



VNIVERSITAT
D' VALÈNCIA

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

LA NT-3 EN ALTERACIONES METABÓLICAS

MARÍA BOVÉ JÁTIVA

Tesis doctoral

Valencia, 2021

Directoras

Pilar D'Ocón Navaza

M^a Dolores Ivorra Insa

M^a Antonia Noguera Romero



Doctorado en Biomedicina y Farmacia

Dña. Pilar D'Ocón Navaza, Dña. M^a Dolores Ivorra Insa y Dña. M^a Antonia Noguera Romero Catedráticas de la Universitat de Valencia,

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por la Lda. **MARÍA BOVÉ JÁTIVA**, titulado “ *La NT-3 en alteraciones metabólicas*”, para obtener el grado de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento. Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de la Tesis, para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Lo que firmamos en Valencia septiembre 2021

Pilar D'Ocón Navaza M^a Dolores Ivorra Insa M^a Antonia Noguera Romero

La presente tesis doctoral ha sido financiada con los siguientes proyectos:

- Neurotrofina-3, nueva diana terapéutica en patología cardiovascular. Financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad de España. Proyecto SAF: 2013-45362-R
- Nueva diana farmacológica en la prevención del riesgo cardiometabólico. Financiado por la Universitat de València y la Fundación INCLIVA. Programa VLC-BIOCLINIC 2017.

A lo largo de esta tesis doctoral se ha publicado el siguiente trabajo:

- Bové, M., Monto, F., Guillem-Llobat, P., Ivorra, M. D., Noguera, M. A., Zambrano, A., Sirerol-Piquer, M. S., Requena, A. C., García-Alonso, M., Tejerina, T., Real, J. T., Fariñas, I., & D'Ocon, P. (2021). NT3/TrkC Pathway Modulates the Expression of UCP-1 and Adipocyte Size in Human and Rodent Adipose Tissue. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 630097. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2021.630097/PDF>

A mis padres,

A Carlos,

Nunca pensé que llegaría este momento, el fin de la tesis doctoral.

No podría haberlo conseguido sin dos personas fundamentales para mí, mis padres, Pilar y Guillermo. Sin vosotros nada de esto sería posible. En todos los recuerdos que tengo siempre estáis a mi lado, apoyándome y confiando en mí, aunque a veces las decisiones sean un poco atrevidas y el futuro incierto. Gracias por sacrificaros siempre para que yo siga formándome, para que nunca me falte de nada y esté feliz cumpliendo sueños, aunque eso conlleve dejar de lado los vuestros. Os admiro, para mi sois un ejemplo a seguir. Os debo todo lo que soy hoy así que esta tesis es tan vuestra como mía. Os quiero muchísimo.

Mis padres tampoco existirían sin mis abuelos, de quienes siempre me acuerdo. Siempre os alegrabais por mí así que sé que estaríais muy felices. En especial mi abuelo Alberto, que siempre está conmigo y a quien echo de menos todos los días, ojalá pudiera contarte todo lo nuevo que hay por aquí. Y, por último, a mi abuela María, una de mis personas favoritas del mundo que es algo más que una abuela. Aunque sufras en silencio, siempre me has escuchado, aconsejado y animado a seguir hacia delante...te quiero tanto.

La primera vez que tuve contacto con el mundo de la farmacología fue en clase de Pilar. Has sido una de las mejores docentes que he tenido y conseguiste transmitirme tu pasión por la investigación. Eso me llevó al máster, donde os conocí a las tres, y terminé empezando la tesis doctoral. Gracias a Pilar, Loles y Marian por aceptarme en el laboratorio y abrirme las puertas a vuestro mundo de neurotrofinas, adrenoceptores y funcionales. Siempre me habéis aconsejado, animado y enseñado todo lo que sabéis. Gracias por vuestra paciencia durante la escritura de la tesis y por el tiempo dedicado para que esto sea posible. Marian, tus ánimos lo hacen siempre todo más fácil. Y Loles, gracias por estar tan pendiente de mí todo este tiempo.

Dedicarse a la investigación no es fácil, no todo el mundo la entiende, dedicar horas y horas a buscar respuestas a preguntas, a realizar experimentos que a veces no salen, o a obtener resultados que te dejan más desconcertada que antes. Pero qué emocionante es descubrir algo nuevo. Todo este proceso siempre es más fácil rodeado de gente que vive lo mismo que tú. Por ello, esta tesis se la dedico también a todos mis compañeros de laboratorio, quienes han dedicado horas y horas a responder sus propias preguntas y lo hacen todo un poco más fácil.

A Fermín, que me enseñó todo de la forma más generosa posible, tu pasión por investigar y por enseñar nos motivaban a todos. Cris, todavía recuerdo el primer día que te conocí, me quedé alucinada con la velocidad a la que hablabas y tu rapidez con todo. Recuerdo los madrugones, los días largos, mi primera vez con las ratas y los 30 minutos libres de cada funcional. Me enseñaste muchas cosas de las que sé y lo sigues haciendo. Que la velocidad te lleve lejos y yo lo siga viendo desde cerca. A Andrea, qué suerte la

mía coincidir contigo en espacio/tiempo. Mi compañera de doctorado con quien esta frase toma todo el sentido “Andamos el camino mejor acompañados, en los buenos momentos o en los momentos malos, a veces el viaje se pone cuesta abajo, y es bueno dar con quien tragar los malos tragos”. Cuántos momentos compartidos y que momentos de reírnos hasta llorar. Miguel, mi escritor favorito y compañero de departamento que lo hizo todo un poquito más fácil, gracias por los consejos, y los momentos compartidos, qué lejos vas a llegar cerebritito. Al resto de mis compañeros de laboratorio. Lola, por contagiar tu alegría y siempre estar dispuesta a animar al resto, a Carmen, a las Lauras y a Josep. A Aida, por tu ayuda y confesiones compartidas. A Maria Piacenti, grazie per il percorso insieme, non dimenticherò mai quello che hai fatto per me.

Tampoco puedo olvidarme del resto del departamento, quiénes me han animado durante todo este tiempo. Terencio, creo que eres la persona más agradable del mundo, siempre nos haces sentir bien a todos. Gracias a Isabel, Montesinos, Rosa, Marisa y Núria. A Carlos, que siempre me ayudaba con los animales. A Inés, gracias por tus consejos en el momento adecuado. Y Mamen, qué habría hecho sin ti tantas veces.

A Valli y Enrique, por ser tan generosos y buenos conmigo. Siempre estáis dispuestos a ayudarme y me habéis hecho el camino un poco más fácil. Gracias por aceptarme y cuidarme tan bien.

Siempre he pensado que los animales son mejor que muchos humanos. Para mí, Tula es de las mejores cosas de la vida. Me has enseñado tantas cosas, das tanto sin pedir nada a cambio. No sé si hay algún perro a quien tires 2000 pelotas y vuelva a por una más. Te quiero Tulamita. Y aunque nunca me apasionaron los gatos, Luna vino para tumbar mis ideas y me acompañó durante muchas de las horas de todo este periodo, eso sí, haciendo sus siestitas. Te echo de menos lentejita.

Por último, pero no menos importante, a Carlos. Sin ti todo esto habría sido bastante más difícil. Yo no sé si hay alguien más bueno que tú. Tu criterio y tus consejos me han hecho mejorar y tu confianza en mí hacen seguir avanzando cuando ya puedo más. Gracias por tu ayuda desconsiderada y tu paciencia infinita con esta cabeza de chorlito. Sobre todo, gracias por empujarme a escuchar mi voz interior y a abrir caminos hacia el norte que sin ti serían imposibles de imaginar. Ojalá te vieras con mis ojos, qué suerte la mía. Te quiero.

En resumen....

Gracias a todas y todos los que hicisteis que valiera la pena saltar a esta piscina sin saber si estaba llena.

ABREVIATURAS

A	adrenalina
AC	adenilato ciclasa
ADA	adenosín deaminasa
<i>ADRB1</i>	gen para el AR- β 1 de humanos
<i>Adrb1</i>	gen para el AR- β 1 de roedores
<i>Adrb2</i>	gen para el AR- β 2 de roedores
<i>ADRB2</i>	gen para el AR- β 2 de humanos
<i>Adrb3</i>	gen para el AR- β 3 de roedores
<i>ADRB3</i>	gen para el AR- β 3 de humanos
AGL	ácidos grasos libres
AMPC	adenosina monofosfato sódico cíclico
AR	receptores adrenérgicos
AR- α	receptor adrenérgico alfa
AR- β	receptor adrenérgico beta
ATF-2	factor de transcripción activador 2
ATGL	lipasa adipocítica de trigéridos o fosfolipasa similar a la patatina-2
ATP	adenosín 5'-trifosfato
ATP-III	<i>Adult Treatment Panel III</i>
BAT	tejido adiposo pardo
BDNF	factor neurotrófico derivado del cerebro
BMP	proteína morfogénica ósea
BSA	albúmina de suero bovino
C/EBP α	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alfa</i>
C/EBP β	<i>CCAAT/enhancer-binding protein beta</i>
CCR	curvas de concentración respuesta
cDNA	DNA complementario
cHDL	colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad
cLDL	colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
Ct	<i>cycle threshold</i> (umbral del ciclo)
DAG	diacilglicerol
DEPC	dietil pirocarbonato
DM	diabetes <i>mellitus</i>
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico

dNTPs	deoxinucleósido trifosfato
e.e.m.	error estándar de la media
EDTA	ácido etilendiaminatetraacético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
E _{max}	efecto máximo
eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial
eNT3-	ratones con expresión endotelial de NT3 reducida
eNT3+	ratones control
FE	fenilefrina
Fsp27	<i>fat-specific protein 27</i>
G1	<i>growth 1</i>
<i>Gapdh</i>	gen para la gliceraldehido-fosfato deshidrogenasa en roedores
<i>GAPDH</i>	gen para la gliceraldehido-fosfato deshidrogenasa en humanos
GAPDH	glicerol-fosfato deshidrogenasa
GK	glicerol quinasa
GLUT1	transportador de glucosa 1
GLUT4	transportador de la glucosa regulada por la insulina
G _s	proteína G estimuladora
G _{αs}	subunidad alfa de proteína G _s
hAT	tejido adiposo visceral humano
HbA1c	hemoglobina glicosilada A1c
HCSCM	Hospital Clínico San Carlos de Madrid
HCUV	Hospital Clínico Universitario de Valencia
HEPES	ácido 2-[4-(2-hidroxietilpiperazin-1-il)]
HIF-1-α	factor inducible por hipoxia 1 alfa
Hn	<i>hedgehog</i>
HOMA-IR	modelo homeostático de resistencia a la insulina
HSL	lipasa sensible a hormonas
HTA	hipertensión arterial
IDL	lipoproteínas de mediana densidad
IGF-1	factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL	interleucina
IMC	índice de masa corporal
K252a	inhibidor de las tirosin quinasa
KAT	tejido adiposo perirrenal

KCl	cloruro potásico
kDa	kilodalton
KO	<i>knockout</i>
KRB	Krebs-Ringer bicarbonatado
KRBA	Krebs-Ringer bicarbonatado enriquecido con albúmina
LDL	lipoproteínas de baja densidad
LDs	gotas lipídicas
Lkb1	cinasa hepática B1
LPL	lipoproteína lipasa
MAG	monoacilglicerol
MCP-1	proteína quimiotáctica de monocitos 1
MGB	<i>minor groove binder</i>
MGL	lipasa de monoacilglicerol
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MSC	células madre mesenquimales
mTORC	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NA	noradrenalina
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NaOH	hidróxido de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>
NEFA	ácidos grasos no esterificados
NGF	actor de crecimiento nervioso
no-HDL	no unido a lipoproteínas de alta densidad
NT	neurotrofina
NT3 ^{+/-}	ratones heterocigotos para NT3
NT3 ^{+/+}	ratones control
NT3	neurotrofina-3
NT4	neurotrofina-4
NT5	neurotrofina-5
NT6	neurotrofina-6
NT7	neurotrofina-7
<i>NTF3</i>	gen para la NT3 en humanos
<i>Ntf3</i>	gen para la NT3 en roedores

<i>NTRK3</i>	gen para la TrkC en humanos
<i>Ntrk3</i>	gen para la TrkC en roedores
OB	leptina
p38 MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
p75 ^{NTR}	receptor de baja afinidad de neurotrofina
PBS	tampón fosfato salino
PBS-T	tampón fosfato salino con 0,1% de Tween 20
pCE ₅₀	logaritmo negativo de la EC50
pCE ₅₀₍₁₎	sitio de alta afinidad
pCE ₅₀₍₂₎	sitio de baja afinidad
PCG-1 α	coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas
PET	tomografía por emisión de positrones
PKA	proteína cinasa A
PLIN1	perilipina 1
PLIN5	perilipina 5
PNPLA2	lipasa adipocítica de triglicéridos o fosfolipasa similar a la patatina-2
PPAR γ	receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas
PRDM16	<i>PR domain containing 16</i>
Pre-pro-NT	pre-pro-neurotrofinas
Pre-pro-NT	pre-pro-neurotrofinas
Pro-BDNF	pro-factor neurotrófico derivado del cerebro
Pro-NGF	pro-factor de crecimiento nervioso
ProNT	pro-neurotrofinas
Pro-NT3	pro-neurotrofina 3
Pro-NT4	pro-neurotrofina 4
PVDF	fluoruro de povinildieno
qPCR	reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
REL	retículo endoplasmático liso
RER	retículo endoplasmático rugoso
RNA	ácido ribonucleico
RT	transcripción reversa
SDS	dodecilsulfato de sodio
SM	síndrome metabólico
SMAD	<i>small mothers against decapentaplegic</i>

SNC	sistema nervioso central
SNS	sistema nervioso simpático
SVF	fracción estromal vascular
TA	temperatura ambiente
TG	triglicéridos
TLR-4	receptores tipo Toll-4
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa
Trk	receptor de la tropomiosina cinasa
TrkA	receptor de la tropomiosina cinasa A
TrkB	receptor de la tropomiosina cinasa B
TrkC	receptor de la tropomiosina cinasa C
UCP-1	<i>uncoupling protein 1</i>
VAT	tejido adiposo perivascular
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad
Wad	adipocitos humanos aislados de WAT
WAGR	tumor de Wilms- aniridia
WAT	tejido adiposo blanco
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosidasa
Zc	Zucker control
ZFP	<i>Zn finger protein</i>
Zob	Zucker obesas
β -gal	enzima galactosidasa

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. NEUROTROFINAS	3
1.1. ESTRUCTURA DE LAS NEUROTROFINAS.....	4
1.2. RECEPTORES DE NEUROTROFINAS: TRK	5
1.3. ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES TRK.....	7
1.4. BIOSÍNTESIS DE NEUROTROFINAS. PROCESAMIENTO Y SECRECIÓN.....	9
1.5. NT3	10
1.6. RECEPTOR DE NT3: TrkC	11
2. TEJIDO ADIPOSO	12
2.1. TIPOS DE TEJIDO ADIPOSO.....	12
2.1.1. TEJIDO ADIPOSO BLANCO	12
2.1.2. TEJIDO ADIPOSO PARDO	15
2.1.3. ADIPOCITOS <i>BRITE</i> O <i>BEIGE</i>	20
2.2. INTERACCIONES ENTRE AMBOS TEJIDOS.....	21
2.2.1. FENÓMENO <i>BROWNING</i> DURANTE LA EXPOSICIÓN AL FRÍO.....	22
2.2.2. FENÓMENO <i>WHITENING</i> DURANTE EL BALANCE ENERGÉTICO POSITIVO.....	23
2.3. DISTRIBUCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO EN HUMANOS Y ROEDORES	23
2.3.1. HUMANOS.....	24
2.3.2. ROEDORES.....	26
2.4. INERVACIÓN Y AR- β EN TEJIDO ADIPOSO	28
2.4.1. AR- β EN WAT.....	29
2.4.1.1. WAT DE ROEDORES.....	29
2.4.1.2. WAT DE HUMANOS.....	31
2.4.2. AR- β EN BAT	32
2.4.2.1. BAT DE ROEDORES	32
2.4.2.2. BAT DE HUMANOS	34
2.4.3. ADRENOCEPTORES EN ADIPOCITOS <i>BRITE</i>	35
2.5. FUNCIONES “CLÁSICAS” DEL TEJIDO ADIPOSO	36
2.5.1. ADIPOGÉNESIS.....	36
2.5.1.1. FACTORES QUE DETERMINAN LA FASE DE COMPROMISO A LINAJE ADIPOCÍTICO	37

2.5.1.2.	FACTORES QUE DETERMINAN LA DIFERENCIACIÓN TERMINAL A ADIPOCITOS	37
2.5.1.3.	DESDFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS.....	38
2.5.2.	LIPÓLISIS	39
2.6.	REMODELACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO.....	40
2.6.1.	IMPORTANCIA DEL DESARROLLO TEMPRANO	41
2.6.2.	CONSECUENCIAS FISIOPATOLÓGICAS SEGÚN LOS DEPÓSITOS ADIPOSOS IMPLICADOS.....	41
2.6.3.	HIPERTROFIA ADIPOSA.....	42
2.6.4.	HIPERPLASIA ADIPOSA.....	43
3.	PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON DISFUNCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO	44
3.1.	OBESIDAD.....	44
3.2.	SÍNDROME METABÓLICO Y RESISTENCIA A LA INSULINA	45
3.2.1.	DEFINICIÓN DE SÍNDROME METABÓLICO	46
3.2.2.	CONCEPTO DE RESISTENCIA A LA INSULINA.....	46
4.	RELACIÓN ENTRE NEUROTROFINAS CON LA DISFUNCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO.	48
4.1.	PAPEL ENDOCRINO DE LAS NEUROTROFINAS. NEUROTROFINAS COMO ADIPOCINAS	48
4.2.	EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LAS NEUROTROFINAS EN TEJIDO ADIPOSO	49
4.2.1.	NGF y BDNF	49
4.2.2.	NT3	50
4.3.	MECANISMOS FISIOLÓGICOS DE SEÑALIZACIÓN DE LAS NEUROTROFINAS EN TEJIDO ADIPOSO.....	52
4.3.1.	SEÑALIZACIÓN CON FIBRAS NERVIOSAS AFERENTES	52
4.3.2.	SEÑALIZACIÓN CON FIBRAS NERVIOSAS EFERENTES	52
II.	OBJETIVOS	53
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	57
1.	MODELOS CELULARES	59
1.1.	PREADIPOCITOS HUMANOS.....	59
1.2.	ADIPOCITOS HUMANOS.....	59
2.	MODELOS ANIMALES	60
2.1.	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	61

2.1.1.	RATAS WISTAR.....	61
2.1.2.	RATAS ZUCKER.....	61
2.1.3.	RATONES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE.....	61
2.2.	SACRIFICIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	62
2.3.	EXTRACCIÓN DE TEJIDO ADIPOSO.....	63
2.4.	EXTRACCIÓN DE ADIPOCITOS DE TEJIDO ADIPOSO VISCERAL (Wad).....	64
2.5.	ANÁLISIS ANTROPOMÉTRICO Y MARCADORES BIOQUÍMICOS.....	65
3.	MODELOS HUMANOS.....	66
3.1.	CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	66
3.2.	OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	67
3.2.1.	TEJIDO ADIPOSO VISCERAL.....	67
3.2.2.	SANGRE.....	67
4.	CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA (RT-PCR A TIEMPO REAL).....	68
4.1.	EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS CUALITATIVO/CUANTITATIVO DEL RNA TOTAL.....	68
4.2.	CUANTIFICACIÓN DEL RNA.....	69
4.3.	TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT) – SÍNTESIS DE cDNA.....	69
4.4.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (qPCR).....	70
4.5.	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	71
5.	CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA (WESTERN BLOT).....	71
5.1.	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES Y CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO.....	72
5.2.	INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT).....	72
5.3.	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	73
6.	DIFERENCIACIÓN DE PREADIPOCITOS A ADIPOCITOS HUMANOS.....	74
6.1.	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	75
7.	LIPÓLISIS.....	76
7.1.	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	78
8.	HISTOLOGÍA.....	79
8.1.	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	79
9.	TINCIÓN HISTOQUÍMICA: DETECCIÓN DE LA β-GALACTOSIDASA POR X-GAL.	79
10.	ESTUDIOS FUNCIONALES DE REACTIVIDAD VASCULAR.....	81
10.1.	EXTRACCIÓN DE LA AORTA Y MONTAJE EN BAÑO DE ÓRGANOS.....	81

10.2. FÁRMACOS UTILIZADOS.....	82
10.3. DESCRIPCIÓN DE LOS PROTOCOLOS EXPERIMENTALES	82
10.3.1. MESETA DE CONTRACCIÓN CON KCL (80 mM)	82
10.3.2. DETERMINACIÓN FUNCIONAL DE LA PRESENCIA DE ENDOTELIO	82
10.3.3. CURVAS CONCENTRACIÓN RESPUESTA.....	83
10.4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	83
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	84
IV. RESULTADOS	85
1. EXPRESIÓN DE NT3, TrkC Y LOS TRES SUBTIPOS DE AR-β EN TEJIDO ADIPOSEO DE RATA Y HUMANO	87
1.1. EXPRESIÓN EN TEJIDO ADIPOSEO DE RATAS WISTAR	87
1.2. EXPRESIÓN EN TEJIDO ADIPOSEO VISCERAL HUMANO.....	90
1.3. LOCALIZACIÓN TISULAR DE NT3.....	93
2. EFECTO DE LA NT3 SOBRE LA LIPÓLISIS EN ADIPOCITOS AISLADOS.....	95
3. EFECTO DE LA VÍA NT3/TrkC SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS HUMANOS.....	97
3.1. CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA DE LOS ADIPOCITOS TRAS SU DIFERENCIACIÓN EN PRESENCIA DE NT3.....	97
3.2. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE UCP-1 EN LOS ADIPOCITOS TRAS SU DIFERENCIACIÓN EN PRESENCIA DE NT3.....	99
3.3. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS AR- β TRAS SU DIFERENCIACIÓN EN PRESENCIA DE NT3.....	100
4. EXPRESIÓN GÉNICA Y CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN TEJIDO ADIPOSEO DE RATONES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE CON UNA EXPRESIÓN REDUCIDA DE NT3..	101
4.1. EXPRESIÓN GÉNICA DE <i>Ntf3</i> , <i>Ntrk3</i> Y LOS TRES SUBTIPOS DE <i>Adrb</i>	101
4.2. VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	103
4.3. CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y EN LA EXPRESIÓN DE UCP-1 EN TEJIDO ADIPOSEO VISCERAL E INTERESCAPULAR.....	104
5. NT3 Y RIESGO CARDIOMETABÓLICO	107
5.1. NT3 Y RIESGO CARDIOMETABÓLICO EN RATAS ZUCKER	107
5.1.1. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE NT3, TrkC Y AR β	108
5.1.2. CAMBIOS EN LA FUNCIONALIDAD VASCULAR.....	112

5.2.	NT3 Y RIESGO CARDIOMETABÓLICO EN HUMANOS	115
5.2.1.	PACIENTES CON NORMO PESO O CON OBESIDAD DE GRADO 1.....	115
5.2.2.	PACIENTES CON OBESIDAD MODERADA-SEVERA	118
6.	NT3 Y ENVEJECIMIENTO	124
6.1.	CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE <i>Ntf3</i> , <i>Ntrk3</i> Y LOS TRES SUBTIPOS DE <i>Adrb</i> EN FUNCIÓN DE LA EDAD EN RATAS WISTAR	124
6.2.	CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE <i>NTF3</i> , <i>NTRK3</i> Y LOS TRES SUBTIPOS DE <i>ADRB</i> EN FUNCIÓN DE LA EDAD EN HUMANOS.....	127
V.	DISCUSIÓN.....	129
1.	LA VÍA NT3/TrkC ESTÁ PRESENTE EN TEJIDO ADIPOSO HUMANO Y DE ROEDORES.....	131
2.	NT3 ESTIMULA LA LIPÓLISIS, DISMINUYE EL TAMAÑO DE LOS ADIPOCITOS E INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE UCP-1.....	135
3.	NT3 Y RIESGO CARDIOMETABÓLICO	138
4.	NT3 Y ENVEJECIMIENTO	147
5.	RELEVANCIA CLÍNICA DE LOS RESULTADOS	149
VI.	CONCLUSIONES	153
VII.	BIBLIOGRAFÍA	157
VIII.	ANEXOS	191

INTRODUCCIÓN

1. NEUROTROFINAS

Las neurotrofinas (NT) comprenden una familia de proteínas conocidas por sus efectos en la supervivencia, desarrollo y función neuronal (Lewin y Barde, 1996; Huang y Reichardt, 2001, 2003; Reichardt, 2006). Forman parte del conjunto de factores neurotróficos, donde se incluyen otras familias que escapan a los objetivos de este trabajo.

La primera NT descubierta fue el factor de crecimiento nervioso (NGF), seguida del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Ambas NT son las más estudiadas y ejercen acciones relacionadas con el crecimiento, la diferenciación, la plasticidad sináptica y la supervivencia neuronal durante el desarrollo y tras daño neuronal (Cohen et al., 1954; Levi-Montalcini, 1987; Hofer y Barde, 1988; Thoenen, 1991; Chao, 2003).

Todas las NT comparten un alto nivel de homología en secuencia y estructura y una gran similitud en la organización de los segmentos génicos adyacentes. Probablemente, esto se deba a un origen común a partir de duplicaciones sucesivas de una porción del genoma derivado de un cordado ancestral (Hallböök et al., 1991). De hecho, el descubrimiento de las otras NT fue posible gracias a la clonación molecular de secuencias altamente conservadas presentes en NGF y BDNF (Skaper, 2018). A raíz de estos estudios, se diferenciaron la neurotrofina-3 (NT3) (Ernfors et al., 1990; Hohn et al., 1990; Jones y Reichardt, 1990) y la neurotrofina-4 (NT4) (Hallböök et al., 1991; Ip N et al., 1992). Posteriormente, se identificaron cuatro NT en mamíferos (NGF, BDNF, NT3 y NT4) y dos más en peces (neurotrofina-6, NT6 y neurotrofina-7, NT7), sin aparentes ortólogos en mamíferos (Caporali y Emanuelli, 2009).

El sistema nervioso de los mamíferos expresa altas cantidades de NT que regulan su desarrollo y su función. Sin embargo, otras células no neuronales como los cardiomiocitos, células beta pancreáticas, endoteliales, epiteliales, musculares lisas de los vasos sanguíneos, adipocitos e incluso células del sistema inmune también pueden expresarlas (Caporali y Emanuelli, 2009; Chaldakov et al., 2009; Meloni et al., 2015).

Las funciones de las NT en tejidos no neuronales son menos conocidas y parece que actúan tanto en el desarrollo embrionario como durante la edad adulta. Sus efectos abarcan diversos procesos fisiológicos (proliferación y activación celular, control

hormonal, balance energético, gametogénesis, plasticidad, aprendizaje y memoria) y patológicos (neurodegeneración y regeneración, inflamación, dolor y estrés) (Martinelli y Camargos, 2016).

1.1. ESTRUCTURA DE LAS NEUROTROFINAS

Los distintos miembros que componen esta familia presentan una alta homología en la secuencia aminoacídica (en torno al 50-60%) y un alto grado de conservación entre especies. Todas se sintetizan como precursores glicosilados de tipo pre-pro-neurotrofinas (pre-pro-NT) (Ilustración 1) con un tamaño de 35-40 kDa que son procesados mediante proteólisis para dar lugar a proteínas homodiméricas maduras de 12-13 kDa.

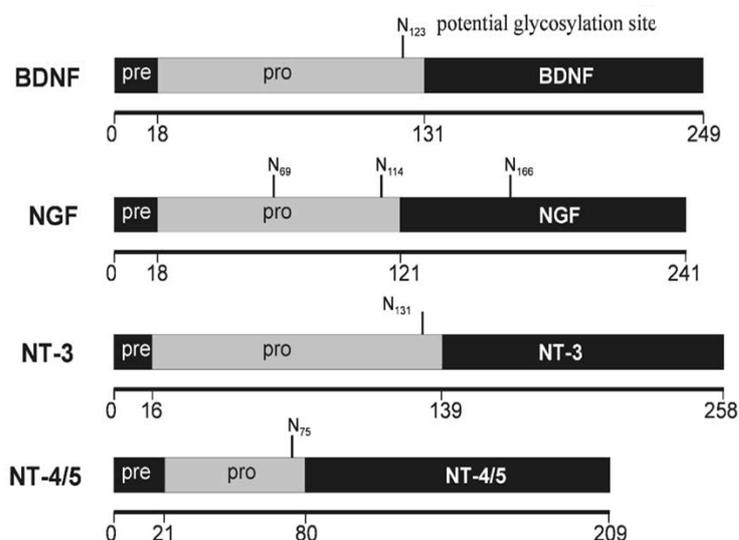


Ilustración 1. Estructura primaria de las proteínas para las neurotrofinas (NT) de BDNF, NGF, NT3 y NT4/5. La zona “pre” de las NT es un péptido señal que se separa del resto de proteína y se forma así la pro-neurotrofina (pro-NT). La proteína madura se forma por acción de convertasas que actúan sobre las pro-NT. La N indica sitios potenciales para la glicosilación. Fuente: adaptado de Lessmann et al., 2003.

Las proteínas maduras pueden secretarse al espacio extracelular, aunque algunos autores indican que no solo las proteínas maduras se secretan, sino que también las pro-neurotrofinas (pro-NT) pueden secretarse y ser biológicamente activas. De hecho, la escisión de los precursores se puede producir tanto durante la vía secretora o después de la secreción (Caporali y Emanuelli, 2009; Bothwell, 2014). Esto demuestra que uno de

los puntos de regulación de la actividad de las NT son las proteasas responsables de su conversión a NT maduras (Lee R et al., 2001, Lessmann et al., 2003).

En el organismo, las NT maduras se asocian de forma no covalente formando dímeros de protómeros de 13,5 kDa aproximadamente (Radziejewski et al., 1992; Bothwell, 2014). Cada subunidad de las NT está formada por dos pares de cadenas β antiparalelas y están estabilizadas por tres enlaces disulfuro (Robinson et al., 1995; Butte et al., 1998). Además, diversos estudios indican que *in vitro*, los dímeros de NT forman heterodímeros entre diferentes tipos de NT ya que la superficie de interacción de los dímeros de NT está muy conservada. Sin embargo, no hay evidencias de la existencia de estos heterodímeros *in vivo* (Jungbluth et al., 1994; Robinson et al., 1995).

1.2. RECEPTORES DE NEUROTROFINAS: TRK

Las NT llevan a cabo sus acciones interaccionando con sus receptores: los receptores de la tropomiosina cinasa (Trk), de alta afinidad, de los que se conocen tres subtipos (TrkA, TrkB, TrkC) y el receptor de baja afinidad (p75^{NTR}). Los receptores Trk se unen con preferencia a las NT maduras de forma selectiva: NGF se une a TrkA, BDNF y NT4 se unen a TrkB y NT3 se une a TrkC, aunque también puede unirse a formas alternativas de TrkA y TrkB (Clary y Reichardt, 1994) activando rutas de señalización diferentes a las de NGF (Harrington et al., 2011). No obstante, todas las NT (pro-NT y NT maduras) son capaces de unirse a p75^{NTR} (Caporali y Emanuelli, 2009) (Ilustración 2).

El receptor p75^{NTR} media efectos pro-apoptóticos cuando se encuentra en forma monomérica. De hecho, dimerizaciones u homomultidimerizaciones de este receptor suprimen su efecto pro-apoptótico (Rabizadeh et al., 2000). Como se ha señalado antes, puede ser activado por todas las formas y tipos de NT (pro-NT y formas maduras) como ocurre en situaciones en las que el procesamiento intracelular de las pro-NT no es eficiente y se liberan por los tejidos uniéndose con gran afinidad al p75^{NTR}. De este modo, se activan vías de señalización controladas por este receptor que en gran parte promueven la apoptosis (Lee R et al., 2001).

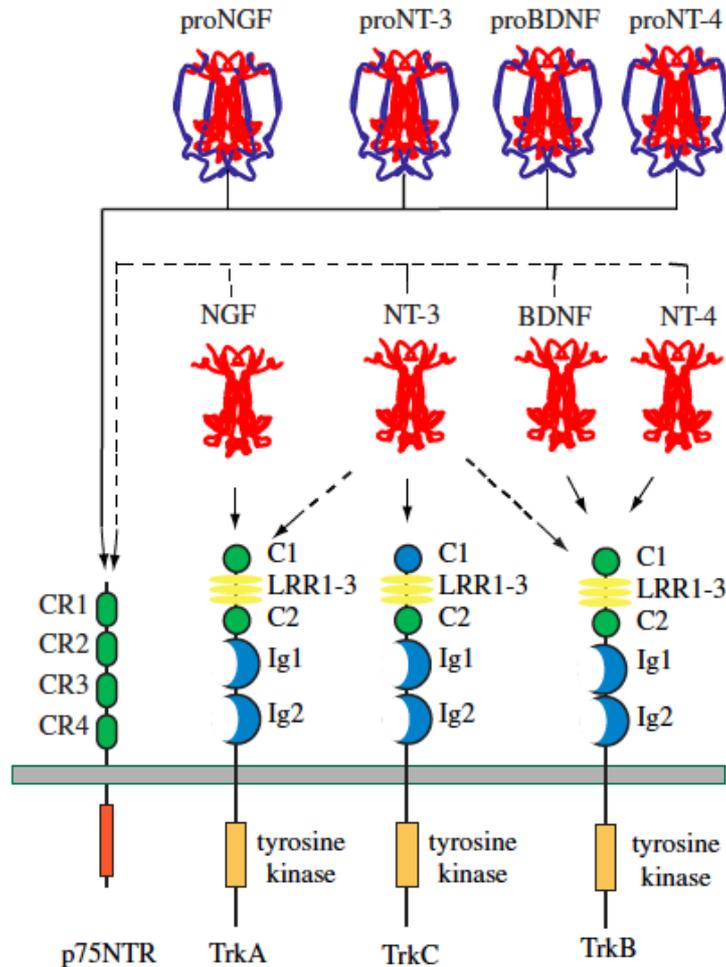


Ilustración 2. Interacciones de las neurotrofinas (NT) y pro-neurotrofinas (pro-NT) con los receptores Trk y p75^{NTR}. Todas las pro-NT y las NT, con menor eficiencia, pueden unirse al receptor p75^{NTR}. Sin embargo, solo las NT maduras tras mecanismos de proteólisis pueden unirse a los receptores Trk. En concreto, NGF se une específicamente a TrkA; BDNF y NT4 se unen al TrkB; NT3 activa TrkC y, con menos eficiencia, activa TrkA y TrkB. *Fuente: Reichardt, 2006.*

Evidencias sugieren que, tras una lesión o degeneración cerebral, aumenta la secreción de pro-NT y su unión a p75^{NTR}, aumentando así la pérdida neuronal en lesiones y modelos de enfermedades (Pedraza et al., 2005).

Diferente es el caso de los receptores Trk que solo interaccionan con NT maduras y, por tanto, los procesos que regulan la maduración también regulan la activación de estos receptores (Lee R et al., 2001). La unión de NT maduras a receptores Trk promueve la supervivencia y diferenciación celular. Al contrario que el receptor p75^{NTR}, se activan por dimerización y fosforilación de determinados residuos tirosina presentes en el dominio citoplasmático activando múltiples cascadas de señalización (Ilustración 2).

Aunque los dos tipos de receptores de NT (p75^{NTR} y Trk) promueven efectos contrarios, existe una regulación entre ellos basada en la presencia del otro, inhibiendo o favoreciendo la señalización (Caporali y Emanuelli, 2009).

Respecto a la expresión de los receptores Trk, esta es esencial en el sistema nervioso para el correcto desarrollo del mismo (Klein et al., 1994; Silos-Santiago et al., 1997) así como para el correcto desarrollo de otros sistemas. De hecho, hay estudios que indican que animales sin expresión de Trk presentan graves deficiencias a nivel cardiovascular (Tessarollo et al., 1997; Wagner et al., 2005).

1.3. ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES TRK

Los receptores Trk pertenecen a la familia de receptores tirosina cinasas y son receptores transmembrana de aproximadamente 140 kDa con un dominio tirosina cinasa intracelular y un dominio de unión a ligando extracelular (Deinhardt y Chao, 2014).

Cuando los ligandos se unen al receptor Trk, se produce la dimerización del receptor y la fosforilación de los residuos de tirosina del dominio cinasa intracelular del receptor. Así, se activa la cinasa y se inicia la cascada de señalización (Ilustración 3) (Barbacid, 1994; Deinhardt y Chao, 2014).

Dentro de los receptores tirosin cinasa no solo están los receptores Trk, sino que también se encuentran los receptores de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) (Barbacid, 1994; Longo y Massa, 2013; Kawaguchi-Manabe et al., 2007).

Los receptores Trk pueden tener dos conformaciones: completa y truncada donde algunas partes del dominio intracelular del receptor están ausentes. Los receptores truncados están muy expresados en el sistema nervioso y presentan actividad (Fenner, 2012; Deinhardt y Chao, 2014). Las distintas isoformas de los receptores Trk se originan por fenómenos de *splicing* alternativo que pueden producirse en el dominio intracelular (Menn et al., 1998; Deinhardt y Chao, 2014). De hecho, las isoformas truncadas de TrkB y TrkC no presentan el dominio tirosin cinasa presente en las formas completas de ambos receptores (Longo y Massa, 2013).

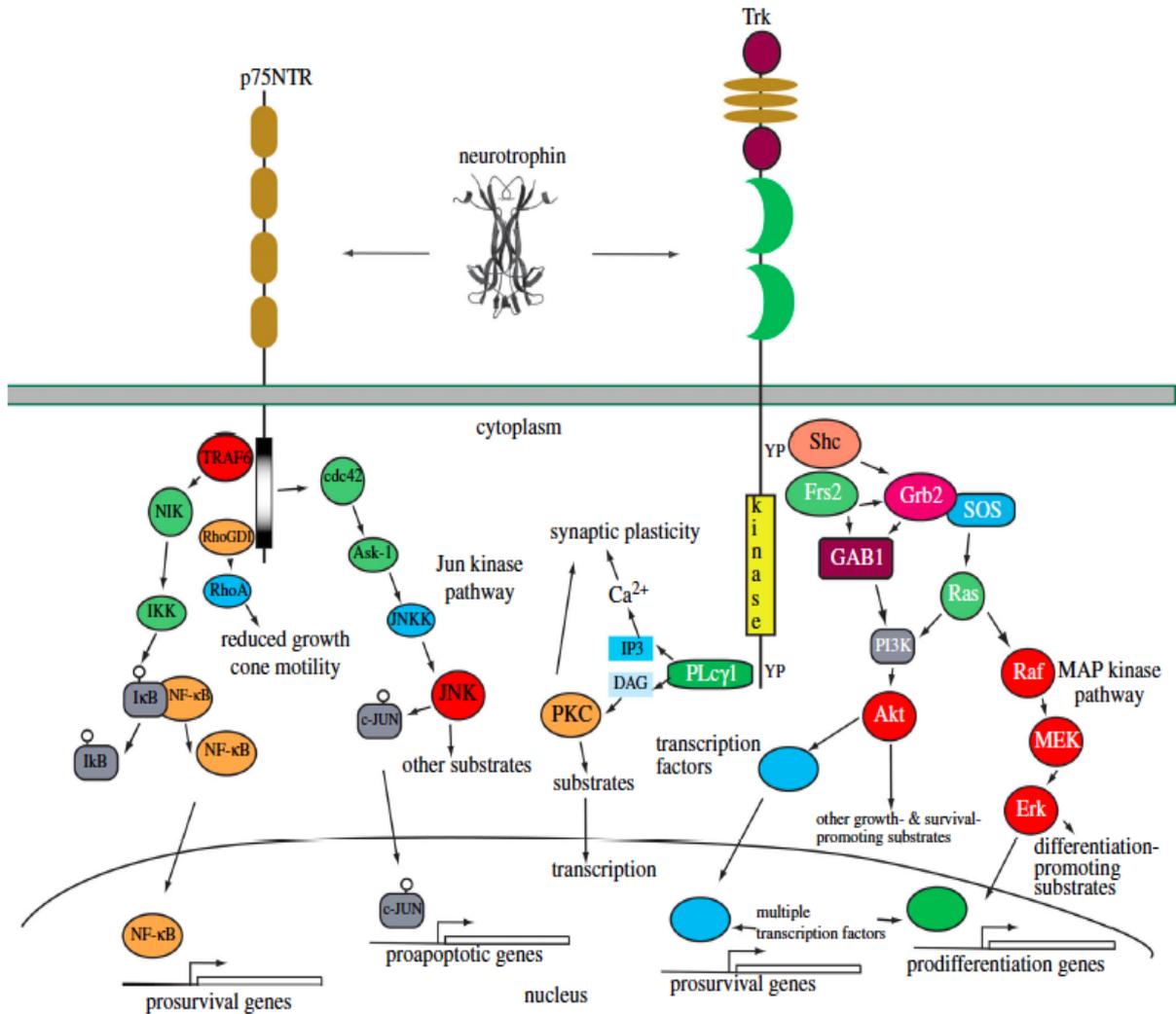


Ilustración 3. Señalización de las neurotrofinas (NT). A través de la activación de los receptores Trk y p75^{NTR}, las NT activan una serie de vías intracelulares que son diferentes para cada receptor. La activación de p75^{NTR} da lugar a la transcripción de genes proapoptóticos o genes que promueven la supervivencia. En cambio, la activación de Trk produce la transcripción de genes que promueven la supervivencia y la diferenciación. *Fuente: Reichardt, 2006.*

La actividad de los receptores Trk puede inhibirse con el alcaloide natural K252a, un compuesto que inhibe de forma selectiva a todas las isoformas de los receptores. Se trata de una inhibición competitiva con el ATP en su unión al dominio catalítico, impidiendo así la activación del dominio cinasa y por tanto el inicio de la cascada de señalización (Morotti et al., 2002).

1.4. BIOSÍNTESIS DE NEUROTROFINAS. PROCESAMIENTO Y SECRECIÓN

El proceso de secreción de las NT se inicia en el retículo endoplasmático rugoso (RER) produciéndose en primer lugar pre-pro-proteínas de 35 kDa aproximadamente, que posteriormente se procesan en pro-NT (pro-NGF, pro-BDNF, pro-NT3 y pro-NT4). El tamaño de las pro-NT varía entre 210 y 270 aminoácidos y se transportan mediante vesículas hasta el aparato de Golgi para su posterior procesamiento (Bothwell, 2014; Caporali y Emanuelli, 2009). Las pro-NT tienen capacidad de dimerizar y formar homodímeros y heterodímeros de naturaleza estable (BDNF y NT3) e inestable (NGF) (Farhadi et al., 2000). Además, estas pro-NT pueden sufrir modificaciones post-translacionales.

Las pro-NT dan lugar a NT maduras de 120 aminoácidos y 13 kDa aproximadamente, tras un procesamiento proteolítico llevado a cabo por proteasas de la familia de las pro-proteínas convertasas (Seidah et al. 1996), que puede ocurrir durante o posteriormente a su secreción (Caporali y Emanuelli, 2009; Bothwell, 2014).

En ocasiones, el procesamiento de las NT es incompleto, lo que conduce a la liberación de pro-NT al plasma. Esas pro-NT pueden procesarse mediante enzimas plasmáticas (metaloproteasas y plasmina) (Lee R et al., 2001). Cuando las pro-NT se procesan, se liberan 2 péptidos: un pro-péptido N-terminal y la NT madura (C-terminal). Así el receptor podría quedar expuesto a la influencia de ambos péptidos (Bothwell, 2016). En general, la acción biológica de las NT está regulada por su escisión proteolítica, con proformas que activan preferentemente receptores $p75^{NTR}$ para mediar apoptosis y formas maduras que activan receptores Trk para promover la supervivencia celular (Lee R et al., 2001).

Las NT pueden secretarse por dos vías: constitutiva y regulada. La vía constitutiva es independiente de calcio y se produce en ausencia de estímulos iniciadores. En cambio, la vía regulada es dependiente de calcio y la secreción se produce en respuesta a un determinado estímulo activador (Al-Qudah y Al-Dwairi, 2016).

Las células neuronales y neuroendocrinas hacen uso de la vía constitutiva (principalmente para la secreción de NGF, NT3 y NT4) y regulada (para la secreción de BDNF). En contraposición, las células de estirpe no neuronal utilizan únicamente la vía

constitutiva (Farhadi et al., 2000; Reichardt, 2006).

1.5. NT3

El patrón de expresión de NT3 cambia en función de la naturaleza del tejido. En tejidos neuronales, NT3 presenta una elevada expresión durante el desarrollo embrionario (proliferación, migración y diferenciación neuronal de precursores) que disminuye drásticamente o incluso desaparece en la edad adulta (Ernfors et al., 1990; Hohn et al., 1990; Friedman et al., 1991; Maisonpierre et al., 1990; Lamballe et al., 1994). En tejidos no neuronales, la expresión de NT3 aparece durante el desarrollo y se mantiene en la edad adulta. Entre los tejidos no neuronales que expresan NT3 se encuentran: músculo esquelético, corazón, pulmón, hígado e intestino (Hohn et al., 1990; Tessarollo et al., 1994; Donovan et al., 1995; Su et al., 2016).

Respecto a las funciones de NT3, se le atribuyen funciones reguladoras de la neurogénesis e incluso efectos neuroprotectores frente a la isquemia (Zhang J et al., 2012; Gibon et al., 2017). Sin embargo, no se conoce bien su papel en tejidos no neuronales.

Para llevar a cabo su actividad, NT3 puede unirse a los receptores de superficie celular TrkC y p75^{NTR}. Cuando se une a TrkC se activan vías relacionadas con control de distintos procesos del desarrollo y cuando se une a p75^{NTR} se activan vías apoptóticas (Yano et al., 2009; Zanin et al., 2016; Gibon et al., 2017).

Los procesos activados por la interacción NT3 y Trk controlan la proliferación y diferenciación de células neurales, la migración de células de Schwann (Yamauchi et al., 2004), células de melanoma (Truzzi et al., 2008), células madre mesenquimales, células estromales de la médula ósea (Birnbaum et al., 2007) y desarrollo del sistema nervioso entérico (Chalazonitis, 2004).

Al igual que el resto de las NT, NT3 se sintetiza en forma de pre-pro-proteína que se procesa hasta pro-NT3 que dará lugar a NT3 madura. Tanto pro-NT3 como NT3 pueden ejercer funciones en tejidos neuronales y no neuronales. Varios autores indican que la pro-NT3 al interactuar con p75^{NTR} en tejidos neuronales actúa como factor apoptótico o regulador de la proliferación y neurogénesis (Yano et al., 2009; Tauris et al., 2011; Zanin et al., 2016; Gibon et al., 2017).

1.6. RECEPTOR DE NT3: TrkC

El receptor TrkC se une a la forma madura de NT3. El receptor completo (Ilustración 2) tiene un tamaño de 140-150 kDa aproximadamente y, además, presenta múltiples isoformas.

Diversos análisis por Western Blot señalan las posibles isoformas de TrkC en función de las bandas observadas. El receptor completo se corresponde con la banda de 140-150 kDa y presenta actividad catalítica en su dominio intracelular (Tsoulfas et al., 1993; Elkabes et al., 1995; Tessarollo et al., 1997; Menn et al., 2000). Las bandas que corresponden a isoformas truncadas del receptor han sido detectadas a 50-60 kDa y 110 kDa, ambas sin presencia del dominio catalítico (Donovan et al., 1995; Tessarollo et al., 1997; Menn et al., 1998). A su vez, algunos estudios indican posibles variantes de las isoformas previamente indicadas que comprenden tamaños desde 80 a 150 kDa (Lamballe et al., 1993; Tsoulfas et al., 1993; Quartu et al., 2003).

TrkC, al igual que NT3, se expresa en tejidos neuronales y no neuronales. Se ha detectado expresión de TrkC en sistema nervioso central y periférico (Lamballe et al., 1994) así como en pulmones, corazón, riñón, papilas dentales, células de glándula submandibular y tejido adiposo pardo (BAT) (Donovan et al., 1995; Tessarollo et al., 1993, 1997; Lin et al., 2000; Youn et al., 2003).

Cuando NT3 se une a TrkC, se produce la activación del receptor gracias a la activación del dominio cinasa intracelular y se inician determinadas vías de señalización que regulan procesos como proliferación, crecimiento, diferenciación y supervivencia neuronal de células neuronales y sistemas no neuronales. Respecto a la actividad de las isoformas truncadas, los estudios sugieren que pueden modular negativamente la actividad de los receptores TrkC completos (Lin et al., 2000), incluso inhibir la actividad catalítica del receptor si ambos están coexpresados (Palko et al., 1999; Lin et al., 2000; Youn et al., 2003; Bartkowska et al., 2013).

2. TEJIDO ADIPOSEO

El tejido adiposo es un tipo de tejido conectivo formado mayoritariamente por adipocitos. Estos adipocitos están embebidos en un estroma vascular o matriz extracelular compuesto por fibroblastos, colágeno, preadipocitos, células vasculares endoteliales y macrófagos residentes. A su vez, el tejido está irrigado por vasos sanguíneos e innervado por el sistema nervioso simpático (SNS) (Esteve Ràfols, 2014).

La principal célula que forma el tejido adiposo es el adipocito. Hay dos tipos de adipocitos: blanco y pardo. Aunque ambos tipos contienen grandes cantidades de lípidos, cada uno desempeña funciones diferentes e incluso opuestas (Cinti, 2019). No obstante, se ha identificado otro tipo de adipocito que se denomina *brite* o *beige* y que comparte características entre blancos y pardos, (Wu J et al., 2012).

El tejido adiposo tiene una estructura característica formada por lóbulos y lobulillos, que se forman gracias a la unión entre los adipocitos mediante fibras reticulares de colágeno. Morfológicamente, los adipocitos son células redondeadas con un tamaño aproximado de 10 a 200 micras (Cinti, 2005; Lee M et al., 2013).

2.1. TIPOS DE TEJIDO ADIPOSEO

2.1.1. TEJIDO ADIPOSEO BLANCO

ESTRUCTURA MACROSCÓPICA

El tejido adiposo blanco (WAT) está formado por adipocitos y células que forman la matriz extracelular o estroma, como fibroblastos, células inmunes (macrófagos, eosinófilos, linfocitos y mastocitos), células vasculares (endoteliales, pericitos, musculares lisas, adventicias) y nerviosas (células Schwann, perineurales y neuronas). En humanos, es abundante el colágeno tipo VI (Khan et al., 2009; Pasarica et al., 2009; Cinti, 2018).

Además de adipocitos maduros, el tejido adiposo está formado por preadipocitos situados en las inmediaciones del espacio pericapilar. Los preadipocitos son células con un núcleo grande rico en eucromatina y citoplasma poco diferenciado (elevado ratio núcleo/citoplasma). El citoplasma suele contener gránulos de glucógeno y pequeñas gotas lipídicas (LDs) (Cinti, 2018).

WAT es un tejido vascularizado, y está innervado únicamente por el SNS. La innervación se produce por fibras nerviosas amielínicas noradrenérgicas y fibras mielínicas sensitivas (Bartness y Bamshad, 1998; Bartness, 2002; Bartness y Song, 2007; Bartness et al., 2010; Cinti, 2018) que se encuentran alrededor de los vasos e incluso en contacto con los adipocitos (Giordano et al., 1998, 2008).

Generalmente, en mamíferos de tamaño pequeño el WAT tiene tonalidad blanca, aunque en humanos tiende a ser amarillo y formado por adipocitos aproximadamente un 30% más grandes (Cinti, 2019).

ESTRUCTURA MICROSCÓPICA

A nivel microscópico, el WAT está formado por adipocitos blancos en los que el 90% de la célula está ocupada por una gota de grasa unilocular formada por triglicéridos (TG). Su gran tamaño hace que el resto de citoplasma, núcleo y orgánulos, estén desplazados hacia la periferia. La gota lipídica no está recubierta de membrana, pero sí de una serie de proteínas que ejercen acciones metabólicas como, por ejemplo, la proteína antilipolítica perilipina 1 (PLIN1) y la proteína Fsp27 (*fat-specific protein 27*) con funciones en la reagrupación de los lípidos en una única gota lipídica, característica de los adipocitos blancos en WAT (Cinti, 2018).

Los adipocitos blancos tienen pocos orgánulos como mitocondrias, RER, retículo endoplasmático liso (REL) y aparato Golgi. Externamente a la membrana plasmática, contienen una lámina externa formada, en el adipocito maduro, por colágeno IV, laminina, heparán sulfato y fibronectina (Cinti, 2018). No existe consenso en si la fibronectina está presente solo durante la adipogénesis o en el adipocito maduro (Nakajima et al., 1998; Pierleoni et al., 1998).

Los adipocitos blancos se caracterizan por tener forma esférica lo que optimiza al máximo su relación superficie/volumen. Su tamaño varía de forma fisiológica de 10 a 200 micras. El tamaño puede verse influido por varios factores como la localización del depósito de grasa y la técnica empleada para su fijación. Por una parte, los adipocitos son un 20-30% más grandes cuando se fijan en fresco respecto a cuando se fijan en parafina. Por otra parte, aunque la distribución de los adipocitos condicione su tamaño, en la

literatura no existe consenso en el tamaño de los adipocitos según los depósitos (Cinti 2010, 2018; Verboven et al., 2018).

FUNCIÓN

El WAT tiene como función principal almacenar energía en forma de TG para ser liberada cuando el organismo lo necesita. En situaciones crónicas de balance energético positivo, el WAT activa mecanismos con el fin de mantener la homeostasis del organismo. Cuando el aporte de energía al organismo es excesivo y/o el gasto energético disminuye, el exceso de energía se deposita eficientemente en forma de TG. De esta forma, WAT almacena la energía extra del organismo a través de mecanismos de hipertrofia e hiperplasia (Tchoukalova et al., 2010; Chusyd et al., 2016; Cinti, 2018). Por otro lado, frente a una situación de escasez de ingesta energética y/o incremento del gasto energético el WAT moviliza los depósitos de lípidos liberando ácidos grasos libres (AGL) y glicerol que a través de la sangre son transportados a los tejidos, donde serán oxidados para obtener energía (Esteve Ràfols, 2014).

El WAT expresa los diferentes subtipos de adrenoreceptores- β (AR- β) (De Matteis et al., 2002; Bordicchia et al., 2014). Por tanto, el tono simpático y los AR- β controlan diversas funciones en WAT. Los AR- β presentes en WAT pueden activarse como respuesta a la liberación de noradrenalina (NA) por las fibras que lo inervan. De este modo, la actuación del SNS en el tejido adiposo puede promover la lipólisis de WAT que produciría un aumento de AGL disponibles para su uso en otros órganos en situaciones de ayuno o estados catabólicos (Heeren y Scheja, 2018).

Otras funciones: WAT como órgano endocrino

Clásicamente se le ha atribuido al WAT un papel de reservorio energético donde la grasa se libera en forma de AGL y glicerol cuando se necesita para obtener energía. No obstante, el tejido adiposo se puede considerar un órgano endocrino, que juega un papel crucial en procesos como la homeostasis glucídica y lipídica, secretando adipocinas como leptina y adiponectina, así como en procesos inflamatorios secretando citocinas que influyen sobre el sistema inmune y contribuyen a la inflamación sistémica (Trayhurn y Beattie, 2001; Galic et al., 2010).

La idea de que el WAT actúe como órgano endocrino surge a raíz de la identificación de una hormona secretada por WAT: la leptina. Se trata de un factor citocina-like también conocido como proteína OB, que cuando está mutada en el modelo animal de ratones *ob/ob* desarrollan obesidad (Zhang Y et al., 1994). Estos ratones presentan hiperfagia, hiperinsulinemia e infertilidad. Además, la administración exógena de leptina a estos ratones revierte la situación (Dardeno et al., 2010). Por ello, la leptina es conocida como “la hormona de la saciedad” ya que tiene acciones centrales sobre el hipotálamo y sobre órganos periféricos. A raíz de estas observaciones también se ha deducido que estados de obesidad promueven una resistencia a la leptina (de manera análoga a como ocurre con la insulina), lo que impide la retroalimentación negativa para reducir la ingesta de energía.

Aunque la leptina es mayoritariamente producida en el WAT, se han identificado otros tejidos que la secretan como BAT, estómago, placenta, glándula mamaria, folículos ováricos y, en órganos fetales, corazón, hueso y cartílago, aunque lo hacen en menor grado (Trayhurn et al., 1999; Trayhurn y Beattie, 2001).

Además de la leptina, WAT secreta otras moléculas señal y factores proteicos, lo que sugiere que WAT no es solo un reservorio de grasa, sino que participa en la regulación de procesos metabólicos y mantenimiento de la homeostasis (Ahima et al., 2000; Trayhurn y Beattie, 2001). Todas estas moléculas liberadas por el tejido adiposo pueden tener efectos locales (autocrinos o paracrinos) y a distancia (endocrinos).

2.1.2. TEJIDO ADIPOSO PARDO

ESTRUCTURA MACROSCÓPICA

El BAT es un tejido muy vascularizado e innervado. De hecho, la densidad de capilares en este tejido es hasta seis veces superior que en WAT. Es importante que haya un correcto flujo sanguíneo que aporte a BAT la energía necesaria y le permita disipar el calor que se genera por termogénesis. Los vasos guardan especial relación espacial con los adipocitos, lo que sugiere una importante relación funcional entre ambos (Cinti, 1999, 2018). La gran densidad de vasos y mitocondrias le aporta el color pardo característico en fresco.

INTRODUCCIÓN

BAT está también muy innervado y las fibras son tanto mielínicas como amielínicas (Cannon et al., 1986; Giordano et al., 2008). Suelen ser fibras noradrenérgicas, aunque en determinados depósitos como el mediastínico se han identificado fibras colinérgicas (Giordano et al., 2004). Las fibras nerviosas suelen distribuirse por el parénquima entre los adipocitos (Cinti, 2018).

Dentro de BAT, solo una pequeña proporción de células (5-50%) son adipocitos pardos maduros. Ocupan gran parte del tejido la parte estromal, que incluye progenitores mesenquimales, progenitores endoteliales y preadipocitos indiferenciados. Estos preadipocitos podrán diferenciarse a adipocitos maduros tras un estímulo determinado (Evans et al., 2019).

ESTRUCTURA MICROSCÓPICA

A nivel microscópico, BAT está formado por adipocitos pardos que tienen forma poligonal y un tamaño entre la mitad y 1/3 del adipocito blanco. Se caracterizan por ser células multiloculares ya que, a diferencia de los adipocitos blancos, almacenan las grasas en múltiples LDs. Al igual que en WAT, las LDs no están rodeadas por membrana, sino por una capa de proteínas entre las que destaca la proteína antilipolítica PLIN1 y la perilipina 5 (PLIN5) (Cinti, 2018).

Su citoplasma contiene un gran número de mitocondrias de gran tamaño que contienen de forma exclusiva la proteína *uncoupling protein-1* (UCP-1), responsable del fenómeno de termogénesis por el que se libera calor a partir de energía almacenada en los ácidos grasos.

Al igual que en los adipocitos blancos, tienen una lámina externa por fuera de la membrana plasmática y el resto de los orgánulos son similares. No obstante, los adipocitos pardos tienen el núcleo redondeado y en posición central. Además, pueden presentar en el citoplasma gránulos típicos de otras células endocrinas (Cinti, 2018).

FUNCIÓN

El BAT puede disipar energía química a través del desacoplamiento de la cadena respiratoria y la producción de calor a partir de energía almacenada en forma de grasas. (termogénesis). Este proceso está mediado por la actividad de la proteína UCP-1 y puede ser activada por ciertos estímulos como exposición al frío, componentes adrenérgicos o

alteraciones genéticas (Fenzl et al., 2014).

La cadena respiratoria mitocondrial mantiene un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna para la producción de ATP. La termogénesis es posible gracias a la actividad de la proteína UCP-1, responsable de desacoplar la cadena respiratoria de la ATP sintasa y liberar energía en forma de calor. En concreto, provoca el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa para la generación del ATP, gracias a la generación de un transporte de protones en la membrana interna, por la que pasan del espacio intermembrana al interior de la matriz mitocondrial (Cannon y Nedergaard, 2004). Como se ha indicado anteriormente, UCP-1 es característica y exclusiva del tejido pardo y es considerada un marcador metabólico de los adipocitos pardos (Cannon y Nedergaard, 2004, Frontini et al., 2007; Ricquier et al., 2017). Durante la termogénesis se produce una activación de la UCP-1 y una síntesis de nuevas UCP-1 en caso necesario (Cinti, 2018, Heeren y Scheja, 2018). Además, si el estímulo es suficientemente prolongado o intenso, se produce un incremento del número de adipocitos pardos y de sus precursores (Vitali et al., 2012; Lee Y et al., 2015, Cinti, 2018).

El tono simpático es el mayor responsable de la activación de la termogénesis (Cannon y Nedergaard, 2004). El SNS libera NA como respuesta a la activación del hipotálamo por parte de las fibras sensitivas presentes en receptores de la piel y adipocitos (Ye et al., 2013). Así, los impulsos aferentes llegan al hipotálamo, que activa al SNS que promueve la secreción de NA en todas las fibras nerviosas que inervan al parénquima del tejido adiposo. La NA se une a los AR- β_3 que también se expresan en los adipocitos pardos y se activan vías que derivan en la estimulación del proceso termogénico. Como el AR- β_3 es un tipo de receptor adrenérgico (AR) acoplado a la proteína G estimuladora (Gs), su activación inicia la cascada de señalización mediada por AC/AMPC/PKA (adenilato ciclasa/adenosina monofosfato sódico cíclico/proteína cinasa A). Estas vías pueden ser de efecto rápido (vía rápida) o efecto lento (vía lenta, termogénesis adaptativa) (Ilustración 4).

Vía rápida de activación termogénica. En esta ruta, se promueve lipólisis mediante la acción de PKA sobre varias lipasas y la desactivación de la perilipin1 por fosforilación. Las lipasas activadas son: lipasa adipocítica de triglicéridos (ATGL), lipasa sensible a hormonas (HSL) y lipoproteína lipasa (LPL), que terminan incrementando la lipólisis de

INTRODUCCIÓN

los lípidos almacenados en las LDs, formándose ácidos grasos libres a partir de los TG. De este modo, se induce la lipólisis y como producto final se liberan ácidos grasos no esterificados (NEFA) del interior de los adipocitos que se metabolizan por beta oxidación en la mitocondria. Además de servir como sustrato para la oxidación, los NEFA activan directamente la UCP-1 (Cannon y Nedergaard, 2004; Heeren y Scheja, 2018; Evans et al., 2019) (Ilustración 4A).

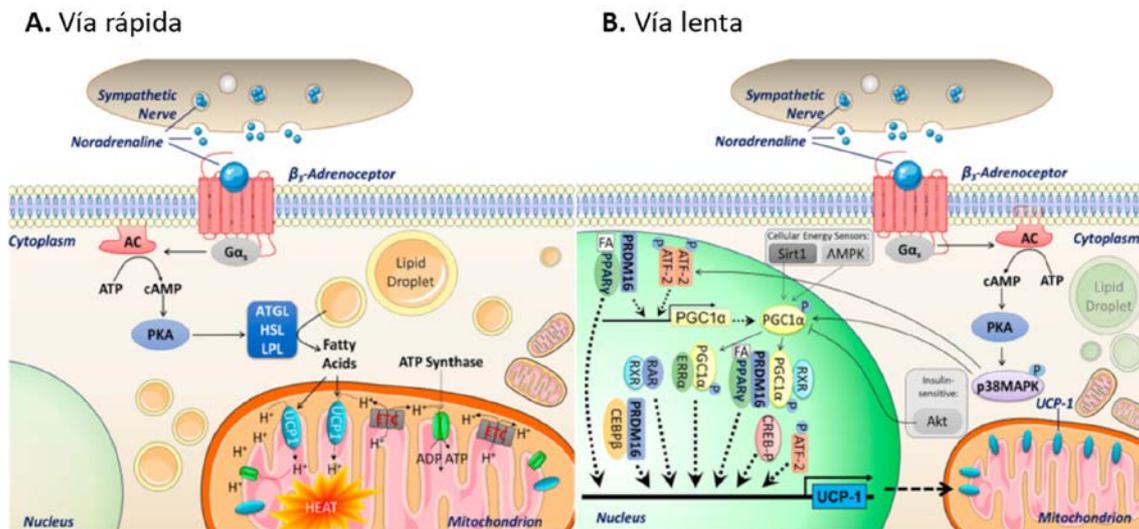


Ilustración 4. Mecanismos de termogénesis mediada por noradrenalina (NA) en BAT.

La activación de los AR- β_3 por estimulación de NA que incrementa el desacoplamiento mitocondrial vía Gas/AC/AMPc/PKA produciendo la activación de la termogénesis a través de **(A)** Vía rápida, donde se libera calor como resultado del desacoplamiento de la cadena respiratoria mediado por la UCP-1 o **(B)** Vía lenta, termogénesis adaptativa, donde se produce un incremento de la síntesis de nuevas UCP-1 en la membrana mitocondrial interna. *Fuente: Adaptado de Evans et al., 2019).*

En resumen, como resultado final de la termogénesis, en lugar de generar energía se libera calor. Cuando los NEFA se oxidan en la mitocondria, se produce la liberación y acumulo de protones en el espacio intermembrana, formándose un gradiente. La UCP-1 es un canal de protones situado en la membrana interna mitocondrial, que permite que pasen de nuevo al interior de la matriz mitocondrial liberando calor; es decir, desacopla el gradiente de protones y la producción de ATP por la ATP sintasa (Ricquier, 2017; Cinti, 2018; Heeren y Scheja, 2018; Evans et al., 2019) (Ilustración 4A).

Vía lenta de activación termogénica En esta ruta, la activación de la AC aumenta la formación de AMPc que a su vez activa a la PKA (Cinti, 2018; Heeren y Scheja, 2018). A su vez, PKA fosforila una serie de enzimas necesarias para llevar a cabo la termogénesis: CREB (*cAMP response element-binding protein*) y p38 MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinase*). A su vez, p38 MAPK ejerce efectos en la transcripción de UCP-1 a través de la fosforilación de PGC-1 α (coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas) y ATF-2 (factor de transcripción activador 2, que a su vez promueve la transcripción de PGC-1 α). Los ácidos grasos también ejercen cambios adaptativos a través de la activación de PPAR γ (receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas), que se combina con PRDM16 (*PR domain containing 16*) para promover la transcripción de PGC-1 α . PPAR γ , PGC1 α , PRDM16, y ATF-2, desarrollando un rol central en la regulación y el incremento de la transcripción de UCP-1. Así, se produce un incremento en la cantidad de proteína UCP-1 y por tanto, una mejor capacidad desacopladora mitocondrial (Collins y Surwit, 2001; Cao et al., 2001, 2004; Cannon y Nedergaard, 2004; Evans et al., 2019; Yang y Mottillo, 2020) (Ilustración 4B).

Además de la vía mediada por los AR- β_3 , la UCP-1 puede activarse por otras cascadas de señalización. Algunos estudios proponen inductores como: acumulación de especies reactivas de oxígeno en adipocitos pardos, el sensor nutricional mTORC (*mammalian Target of Rapamycin*), la cinasa hepática B1 (Lkb1) y el ácido 12,13-dihydroxy-9Z-octadecenoico (Labbé et al., 2016; Shan et al., 2016; Lynes et al., 2017).

Muchos estudios relacionan BAT con obesidad ya que se ha observado que ratones deficientes en BAT son propensos a desarrollar obesidad (Lowell et al., 1993). En la misma línea, ratones con BAT incrementado tienen mejores efectos tras seguir una dieta alta en grasas (Stanford et al., 2013).

Otras funciones: BAT como órgano endocrino

Son varias las evidencias que muestran que BAT puede tener una cierta función endocrina ya que secreta moléculas de señalización celular como adipocinas, entre otras. Su papel endocrino estaría bajo el control del SNS (Cannon y Nedergaard, 2004; Villarroya et al., 2013; Wang GX et al., 2015). Un ejemplo de su función endocrina es la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a través de distintas vías.

Por una parte, la secreción de VEGF puede producirse tras exposición al frío donde se activan los AR- β_3 , los adipocitos pardos de BAT (Tonello et al., 1999; Fredriksson et al., 2000) de forma independiente a la UCP-1 (Fredriksson et al., 2005). Otra de las vías es la estimulación de los AR- β_1 (Fredriksson et al., 2000). Esta secreción de VEGF podía tener un papel muy importante durante los fenómenos de hipertrofia e hiperplasia, ya que se produce un aumento de vascularización por angiogénesis para que llegue más flujo sanguíneo al tejido (Bukowiecki et al., 1982).

Por último, BAT tiene un papel en la regulación de glucosa en el organismo. Varios estudios señalan que durante la exposición al frío se regulan al alza genes asociados con el metabolismo de glucosa (Hao et al., 2015) y se aumenta el consumo de glucosa y lípidos (Peirce y Vidal-Puig, 2013; Stanford et al., 2013).

2.1.3. ADIPOCITOS *BRITE O BEIGE*

Recientemente se reconoció la existencia de los adipocitos *beige* o *brite* (*brown in white*) (Wu J et al., 2012). Aunque se sabe que tienen un fenotipo intermedio entre los adipocitos blancos y los pardos, su función es menos conocida. Difieren de los adipocitos clásicos en su apariencia, morfología, función y perfil génico (Evans et al., 2019). Las diferencias principales entre los adipocitos blancos, pardos y blancos están recogidas en la tabla 1.

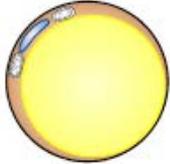
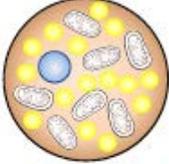
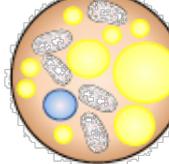
	BLANCO	PARDO	BRITE
Adipocitos			
Visualización	UCP-1 negativo Densidad mitocondrial baja Una única gota lipídica	UCP-1 positivo Densidad mitocondrial alta Numerosas LDs	UCP-1 positivo Densidad mitocondrial elevada LDs grandes y pequeñas
Función	Almacenamiento lípidos Secreción de adipocinas (leptina/adiponectina)	Termogénesis	Termogénesis
Genes Distintivos	Hoxc9, Fabp4, Adipoq	Ucp1, Prdm16, Cidea, Ppargc1a, Adipoq, Fabp4, Fabp3, Cpt1b	Ucp1, Hox9, Prdm16, Cidea, Ppargc1a, Adipoq, Fabp4, Fabp3, Cpt1b

Tabla 1. Diferencias morfológicas, funcionales y de expresión en los genes distintivos en adipocitos blancos, pardos y brite. Fuente: adaptado de Evans et al., 2019.

2.2. INTERACCIONES ENTRE AMBOS TEJIDOS

El tejido adiposo es un tejido dinámico que responde en función de las necesidades del organismo para mantener una correcta homeostasis. WAT y BAT pueden almacenar ácidos grasos en situaciones de excesiva ingesta y liberarlos cuando el organismo los necesita. Por un lado, el BAT tiene la especial capacidad de disipar energía en forma de calor a través de la termogénesis por acción de la proteína UCP-1. Por otro lado, el WAT tiene una mayor capacidad para almacenar energía que el BAT.

No obstante, aunque WAT y BAT presentan importantes diferencias estructurales y funcionales, ambos poseen un gran poder de adaptación y son capaces de cambiar su fenotipo según las necesidades del organismo. Los estímulos que conducen a estos cambios son diversos. Por ejemplo: una exposición crónica al frío promueve que WAT se vuelva más pardo (*browning*), mientras que un balance energético positivo induce a BAT a volverse más blanco (*whitening*) (Cinti, 2019).

Algunos autores sugieren que existe una comunicación entre WAT, BAT y el sistema nervioso que tiene la función de mantener la homeostasis de forma sincronizada cuando

el organismo está expuesto a condiciones como ayuno o exposición al frío. Según indican estos autores, son los AGL liberados por lipólisis en WAT los que activarían las fibras nerviosas aferentes de WAT e iniciarían la comunicación con el SNS, lo que en respuesta aumentaría la termogénesis en BAT (Garretson et al., 2016).

2.2.1. FENÓMENO *BROWNING* DURANTE LA EXPOSICIÓN AL FRÍO

La exposición al frío activa la termogénesis con el fin de generar calor a partir de energía y regular la temperatura. Esta respuesta adaptativa se produce por la activación del BAT y *browning* del WAT tras la liberación de NA por los terminales simpáticos y activación de los AR- β .

En WAT, el proceso de *browning* puede ocurrir por varios mecanismos: inducción y activación de la subpoblación de adipocitos *brite* (Collins, 2011), y por transdiferenciación de adipocitos blancos (Cinti, 2018). En roedores, estos adipocitos *brite* se han encontrado en WAT axilar, inguinal, perirrenal y perigonadal (Cannon y Nedergaard, 1978; Himms-Hagen et al., 1986; Cinti, 2018).

Durante el *browning*, el adipocito blanco sufre una serie de cambios morfológicos: las vacuolas lipídicas disminuyen su tamaño y la gota lipídica unilocular pasa a ser multilocular, las mitocondrias incrementan su tamaño, se vuelven esféricas, aumentan sus crestas y expresan UCP-1 (Ricquier et al., 1978; Himms-Hagen et al., 1986; Cousin et al., 1992; Jimenez et al., 2003; Wikstrom et al., 2014; Cinti, 2018). De forma paralela, se produce un incremento de la inervación del parénquima y aumentan las uniones tipo *gap* entre adipocitos (Barbatelli et al., 1994). Estas uniones *gap* facilitan el acoplamiento eléctrico de los adipocitos durante la termogénesis. En cualquier caso, todos estos cambios morfológicos dependerán de la actividad termogénica de los depósitos pardos. (Cinti, 2018).

Sin embargo, los mecanismos moleculares del *browning* no son del todo conocidos (Cinti 2018). Se cree que los receptores responsables del *browning* son los AR- β_3 ya que este receptor está expresado en adipocitos blancos y su expresión aumenta tras la exposición al frío (De Matteis et al., 2002; Bordicchia et al., 2014). En esta línea, el aumento del tono simpático en WAT podría inducir el *browning* para favorecer la termogénesis (Cinti, 2018). De hecho, la inervación de ambos tejidos por fibras noradrenérgicas aumenta

durante la exposición al frío, y se ha demostrado una correlación entre la densidad de fibras noradrenérgicas y la intensidad del *browning* (Vitali et al., 2012). Esto pone manifiesto el importante control neurogénico al que se encuentra sometido el tejido, ya que es capaz de cambiar su fenotipo en función de las necesidades.

Aunque son muchos los estudios que indican que el *browning* se produce a través del AR- β_3 , Jimenez et al. (2003) observó que ratones β_3 -*knockout* (KO) expuestos a frío expresan menos niveles de UCP-1 que los *wild type*. No obstante, siguen teniendo expresión de UCP-1 lo que sugiere que no solo el AR- β_3 es el responsable del fenómeno *browning* inducido por frío.

2.2.2. FENÓMENO WHITENING DURANTE EL BALANCE ENERGÉTICO POSITIVO

En el *whitening*, al contrario que en el *browning*, aumenta el WAT, disminuye la actividad de adipocitos pardos y se induce su conversión a blancos. Esto posee relevancia en estados de envejecimiento y en obesidad, donde el *whitening* de depósitos pardos contribuye al estado proinflamatorio (Cinti, 2018; Kotzbeck, 2018).

En el envejecimiento, el *whitening* de BAT probablemente depende de la reducción de la actividad del SNS, como lo demuestran estudios donde se observa el blanqueamiento de BAT en ratones sin AR- β_3 (Bachman et al., 2002).

Sin embargo, el *whitening* de BAT debido a un balance energético positivo puede considerarse una respuesta adaptativa al medio, ya que adquiriría una capacidad para almacenar energía (Cinti et al., 1997, 2018).

2.3. DISTRIBUCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO EN HUMANOS Y ROEDORES

En mamíferos hay varios tipos de tejido adiposo que se distribuyen en localizaciones distintas y varían entre individuos. Existen dos depósitos principales: el visceral y el subcutáneo. Además, tal y como se ha detallado anteriormente (apartado 2.1 de introducción), según la histología se diferencian dos tipos de tejido adiposo, WAT y BAT. el tejido adiposo se diferencia en dos tipos principales, WAT y BAT. Es importante destacar que el hecho de que un depósito graso se considere WAT o BAT depende de la proporción predominante de uno u otro, ya que todos los depósitos tienen composición mixta (WAT y BAT) (Cinti, 2005). Los tejidos con un predominio de adipocitos blancos

son macroscópicamente blancos y se consideran WAT, mientras que los tejidos con predominio de adipocitos pardos son macroscópicamente pardos y se consideran BAT.

El tejido adiposo subcutáneo se encuentra por debajo la epidermis mientras que el tejido visceral se encuentra alrededor de los órganos. Además, la localización de estos depósitos en el organismo es importante pues de ella dependerá su papel estructural y funcional, que muchas veces distan de las funciones clásicas. Por ejemplo, el tejido adiposo alrededor de estructuras esqueléticas ofrece protección mecánica, el de la glándula mamaria y corazón soporte metabólico y nutricional, y el de la piel e intestinal contribuyen activamente en el sistema inmune innato respondiendo a la invasión bacteriana (Zwick et al., 2018).

La composición del tejido adiposo en los depósitos viscerales y subcutáneos varía en función de la genética, la edad, estado nutricional, especie, la sensibilidad a determinadas hormonas y glucocorticoides y determinadas condiciones ambientales (Sánchez-Gurmaches et al., 2014). Algunos estudios evidencian que el número de adipocitos pardos decrece con la edad en todos los depósitos (Sbarbati et al., 1991; Morroni et al., 1995). Se ha observado además que la presencia de adipocitos marrones en cada uno de los depósitos posee una fuerte influencia genética (Guerra et al., 1998; Cinti 2015).

Los depósitos también varían en función de la especie. Humanos y roedores comparten cierta correspondencia entre los depósitos grasos y su composición. En las ilustraciones 4 y 5 se observa la distribución y naturaleza de tejidos grasos en humanos y roedores, respectivamente.

2.3.1. HUMANOS

En humanos, el depósito visceral principal se encuentra dentro de la cavidad abdominal, pero no exclusivamente. Este depósito se puede dividir en mesentérico, retroperitoneal, omental, gonadal y pericárdico (Wajchenberg, 2000) (Ilustración 5A). De forma general, un aumento de los depósitos viscerales se relaciona con el desarrollo de alteraciones metabólicas como diabetes *mellitus* (DM) tipo 2 y enfermedad cardiovascular (Shuster et al., 2012) (Ilustración 5B).

El tejido adiposo subcutáneo se encuentra distribuido por debajo de la piel de todo el

cuerpo, aunque los principales depósitos están en abdomen, glúteos y muslos. Estos dos últimos forman el depósito gluteofemoral, mientras que el depósito abdominal se subdivide en superficial y profundo según su relación con la fascia abdominal superficial (Chusyd et al., 2016; Kwok et al., 2016) (Ilustración 5A).

Además de estos, existen otros depósitos grasos de pequeño tamaño, generalmente asociados a otros órganos por todo el organismo. Estos depósitos son: tejido adiposo de la piel, facial, mamario, articular, de la medula ósea, palmar y plantar, cardiovascular y mesentérico. Sus funciones, aunque todavía desconocidas, son distintas a las clásicas y de características órgano específicas (Zwick et al., 2018).

El BAT está presente en la infancia e involuciona a partir de la primera década de vida, hasta desaparecer de casi todas las áreas en la edad adulta. En niños está presente en la zona interescapular (Stephens, 2011) y en adultos queda reducido a localización: perirrenal (Krief et al., 1993), periaórtica, mediastínica y cervical (Lidell, 2018) (Ilustración 5A). En 2007 se demostró que el BAT persistente en adultos está activo, lo que sugiere un papel en la regulación del metabolismo energético (Cypess et al., 2012). De hecho, este tejido se puede inducir en condiciones especiales, por ejemplo, durante una exposición crónica al frío o estimulación β -adrenérgica prolongada (Zwick et al., 2018).

Las implicaciones fisiopatológicas del tejido visceral y subcutáneo son distintas. El tejido adiposo visceral, depositado principalmente en la cavidad intrabdominal, determina un elevado índice cintura-cadera (obesidad de tipo central o androide) que a su vez se relaciona con el desarrollo de enfermedad metabólica caracterizada por: resistencia a insulina, DM tipo 2, dislipemia, hipertensión arterial (HTA), aterosclerosis, esteatosis hepática y cáncer (Gesta et al., 2007; Sánchez-Gurmaches et al., 2014).

En cambio, el tejido adiposo subcutáneo parece tener efectos beneficiosos en el metabolismo ya que se relaciona con una mejora de la sensibilidad a insulina y un menor riesgo de desarrollar DM tipo 2 (Gesta et al., 2007; Sánchez-Gurmaches et al., 2014). Una de las posibles razones es que la acumulación de grasa en depósito subcutáneo no incrementa la inflamación, riesgo cardiovascular o enfermedad metabólica según apuntan diversos estudios genéticos, fisiológicos y epidemiológicos (Karpe y Pinnick, 2014). Este tipo de depósito es el que se relaciona con la obesidad periférica o ginecoide.

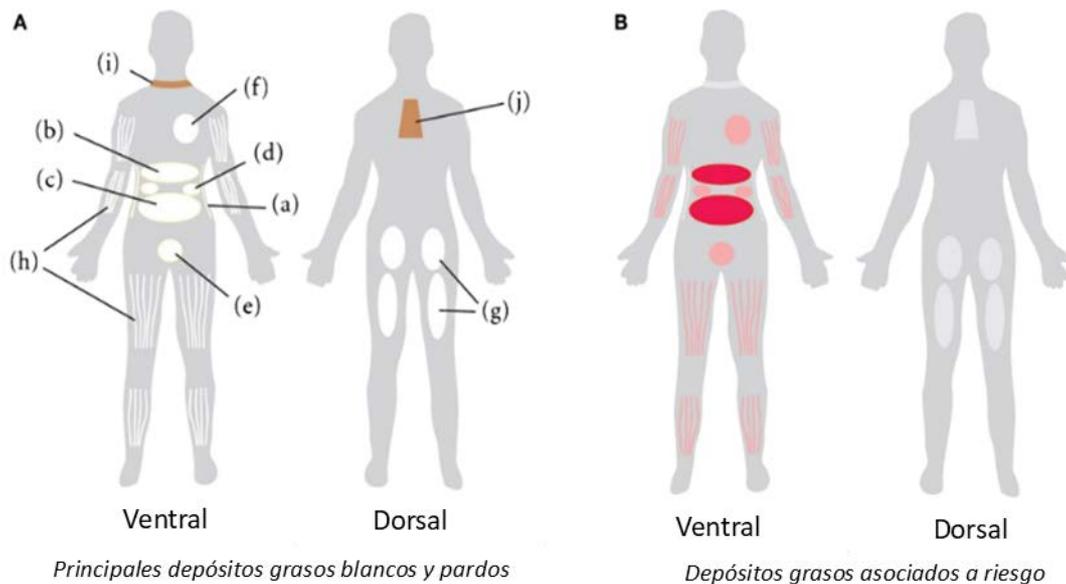


Ilustración 5. Depósitos de tejido adiposo en humanos. (A) Distribución fisiológica: el WAT puede encontrarse en el tejido adiposo subcutáneo abdominal (a), gluteofemoral (g) e intramuscular (h). También hay WAT visceral como el omental (b), mesentérico (c), retroperitoneal (d), gonadal (e) y pericardial (f). El BAT se encuentra supraclavicular (i) y subescapular (j). **(B)** Depósitos asociados a un incremento del riesgo de comorbilidades y mortalidad asociadas a la obesidad. Fuente: adaptado de Chusyd et al., 2016.

2.3.2. ROEDORES

Los depósitos de grasa en roedores guardan similitud con los depósitos de grasa de humanos. El depósito subcutáneo de roedores también se encuentra por debajo de la piel, pero a diferencia de los humanos, existe una barrera de tejido muscular entre el tejido adiposo y la piel.

Los roedores presentan dos compartimentos de tejido adiposo subcutáneo: uno anterior (entre las escápulas y que desciende por el cuello hasta las axilas) y otro posterior o inguinal (que se extiende desde región dorsolumbar a glútea). El tejido inguinal es el más utilizado para estudiar el comportamiento subcutáneo, y sería el análogo del compartimento gluteofemoral en humanos (Ilustración 6).

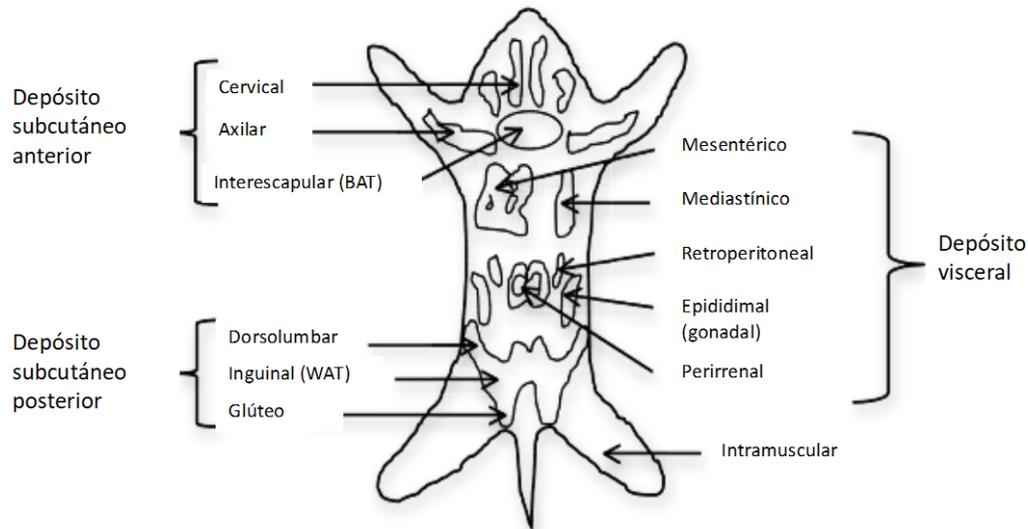


Ilustración 6. Distribución del tejido adiposo en ratón. Está compuesto por dos depósitos subcutáneos (anterior y posterior) y varios depósitos viscerales. Entre los depósitos de WAT destacan el inguinal y el epididimal. El BAT se encuentra principalmente en la región interescapular y también está distribuido a lo largo del resto de depósitos grasos (Chusyd et al., 2016).

El depósito visceral de roedores, al igual que en humanos, se sitúa principalmente dentro de la cavidad abdominal. Podemos encontrar el compartimento perigonadal (epididimal en machos y periovárico en hembras), perirrenal, y mesentérico. Este último es el considerado más similar al tejido adiposo abdominal humano tanto por localización como por biología, ya que presenta drenaje por vena portal, aunque no suele ser escogido para su estudio por las limitaciones técnicas, entre las que se encuentran su difícil separación de los vasos.

Para el estudio de tejido visceral en roedores, suele utilizarse tejido adiposo perigonadal, ya que es el más accesible y de mayor tamaño. Sin embargo, no existe una clara analogía de éste en humanos, y algunos autores lo consideran perivisceral más que visceral. Por otro lado, el tejido adiposo omental, claramente desarrollado en humanos, está poco definido en roedores, por lo que no suele ser escogido para su estudio.

Estas diferencias anatómicas entre roedores y humanos han de tenerse en cuenta a la hora de extrapolar resultados (Chusyd et al., 2016). A parte de los depósitos mencionados, existen otros compartimentos de menor tamaño alrededor del corazón, de la aorta, y de sus ramas principales (Cinti, 2005, 2018).

En condiciones normales, el BAT se encuentra mayoritariamente en la región interescapular y en menor medida en tejido subcutáneo anterior, en el mediastino, en región cervical y en tejido subescapular (Cinti, 2005, 2018; Zwick et al., 2018). También existen adipocitos pardos diseminados en el interior de depósitos de WAT, como en los depósitos axilares, inguinales, perirenales y perigonadales (Cinti, 2018).

Como se ha indicado anteriormente, se ha reconocido la existencia de un tercer tipo de adipocitos que comparte características con los adipocitos blancos y los pardos y se denominan *brite* o *beige* (Wu J et al., 2012).

2.4. INERVACIÓN Y AR- β EN TEJIDO ADIPOSO

Tal y como se ha explicado previamente (apartados 2.1.1 y 2.2.2 de la introducción), WAT y en mayor medida BAT, están inervados por fibras mielínicas noradrenérgicas y amielínicas sensitivas distribuidas por el parénquima entre los adipocitos y los vasos sanguíneos (Cinti, 2018). El SNS es el único que inerva al tejido adiposo y tiene un papel muy relevante en el control de la homeostasis metabólica y glucídica del organismo. El SNS media sus efectos a través de los AR, que se expresan en varios tejidos. En concreto, en el tejido adiposo los AR ejercen funciones importantes como regular la lipogénesis, la lipólisis, la termogénesis, el metabolismo de glucosa y la secreción de hormonas por los adipocitos que controlan múltiples aspectos de la homeostasis energética del organismo. No obstante, el SNS también ejerce sus funciones de mantenimiento de la homeostasis metabólica a través de la regulación de la actividad de AR en otros tejidos como páncreas, músculo esquelético, corazón, hígado, cerebro, tracto gastrointestinal (Evans et al., 2019).

Los AR pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. Son receptores integrados en la membrana y constan de 7 fragmentos transmembrana con un dominio extracelular N-terminal y un dominio intracelular C-terminal. Estos receptores se activan por acción de las catecolaminas endógenas adrenalina (A) (liberada por la glándula adrenal) y NA (liberada por los terminales nerviosos). Existen dos familias de AR: α y β (Evans et al., 2019).

En la presente tesis doctoral, nos centraremos en la regulación de la actividad del tejido adiposo a través de la estimulación de los AR- β . El tejido adiposo de roedores y humanos

expresa los 3 subtipos de AR- β : β_1 , β_2 y β_3 . Los AR- β están acoplados a la subunidad alfa de proteína Gs (G α s) y median respuestas excitatorias. Al activarse las proteínas G α s activan a la AC que incrementa los niveles de AMPc y se inician determinadas vías de señalización.

La expresión de los diferentes subtipos de AR- β es distinta en WAT, BAT y adipocitos *brite*, por tanto, la función será diferente en función del receptor activado por las catecolaminas endógenas (Evans et al., 2019).

Los AR- β , especialmente el subtipo β_3 , ejercen efectos en el control de muchas de las funciones ejercidas por el tejido adiposo. El subtipo AR- β_3 se expresa en WAT y BAT y media efectos de lipólisis en WAT y termogénesis en BAT (Langin et al., 1991; Lönnqvist et al. 1993). También estimula el *browning* de los adipocitos *brite* dentro de los depósitos de grasa blanca y ejerce efectos en el control de la transcripción nuclear de factores que incrementan la biogénesis de mitocondrias y la expresión de UCP-1 (Collins et al., 2011; Bordicchia et al., 2014; Giordano et al., 2014; Evans et al., 2019).

Además, este subtipo AR- β_3 también está presente en los vasos que irrigan la grasa y, de hecho, producen vasodilatación (Bhadada et al., 2011).

La expresión de los AR- β puede estar condicionada por varios factores como ejemplo la edad. De hecho, la expresión de los AR- β_3 decrece con la edad, la obesidad y la DM tipo 2 (Evans et al., 2019).

A continuación, explicaremos la expresión y la función de los AR- β , ya que es distinta en roedores y humanos adultos.

2.4.1. AR- β EN WAT

2.4.1.1. WAT DE ROEDORES

Expresión de AR- β en WAT de roedores

En roedores, los tres subtipos de AR- β están expresados en WAT, tanto en los depósitos visceral y subcutáneo, siendo el AR- β_3 el principal responsable de la lipólisis en adipocitos maduros. El patrón de expresión de los AR- β varía durante la diferenciación de los adipocitos. De hecho, al inicio hay mucha más expresión de β_1 que de β_3 , mientras que en los adipocitos diferenciados hay más expresión de β_3 (Evans et al., 2019).

Función de AR- β en WAT de roedores

Varios estudios señalan la importancia de los AR- β en la homeostasis del tejido adiposo. β_1 y β_3 ejercen efectos en la lipólisis en adipocitos maduros (Susulic et al., 1995; Germack et al., 1997; Klaus et al., 2001), mientras que estos mismos estudios excluyeron la existencia de un papel para los AR- β_2 .

Estudios previos señalan que el subtipo responsable de la proliferación y diferenciación de preadipocitos es el AR- β_1 . En estos estudios, la administración de isoprenalina (agonista no selectivo β_1 y β_2) aumenta la diferenciación de preadipocitos mientras que el CL316243 (agonista β_3) no lo hace. Además, el SNS a través de la NA y junto con otros estímulos hormonales, regula la lipólisis en WAT. De hecho, la NA es el principal regulador de la tasa lipolítica y la hiperplasia adipocitaria (Bowers et al., 2004; Bartness et al., 2010, 2014). Esto concuerda con estudios en ratones con denervación simpática en los que hay una inhibición de la lipólisis, una acumulación de lípidos y un aumento de la proliferación del WAT (Youngstrom y Bartness, 1998).

Además, se ha visto que ratones β_3 -KO presentan una acumulación de lípidos en respuesta a una dieta con elevada concentración grasa, una disminución de masa magra y un aumento de la ingesta de comida, lo que lleva a un aumento del tejido adiposo. En esta línea, en adipocitos obtenidos de ratones β_3 -KO se observa cierta actividad compensadora que parece ser ejercida por los AR- β_1 (Susulic et al., 1995; Revelli et al., 1997). El subtipo β_2 , aunque se expresa en WAT, no hay evidencias que sugieran que ejerza alguna función (Evans et al., 2019).

Por otra parte, en ratones sin expresión de ningún subtipo AR- β , hay un aumento de todos los depósitos de WAT. En estos ratones existe una actividad lipolítica residual en respuesta a NA, que en este caso no ha podido ser compensada por otro AR- β (Tavernier et al., 2005). Estos animales padecen obesidad en una dieta normal que incrementa mucho más si se les administra una dieta con alto contenido graso (Bachman et al., 2002; Jimenez et al., 2002).

Finalmente, tal y como hemos descrito en el apartado 2.2.1 de la presente tesis, el AR- β_3 parece ser el responsable de browning del WAT (De Matteis et al., 2002; Bordicchia et al., 2014). En este sentido, es importante añadir que la NA no alcanza por igual a todos

los depósitos grasos de WAT y tras exposición al frío, se activa el SNS y la NA liberada alcanza los depósitos WAT inguinales y retroperitoneales en mayor medida que los epididimales (Garofalo et al., 1996; Brito et al., 2008).

2.4.1.2. WAT DE HUMANOS

Expresión AR- β en WAT de humanos

El WAT de humanos también expresa los 3 subtipos de AR- β (β_1 , β_2 y β_3), siendo la expresión de AR- β_3 no tan relevante como la expresión de AR- β_1 y AR- β_2 (Evans et al., 2019). La expresión de AR- β_3 es mínima y se cree que puede deberse a la existencia de subpoblaciones celulares AR- β_3 positivas en los depósitos de WAT. Otro estudio ha detectado que la expresión del AR- β_3 en tejido visceral y subcutáneo de humanos es muy variable entre distintos pacientes, siendo la variabilidad menor en el depósito visceral (Bordicchia et al., 2014). Esto puede ser debido a la mayor presencia de capilares, fibras noradrenérgicas y adipocitos pardos por la proximidad a las arterias renales de la biopsia utilizada (Frontini y Cinti, 2010).

En ensayos con adipocitos humanos cultivados a partir de SVF (fracción estromal vascular) de depósitos de grasa humanos, los niveles de mRNA de AR- β_1 y AR- β_3 son despreciables, pero sí se detecta expresión de AR- β_2 .

Función AR- β en WAT de humanos

El AR- β_3 en tejido adiposo tiene más funciones en roedores que en humanos, donde solo ejercería efectos lipolíticos (Carpéné C et al., 1998; Michel et al., 2019). Estudios señalan que tras activación de AR- β_3 no se aumenta la lipólisis ni la termogénesis en WAT de humanos, y estas funciones son llevadas a cabo por los AR- β_1 y β_2 (LaFontan y Berlan, 1995; Carpené et al., 1999). Sin embargo, hay que destacar que la mayoría de estos estudios utilizaron agonistas β_3 como CL316243, que tiene poco efecto sobre el AR- β_3 humano (Evans et al., 2019).

Otro estudio realizado en adipocitos humanos viscerales y subcutáneos concluyó que, a pesar de la baja expresión en tejido adiposo humano del AR- β_3 , la activación por L-nevibolol (agonista β_3) inducía lipólisis y termogénesis, disminuyendo el tamaño de las gotas lipídicas de los mismos. Además, este estudio detectó en muestras de tejido adiposo *ex vivo* un aumento del AR- β_3 cuando los adipocitos son expuestos al frío, lo que

sugiere un papel en la función termogénica. En consonancia, también comprobaron que el tratamiento con agonistas β_3 aumentaba la expresión de UCP-1 en adipocitos humanos viscerales y subcutáneos (Bordicchia et al., 2014).

2.4.2. AR- β EN BAT

2.4.2.1. BAT DE ROEDORES

Expresión

En roedores, BAT expresa todos los subtipos de AR- β , siendo el β_3 el más expresado seguido de β_1 y β_2 (Collins et al., 1994).

En los adipocitos pardos, los AR- β_1 se expresan desde que son preadipocitos hasta su maduración, aunque los niveles decaen durante el desarrollo. De hecho, la disminución en los niveles de β_1 durante la maduración del adipocito pardo coincide con el aumento de los AR- β_3 (Bronnikov et al., 1999).

Función

Varios estudios demuestran el papel imprescindible de los AR- β durante el desarrollo y en la correcta fisiología del BAT. Se ha visto en estudios con ratones sin expresión de ningún subtipo de AR- β que éstos no pueden sobrevivir en situaciones de exposición al frío. Además, morfológicamente BAT se convierte en WAT y sus adipocitos expresan leptina, molécula de secreción típica de adipocitos blancos (Bachman et al., 2002; Jimenez et al., 2002).

El AR- β_3 es el subtipo que más funciones desempeña en el BAT de roedores y esto se correlaciona con los elevados niveles de expresión. Tal y como indican varios estudios, la administración de agonistas β_3 produce un aumento de la cantidad de UCP-1 y un aumento en la termogénesis (Arch, 1993; Cannon y Nedergaard, 2004).

Son varios los estudios que indican que el AR- β_3 es el responsable de aumentar la captación de glucosa en los adipocitos pardos a través del aumento de síntesis y translocación del transportador de glucosa 1 (GLUT-1) a la superficie celular (Chernogubova et al., 2005; Dallner et al., 2006; Olsen et al., 2014; Merlin et al., 2018b). Esto ocurre a través de la modulación de la vía de señalización que incluye a la proteína

mTORC2 que es independiente de vías señalizadas por la insulina y de la presencia de UCP-1 (Olsen et al., 2014, 2017).

Los AR- β_1 se expresan en adipocitos pardos y tejido pardo, aunque las funciones en los adipocitos maduros no son relevantes (Chernogubova et al., 2005). No obstante, sí ejercen un papel en los preadipocitos, donde incrementan los niveles de AMPc y promueven su diferenciación (Bronnikov et al., 1992; Evans et al., 2019).

A pesar de que se pensaba que los AR- β_1 no ejercían funciones en los adipocitos pardos adultos y su papel parecía estar limitado a la fase de preadipocito, en estudios con ratones β_1 -KO se observó una peor respuesta al frío en BAT (Ueta et al., 2012) y ratones con sobreexpresión β_1 son resistentes a obesidad inducida por dieta (Soloveva et al., 1997). Por tanto, sí parece que ejerza función en el tejido completo (Evans et al., 2019). Además, el papel de los AR- β_3 puede ser compensado por el β_1 cuando es necesario. Diversos estudios indican que ratones β_3 -KO, no presentan diferencias en la tasa metabólica o diferencias en la respuesta al frío respecto a ratones que expresan β_3 (Susulic et al., 1995; Mattsson et al., 2011; De Jong et al., 2017) y pueden aumentar los niveles de UCP-1 (Chernogubova et al., 2005). En estos ratones están elevados los niveles y la función del β_1 en BAT y adipocitos pardos. Esto parece ser una compensación para permitir que BAT y sus adipocitos puedan responder a la NA liberada por estímulos del SNS (Susulic et al., 1995; Chernogubova et al., 2005; Mattsson et al., 2011)

En cuanto a los AR- β_2 , están expresados en tejido adiposo BAT (Levin y Sullivan, 1986; Chernogubova et al., 2005) pero no se cree que estén expresados en adipocitos pardos (Bengtsson et al., 2000; Chernogubova et al., 2005). Una posible explicación es que sean los vasos que irrigan al tejido, y no los adipocitos pardos, los que expresen β_2 . En este caso, la activación de los β_2 produciría un incremento de flujo sanguíneo en BAT (Ernande et al., 2016).

En experimentos realizados con ratones β_2 -KO, se ha detectado que tienen intacta la termogénesis inducida por frío y por dieta (Fernandes et al., 2014). Y en estudios realizados con ratones β_1 y β_3 -KO, no se han apreciado diferencias morfológicas de los adipocitos pardos respecto a los ratones *wild type*, lo que sugiere que los β_2 pueden ejercer un papel compensador cuando β_1 y β_3 no se expresan (Bachman et al., 2002).

En síntesis, el incremento de actividad del SNS sobre el BAT a través de la NA, induce la activación de los AR- β_3 localizados en adipocitos maduros. De esta manera, se produce un incremento en el desacoplamiento mitocondrial. Si la estimulación del AR- β_3 se cronifica, se incrementan los niveles de UCP-1. A su vez, los AR- β_3 incrementan la captación de glucosa en BAT y aumentan la secreción de adipocinas y otros factores, entre los que se encuentra VEGF, que promueve el remodelamiento vascular.

2.4.2.2. BAT DE HUMANOS

Expresión

El BAT de humanos expresa los 3 subtipos de AR- β (β_1 , β_2 y β_3) siendo la proporción de AR- β_3 mayor en BAT que en WAT (Evans et al., 2019).

Función

En un primer momento, se sabía que BAT estaba presente en neonatos, disminuyendo con la edad, y presente en mayor medida en adultos expuestos al frío, donde se ha visto que la expresión de AR- β_3 se eleva cuando los sujetos expuestos al frío (Chondronikola et al., 2016).

Evidencia procedente de estudios en roedores sugiere que la activación AR- β_3 induce la termogénesis del BAT, lo que convirtió al AR- β_3 en la diana potencial para tratamiento de obesidad y DM tipo 2. Por ello, muchos estudios se centraron en encontrar un agonista β_3 que aumentara la termogénesis en tejido adiposo en humanos, evitando efectos no deseados en el sistema cardiovascular. Sin embargo, estos estudios no fueron fructuosos (Larsen et al., 2002; Redman et al., 2007; Arch, 2011), hasta que se empezó a usar el agonista β_3 de eficacia demostrada sobre el receptor humano, mirabegrón, autorizado para el tratamiento de la vejiga hiperactiva. En concreto, la estimulación con mirabegrón aumenta el consumo de glucosa en BAT medido por tomografía por emisión de positrones (PET), y se correlaciona con aumento del metabolismo basal y del consumo de oxígeno (Cypess et al., 2015; Din et al., 2016). También se ha visto un efecto similar con efedrina, un agonista simpaticomimético, lo que sugiere que esta vía está mediada por el SNS (Carey et al., 2012). Además, la actividad de BAT se ha visto que está inversamente correlacionada con la edad, el índice de masa corporal (IMC) y el estado glucídico (Cypess et al., 2009; Ouellet et al., 2011).

No obstante, un estudio reciente desafía esta teoría y propone que el receptor AR- β_2 es el responsable de los efectos lipolíticos y termogénicos observados en humanos. Los autores observan que solo dosis máximas de mirabegrón inducen la lipólisis y termogénesis en humanos, y que se acompaña de activación del sistema cardiovascular. Además, establecen que este efecto está mediado por el AR- β_2 . Por ello, concluyen que los efectos observados con mirabegrón son producidos por activación cruzada con otros AR- β .

En cualquier caso, las últimas evidencias apuntan a que los únicos estímulos que capaces de incrementar la actividad de BAT en humanos son el frío y la activación del SNS a través de AR- β .

2.4.3. ADRENOCEPTORES EN ADIPOCITOS *BRITE*

Como se ha explicado anteriormente, los adipocitos *brite* o *beige* se localizan dentro de depósitos de WAT y se originan a partir de una célula precursora de adipocitos blancos mediante un fenómeno llamado *browning*. Morfológicamente, comparten características entre los adipocitos pardos y los blancos.

Estudios *in vitro* indican que los adipocitos *brite* son capaces de expresar los 3 subtipos de AR- β , pero solo el β_3 es funcional (Merlin et al., 2018a). En estos adipocitos *brite*, los niveles de β_3 son más elevados y median respuestas como: aumento del consumo de O₂ en termogénesis por aumento de UCP-1, aumento de los niveles de GLUT-1 en la superficie celular, aumento de la captación de glucosa, aumento de la glicolisis y aumento en los niveles de AMPc. Además, estas respuestas eran más pronunciadas en adipocitos *brite* derivados de WAT inguinal (subcutáneo) que de WAT epididimal (visceral) (Merlin et al., 2018b). Esto podría explicar por qué es más complicado el *browning* en el WAT visceral que en el subcutáneo (Waldén et al., 2012; Okamatsu-Ogura et al., 2013). Los adipocitos *brite*, cuando están expuestos al frío, aumentan su expresión de UCP-1 y se vuelven termogénicamente funcionantes (Guerra et al., 1998; Vitali et al., 2012; Shabalina et al., 2013; Kalinovich et al., 2017;). Tal y como se ha explicado previamente (apartado 2.2.1 de introducción), se cree que este proceso de *browning* en adipocitos blancos expuestos al frío puede ser debido a la estimulación del SNS a través de AR- β_3 . De este modo, el frío aumenta la actividad del SNS y, por tanto, aumenta la liberación de NA desde los terminales nerviosos a estos depósitos grasos

(Bartness et al., 2014).

También se ha estudiado si tras el *browning* inducido por frío, los adipocitos *brite* que aumentan la expresión de UCP-1 son funcionales.

2.5. FUNCIONES “CLÁSICAS” DEL TEJIDO ADIPOSO

2.5.1. ADIPOGÉNESIS

La adipogénesis es el proceso mediante el cual las células madre mesenquimales (MSC) se comprometen al linaje adiposo (fase de compromiso) y se diferencian en adipocitos (fase de diferenciación terminal). Estas MSC se encuentran en el estroma perivascular del tejido adiposo y en la médula ósea. Son pluripotenciales y tienen la capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares (adipocitos, miocitos, condrocitos y osteocitos). El destino de estas células a un linaje concreto dependerá del microambiente concreto en el que se encuentren.

La formación de adipocitos desde MSC se denomina adipogénesis y está compuesta por dos fases. En la primera se produce un compromiso, convirtiéndose en preadipocito, ya restringidos a este linaje, pero sin cambios morfológicos. En la segunda fase se produce la diferenciación: pasan de estar en fase G1 (*Growth 1*) a entrar en mitosis, iniciando una expansión clonal y terminando la diferenciación a adipocitos (Tang y Lane, 2012).

Los mecanismos que activan la adipogénesis son varios, destacando entre ellos el elevado consumo calórico y de glucosa mantenidos. En este estado metabólico se induce la entrada de las MSC a la fase de compromiso que terminará dando lugar a preadipocitos. Se han identificado factores que pueden comprometer o inhibir la conversión de estas células pluripotenciales al linaje adipocítico. Entre ellos destacan: miembros de la familia BMP (proteínas morfogénicas óseas, BMP2 y BMP4), Wnt y Hn (*hedgehog*). En concreto, BMP4 y BMP2 tienen un rol activador, mientras que la señalización de Hn tiene un efecto inhibitor. Wnt tiene ambas acciones. La interacción y el balance resultante de estos factores de señalización determinará si se producen nuevos adipocitos (Tang y Lane, 2012).

2.5.1.1. FACTORES QUE DETERMINAN LA FASE DE COMPROMISO A LINAJE ADIPOCÍTICO

Estudios recientes han identificado que BMP2 y BMP4 son suficientes para comprometer un cultivo de fibroblastos hacia linaje adipocítico. Las BMP actúan uniéndose a sus receptores BMP y activan las proteínas SMAD (*small mothers against decapentaplegic*): SMAD1, SMAD5 y SMAD8, que a su vez conducen a la activación del factor de transcripción de SMAD4. Una vez SMAD4 está activado, este promueve la diferenciación terminal a adipocito mediante la transcripción de PPAR γ , considerado el regulador maestro de la adipogénesis (Huang et al., 2009).

Por otra parte, los fibroblastos adipogénicos son ricos en el factor de transcripción ZFP (*Zinc finger protein*) 423 y su acción principal es sensibilizar los fibroblastos a la cascada de señalización mediada por BMP, necesaria para el compromiso (Gupta et al., 2010). Concretamente, se ha visto que ZFP423 es necesaria para el desarrollo fetal del tejido adiposo subcutáneo, pero no para el desarrollo tejido adiposo visceral (Shao et al., 2017)

También existen otros factores de transcripción implicados en la regulación de la adipogénesis, como ZFP467, que suprime la osteogénesis y promueve la adipogénesis de las MSC (Quach et al., 2011).

2.5.1.2. FACTORES QUE DETERMINAN LA DIFERENCIACIÓN TERMINAL A ADIPOCITOS

El PPAR γ es el principal factor de transcripción y está considerado como el regulador principal de la adipogénesis, siendo indispensable para la diferenciación de los adipocitos tanto *in vitro* como *in vivo*. (Tontonoz et al., 1994, Barak et al., 1999, Rosen et al., 1999, Wang F et al., 2013). Se han descrito numerosos metabolitos endógenos ligandos de PPAR γ , pero su afinidad por estos receptores y su cantidad relativa en el tejido adiposo es baja, por lo que hasta el momento se desconoce cuál es su ligando principal.

Una de las consecuencias más importantes de la activación de PPAR γ es la activación del factor de transcripción C/EBP α (*CCAAT/enhancer-binding protein alfa*). Ambos actúan conjuntamente y son suficientes para producir la diferenciación terminal a adipocitos (Wu Z et al., 1999). De hecho, actúan sinérgicamente ya que C/EBP α y PPAR γ comparten más del 90% de sitios de unión a DNA. Además, PPAR γ precisa la inducción de proteínas

de la familia C/EBP para activar completamente los genes expresados en adipocitos maduros (como por ejemplo el receptor de insulina, gen AP2 y adiponectina) (Lefterova et al., 2008).

En el caso de la adipogénesis embrionaria, esta no es dependiente de C/EBP α , probablemente porque C/EBP β (CCAAT/enhancer-binding protein beta) comparte redundancia funcional con C/EBP α . Además, esta redundancia se restringe a la etapa embrionaria, ya que C/EBP α es necesaria para todas las formas de adipogénesis adulta (Wang F et al., 2013).

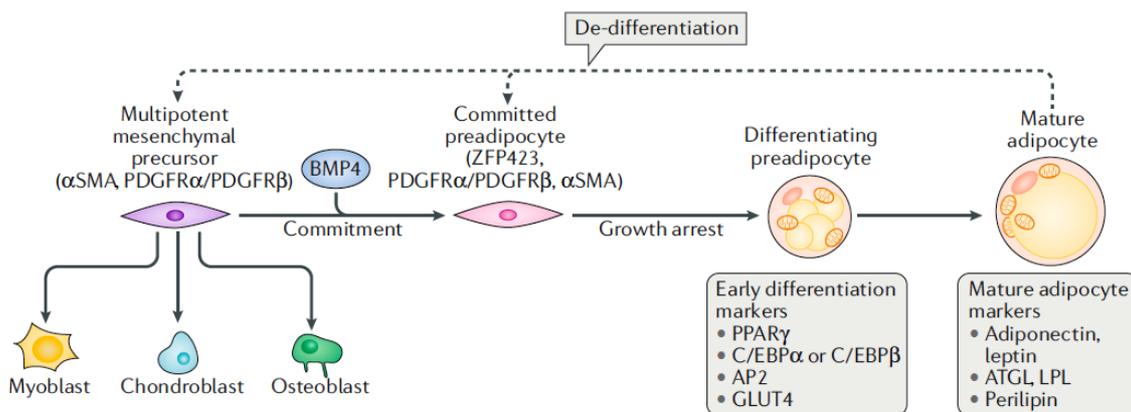


Ilustración 7. Mecanismos moleculares de adipogénesis. El proceso de diferenciación a adipocitos está compuesto por varias fases. La primera consiste en una fase de compromiso donde los precursores mesenquimales multipotentes quedan restringidos al linaje adipocítico. La segunda consiste en una fase de diferenciación terminal donde se produce la detención del crecimiento donde se inicia la diferenciación a adipocitos y la maduración de los adipocitos. Evidencias recientes sugieren la existencia de un proceso de desdiferenciación donde los adipocitos maduros podrían involucionar hasta estados previos del proceso de diferenciación. Fuente: Ghaben y Scherer, 2019.

2.5.1.3. DESDIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS

Además del proceso de diferenciación, recientemente se ha sugerido que los adipocitos podrían desdiferenciarse y volver a un estado de precursor de tipo fibroblasto (*fibroblast-like*). Ello se deduce de estudios en modelos animales donde se han visto fibroblastos de origen adipogénico durante la cicatrización (Plikus et al., 2017) y la fibrosis dérmica (Marangoni et al., 2015).

2.5.2. LIPÓLISIS

La lipólisis es una reacción catabólica que moviliza lípidos almacenados en el tejido adiposo para obtener energía en función de las demandas energéticas del organismo. Se produce la hidrólisis de los TG almacenados y se liberan ácidos grasos no esterificados y glicerol a la circulación, donde son utilizados por otros tejidos como sustrato energético. Las tasas de lipólisis están influenciadas por cambios del estado nutricional, y están reguladas por señales hormonales y bioquímicas que modulan la actividad de las enzimas lipolíticas y otras proteínas sin actividad enzimática, para obtener la respuesta adecuada en función de las necesidades y la disponibilidad de las reservas (Duncan et al., 2007; Bartness et al., 2014).

La lipólisis está catalizada por tres lipasas principales: HSL, ATGL (también conocida como PNPLA2 de fosfolipasa similar a la patatina-2), y MGL (lipasa de monoacilglicerol). Estas tres lipasas actúan de forma secuencial para producir la degradación de TG almacenado en el tejido adiposo, liberando tres ácidos grasos no esterificados y glicerol. Sin embargo, esta hidrólisis de los TG puede revertirse a través de la reesterificación y reciclaje de los AGL (Yang y Mottillo, 2020).

Durante la lipólisis, la primera lipasa encargada de iniciar el proceso es la HSL, y su actividad está regulada principalmente por catecolaminas a través de receptores adrenérgicos. De forma resumida, la secuencia de las reacciones es la siguiente: ATGL produce la hidrólisis de los TG para formar diacilgliceroles (DAG), liberándose un AGL; a continuación, DAG se convierte en monoacilglicerol (MAG) a través de la acción de la MGL liberándose un AGL o, en cambio, se hidroliza totalmente por la HSL con la liberación de dos AGL y un glicerol (Saponaro et al., 2015).

La modulación del SNS sobre el tejido adiposo está controlado por factores celulares, y por número, afinidad y tipo de los AR localizados en la membrana de los adipocitos (Collins et al., 2004; Langin, 2006). Los AR tienen un papel muy importante en la lipólisis ya que grado de respuesta depende de qué tipo de AR se active. La activación de los AR beta (subtipos 1-3) estimulan, mientras que la activación de los AR- α_2 , inhiben la lipólisis (Collins, 2011; LaFontan y Berlan, 1995). La contribución al resultado final de ambos AR depende del depósito de WAT, especie, sexo, edad y adiposidad (Carpéné C et al., 1998).

La NA y la A son las principales catecolaminas que estimulan la lipólisis en adipocitos (Carpéné et al., 1998; Shi y Collins, 2017).-La activación mediante estas catecolaminas se produce a través de los AR- β_3 en roedores y β_1 and β_2 en humanos (LaFontan y Berlan, 1995; Langin et al., 2006). A su vez, estos receptores se encuentran acoplados a la proteína Gs y promueven la activación de la AC que incrementa de AMPc. Posteriormente, AMPc activa PKA, que a su vez fosforila y activa PNPLA2/ATGL o HSL, desencadenando la reacción lipolítica previamente descrita (Bartness et al., 2014; Yang y Mottillo et al., 2020).

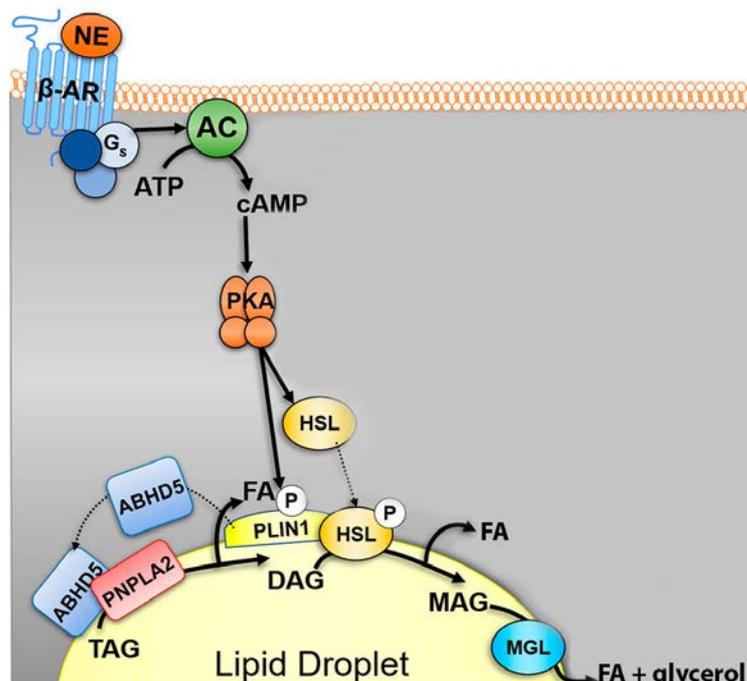


Ilustración 8. Estimulación de la lipólisis mediada por noradrenalina (NA) a través AR- β_3 . La activación de AR- β_3 por NA (NE en la ilustración) activa la vía Gs/AC/PKA. A su vez, PKA fosforila a PLIN1 (perilipin-1), que libera ABHD5 (dominio α/β hidrolasa que contiene la proteína 5), lo que permite la activación de PNPLA2 (lipasa adipocítica de adipocitos), produciéndose la hidrólisis de los TG para obtener DAG (diacilglicerol) y un AGL (ácidos grasos libres, FA en la ilustración). A su vez, PKA también fosforila a HSL (lipasa sensible a hormonas), que se une a PLIN1 e hidroliza DAG. Formándose MAG (monoacilglicerol) y un AGL. Finalmente, MAG se hidroliza por la enzima MGL y se libera un AGL y glicerol. Fuente: adaptado de Yang y Mottillo, 2000.

2.6. REMODELACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo puede expandirse a expensas del tamaño de adipocito (hipertrofia), a expensas del número de adipocitos (hiperplasia), o a una mezcla de ambos. En la obesidad, el aumento del WAT es debido tanto a hipertrofia como a hiperplasia (Faust y Miller, 1981), y en casos extremos este tejido puede alcanzar 2/3 del peso corporal

total. De forma general, un balance energético positivo induce la hipertrofia del adipocito al aumentar el contenido de grasa en su gota lipídica. Cuando el adipocito alcanza tamaño crítico, se estimula la maduración de preadipocitos dando lugar a hiperplasia. No obstante, este umbral varía según el tipo de depósito, factores genéticos, nutricionales y ambientales (Hirsch y Batchelor, 1976).

2.6.1. IMPORTANCIA DEL DESARROLLO TEMPRANO

Los depósitos de tejido adiposo ya están presentes en la semana 28 del desarrollo fetal (Poissonnet et al., 1984). En condiciones fisiológicas presentan un grado máximo de hiperplasia durante 2 etapas: al final del desarrollo fetal y primeras semanas de vida, y durante la pubertad (Knittle et al., 1979). Esto se correlaciona con los periodos de máximo crecimiento en estatura y de otros órganos. En ocasiones, la hiperplasia puede persistir en el primer año o dos años de vida, especialmente en niños obesos. La importancia de este hecho viene dada porque la hiperplasia es un proceso irreversible, así que el número total de adipocitos en la edad adulta vendrá dado por el número acumulado al final de la pubertad (Bonnet, 1981). No obstante, factores ambientales y genéticos influyen también, según observaciones de estudios con gemelos homocigotos (Heinonen et al, 2016).

2.6.2. CONSECUENCIAS FISIOPATOLÓGICAS SEGÚN LOS DEPÓSITOS ADIPOSOS IMPLICADOS

Los depósitos viscerales tienden a contener de forma inherente adipocitos de mayor tamaño (hipertróficos) que los subcutáneos (Wang QA et al., 2013; Gawronska-Kozak et al., 2014). Esto además es independiente del estado metabólico e IMC (Liu et al., 2009). Estas aseveraciones provienen en parte de estudios *in vitro*, en los que se observó un mayor potencial para la hiperplasia en adipocitos provenientes de tejido subcutáneo que del visceral (Baglioni et al., 2012). Sin embargo, un experimento *in vivo* en modelo de roedor encontró hallazgos opuestos: una dieta hipercalórica indujo hiperplasia del tejido perigonadal (visceral), pero no del inguinal (subcutáneo) (Wang QA et al., 2013).

Pese a la naturaleza contradictoria de estos datos, se pone de manifiesto que tejido visceral y subcutáneo presentan diferentes comportamientos en la obesidad. El grado de hipertrofia o hiperplasia está implicada en la fisiopatología de la obesidad y el

síndrome metabólico (SM), como se explica a continuación.

2.6.3. HIPERTROFIA ADIPOSITA

La hipertrofia del adipocito se ha relacionado con disfunción del tejido adiposo. Es bien conocida desde hace décadas la relación entre el tamaño de adipocito y la resistencia a la insulina (Salans et al., 1971, Stern et al., 1972). Un tejido adiposo hipertrófico se asocia a un mayor riesgo cardiovascular y riesgo de DM tipo 2 (Boyko et al., 2000).

En primer lugar, la hipertrofia del adipocito produce una hipoxia tisular al presentar una disminución relativa del lecho capilar que lo nutre. Esto estimula factores angiogénicos, como el factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1- α), y regula al alza genes proinflamatorios (Trayhurn, 2013). Los adipocitos hipertróficos muestran además una lipólisis basalmente más elevada (Wueest et al., 2009), liberando AGL a la sangre que contribuyen a efectos deletéreos por lipotoxicidad en otros órganos, y a la resistencia a la insulina *per se* a través de la estimulación de los receptores tipo Toll-4 (TLR-4) (Song, 2006). Estos adipocitos, además, muestran alteraciones necróticas (Strissel et al., 2007; Giordano et al., 2013), y secretan al medio sustancias proinflamatorias como TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), IL (interleucina)-6, IL-8 y MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1). A su vez, estas sustancias (en especial TNF- α) producen resistencia a la insulina mediante la fosforilación del “sustrato 1 del receptor de insulina”. Además, los adipocitos hipertróficos muestran alteración en la actina de su citoesqueleto que interrumpe el normal funcionamiento del transportador de la glucosa regulada por la insulina (GLUT-4) (Kim et al., 2015), lo que todavía contribuye más a la resistencia a la insulina (Atkinson et al., 2013).

Las citocinas proinflamatorias secretadas atraen macrófagos y linfocitos T (Chawla et al., 2011; Huh et al., 2014). Estas citocinas incrementan la secreción de todavía más sustancias proinflamatorias, perpetúan la resistencia a la insulina y estimulan la lipólisis de adipocitos, contribuyendo una vez más a los efectos deletéreos. La inflamación local se observa también en otros tejidos como hígado, músculo y páncreas, por lo que es posible que esta inflamación también induzca resistencia a la insulina en otros tejidos (Choe et al., 2016).

Además, el depósito donde deposita la grasa también se ha relacionado con la

resistencia insulina. El aumento de depósito visceral, especialmente abdominal, se ha relacionado riesgo de DM tipo II (Boyko et al., 2000), dislipemia (Wajchenberg et al., 2002), HTA (Hayashi et al., 2003) e incluso por mortalidad globalmente (Kuk et al., 2006). Algunos, incluso relacionan también el depósito de grasa subcutáneo abdominal (Smith et al., 2001). Por otro lado, el aumento del depósito subcutáneo se ha relacionado con un efecto protector (Snijder et al., 2004).

2.6.4. HIPERPLASIA ADIPOSA

El crecimiento de tejido adiposo mediante hiperplasia precisa de precursores (preadipocitos) mediante el proceso de adipogénesis. Es de esperar que aquellos depósitos con más preadipocitos tendrán más facilidad para la hiperplasia que aquellos con menos. Los preadipocitos miden alrededor de una décima parte que los adipocitos maduros, y funcionalmente pueden acumular lípidos. El WAT tiene muchos más preadipocitos que el BAT. Dentro del WAT, el tejido subcutáneo presenta mayor proporción de preadipocitos que el visceral (Tchkonina et al., 2005), lo que condiciona la forma de expansión de cada tejido: el visceral se suele expandir mediante hipertrofia y el subcutáneo mediante hiperplasia. La expansión mediante hiperplasia implica mayor número de adipocitos de menor tamaño, ya que el exceso de grasa se distribuye por un número de adipocitos mayor. Esto también condiciona una menor expansión de tejidos que se expanden mediante hipertrofia (ej. visceral), y a una disminución del riesgo cardiovascular y enfermedades metabólicas (Snijder et al., 2004). De hecho, la falta de expansión del tejido subcutáneo mediante hiperplasia se considera como un factor que conduce a la resistencia a la insulina (Gealekman et al., 2011). Estos datos son consistentes con el hecho de que el uso de tiazolidinedionas (antidiabéticos orales) en pacientes diabéticos producen un aumento de peso a expensas del tejido adiposo subcutáneo (Kang y Park, 2011) y mejoran su resistencia a la insulina.

Esta plasticidad para la hiperplasia es inversamente proporcional a la tasa de recambio o *turnover* de los TG contenidos en él. La tasa de recambio depende de la capacidad del tejido para promover la lipólisis y lipogénesis. El tejido subcutáneo posee una tasa de recambio inferior al visceral (Caserta et al., 2001; Sackmann-Sala et al., 2012), lo que podría tener implicaciones fisiopatológicas.

3. PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON DISFUNCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO

3.1. OBESIDAD

La obesidad es un estado patológico del organismo caracterizado por un exceso de grasa corporal suficiente como para tener efectos negativos en la salud. Generalmente se considera obesa a una persona con IMC $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ y con sobrepeso si se encuentra entre 25 y 30 kg/m^2 . Se trata de una aproximación sencilla para calcular la cantidad de adiposidad en un individuo. Sin embargo, no es del todo precisa, pues no tiene en cuenta la variabilidad de otros componentes como tejido muscular (ej. una persona hipermusculada puede tener un IMC elevado sin estar obeso), acuoso (ej. estado edematoso), u óseo (ej. osteoporosis). Otra definición operativa de obesidad es la presencia de un perímetro de cintura $\geq 102 \text{ cm}$ en hombres y $\geq 88 \text{ cm}$ en mujeres, pues ello se considera un factor de riesgo cardiovascular independiente, y se ha asociado con la resistencia a la insulina y SM (ver apartado 3.2 de introducción). Por ello, también se puede considerar una persona obesa con IMC normal, si existen un exceso de adiposidad visceral, que se traduce clínicamente con aumento del perímetro abdominal o datos sugestivos de hiperinsulinemia (Ruderman et al., 1998)

Existen diferentes patrones anatómicos de acumulación de grasa. La obesidad central o androide se caracteriza por acumulación de grasa en el abdomen, tórax, hombros y nuca. Se asocia a forma de “manzana” y es más común en hombres. En la obesidad periférica o ginecoide se acumula grasa alrededor de caderas, muslos y senos. Se asocia a forma de “pera” y es más común en mujeres. Este dimorfismo sexual, aunque no está siempre presente, se cree que es debida a la presencia de testosterona (que facilitaría el depósito visceral) y estrógenos (que inhibirían dichos depósitos). La obesidad central se debe a un mayor depósito de grasa visceral y, por tanto, factor de riesgo cardiovascular. La obesidad periférica se debe a un mayor depósito de grasa subcutánea y se le atribuye efecto protector cardiovascular (Després, 2012).

Cabe mencionar que estos dos patrones no son dos categorías discretas, sino que forman parte de un espectro continuo.

3.2. SÍNDROME METABÓLICO Y RESISTENCIA A LA INSULINA

El SM, también llamado “síndrome de resistencia a la insulina” o “síndrome X”, es en realidad una constelación de características clínicas en un mismo individuo. Se caracteriza por la presencia de obesidad, resistencia a la insulina, dislipemia y HTA, que conducen a un aumento del riesgo cardiovascular. La presencia simultánea de estos factores de riesgo en una misma persona podría tener vías fisiopatológicas comunes: un aumento del tejido adiposo, especialmente abdominal, conduciría a una resistencia a la insulina, alteración en la captación de ácidos grasos, secreción anormal de adipocinas, inflamación, disfunción endotelial, HTA y desarrollo de aterosclerosis (DeFronzo y Ferrannini, 1991). No obstante, todavía no se ha podido definir con detalle una vía fisiopatológica común que los una, ya que la resistencia a la insulina podría no estar presente en todas las personas con este síndrome. Además, no se ha podido demostrar que la presencia simultánea de estos factores suponga un riesgo adicional a la presencia de cada factor por separado (Sundström et al., 2006). Los criterios para definir este síndrome son además variables. Por ello, existe controversia con respecto a la existencia de este “síndrome” como entidad propia y a su utilidad diagnóstica en la práctica clínica (Grundy et al., 2005).

El SM se caracteriza por la presencia de inflamación de bajo grado, sistémica y local en el tejido adiposo abdominal. La inflamación local del tejido adiposo produce la liberación de adipocinas por parte del tejido y su posterior aumento en sangre, lo que contribuye a perpetuar la inflamación (Bastard et al., 2006; Elks y Francis, 2010).

A la larga, el estado inflamatorio provoca alteraciones neuroinmunoendocrinas que provocan un incremento de los niveles de citocinas proinflamatorias en tejido y plasma, un aumento de NT (NGF y BDNF) en plasma, disautonomía, alteraciones hormonales y de neurotransmisores, activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, alteraciones inmunológicas, insulino-resistencia y aterosclerosis (Chaldakov, 2010).

3.2.1. DEFINICIÓN DE SÍNDROME METABÓLICO

Existen varias definiciones, pero el más utilizado es el definido por el *National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP-III)*. Según esta definición, requiere la presencia de 3 de los siguientes 5 criterios. Nótese que no es necesaria la presencia de obesidad abdominal ni la presencia de resistencia a la insulina.

- Obesidad abdominal, definida como perímetro de cintura ≥ 102 cm en hombres y ≥ 88 cm en mujeres.
- TG ≥ 150 mg/dL o tratamiento para bajar TG.
- Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) $<$ de 40mg/dL en hombres y $<$ 50mg/dL en mujeres, o necesidad de tratamiento para bajar colesterol.
- Tensión arterial $\geq 130/85$ mmHg, o necesidad de tratamiento antihipertensivo.
- Glucemia en ayunas ≥ 100 mg/dL o necesidad de tratamiento antidiabético.

3.2.2. CONCEPTO DE RESISTENCIA A LA INSULINA

La resistencia a la insulina se puede definir como una respuesta biológica disminuida a concentraciones normales de insulina. En la práctica se puede evaluar como una menor disposición de glucosa circulante (Moller y Flier, 1991). Se ha relacionado con hiperinsulinismo compensador y mayor riesgo de DM tipo 2, HTA y otras enfermedades como síndrome de ovarios poliquísticos.

También se ha desarrollado con los procesos de disfunción endotelial, inflamación y coagulación, que conducen a la aterosclerosis.

Causas

La causa más frecuente es la obesidad, que suele ser central o abdominal, pero también ectópica (ej. depósitos en músculo o hígado). Sin embargo, también puede ser primaria (de origen genético), o secundaria a otras causas (inducidas por estrés o infección por activación de hormonas contrarreguladoras, medicaciones como glucocorticoides, inactividad física, embarazo, inmunomediadas, etc.) (Semple et al., 2011).

Evaluación

El *gold standard* para medir la resistencia a la insulina es el *clamp* euglucémico hiperinsulinémico pero su uso es muy complejo, y por lo tanto, se suele recurrir a estimaciones más sencillas aunque menos exactas. La más utilizada, y la que usamos en la presente tesis con nuestros pacientes, es el HOMA-IR (de las siglas en inglés para “modelo homeostático de resistencia a la insulina). Se trata de una fórmula que relaciona los niveles de glucemia e insulinemia en ayunas (Matthews et al, 1985).

La fórmula para calcular el HOMA-IR, cuando se mide la glucemia en mg/dL, y la insulinemia en $\mu\text{U} / \text{mL}$ es la siguiente:

$$\text{HOMA} - \text{IR} = \frac{\text{glucemia en ayunas} \times \text{insulinemia en ayunas}}{405}$$

Habitualmente se establece un punto de corte alrededor de 3,2 en base al percentil 75 de la población general (Ascaso et al., 2001). No obstante, los valores de normalidad son difusos, y establecer un umbral puede clasificar erróneamente a pacientes con resistencia a la insulina (Martinez-Hervas et al., 2011). Lo fundamental en este valor es que, a mayor insulinemia o glucemia, mayor es el producto representado por el HOMA-IR, lo que indica una mayor resistencia a la insulina.

A pesar de todo, los resultados se han de interpretar con cautela ya que existen limitaciones, como cambios en la función de los islotes beta pancreáticos, falta de estandarización en las técnicas de detección de insulina, casos raros de mutaciones en el gen de la insulina, etc. (Steiner et al.,1990).

4. RELACIÓN ENTRE NEUROTROFINAS CON LA DISFUNCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO

4.1. PAPEL ENDOCRINO DE LAS NEUROTROFINAS. NEUROTROFINAS COMO ADIPOCINAS

Aunque al tejido adiposo se le atribuyó durante mucho tiempo una función de reserva energética, hoy en día se considera el mayor órgano endocrino y paracrino del cuerpo humano. El punto de partida para este nuevo pensamiento fue el descubrimiento de la leptina (Zhang Y et al., 1994).

En su papel como órgano endocrino, el tejido adiposo secreta proteínas de señalización llamadas globalmente adipocinas. Las más conocidas son la leptina y la adiponectina. No obstante, en los últimos años se han descrito otras moléculas secretadas por el tejido adiposo como son los factores neurotróficos, entre los que destacan NGF y BDNF (Chaldakov et al., 2014). Muchas de las adipocinas secretadas por el tejido adiposo, están vinculadas con la inflamación como, por ejemplo: TNF- α , IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10 y haptoglobina. Entre ellas también se encuentran la leptina y la adiponectina (Trayhurn y Beattie, 2001). En suma, varios estudios relacionan los niveles circulantes de estas adipocinas con el IMC, grasa corporal y en algunos casos, con alteraciones del metabolismo de la glucosa y lípidos (Bulló et al., 2007).

En general, estas adipocinas son secretadas por el tejido adiposo y ejercen acciones endocrinas y paracrinas a través de las cuales median procesos biológicos como la ingesta de comida, la inmunidad, la inflamación, la memoria, el estado de ánimo y el metabolismo. Dentro de los efectos metabólicos destaca el mantenimiento de la homeostasis glucídica, lipídica y energética, cardioprotección, neuroprotección y envejecimiento (Chaldakov et al., 2014).

4.2. EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LAS NEUROTROFINAS EN TEJIDO ADIPOSO

4.2.1. NGF y BDNF

Las NT más estudiadas en tejido adiposo son NGF y BDNF. Varios estudios indican que el tejido adiposo secreta NGF Y BDNF (Chaldakov et al., 2004; Ryan et al., 2008). Debido a sus acciones en el metabolismo, ambas han sido denominadas metabocinas (Sornelli et al., 2007).

NGF y BDNF median efectos neurotróficos y metabotróficos relacionados con la obesidad, la DM tipo 2 y el SM (Hristova, 2013). Entre sus acciones destacan sus efectos metabotróficos en la homeostasis glucídica, lipídica y energética (Unger et al., 2007) así como en la homeostasis cardiometabólica y cardioprotección (Chaldakov et al., 2010).

Varios estudios indican que los niveles de NGF y BDNF están disminuidos en patologías como la aterosclerosis coronaria, el síndrome coronario agudo (Chaldakov et al., 2004), el SM (Geroldi et al., 2006; Bulló et al., 2007), la obesidad y la DM tipo 2 (El-Gharbawy et al., 2006; Yamanaka et al., 2006; Bulló et al., 2007; Sposato et al., 2007; Unger et al., 2007). Además, algunas evidencias indican que los niveles de ambas NT también pueden alterarse en situaciones de estrés (Fiore et al., 2009).

Otro estudio identificó que roedores sometidos a estrés experimental o ratas con DM tipo I, presentaban alteraciones en los niveles de NGF y BDNF en WAT (epicárdico) y BAT (interescapular) (Sornelli et al., 2009). En este estudio se hipotetiza un posible origen de NGF y BDNF en los mastocitos presentes en el tejido adiposo, ya que estudios previos señalan la presencia de estas NT en mastocitos (Vega et al., 2003; Chaldakov et al., 2010). Además, esta idea está apoyada por las evidencias que indican que en condiciones de estrés o DM los mastocitos sufren cambios en la degranulación (De Simone et al., 1990; Cirulli et al., 1998).

Existen algunas evidencias contradictorias con respecto a los niveles de NGF y BDNF en plasma en patologías cardiometabólicas. Un estudio con un grupo pequeño de pacientes con patología cardiovascular o SM señaló un déficit sistémico de NGF y BDNF (Chaldakov et al., 2001, 2004). En contraposición, otro estudio posterior mostró que NGF está incrementado en pacientes con sobrepeso, obesidad mórbida y SM (Bulló et al., 2007).

Sin embargo, este incremento fue menos pronunciado en aquellos sujetos obesos mórbidos. Además, este estudio encontró una relación negativa entre los niveles de NGF con el cHDL y la apolipoproteína A. Con respecto a los niveles de BDNF, únicamente se encontró un ligero aumento no significativo en obesos mórbidos.

Entre las evidencias del papel metabotrófico de NGF destaca que las células β pancreáticas secretan NGF y expresan su receptor TrkA, que a su vez está implicado en la patología de la DM. Además, NGF favorece la cicatrización de úlceras diabéticas en la piel (Generini et al., 2004).

Varias evidencias indican una relación entre BDNF y la ingesta de comida. Se ha visto que, en ratones, la expresión de BDNF se reduce durante el ayuno (Xu et al., 2003). Además, ratones KO de BDNF presentan hiperfagia (Rios et al., 2001). Por otro lado, la administración exógena de BDNF reduce la ingesta (Pelleymounter et al., 1995).

En humanos la experiencia es más limitada, pero la delección de un alelo de BDNF se ha observado en niños con síndrome con obesidad severa, hiperfagia, hiperactividad y alteración cognitiva (Gray et al., 2006). La mutación de su receptor TrkB también se asocia a un síndrome similar (Yeo et al., 2004). Igualmente, niños con el síndrome “tumor de Wilms- aniridia” (WAGR) presentan delecciones del cromosoma 11p.12 que incluyen el locus del BDNF y presentan obesidad precoz (Han et al., 2008).

Otro estudio demuestra que BDNF tiene efectos antidiabéticos y anorexigénicos (Geroldi et al., 2006; Lebrun et al., 2006; Yamanaka et al., 2006; Unger et al., 2007).

En suma, todas estas evidencias tanto en humanos como en modelos animales apuntan a BDNF como un factor regulador del peso, y que lo hace – al menos en parte- a través de la reducción de la ingesta.

4.2.2. NT3

Entre las NT estudiadas como metabocinas, destacan los estudios de NGF y BDNF. Sin embargo, solo algunos estudios indirectos estudian la posible función de NT3 como metabocina.

Un estudio analizó los niveles en plasma de NT3 en mujeres con diferentes grados de adiposidad, obesidad y SM. Los niveles de NT3 estaban relacionados positivamente con

el IMC y la circunferencia de cadera en pacientes con sobrepeso (IMC 25-40 kg/m²) y obesidad mórbida (IMC 40 kg/m²) vs pacientes control (IMC 18,5 – 24,9 kg/m²). En cambio, NT3 se correlaciona negativamente con la concentración de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) y pacientes con hipertrigliceridemia tienen niveles de NT3 más bajos. Por ello, NT3 parece estar más relacionada con el perfil lipídico que con el grado de adiposidad, la distribución de la grasa corporal y los marcadores de inflamación sistémica (Bulló et al., 2007).

Por el contrario, otro estudio describe que un grupo de pacientes varones y alcohólicos con obesidad presentan niveles elevados de NT3 en suero que están positivamente asociados con el IMC. Asimismo, describen una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de NT3 y los niveles de cLDL (Popa-Wagner et al., 2013).

A pesar de estos antecedentes, no está clara la función que ejerce NT3 en el tejido adiposo ya que no ha sido analizada previamente su presencia y función en el mismo.

TEORÍA NEUROTRÓFICA DE LA ETIOPATOGENIA DEL SÍNDROME METABÓLICO

La teoría neurotrófica del SM aparece en 2006 (Hristova y Aloe, 2006) y plantea que las NT tienen un papel importante en el desarrollo del SM. Esta teoría indica que los niveles de NT cambian durante la progresión del SM. En estados iniciales, hay un aumento de NGF que produce una hiperactivación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal con aumento de los niveles de cortisol y disminución de sensibilidad de los receptores de leptina, como mecanismo compensatorio del estado inflamatorio. En cambio, los estados avanzados se caracterizan por presentar hiponeurotrofinemia reflejando la claudicación del mecanismo compensatorio. Este déficit metabotrófico deriva en alteraciones patológicas como obesidad, DM tipo 2, SM y aterosclerosis (Chaldakov et al., 2001; Hristova, 2013).

4.3. MECANISMOS FISIOLÓGICOS DE SEÑALIZACIÓN DE LAS NEUROTROFINAS EN TEJIDO ADIPOSO

4.3.1. SEÑALIZACIÓN CON FIBRAS NERVIOSAS AFERENTES

El tejido adiposo libera factores neurotróficos como NGF y BDNF, y las fibras aferentes (o sensitivas) locales expresan sus receptores (Rosell et al., 2014; Christian, 2015; Nakagomi et al., 2015; Cao et al., 2018). Estas fibras aferentes se comunican con el sistema nervioso central (SNC) para mediar respuestas efectoras a distancia a través del SNS, como el *browning* del WAT (Garretson et al., 2016). De hecho, la denervación selectiva de las fibras aferentes del WAT suprime la respuesta efectora simpática y la termogénesis en depósitos de BAT distantes (Nguyen et al., 2018).

Además de factores neurotróficos, otros factores liberados por el tejido adiposo (como leptina, ácidos grasos, VEGF o citocinas) pueden actuar sobre fibras nerviosas aferentes produciendo efectos diversos (Guilherme et al., 2019).

4.3.2. SEÑALIZACIÓN CON FIBRAS NERVIOSAS EFERENTES

Es conocida la importancia de la inervación simpática del WAT y BAT para la respuesta termogénica frente al frío (Schulz et al., 2013). Asimismo, la simpatectomía regional conduce a un compromiso en la termogénesis y a ratones susceptibles de sufrir obesidad (Pereira et al., 2017). Por tanto, es de suponer que la inervación SNS sobre estos tejidos es de gran importancia para la regulación del metabolismo energético.

Es posible que las NT producidas por el tejido adiposo actúen directamente sobre las fibras nerviosas simpáticas (eferentes) a nivel local a modo de retroalimentación. El estímulo del WAT o BAT por NA libera a su vez factores como NGF y BDNF (Guilherme et al., 2019) que pueden actuar sobre las fibras nerviosas simpáticas. A su vez, el estímulo crónico con NA contribuye al *browning* del WAT que también produce alguno de estos neuropéptidos. Por ello, es plausible que estos factores actúen en un circuito de retroalimentación positiva para promover la inervación simpática durante la respuesta termogénica al frío y el *browning*. De hecho, la inhibición de NGF y su receptor TrkA suprime el *browning* del WAT (Cao et al., 2018).

OBJETIVOS

El objetivo de la presente tesis es determinar si hay expresión de NT3 y TrkC en el tejido adiposo de humanos y roedores, para poder estudiar el papel de la vía NT3/TrkC como modulador del metabolismo energético y su relación con enfermedades metabólicas y el envejecimiento.

Para ello, nos propusimos estudiar los siguientes aspectos:

1. Determinar la expresión génica y proteica de NT3 y TrkC en tejido adiposo y adipocitos de roedores y humanos.
2. Estudiar el rol de la vía NT3/TrkC en procesos como lipólisis y adipogénesis.
3. Analizar, en dos modelos de ratones modificados genéticamente con expresión reducida de NT3, la presencia de cambios en expresión génica e histológicos. Así como cambios en la expresión de UCP-1.
4. Analizar la expresión génica y proteica de NT3 y TrkC en tejido adiposo en un modelo de rata con síndrome metabólico y estudiar si existen alteraciones en la reactividad vascular.
5. Evaluar la existencia de cambios en la expresión de NT3/TrkC en una población de pacientes con obesidad moderada-severa y síndrome metabólico.
6. Analizar si la expresión génica de NT3 y su receptor se ve influenciada por la edad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MODELOS CELULARES

1.1. PREADIPOCITOS HUMANOS

Los preadipocitos blancos humanos (C-12732) fueron adquiridos de Promocell como células humanas primarias. Como indica el fabricante, los preadipocitos fueron aislados de tejidos humanos (tejido adiposo subcutáneo o visceral) obtenidos de centros médicos autorizados y siempre siguiendo estrictos estándares éticos. Tras el aislamiento, las células fueron criopreservadas en medio serum-free PromoCell Cryo-SFM (C-22912), para asegurar una congelación óptima y, por tanto, una elevada viabilidad celular tras el descongelado.

Siguiendo el protocolo de Promocell, una vez descongelados en un baño de agua a 37°C durante 2 minutos, los preadipocitos en fase 2 se sembraron con una densidad de 5000 células/cm² y se cultivaron con medio de crecimiento (Preadipocyte Growth Medium SupplementMix C-39427, PromoCell). A las 24 horas se realiza un cambio de medio para eliminar las células muertas y a partir de ese momento se realizaron cambios de medio cada 48 horas. Una vez en fase 3 y a una confluencia del 80-90%, las células se utilizan para iniciar el proceso de diferenciación o determinar la expresión génica.

1.2. ADIPOCITOS HUMANOS

Los adipocitos humanos fueron obtenidos tras la diferenciación de los preadipocitos de PromoCell siguiendo los pasos que indica el fabricante. En líneas generales, una vez los preadipocitos se han cultivado hasta fase 3 se inicia el proceso de diferenciación. Para ello, se cambia el medio de crecimiento de preadipocitos por el medio de diferenciación (Preadipocyte differentiation medium C-27436, Promocell) durante 72 horas para diferenciar los preadipocitos en adipocitos. Pasado este tiempo, se vuelve a cambiar el medio por un medio de nutrición de adipocitos (Adipocyte nutrition medium C-27438, Promocell) para completar el proceso de diferenciación. A partir de este momento, se cambia el medio de nutrición cada 48 horas. Pasados 15 días el proceso de maduración de los adipocitos se completó y se hicieron los experimentos.

En caso de diferenciación en presencia de estímulos, el proceso es el mismo pero el medio de nutrición de los adipocitos se complementa con los distintos estímulos a

estudiar tal y como se explica en el apartado 6 tabla 5 de la sección de materiales y métodos.

Todos los medios empleados están suplementados con los antibióticos gentamicina 50 ug ml⁻¹ (Gente-Gobens®; Normon) y anfotericina 50 ng ml⁻¹ (Biowhittaker®; Cambrex). En todo momento las células se cultivaron en condiciones de esterilidad, a 37°C en un incubador con 5% de CO₂. Todos los procedimientos se llevaron en las instalaciones del servicio de cultivos celulares y citometría flujo de la Universidad de Valencia.

Con los adipocitos diferenciados se realizaron distintos experimentos: determinación de la expresión génica y proteica y diferenciación en presencia de diferentes estímulos.

2. MODELOS ANIMALES

Para abordar los diferentes experimentos realizados a lo largo de la presente tesis doctoral, se utilizaron varios modelos animales, así como animales modificados genéticamente. Los distintos modelos fueron:

- Ratas Wistar de diferentes edades.
- Ratas Zucker obesas (fa/fa) y sus controles, Ratas Zucker no obesas.
- Ratones Ntf3^{flox1/flox2}; Tie2-cre⁺⁰ y sus controles, Ntf3^{flox1/flox2}; Tie2-cre^{0/0}.
- Ratones Ntf3^{+lacZneo} y sus controles Ntf3^{+/+}.

El cuidado y tratamiento de los animales, así como los procedimientos experimentales cumplen con la guía ARRIVE (del inglés: Animal Research: Reporting In Vivo Experiments) y se realizaron siguiendo la legislación española recogida en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, sobre «Protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos» el cual transpone y desarrolla la Directiva de la Unión Europea (2010/63/UE). Además, todos los protocolos utilizados han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Valencia.

Todos los animales fueron estabulados hasta su sacrificio, siguiendo ciclos de luz-oscuridad de 12 horas a una temperatura ambiente (TA) de 22°C y 60% de humedad, con alimentación artificial y agua de bebida ad libitum.

2.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

2.1.1. RATAS WISTAR

Se emplearon ratas Wistar macho de 16 y 72 semanas de edad (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, Spain), criadas en el servicio de Producción animal del SCSIE de la Universidad de Valencia. Las ratas Wistar de 16 semanas tenían un peso de 250-300 gramos y las de 72 semanas un peso de 450-550 gramos.

2.1.2. RATAS ZUCKER

Las ratas obesas Zucker (fa/fa) son un modelo animal con resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, dislipemia y síndrome metabólico que desarrollan obesidad. La mutación en el gen *Lepr^{fa}* fue descubierta en 1961 por Lois y Theodore Zucker en la población de ratas consanguíneas 13 M. Se trata de una mutación en el receptor de la leptina que se hereda como carácter autosómico recesivo y condiciona al desarrollo de obesidad. Los animales homocigotos para el alelo fa, más conocidos como ratas Zucker obesas, acusan obesidad entre la tercera y la quinta semana de vida (Vickers et al., 2011).

En el presente estudio se emplearon ratas Zucker macho obesas y sus controles (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) de 35 semanas de edad.

2.1.3. RATONES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE

Para este trabajo se utilizaron ratones cedidos por el Centro de Investigaciones Biomédicas en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, perteneciente al Departamento de Biología Celular (Universidad de Valencia). Los animales fueron criados en el servicio de Producción animal del SCSIE de la Universidad de Valencia.

Ratones *Ntf3*^{+/*lacZneo*} (NT3^{+/-}) y sus controles *Ntf3*^{+/+} (NT3^{+/+})

Este modelo consiste en ratones transgénicos NT3^{+/*lacZneo*}, con expresión parcial de NT3, creados usando recombinación homóloga de un constructo incorporado a células madre embrionarias (Fariñas et al., 1994). La región que codifica para la proteína NT3 ha sido reemplazada por el gen *lacZ* que codifica para β-galactosidasa. Los animales de genotipo *Ntf3*^{+/+} utilizados como controles fueron de igual fondo genético que los mutantes analizados, en este caso CD1/ICR.

A partir de ahora, se nombrarán a los ratones heterocigotos $Ntf3^{+/\text{lacZneo}}$, con expresión reducida de NT3 en el organismo, ratones NT3^{+/-}; y a sus controles $Ntf3^{+/+}$, que expresan el 100% de la NT3 en el organismo, ratones NT3^{+/+}.

Se utilizaron animales adultos machos de genotipo heterocigoto NT3^{+/-} y control NT3^{+/+} con edades comprendidas entre 35 y 41 semanas. Los controles pertenecían a la misma camada que los heterocigotos.

Ratones $Ntf3^{\text{flox1/lox2}}$; Tie2-cre^{+/0} y sus controles, $Ntf3^{\text{flox1/lox2}}$; Tie2-cre^{0/0}.

Este modelo consiste en ratones transgénicos vienen del cruce de dos tipos de cepas de ratones que son los $Ntf3^{\text{flox1/lox2}}$ (B6.129S4-Ntf3tm2Jae/J) y los Tie2-cre^{+/0} (B6.Cg-Tg(Tek-cre)1Ywa/J), ambos obtenidos en *The Jackson Laboratory*.

Los ratones $Ntf3^{\text{flox1/lox2}}$ son ratones mutantes que poseen sitios *loxP* flanqueando el gen *Ntf3*. Por otra parte, los ratones Tie2-cre^{+/0}, tienen el transgén Tie2-Cre (Tek-Cre) que contiene el promotor del receptor tirosin quinasa de angiopoyetina específico endotelial (Tie2/Tek) dirigiendo la expresión de la recombinasa Cre. Estos ratones transgénicos Tek-Cre delecionan las secuencias que tienen sitios *loxP* en células endoteliales. Por ello, una parte de la descendencia, empleada en la presente tesis, son ratones que no expresan NT3 endotelial.

A partir de ahora, se nombrarán a los ratones mutantes $Ntf3^{\text{flox1/lox2}}$; Tie2-cre^{+/0}, que no expresan NT3 en el endotelio, ratones eNT3⁻; y a sus controles $Ntf3^{\text{flox1/lox2}}$; Tie2-cre^{0/0}, que no expresan NT3 en el endotelio, ratones eNT3⁺.

Se utilizaron animales adultos macho de genotipo mutante y sus controles con edades comprendidas entre 50 y 63 semanas. Los controles pertenecían a la misma camada que los mutantes.

2.2. SACRIFICIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se anestesió a los animales usando el anestésico inhalatorio volátil isoflurano (IsoFlo[®], Esteve). El sacrificio de los animales se realizó a primera hora de la mañana por decapitación y posterior exanguinación.

Durante todo el proceso se tuvieron en cuenta las recomendaciones para la eutanasia de los animales, de la Dirección general de medio ambiente (DGXI) de la Comisión

Europea, para el sacrificio con el mínimo sufrimiento físico y mental del animal (Close y et al., 1996).

2.3. EXTRACCIÓN DE TEJIDO ADIPOSO

El procedimiento empleado para la disección de los diferentes tipos de tejido adiposo es común tanto en rata como en ratón. En el caso de existir alguna diferencia, se indica en el procedimiento. En todos los casos, cuando se va a realizar posteriormente extracción de RNA o proteínas, se congeló inmediatamente el tejido a -80°C hasta su posterior uso para evitar la degradación tisular.

Los nombres, las siglas y la tipología de cada uno de los depósitos de tejido adiposo de rata empleados en la presente tesis, se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Nomenclatura empleada para cada uno de los tipos de tejido adiposo de modelos animales usados en la tesis.

Siglas	Naturaleza Tejido	Tipología
WAT	Visceral	Blanco
Wad	Adipocitos viscerales	Blanco
KAT	Perirrenal	Blanco
BAT	Escapular	Pardo
VAT	Perivascular	Pardo

Tejido adiposo visceral (WAT)

Se coloca al animal en posición supina y con una gasa impregnada en alcohol se limpia el abdomen del animal con el fin de esterilizar y evitar la contaminación de los tejidos a extraer. Posteriormente, con la ayuda de unas pinzas, se levanta la piel a la altura del diafragma y se incide con unas tijeras para cortar el peritoneo transversal y longitudinalmente para exponer los órganos abdominales. A continuación, se localizaron los testículos y se extrajo el tejido adiposo epididimal adherido, que en roedores es de tipología WAT.

Tejido adiposo perirrenal (KAT)

Una vez extraído el WAT, se desplazan los intestinos en sentido contralateral para alcanzar el KAT que se encuentra encapsulado alrededor de los riñones.

Tejido adiposo escapular (BAT)

Para aislar el BAT, se coloca al animal en posición prona y se limpia la zona de la espalda con ayuda de una gasa previamente empapada con alcohol para esterilizar y ayudar a la disección de la piel. Levantando la piel de la espalda con fórceps, se incide con las tijeras para cortar la dermis y la epidermis para exponer el depósito de BAT que se encuentra localizado entre las escapulas. Una vez localizado el tejido, se procede a eliminar cuidadosamente el depósito de WAT superficial que lo recubre. Finalmente, se secciona el BAT evitando diseccionar el músculo asociado a él para evitar la contaminación de la muestra.

Tejido adiposo perivascular de aorta (VAT)

Tras realizar una toracotomía, se separan los pulmones y el corazón dejando al descubierto el segmento de arteria, que se extrae disecándolo con cuidado para no dañar el vaso, desde el cayado aórtico hasta el diafragma, con ayuda de unas pinzas y tijeras de punta fina. La arteria extraída se coloca en una placa Petri que contiene la solución fisiológica de Krebs (NaCl 118 mM, KCl 4.75 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM y glucosa 11.0 mM pH= 7.5) burbujeada con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). A continuación, con la ayuda de una lupa de disección de 20 aumentos (Leica S6E), se procede a la disección del VAT, separándolo de la aorta con sumo cuidado para evitar dañar el vaso.

2.4. EXTRACCIÓN DE ADIPOCITOS DE TEJIDO ADIPOSEO VISCERAL (Wad)

El tampón empleado para el aislamiento Wad es el Krebs-Ringer bicarbonatado (KRB) enriquecido con albúmina al 3,5% peso/volumen (KRBA) y glucosa 6 mM. El KRB está formado por NaCl 118,7 mM, 4,8 mM KCl, 4,8 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 15 mM NaHCO₃. Para que la solución mantenga su estabilidad se añadió HEPES 10 mM y se gaseó con carbógeno (95% O₂-5% CO₂) durante 10-15 minutos para oxigenar la preparación. Asimismo, empleando NaOH (0,1 N), se ajustó el tampón KRB hasta un pH=7.3 aproximadamente. Posteriormente, se añadió la albúmina 3,5% peso/volumen y la glucosa.

Se sacrifica a un animal, no ayunado, a primera hora de la mañana y se extrae el tejido adiposo visceral como está descrito previamente en el apartado 2.3 de la sección de

materiales y métodos. A continuación, se deposita en una placa de Petri con KRBA. Tras aislar el tejido adiposo visceral, se troceó en pequeños fragmentos y se introdujo en un tubo de polipropileno con 15 ml de KRBA y colagenasa ($1,5 \text{ mg ml}^{-1}$) a fin de disgregar el estroma conjuntivo intersticial. Posteriormente, se realizó la digestión enzimática mediante agitación vigorosa (80-90 ciclos/min) durante 30 minutos en baño a 37°C .

A continuación, se separaron los adipocitos del estroma conectivo por filtración a través de una malla. Los adipocitos filtrados quedaron en la superficie y, para eliminar la colagenasa, las células se lavaron con 15 ml de KRB a 37°C . Tras cada lavado, se agitó suavemente y se dejó el tubo durante 5 minutos en el baño hasta que se estabilizaron ambas fases; luego, se desechó la fase inferior por aspiración.

Finalmente, una pequeña muestra de los adipocitos obtenidos se colocó sobre un portaobjetos y se analizó al microscopio su integridad y tamaño.

2.5. ANÁLISIS ANTROPOMÉTRICO Y MARCADORES BIOQUÍMICOS

Se analizaron varios parámetros antropométricos con el fin de determinar si existían diferencias entre los grupos a comparar. Se analizaron cepas de ratones modificados genéticamente y un modelo animal de síndrome metabólico. En ratones, las cepas estudiadas son: ratones heterocigotos para NT3 ($\text{NT3}^{+/-}$) con sus controles ($\text{NT3}^{+/+}$), y ratones sin expresión endotelial de NT3 (eNT3^{-}) con sus controles (eNT3^{+}). Los parámetros antropométricos analizados fueron: edad, peso corporal, ratio del peso de los diferentes depósitos de tejido adiposo (WAT, KAT, BAT) frente al peso corporal, talla y perímetro abdominal. Todos estos valores están indicados en la tabla 10 del apartado 4.2 de resultados. En el caso del modelo animal de síndrome metabólico, se emplearon ratas Zucker obesas y ratas Zucker control y se determinó el peso de los dos grupos de ratas (indicado en tabla 11 del apartado 5.1 de resultados).

Para determinar la glucemia, se obtuvieron muestras de sangre de la vena safena a cargo del servicio de producción animal de la Universidad de Valencia usando técnicas rutinarias. Posteriormente los animales se sacrificaron por retirada de sangre transcardiaca y la sangre se guardó en tubos heparinizados y centrifugada a $1.500g$ a TA durante 30 minutos en *Eppendorf Centrifuge 5804-R* (Hamburg, Germany) para obtener el plasma, que fue inmediatamente congelado a -80°C para estudios posteriores. Tras

la extracción, se determinó la glucemia (mg dL^{-1}) en ayunas con el glucómetro (Contour XT[®] Bayer) y posteriormente, el perfil lipídico se determinó en plasma usando un autoanalizador (Gernonstar, Ansasia, Bombay, India).

En ratones se analizaron varios parámetros como: glucemia (mg dL^{-1}), colesterol total (mg dL^{-1}), cHDL (mg dL^{-1}), cLDL (mg dL^{-1}) y TG (mg dL^{-1}). Todos estos valores están indicados en la tabla 10 del apartado 4.2 de resultados.

En las ratas Zucker se analizaron: colesterol total (mg dL^{-1}), cHDL (mg dL^{-1}) y TG (mg dL^{-1}). El colesterol no unido a lipoproteínas de alta densidad (no-HDL) se calculó restando al colesterol total el cHDL. Todos estos valores están indicados en la tabla 11 del apartado 5.1 de resultados.

3. MODELOS HUMANOS

3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

La selección de los pacientes incluidos en el estudio fue realizada por el Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV) y el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (HCSCM) conforme a lo establecido en los principios de la Declaración de Helsinki. Los protocolos utilizados fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación de los correspondientes hospitales y forman parte de dos proyectos de investigación desarrollados por el Dr. José Tomás Real, del Hospital Clínico de Valencia, y la Dra. María Teresa Tejerina, de la Universidad Complutense de Madrid. En todos los casos se ha obtenido el consentimiento informado de los pacientes.

Las características clínicas demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio se encuentran resumidas en la Tabla 9 del apartado 1.2 de resultados para pacientes del HCSCM y en la tabla 15 del apartado 5.2.2 de resultados para pacientes del HCUV. En el caso de los pacientes de HCSCM se presentaron las características de la población en función de distintos parámetros y se encuentran en las tablas 12 (pacientes agrupados según la presencia de HTA), 13 (pacientes agrupados según la presencia de DM) y 14 (pacientes agrupados según el estilo de vida) del apartado 5.2.1 de resultados.

En todos los pacientes, la presencia de DM o HTA se confirmó con diagnóstico previo. Altura y peso se midieron sin zapatos y con ropa ligera, y el IMC fue calculado como $\text{peso(kg)/altura(m}^2\text{)}$.

3.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

3.2.1. TEJIDO ADIPOSO VISCERAL

Muestras de tejido adiposo visceral humano (hAT), que normalmente se desechan durante las intervenciones quirúrgicas se obtuvieron en ambas poblaciones. Los pacientes del HCUV (n=22) fueron seleccionados por el servicio de Endocrinología y Nutrición del mismo hospital que iban a ser sometidos a cirugía bariátrica. Los pacientes del HCSCM (n=28) fueron seleccionados por el servicio de Cirugía General del mismo hospital que iban a ser sometidos a cirugía abdominal por neoplasia de colon (n=23) u otras patologías (n=5). Se descartaron pacientes con patologías inflamatorias e infecciosas y se utilizaron muestras de tejido adiposo en las que no se observaban alteraciones macroscópicas.

Tras la extracción las muestras se conservaron a -80°C para evitar la degradación tisular hasta su posterior uso.

3.2.2 SANGRE

Muestras de sangre venosa fueron tomadas a primera hora de la mañana en ayunas. El plasma se separó de forma inmediata por centrifugación y se analizó la glucemia, TG y perfil lipídico de acuerdo a los protocolos habituales de cada centro.

4. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA (RT-PCR A TIEMPO REAL)

El análisis cuantitativo de la expresión de los diferentes genes objeto de estudio (expresión génica de NT3, TrkC y AR- β) se realizó con la técnica de RT-PCR a tiempo real en varios territorios grasos de modelos animales y humanos y córtex de roedores.

Esta técnica consta de varios pasos, entre los que se encuentran extracción y análisis cualitativo/cuantitativo del RNA total, transcripción reversa (RT), síntesis del DNA complementario (cDNA) y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR).

4.1. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS CUALITATIVO/CUANTITATIVO DEL RNA TOTAL

Dependiendo de la muestra, el protocolo de extracción de RNA total varió ligeramente. Las muestras de tejido adiposo y córtex cerebral precisaron de triturado y homogeneizado previo utilizando un mortero congelado con nitrógeno líquido para mantener siempre las muestras con temperatura óptima y así evitar su posible degradación. Las muestras celulares no necesitaron un triturado ni homogeneizado previo. Todos los experimentos se realizaron en condiciones apropiadas libres de RNAsas (RNaseZAP[®], Sigma) para evitar la degradación del RNA.

Posteriormente, todas las muestras se introdujeron en un *ependorf* que contiene 1 ml de reactivo de aislamiento (*Tripure Isolation Reagent* de Roche Applied Science) con el fin de destruir las membranas celulares y obtener los ácidos nucleicos junto con otros componentes celulares (proteínas, enzimas, lípidos, carbohidratos...) para su posterior procesamiento. Se agitó la mezcla con un vórtex durante 3 ciclos de 15 segundos a TA.

Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 12.000g durante 10 minutos y a 4°C. Al finalizar, se eliminaron los restos de tejido y/o celulares no lisados recogiendo el sobrenadante que permanecerá durante 5 minutos a TA.

A continuación, se procedió al aislamiento total del RNA, que se consiguió tras varias centrifugaciones utilizando productos de mayor a menor hidrofilia. En primer lugar, se añadieron a la muestra 200 μ l de cloroformo por cada ml de reactivo Tripure y se agitó la muestra con ayuda de un vórtex durante 15 segundos. Tras este proceso, se dejó reposar durante 10 minutos y se realizó una segunda centrifugación a 12000g durante

15 minutos a 4°C para facilitar la separación y precipitación del DNA genómico (gDNA), ya que en este punto el RNA se disolverá en la fase acuosa y quedará en la parte superior del *ependorf*. En segundo lugar, se recogió la fase acuosa que contenía el RNA total y se añadió un volumen de 500µl de isopropanol por cada ml de reactivo Tripure y se mezcló suavemente para proceder a la precipitación de los ácidos nucleicos. Se procedió entonces a una tercera centrifugación a 12.000g durante 10 minutos a 4°C, para obtener el pellet de RNA total. Se descartó el sobrenadante por vertido y se lavó el pellet de RNA con 1 ml de etanol diluido al 70% en agua tratada con DEPC (dietil pirocarbonato) y una cuarta centrifugación a 7.600g durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, se dejó secar el pellet de RNA y se resuspendió en el volumen mínimo necesario de agua tratada con DEPC. Para finalizar, se cuantificó y se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis.

4.2. CUANTIFICACIÓN DEL RNA

Previamente a la congelación del pellet a -80°C, se procedió a su cuantificación para determinar el grado de pureza del RNA aislado. Para ello, se prepararon 500 µL a una dilución 1/250 de cada muestra, que se midieron en un espectrofotómetro de absorción, *Biophotometer® de Eppendorf*. Se midió la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm ya que la ratio 260/280 es un indicador de pureza y un valor mayor de 1.8 indica un RNA de buena calidad. Sabiendo que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg de RNA y aplicando el factor de dilución, se calculó la concentración µM de la muestra.

4.3. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT) – SÍNTESIS DE cDNA

La RT consiste en convertir el mRNA en cDNA. Para ello se utilizó la enzima ImProm-II™ (Promega Corp. Madison, USA), una enzima de alta sensibilidad que permite utilizar cantidades pequeñas de RNA total (0,1-1 µg) para que se lleve a cabo la reacción.

Tras incubar el RNA total con el cebador oligo(dT₁₆) (250 ng) en agua-DEPC a 70°C con el fin de facilitar su unión a la cadena de RNA, se llevó a cabo la reacción de RT con el siguiente mix de reacción: Buffer-RT 5X, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM de cada deoxinucleósido trifosfato (dNTPs), 20 U del inhibidor de ribonucleasas recombinante RNAsin® (Promega Corp. Madison, USA) y 1 µL de la enzima Transcriptasa Reversa Improm-IITM (Promega Corp. Madison, USA), con un volumen final de 20 µl.

Se realizó un primer ciclo de hibridación a 25°C durante 5 minutos, seguidamente la reacción de extensión transcurrió a 42°C durante 60 minutos y, finalmente, la enzima fue desactivada incubando las muestras a 70°C durante 15 min. El cDNA sintetizado fue almacenado a -20°C para su uso posterior.

4.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (qPCR)

Se utilizó el sistema de qPCR a tiempo real para detectar con elevada sensibilidad y precisión la presencia de los mRNA objeto de estudio. Los mRNA codificantes para cada uno de los genes objeto de estudio (NT3, TrkC, los 3 subtipos de AR- β - β_1 , β_2 y β_3 -) y el gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) como control interno se cuantificaron utilizando sondas Taqman® con propiedades fluorescentes, usando un termociclador *GeneAmp 7500 Fast System* (Applied Biosystems, U.S.) como se describe en Oliver et al. (2010) y Montó et al. (2012).

Diluciones 1/10 de la reacción de RT previa fueron analizadas por duplicado mediante ensayos Taqman® de expresión génica (*Taqman® Gene Expression Assays*, Applied Biosystems), consistentes en una mezcla 20X de cebadores y sonda Taqman® MGB (minor groove binder; ligando de unión al surco menor del DNA) marcada con el fluorocromo 6-FAM™ en el extremo 5' de la sonda y un quencher no fluorescente en el extremo 3', diseñados para la detección y cuantificación de secuencias génicas específicas por RT-PCR a tiempo real de dos pasos. La mayoría de las sondas empleadas fueron diseñadas para hibridar en la unión exón-exón y así mejorar la especificidad de hibridación y evitar la contaminación por gDNA (*Taqman® Gene Expression Assays protocol*, Applied Biosystems, US).

Todas las reacciones se ajustaron a un volumen de 25 μ L con *Taqman® Universal Master Mix (AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase*; Applied Biosystems, US), incluyendo 5 μ L de la dilución de la reacción de RT y 1,2 μ L de la mezcla 20X de sonda (250 nM) y cebadores (900 nM) (*Taqman® Gene Expression Assay*). El cDNA fue amplificado según las condiciones del fabricante con un primer paso de activación de la polimerasa a 95°C durante 10 minutos y 40 ciclos compuestos de dos pasos, la desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y la hibridación/extensión a 60°C durante 1 minuto. Tanto las

muestras como el gen de referencia (GAPDH) fueron amplificadas en reacciones paralelas.

Tabla 2. Sondas Taqman® de expresión génica utilizadas en muestras de ratón, rata y humano.

Ratón		Rata		Humano	
Gen (Símbolo)	Id. Sondas	Gen (Símbolo)	Id. Sondas	Gen (Símbolo)	Id. Sondas
Gapdh (GAPDH)	Mm99999915_g1	Gapdh (GAPDH)	Rn99999916_s1	GAPDH (GAPDH)	Hs99999905_m1
Ntf3 (NT3)	Mm01182924_m1	Ntf3 (NT3)	Rn00579280_m1	NTF3 (NT3)	Hs01548350_m1
Ntrk3 (Trk C)	Mm00456222_m1	Ntrk3 (Trk C)	Rn00570389_m1	NTRK3 (Trk C)	Hs00176797_m1
Adrb1 (β1)	Mm01265414_s1	Adrb1 (β1)	Rn00824536_s1	ADRB1 (β1)	Hs00265096_s1
Adrb2 (β2)	Mm02524224_s1	Adrb2 (β2)	Rn00560650_s1	ADRB2 (β2)	Hs00240532_s1
Adrb3 (β3)	Mm00442669_m1	Adrb3 (β3)	Rn00565393_m1	ADRB3 (β3)	Hs00609046_m1

Datos proporcionados por Applied Biosystems (USA).

4.5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los valores del ciclo umbral ("*threshold cycle*", Ct) obtenidos para cada gen en cada reacción fueron calculados mediante el programa *7500 Fast sequence-detection-system* (Applied Biosystems, US). Los valores ΔCt fueron normalizados utilizando como gen de referencia (GAPDH), siendo ΔCt a diferencia entre Ct del gen estudiado y el de referencia (GAPDH). El valor ΔCt se transformó matemáticamente mediante la expresión $2^{-\Delta Ct} \times 10^4$, directamente proporcional al número inicial de copias de cada gen (Livak y Schmittgen, 2001).

5. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA (WESTERN BLOT)

El análisis de la expresión proteica de NT3, TrkC y UCP-1 se realizó mediante la técnica de inmunodetección de proteínas por Western Blot. Se estudiaron varios territorios grasos de modelos animales y humanos: WAT, BAT, KAT, VAT y hAT, así como adipocitos diferenciados en presencia de NT3 32 ng ml⁻¹. Las diferentes condiciones experimentales se detallan en el apartado de resultados de la presente tesis.

5.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES Y CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO

Las muestras de tejido adiposo y las muestras celulares se procesaron tal y como se detalla en el apartado 4.1. Con el fin de lisar las muestras titulares y celulares, se añadió al *ependorf* que las contenía la solución de lisis celular y extracción de proteínas (25 mM HEPES pH=7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA y 1% Tritón X-100) junto a una mezcla comercial que contenía inhibidores de proteasas (Complete®, Roche Diagnostics) y fosfatasa (PhosSTOP®, Roche Applied Science). Posteriormente, se sonicaron las muestras (Microson™ *ultrasonic cell disruptor*) a 4°C durante 3 ciclos de 5 segundos y, a continuación, se centrifugaron 30 minutos a 4°C y 16.100g.

Finalmente, el sobrenadante obtenido, que contenía las proteínas solubles totales, fue alicuotado y almacenado a -80°C. La concentración de proteínas se determinó mediante el método Bradford (Bio-Rad Hércules CA, USA) utilizando la albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) como curva estándar.

5.2. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT)

Para realizar los experimentos de Western Blot, se prepararon 30 µg de proteína total con tampón de carga (60 mM Tris-HCl pH=6,8, 10% glicerol v/v, 2% SDS (dodecilsulfato de sodio), 5% β- mercaptoetanol v/v y 0.01% azul de bromofenol) y se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos. De forma paralela, y para determinar el peso molecular de los péptidos detectados, se cargó en el gel el marcador de pesos moleculares *Precision Plus Protein Standard-Kaleidoscope* (Bio-Rad).

La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis húmeda utilizando geles de poliacrilamida del 10% o 12% que se prepararon usando una solución mixta de acrilamida/bis-acrilamida al 40% (Bio-Rad). La electroforesis se realizó con tampón de electroforesis Tris- Glicina-SDS (25 mM Tris pH=8.3, 192 mM glicina y 0.1% SDS) a un voltaje constante de 110 V durante 90 minutos a 4°C. Transcurrido ese tiempo, los geles se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinildieno (PVDF) durante 2 horas a 4°C a un amperaje constante de 340 mA en tampón de transferencia Tris- Glicina-Metanol (25 mM Tris pH=8.3, 192 mM glicina, 20% metanol y 0.01% SDS). Tanto para la electroforesis como para la transferencia se utilizó el sistema *Mini- Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell System* (BioRad).

Una vez obtenidas las membranas, se bloquearon con BSA 5% (Sigma) preparado con tampón fosfato salino (Roche) con 0,1% Tween 20 (Bio-Rad) (PBS-T) durante 60 minutos en agitación elevada. Tras varios lavados con PBS-T, se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos policlonales (Tabla 3) diluidos en sus correspondientes soluciones de bloqueo.

A continuación, se realizaron diversos lavados con PBS-T y se incubaron con los anticuerpos secundarios adecuados en cada caso, conjugados con peroxidasa y diluidos en BSA 5% (Sigma) preparado con PBS-T durante 50 minutos a TA en oscuridad (Tabla 3). Finalmente, las bandas fueron detectadas mediante incubación con el reactivo quimioluminiscente ECL™ *Prime Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare). Como control de carga se utilizó el anticuerpo policlonal frente a GAPDH.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en el estudio de expresión proteica.

Proteína	Siglas	PM (kDa)	Anticuerpo 1º	Dilución	Anticuerpo 2º	Dilución
Neurotrofina 3	NT3	35	Ac. policlonal de conejo (65804; abcam)	1:1000	Anti-rabbit IgG (GE Healthcare)	1:2500
Receptor tirosin quinasa	TrkC	145	Ac. policlonal de conejo (3376S; cell signaling)	1:1000	Anti-rabbit IgG (GE Healthcare)	1:2500
Proteína desacoplante 1	UCP-1	32	Ac. policlonal de conejo (U6382; sigma aldrich)	1:1000	Anti-rabbit IgG (GE Healthcare)	1:2500
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH	34	Ac. policlonal de conejo (G9545; cell signaling)	1:5000	Anti-rabbit IgG (GE Healthcare)	1:2500

Datos proporcionados por Abcam, Cell Signalling y General Electric Healthcare en función del anticuerpo utilizado.

5.3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Las imágenes de quimioluminiscencia fueron capturadas mediante el *Autochemi™ Bioimaging System*. El soporte informático de captura empleado fue *Labworks 4.6 Image Acquisition and Analysis* (Ultra-Violet Products). Para realizar el análisis densitométrico de las bandas correspondientes a cada una de las proteínas objeto de estudio, se utilizó el software *Image J* (*National institutes of health, USA*). Los datos obtenidos fueron

normalizados con respecto a los obtenidos para el control de carga GAPDH. Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias de proteína inmunodetectable.

6. DIFERENCIACIÓN DE PREADIPOCITOS A ADIPOCITOS HUMANOS

Los preadipocitos se diferenciaron a adipocitos maduros tal y como se ha explicado anteriormente en el apartado 1.2 de la sección de materiales y métodos. En estos experimentos, todo el proceso de diferenciación desde el estadio de preadipocitos se realizó en presencia de distintos estímulos para determinar si producían cambios en la morfología de los adipocitos. Para ello, el medio de nutrición de adipocitos (*Adipocyte nutrition medium* C-27438, Promocell) se complementó con los fármacos indicados en la tabla 4.

Tabla 4. Fármacos empleados en los experimentos de diferenciación.

Fármaco	Siglas	Concentración	Proveedor
Neurotrofina 3	NT3	32 ng ml ⁻¹	PeptoTech, Inc. (Rocky Hill, NJ, USA)
Inhibidor de las tirosin quinasas	K252a	0,20 μM	Calbiochem (San Diego, CA)

Todos los reactivos se disolvieron en agua excepto: el K252a 20 μM que se disolvió en DMSO (dimetil sulfóxido) al 1%. Las diluciones posteriores de K252a se realizaron en agua. La concentración final de DMSO en las placas de las células es 0,01%. Por ello, en todos estos experimentos el medio se complementó con DMSO al 0,01% para igualar condiciones experimentales. Al medio complementado con K252a no se le añadió DMSO extra.

Los experimentos se hicieron por duplicado y en placas de 12 pocillos. Los medios complementados se cambiaron cada 48 horas y se prepararon justo antes del cambio de medio para evitar su degradación. Los experimentos realizados en presencia del inhibidor K252a, éste se añade 1 hora y 45 minutos antes del estímulo (NT3). En las placas que no contenían inhibidores, primero se añadió medio sin complementar y al cabo de 1 hora y 45 minutos se añadió el estímulo. De esta manera, se igualó el tiempo de exposición al estímulo en todos los pocillos. Las combinaciones posibles están resumidas en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones y composición del medio de nutrición de adipocitos.

Condiciones	Medio sin complementar (μ l)	Inhibidor (μ l)	Estímulo (μ l)	Volumen final en el pocillo (μ l)
Control	1000 (0,01% DMSO)	---	---	1000
NT3	900 (0,01% DMSO)	---	100	1000
K252a	900 (sin DMSO)	100 (0,1% DMSO)	---	1000
NT3 + K252a	800 (sin DMSO)	100 (0,1% DMSO)	100	1000

Una vez terminados los 15 días de diferenciación en presencia de estímulos, se tomaron fotos de cada uno de los pocillos con el microscopio invertido *Leica DM IL LED Leica cámara* (objetivo 10x).

6.1. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el software Image J (*National institutes of health, USA*) y se midieron distintos parámetros: área de los adipocitos y diámetro de las gotas lipídicas (LDs).

Para hacer las medidas lo más aleatorias posible se tomó como punto de origen un adipocito central y se midieron, en el caso de las LDs, 25 LDs de 5 adipocitos diferentes en 6 campos, por lo tanto, se midieron 150 LDs para cada una de las condiciones experimentales. En el caso de las áreas de los adipocitos, se midió el área de 10 adipocitos de 6 campos distintos, por lo tanto, se midieron un total de 60 adipocitos para cada una de las condiciones experimentales. Como todos los experimentos se hicieron por duplicado, se midió finalmente un total de 300 LDs y 120 adipocitos para cada una de las condiciones experimentales. Los resultados fueron expresados como unidades de área (μm^2) y diámetro (μm).

7. LIPÓLISIS

Con el fin de analizar si la NT3 tenía efectos sobre la lipólisis en adipocitos aislados de rata (Wad), se realizaron experimentos de lipólisis con ratas Wistar de 16 semanas.

Una vez extraídos los Wad como se ha indicado anteriormente en el apartado 2.4 de la sección materiales y métodos, se incubaron en presencia de distintos fármacos que se encuentran resumidos en la tabla 6.

Tabla 6. Nombre y concentración de los fármacos empleados en los experimentos de lipólisis.

Fármaco	Siglas	Función	Concentración	Proveedor
Neurofina 3	NT3	Factor neurotrófico	32-96 ng ml ⁻¹	PeptoTech, Inc. (Rocky Hill, NJ, USA)
(±) Isoprenalina hemisulfato	Isoprenalina	Agonista no selectivo $\beta_{1/2}$	0,1-1-10 μ M	Sigma Aldrich
Inhibidor de las tirosin cinasas	K252a	Inhibidor tirosin quinazas	0,2 μ M	Calbiochem (San Diego, CA)

Todos los reactivos se disolvieron en agua excepto: isoprenalina 10000 μ M que se disolvió en ácido ascórbico al 0,01% y K252a 20 μ M en DMSO 1%. Las diluciones posteriores se realizaron con agua.

El medio utilizado para la incubación de los adipocitos con los estímulos a analizar es el KRBA explicado anteriormente (apartado 2.4 de la sección de materiales y métodos). El medio se enriqueció con albúmina para acercar la composición del medio de incubación al medio exterior y fijar los AGL liberados por las células adiposas en el curso de la hidrólisis de los TG, evitando la re-esterificación. Por otra parte, la glucosa contenida en el KRBA influye favorablemente en la actividad lipolítica de los adipocitos.

En los experimentos de lipólisis, se añadió adenosina deaminasa (ADA) (1 μ l ml⁻¹) para bloquear la actividad antilipolítica de la ADA liberada por los propios adipocitos y de esta forma aumentar la lipólisis basal y la estimulada. La suspensión de adipocitos se preparó diluyendo los adipocitos extraídos junto con el tampón KRBA en una proporción 1:10.

Para el experimento, se prepararon tubos *ependorf* de 2 ml con 400 μ l de suspensión de adipocitos y se estimularon con 4 μ l de los estímulos a determinar (NT3 e

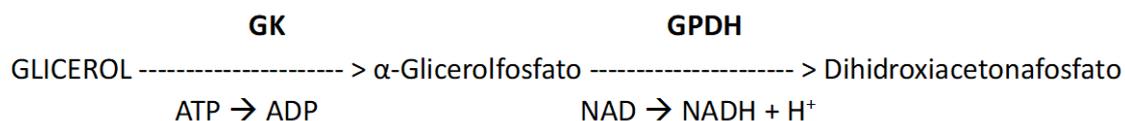
isoprenalina). En los tubos control, los 4 μ l de estímulo se sustituyeron por 4 μ l de KRBA. En el caso de los adipocitos humanos aislados, se añadieron 500 μ l de KRBA enriquecido a las placas. Con el fin de conseguir una cantidad homogénea de adipocitos en cada tubo, se agitó constante y circularmente la suspensión celular previamente a prepararlos.

Una vez preparados los tubos, se colocaron en el baño a 37°C, con agitación constante y a velocidad lenta (40/50 ciclos/min) durante 30 minutos para estabilizarlos. A continuación, se añadieron los inhibidores en aquellos tubos que fuera necesario y se incubaron durante 45 minutos. Finalmente, se añadieron los estímulos y se incubaron durante 90 minutos, periodo durante el cual la lipólisis es una función lineal del tiempo. Para detener la incubación, pasados 90 minutos, se introdujeron los tubos en hielo durante 15-20 min. Una vez finalizados los 15-20 minutos para detener la reacción, se procedió a la medida de la actividad lipolítica. Todos los experimentos se realizaron en presencia de controles y por duplicado.

Para determinación de la actividad lipolítica, se tomó como criterio la cantidad de glicerol liberado por los adipocitos en el medio de incubación. La liberación al medio extracelular refleja de manera fiable la intensidad de la lipólisis, ya que el glicerol producido a partir de la hidrólisis de TG es poco metabolizado por los adipocitos debido a una reducida actividad glicerol quinasa (GK).

La elección del glicerol frente a los AGL como medida fiable de lipólisis se debe a que los AGL producidos durante la lipólisis pueden ser re-esterificados por los adipocitos en los procesos de síntesis de TG, debido a la actividad espontánea de lipogénesis. Como consecuencia, la cantidad de AGL en el medio de incubación es la resultante de dos procesos metabólicos opuestos, lipólisis y lipogénesis, por lo que la determinación de los AGL constituye un índice de lipólisis poco fiable.

Para medir el glicerol, se partió de la reacción siguiente:



GK: Glicerol quinasa

GPDH: Glicerol-fosfato deshidrogenasa

NAD: nicotinamida adenina dinucleótido

Para la medida de glicerol en la suspensión de cada uno de los tubos, se recogieron 60 μl de cada muestra del medio de incubación de los adipocitos, por duplicado. Las muestras se obtuvieron del fondo del tubo para evitar la contaminación con adipocitos que se encuentran en la superficie.

Previamente a la determinación de glicerol, a los 60 μl de muestra a analizar se añadieron 300 μl de reactivo enzimático compuesto por ATP 1,5 mM (Sigma-Aldrich), nicotinamida adenina dinucleótido (NAD, 0,5 mM, Sigma-Aldrich), glicerol-fosfato-deshidrogenasa (GPDH, 8500 unidades L^{-1} , Merck), glicerol quinasa (GK, ≥ 357 unidades L^{-1} , Sigma-Aldrich) y tampón hidracina (1 M, Sigma-Aldrich). El tampón hidrazina estaba formado a su vez por glicina ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$, 0.2 M, Sigma-Aldrich), hidróxido de hidrazonio ($\text{N}_2\text{H}_5\text{OH}$, 1.069 M, Sigma-Aldrich), cloruro de magnesio (MgCl_2 , 0.2 M, Sigma-Aldrich) y H_2O bidestilada. Se ajustó el pH hasta 9.8 con NaOH (0,1 N).

La reacción se produce en presencia de hidrazina, que fija la función cetona y favorece la irreversibilidad de la reacción. La cantidad de $\text{NADH} + \text{H}^+$ producida es proporcional a la cantidad de glicerol presente en la muestra a medir.

Una vez preparada la placa, se agitó suavemente y se mantuvo durante 40 minutos a TA. Pasado este tiempo, se realiza la lectura en el espectrofotómetro a 340 nm.

7.1. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Las absorbancias obtenidas para cada uno de los estímulos se extrapolaron de la recta patrón estándar de glicerol (0.05, 0.1, 0.15, 0.2 $\mu\text{moles glicerol}/200 \mu\text{l}$) y se obtuvo la concentración de glicerol para cada uno de los tubos. A su vez, las concentraciones obtenidas se porcentuaron respecto a la concentración obtenida en el control (adipocitos incubados con tampón en ausencia de ningún estímulo).

8. HISTOLOGÍA

Con el objetivo de determinar si la ausencia de NT3 en el organismo o solo en el endotelio produce cambios morfológicos en el tejido adiposo, se realizaron inclusiones en parafina de WAT y BAT en dos modelos de ratón. Los modelos empleados fueron: ratones eNT3⁻ y sus controles, eNT3⁺; y ratones NT3^{+/-} y sus controles, NT3^{+/+}. Ambos modelos están detallados en el apartado 2.1.3 de la sección de materiales y métodos.

Tras la disección, se lavaron los tejidos con PBS 1X y se introdujeron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas. Tras este tiempo, se procedió a deshidratar los tejidos con diluciones decrecientes de etanol, después con xileno y, por último, con parafina. Las inclusiones de muestras de tejido adiposo en parafina, así como las tinciones de cortes semifinos con hematoxilina-eosina se realizaron en el departamento de microscopía del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE).

8.1. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Para el análisis de las muestras se realizó la medida de las áreas de los adipocitos. Para hacer esta medida de forma aleatoria, se midieron 20 adipocitos de 5 preparaciones para cada muestra, donde se escogió un adipocito central de la preparación y a partir de él se midieron 20 cercanos. Este método se empleó para las medidas de BAT y para las de WAT. Estas medidas se repitieron para 5 ratones de cada grupo.

La toma de medidas de las áreas (μm^2) se realizó con el software *Image J* (*National institutes of health, USA*).

9. TINCIÓN HISTOQUÍMICA: DETECCIÓN DE LA β -GALACTOSIDASA POR X-GAL

El objetivo de estos experimentos es detectar dónde se expresa la NT3 en dos territorios grasos: WAT y BAT. Para ello, se utilizaron ratones transgénicos NT3^{+/-} y sus controles NT3^{+/+} (modelos explicados en el apartado 2.1.3 de materiales y métodos)

La detección es posible porque las células que expresan el gen *lacZ* que codifica a la enzima galactosidasa (β -gal), al ponerse en contacto con el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosidasa (X-gal), dan lugar a un producto azul visible. Esto es debido a

que la enzima β -gal hidroliza el X-gal generando indoxil que al contacto con el aire se transforma en índigo insoluble que tiene color azul. Por tanto, las células teñidas de azul son aquellas en las que el gen *lacZ* se ha expresado bajo el promotor de NT3.

En primer lugar, los animales fueron sacrificados y se extrajeron los tejidos tal y como se indica en los apartados 2.2 y 2.3 de la sección de materiales y métodos. A continuación, se lavaron previamente los tejidos con 1 ml de tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7.4 y se preparó el tampón de reacción que contenía ferricianuro potásico 5mM, deoxicolato sódico 0,01%, $MgCl_2$ 2 mM, PO_4 0,1 M pH 7.4 y Nonidet P-40 0.02%. A este tampón se le añadió el sustrato X-gal a 1 mg ml^{-1} (Roche) disuelto en dimetilformamida (Sigma) a 25 mg ml^{-1} y se reservó a 37°C en oscuridad.

Posteriormente, se realizaron dos incubaciones. En la primera de ellas, se lavan los tejidos con 300 μL de solución A (Tabla 7) en agitación suave y se añaden 500 μL de solución A a cada tejido, incubándolos durante 30 minutos a TA. A continuación, en la segunda incubación se lavaron los tejidos con 300 μL de solución B con agitación suave y se añadieron 500 μL de solución B (Tabla 7) durante 5 minutos a TA.

Tras eliminar el líquido de los tejidos, se añadió 1 ml de tampón de reacción que contenía X-Gal a cada muestra y se incubó durante 1 hora a 37°C en oscuridad. Al acabar el proceso, se lavaron los tejidos con PBS 0,1 M y se llevaron al estereomicroscopio LEICA M165 en el que se tomaron fotos a distintos aumentos.

Tabla 7. Composición de las soluciones A y B para detección de la β -Galactosidasa.

Productos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen
Solución A			
PO_4 (pH=7,4)	1 M	0,1 M	500 μL
$MgCl_2$	1 M	2 mM	10 μL
EGTA	0,2 M	5 mM	25 μL
H_2O mQ			Hasta 5 ml
Solución B			
PO_4 Buffer (pH=7,4)	1 M	0,1 M	500 μL
$MgCl_2$	1 M	2 mM	10 μL
Deoxicolato sódico	1 %	0,01 %	50 μL
Nonidet P-40	10 %	0,02 %	10 μL
H_2O mQ			Hasta 5 ml

10. ESTUDIOS FUNCIONALES DE REACTIVIDAD VASCULAR

Se realizaron estudios funcionales en aorta de ratas Zucker y sus controles con el fin de determinar si existían diferencias en la relajación mediada por AR- β_2 y β_3 en un modelo animal de síndrome metabólico.

10.1. EXTRACCIÓN DE LA AORTA Y MONTAJE EN BAÑO DE ÓRGANOS

La extracción de la aorta se realizó mediante toracotomía en ratas Zucker y se siguió el protocolo indicado en el apartado 2.3 de la sección de materiales y métodos ya que es común para la extracción del tejido adiposo perivascular de aorta.

Una vez extraído el vaso, con sumo cuidado para no dañarlo, se colocó la aorta en una placa Petri que contenía la solución fisiológica de Krebs (NaCl 118 mM, KCl 4.75 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM y glucosa 11.0 mM pH= 7.5) burbujeada con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) y se procedió a la eliminación del tejido adiposo perivascular (explicado en el apartado 2.3 de la sección de materiales y métodos), para dejar la pared arterial desnuda.

Previamente al montaje en el baño de órganos, la arteria se dividió en anillos de aproximadamente 3-4 mm de longitud. Este procedimiento se realizó cuidadosamente para evitar daños en el vaso y, sobre todo, daño endotelial. Los anillos se suspendieron en el baño de órganos con 10 ml de solución de Krebs. El baño se mantuvo en todo momento a 37°C y con aporte continuo de carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂).

Para el montaje en el baño, a través del lumen de cada segmento arterial se introdujeron dos finos alambres de acero inoxidable, uno se fijó al baño de órganos y el otro se conectó a un transductor isométrico de fuerza - desplazamiento (*Grass FT03*), acoplado a un sistema de adquisición de datos (*PowerLab/8SP; ADInstruments*). Los cambios de tensión isométrica se registraron mediante un programa informático (*Chart v5; ADInstruments*).

Antes de iniciar cada protocolo experimental, las preparaciones se sometieron a una tensión inicial de 1 gramo y se mantuvieron durante un periodo de estabilización de 60 minutos, cambiando la solución de Krebs cada 20-30 minutos y ajustando la tensión de las diferentes preparaciones hasta obtener una línea basal estable.

10.2. FÁRMACOS UTILIZADOS

Para los experimentos funcionales de órgano aislado se utilizaron diversos fármacos que están resumidos en la tabla 8.

Tabla 8. Fármacos utilizados en los estudios de órgano aislado.

Fármaco	Concentraciones (M)	Tipo Fármaco	Proveedor
(±) Isoprenalina hemisulfato	0,1 nM a 100 µM	Agonista adrenérgico no selectivo $\beta_{1/2}$	Sigma-Aldrich
SR 58611A	0,1 nM a 100 µM	Agonista adrenérgico selectivo β_3	Sanofi-Aventis (Bridgewater, N.J.)
(R)- (-) Fenilefrina hidrocloruro	1 nM a 1 µM	Agonista adrenérgico selectivo α_1	Sigma-Aldrich
Acetilcolina	0,1 µM a 100 µM	Agonista colinérgico	Sigma-Aldrich

Todos los productos se obtuvieron de Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), excepto el SR 58611A que fue una donación de Sanofi-Aventis (Bridgewater, N.J.). Todos los reactivos se disolvieron en agua excepto: isoprenalina 10 mM que se disolvió en ácido ascórbico al 0,01% y el SR 58611A 10 mM que se disolvió en etanol al 20%. Las diluciones posteriores de isoprenalina y SR 58611A se realizaron en agua.

10.3. DESCRIPCIÓN DE LOS PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

10.3.1. MESETA DE CONTRACCIÓN CON KCL (80 mM)

Al finalizar el periodo de estabilización de 60 minutos y para comprobar la capacidad contráctil de los vasos, se cambió la solución de Krebs por 10 ml de una solución despolarizante obtenida de la sustitución equimolecular en la solución de Krebs de NaCl por KCl a una concentración de 80 mM.

La meseta de contracción se mantuvo durante 10 minutos y la magnitud de esta contracción se tomó como la magnitud de referencia de contracción para el resto de agentes contráctiles.

10.3.2. DETERMINACIÓN FUNCIONAL DE LA PRESENCIA DE ENDOTELIO

Tras un periodo de lavado (15 minutos) comprobamos la integridad funcional del endotelio observando la vasorelajación mediada por un agonista muscarínico,

acetilcolina (acetilcolina 0,1 μM a 100 μM), sobre la meseta de contracción inducida por una concentración del agonista α_1 fenilefrina (FE 1 μM).

Se consideraron las preparaciones con endotelio intacto cuando la relajación de acetilcolina respecto a la meseta de contracción obtenida con FE fue mayor del 70%. Es importante destacar que, en estos experimentos, se trabajó en presencia de endotelio funcional. Tras comprobar la integridad funcional del endotelio, se lavaron las preparaciones con solución fisiológica de Krebs y se dejaron en estabilización durante 30 minutos.

10.3.3. CURVAS CONCENTRACIÓN RESPUESTA

Para realizar las curvas concentración respuesta (CCR) de contracción, se añadieron contracciones acumulativas crecientes (1 nM a 1 μM) del agente contráctil FE cada 5 minutos, hasta alcanzar el máximo de respuesta contráctil y producir una meseta de contracción estable.

Seguidamente, se inició un protocolo para estudiar el efecto de la activación de los AR- β en el tono vascular analizando la acción relajante de distintos agonistas con un perfil de selectividad diferente por los subtipos de los AR- β . Para ello, se construyeron las CCR de relajación de los agonistas de los AR- β sobre las mesetas de contracción inducidas por FE. Se añadieron concentraciones acumulativas crecientes (0,1 nM a 100 μM) de los distintos agonistas con distinta selectividad por los subtipos de AR- β : isoprenalina (agonista no selectivo β_1/β_2) y SR 58611A (agonista selectivo β_3). Las vasodilataciones de los diversos compuestos se expresaron como porcentaje de relajación respecto al máximo de contracción producido por la última concentración de FE añadida al baño.

10.4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Las contracciones de FE se expresaron como porcentaje respecto a la contracción inicial de KCl (80 mM). Las relajaciones inducidas por acetilcolina y por los agonistas de AR- β (isoprenalina, SR 58611A) se expresaron como porcentaje respecto a la contracción máxima inducida por FE (1 μM).

Las CCR de contracción con FE y de relajación con los diferentes agentes relajantes (acetilcolina, isoprenalina, SR 58611A) fueron ajustadas por regresión no-lineal (*GraphPad Software, Inc. San Diego CA, USA*).

Se obtuvieron los siguientes parámetros característicos:

pCE₅₀ = logaritmo negativo de la EC₅₀ (concentración a la que el compuesto produce el 50 % del efecto máximo, sea contracción o relajación). En el caso de que el ajuste de la curva sea significativo para dos sitios de unión, se obtuvieron dos valores de potencia: **pEC₅₀(1)** y **pEC₅₀(2)**, para el sitio de unión de alta y de baja afinidad, respectivamente. En este caso también se calculó el porcentaje de receptores que hay en cada sitio.

E_{max} = efecto máximo contráctil o relajante.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó empleando el software GraphPad Prism 9 (*GraphPad Software, Inc. San Diego CA, USA*). Los resultados se representan como la media \pm el error estándar de la media (e.e.m.) para las determinaciones obtenidas de muestras diferentes.

Se analizó la normalidad de los datos de la muestra con el test de Kolmogorov-Smirnov seguido por el análisis de la variancia (ANOVA) de una vía o dos vías. En caso de comprobarse una distribución normal, se aplicó el test de Newman-Keuls o la t de Student. En cambio, si no seguían una distribución normal se aplicó el test de Kruskal-Wallis seguido por el test de Dunns o Brown-Forsythe y Welch test. Para establecer asociaciones entre variables no paramétricas, se calculó la correlación de Spearman. Un valor de probabilidad de $p < 0,05$ se consideró significativo.

El análisis estadístico realizado depende de la técnica y se especifica en cada uno de los resultados obtenidos en la presente tesis.

RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DE NT3, TrkC Y LOS TRES SUBTIPOS DE AR- β EN TEJIDO ADIPOSO DE RATA Y HUMANO

1.1. EXPRESIÓN EN TEJIDO ADIPOSO DE RATAS WISTAR

En primer lugar, con el fin de caracterizar la expresión génica y el patrón de expresión proteica de NT3 (codificada por *Ntf3*) y TrkC (codificada por *Ntrk3*) así como de los tres subtipos de AR- β (codificados por *Adrb1*, *Adrb2* y *Adrb3*), se eligieron territorios grasos aislados de ratas macho Wistar adultas (16 semanas). Se eligieron diversos tejidos representativos de tejido adiposo de tipo pardo: tejido adiposo interescapular (BAT) y perivascular de aorta (VAT), y de tipo blanco: tejido adiposo visceral (WAT) y perirrenal (KAT). Como control se empleó el córtex cerebral, ya que es un tejido de referencia para la expresión de NT3 y de su receptor (TrkC) (Katoh-Semba et al., 1996 y Caporali A., et al 2009). Además, se aislaron adipocitos del WAT de rata Wistar (Wad) en los que también se determinaron los niveles de expresión génica de *Ntf3* y de los diferentes receptores.

NT3 y su receptor TrkC se expresan en todos los tipos de tejido adiposo

Los resultados obtenidos muestran que existe expresión génica de *Ntf3* (Figura 1A) y *Ntrk3* (Figura 1B) en los diferentes territorios grasos, con niveles similares o incluso superiores a los observados en el córtex cerebral. Los niveles de *Ntf3* en BAT y VAT son similares entre ellos y a los observados en el córtex. Por otra parte, los niveles de *Ntf3* en KAT y WAT son superiores a los obtenidos en el resto de los tejidos. A nivel proteico, se detectaron distintas isoformas de NT3 en todos los tejidos de rata utilizados (35, 25 y 17 kDa) (Figura 1C).

Por lo que respecta a la expresión génica de *Ntrk3*, es de señalar que los niveles de mRNA obtenidos en BAT y VAT fueron similares o incluso superiores a los del córtex cerebral (Figura 1B). Sin embargo, en los territorios de tipo blanco (WAT y KAT) los niveles de *Ntrk3* son inferiores, presentando diferencias significativas respecto a los obtenidos en BAT.

Los niveles de expresión proteica de TrkC se correlacionan con lo observado para los niveles génicos y siguen el mismo perfil, detectándose en todos los tejidos una banda a

RESULTADOS

110 kDa que fue mayor en córtex cerebral, BAT y VAT respecto a los territorios de tipo blanco (WAT y KAT) (Figura 1D).

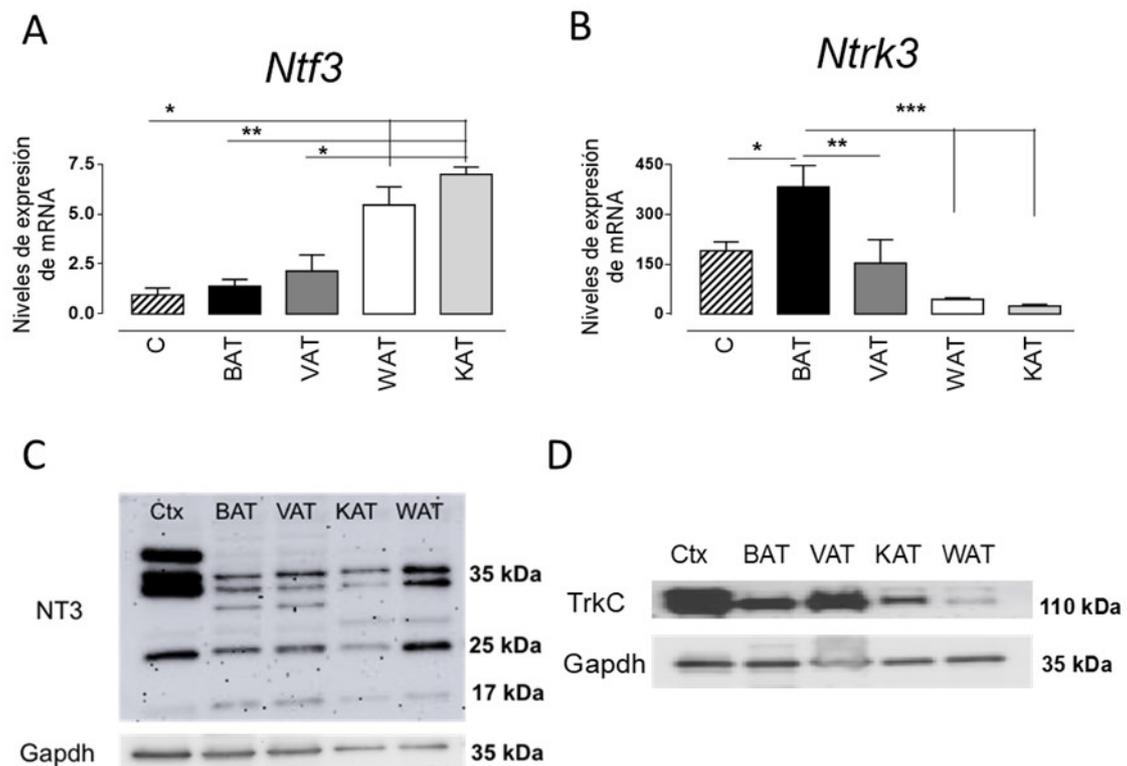


Figura 1. Análisis comparativo de los niveles de expresión génica y proteica de NT3 (A, C) y TrkC (B, D) en diferentes tejidos de ratas Wistar (16 semanas): córtex (C, n=3), tejido adiposo interescapular (BAT, n=6), perivascular de aorta (VAT, n=5), perirenal (KAT, n=5), visceral (WAT, n=15). Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido de test de Newman-Keuls siendo *p<0,05, **p<0,01, *p<0,001 vs WAT y KAT (*Ntf3*, A) o los genes indicados (*Ntrk3*, B). Los valores de mRNA se expresan como $2^{-\Delta Ct} \times 10^4$ y están normalizados usando *Gapdh* como gen de referencia. Los resultados representan la media \pm e.e.m.**

En la Figura 2 se muestran los niveles de expresión génica de los tres subtipos de AR- β en los diferentes tejidos analizados. Los niveles de mRNA del *Adrb1*, *Adrb2* y *Adrb3* fueron menores en BAT y VAT respecto a los obtenidos en WAT y KAT, siendo la diferencia significativa respecto a WAT. Además, se puede observar un patrón de expresión similar en los tejidos de tipo pardo (BAT y VAT) respecto a los de tipo blanco (WAT y KAT).

En el caso del córtex cerebral de rata se detectó la expresión de *Adrb1* y *Adrb2*, pero no de *Adrb3* (Figura 2).

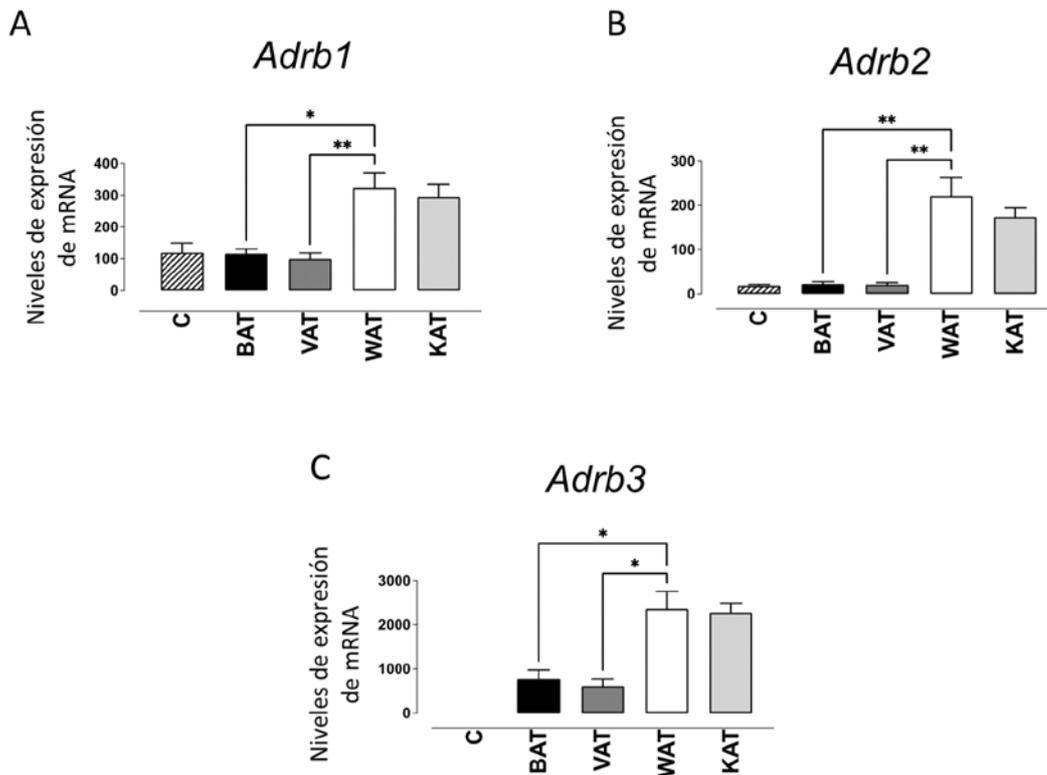


Figura 2. Análisis comparativo de los niveles de expresión de los distintos subtipos de *Adrb* (*Adrb1*, *Adrb2*, *Adrb3*) en diferentes tejidos de ratas Wistar (16 semanas): córtex (C, n=3), tejido adiposo interescapular (BAT, n=6), perivasculAr de aorta (VAT, n=5), visceral (WAT, n=15), perirrenal (KAT, n=5), Análisis estadístico en los diferentes tipos de tejido adiposo: ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls siendo *p<0,05 y **p<0,01 vs WAT. Los valores de mRNA se expresan como $2^{-\Delta Ct} \times 10^4$ y están normalizados usando *Gapdh* como gen de referencia. Los resultados representan la media \pm e.e.m.

La expresión de NT3 es menor en adipocitos aislados respecto a tejido entero

También se comparó la expresión de los cinco genes en adipocitos aislados de WAT de rata Wistar (Wad) respecto al tejido entero (WAT) (Figura 3). Los resultados obtenidos muestran que la expresión de *Ntf3* en adipocitos aislados (Wad) es significativamente inferior a la detectada en tejido entero (WAT), lo que sugiere que *Ntf3* se expresa en mayor proporción en otros tipos celulares que en los adipocitos. De hecho, como se muestra posteriormente existe una expresión mayoritaria de NT3, tanto en WAT como en BAT, a nivel vascular (ver figura 5, al final de este apartado).

Por otro lado, no se observan diferencias entre la expresión génica de *Ntrk3* en Wad frente a WAT, lo que indica que los adipocitos aislados conservan la expresión de *Ntrk3* respecto al tejido entero y confirman la existencia de un papel funcional de este

receptor en los adipocitos. Asimismo, los niveles de expresión de los 3 subtipos de AR- β (*Adrb1*, *Adrb2*, *Adrb3*) fueron similares en adipocitos aislados (Wad) respecto al tejido entero (Figura 3).

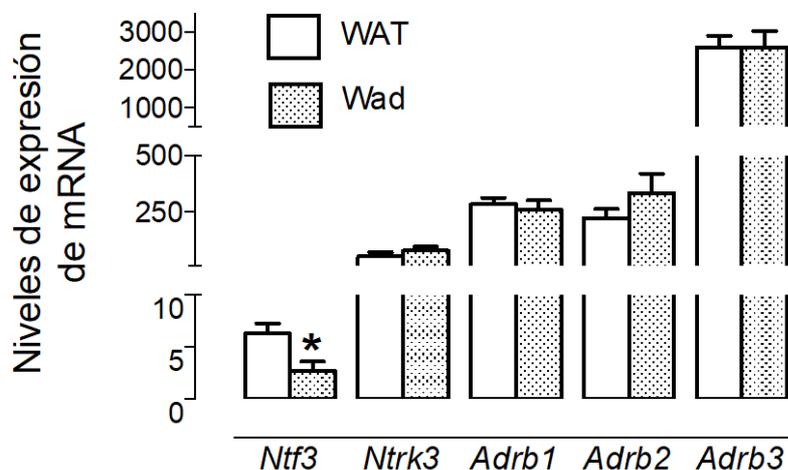


Figura 3. Análisis comparativo de la expresión de *Ntf3*, *Ntrk3*, *Adrb1*, *Adrb2* y *Adrb3* en WAT y adipocitos aislados de WAT (Wad). Análisis estadístico: t Student vs WAT, siendo * $p < 0,05$. Los valores de mRNA se expresan como $2^{-\Delta Ct} \times 10^4$ y están normalizados usando *Gapdh* como gen de referencia. Los resultados representan la media \pm e.e.m. de $n=8$.

1.2. EXPRESIÓN EN TEJIDO ADIPOSO VISCERAL HUMANO

Con el fin de determinar si la NT3 y su receptor TrkC se expresan en tejido adiposo visceral humano (hAT), se analizó la expresión génica y proteica en muestras obtenidas de pacientes sometidos a cirugía abdominal indicada por su patología de base (neoplasia de colon $n=23$ y otras patologías $n=5$). También se analizaron los niveles de expresión génica de los AR- β_1 , β_2 y β_3 , principales reguladores de la función del tejido adiposo. Se describen en primer lugar las características de la población.

Descripción de la población utilizada

La tabla 9 muestra las características clínicas y antropométricas de los pacientes, no observándose diferencias significativas entre hombres y mujeres excepto en los niveles de glucosa, más elevados en las mujeres ($p=0,01196$).

Tabla 9. Características demográficas y perfil bioquímico de todos los pacientes del estudio y, agrupados por género.

	Todos (n=28)	Mujeres (n=13)	Hombres (n =15)	<i>p</i> -valor
Edad, años	73,5 ± 2,1 [41–90]	72,1 ± 2,7 [59–87]	74,8 ± 3,2 [41–90]	0,54377
IMC, kg/m²	25,5 ± 0,7 [19–32]	25,5 ± 1,2 [19–32]	25,6 ± 0,9 [19–31]	0,94302
Glucosa, mg/dL	97,0 ± 3,7 [64–161]	106,8 ± 5,9 [84–161]	88,5 ± 3,6 [64–118]	0,01196*
Colesterol total, mg/dL	182,4 ± 6,5 [128–245]	191,0 ± 10,2 [131–245]	174,9 ± 8,1 [131–222]	0,22510
cHDL, mg/dL	53,8 ± 3,1 [31–93]	53,5 ± 4,3 [31–82]	54,0 ± 4,7 [38–93]	0,93914
cLDL, mg/dL	99,6 ± 5,1 [63–147]	101,7 ± 8,2 [66–139]	97,9 ± 6,8 [63–147]	0,71809
TG, mg/dL	114,3 ± 12,3 [55–286]	124,9 ± 19,4 [64–286]	105,1 ± 15,8 [55–266]	0,43137
Hipertensión arterial	15 (53%)	6 (46%)	9 (60%)	
Diabetes <i>mellitus</i>	7 (25%)	3 (23%)	4 (27%)	
Fumadores activos	3 (11%)	1 (8%)	2 (13%)	
Estilo de vida sedentario	10 (36%)	6 (46%)	4(27%)	

IMC: índice de masa corporal; cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; TG: triglicéridos. Rango entre corchetes para variables cuantitativas y porcentajes entre paréntesis para variables dicotómicas. Los resultados representan la media ± e.e.m. Análisis estadístico: t Student, siendo * $p < 0,05$.

NT3 y su receptor TrkC se expresan en tejido adiposo humano

En la presente tesis detectamos por primera vez expresión génica de NT3 (codificada por *NTF3*), y de su receptor TrkC (codificado por *NTRK3*) en hAT. Los resultados muestran que la expresión de *NTRK3* es significativamente superior a la de *NTF3*. Asimismo, se confirma la expresión de los distintos subtipos de AR- β (codificados por *ADRB1*, *ADRB2* y *ADRB3*), siendo el más expresado el *ADRB2*. Cabe señalar que los niveles de mRNA de *NTRK3* y *ADRB3* fueron similares (Figura 4A).

También se analizó por primera vez la expresión proteica de NT3 y TrkC en hAT, confirmándose la presencia de ambas proteínas y detectando unos niveles superiores de TrkC con respecto a NT3, aunque sin alcanzar diferencias significativas (Figura 4B).

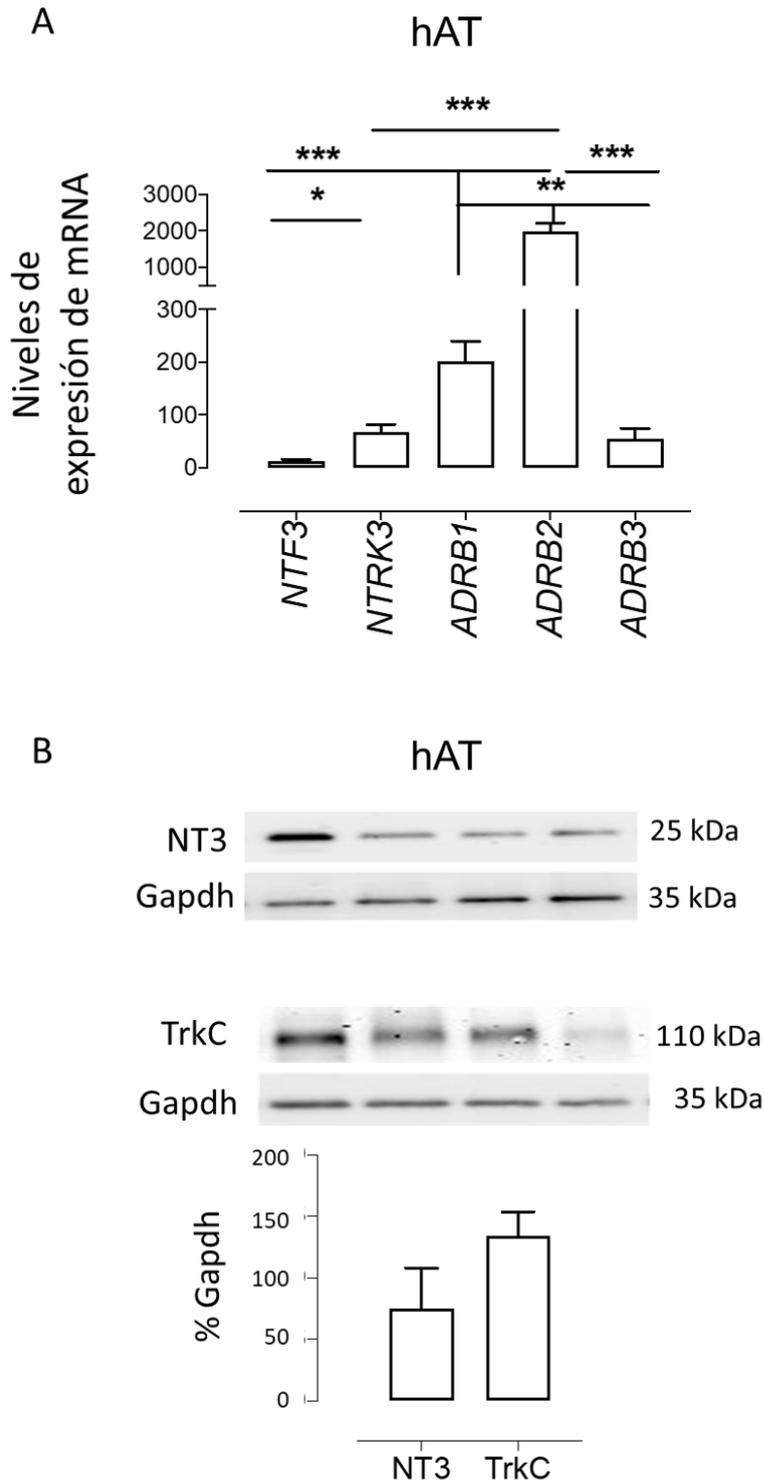


Figura 4. Análisis comparativo de los niveles de expresión de *NTF3*, *NTRK3* y los distintos subtipos de *ADRB* (*ADRB1*, *ADRB2*, *ADRB3*) en tejido adiposo visceral de humanos (hAT). (A) Niveles de mRNA de *NTF3*, *NTRK3* y los tres subtipos de AR- β en hAT (n=28). Los valores de mRNA se expresan como $2^{-\Delta Ct} \times 10^4$ y están normalizados usando *GAPDH* como gen de referencia. Análisis estadístico: test de Kruskal-Wallis seguido del test de comparación múltiple Dunns, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (B) Western Blot representativo de NT3 y TrkC y cuantificación de los niveles de expresión proteica en hAT (n=4) usando Gapdh como referencia. Los resultados representan la media \pm e.e.m.

1.3. LOCALIZACIÓN TISULAR DE NT3

Para profundizar en el análisis de la expresión de NT3 y determinar en qué parte del tejido adiposo se localiza NT3, se utilizó un modelo de ratones modificados genéticamente heterocigotos para NT3, *Ntf3^{+/-lacZ}* (NT3^{+/-}) y, por tanto, con expresión reducida de la misma en todo el organismo. Como controles, se utilizaron los ratones *Ntf3^{+/+}* (NT3^{+/+}), que forman parte de las mismas cepas modificadas, pero expresan NT3 en su totalidad.

En este modelo animal, se detecta la expresión de NT3 a través de la reacción histoquímica producida por la β -galactosidasa, ya que la región que codifica para la proteína NT3 ha sido reemplazada por el gen *lacZ*, creando una mutación nula en los ratones NT3^{+/-}. Los ratones NT3^{+/+} nos sirven de control. Como el gen NT3 ha sido sustituido por el gen *lacZ*, pero su promotor no se ha modificado, se teñirán en azul aquellas estructuras donde se expresaría NT3, permitiéndonos observar su expresión en tejido completo.

Tal y como se observa en la figura 5, únicamente los ratones NT3^{+/-} manifestaron una reacción positiva a la β -galactosidasa tiñendo de azul aquellos lugares que expresan NT3. Los resultados obtenidos nos muestran una expresión mayoritaria de NT3 en los vasos sanguíneos tanto en WAT como en BAT.

Este resultado corrobora la amplia expresión de la NT3 en los tejidos vasculares descrita anteriormente por otros autores (Caporali et al., 2009) y explica la menor expresión de NT3 en adipocitos aislados (Wad) frente a tejido entero (WAT) de ratas Wistar de 16 semanas de edad descrita en el apartado anterior de esta tesis (ver Figura 3).

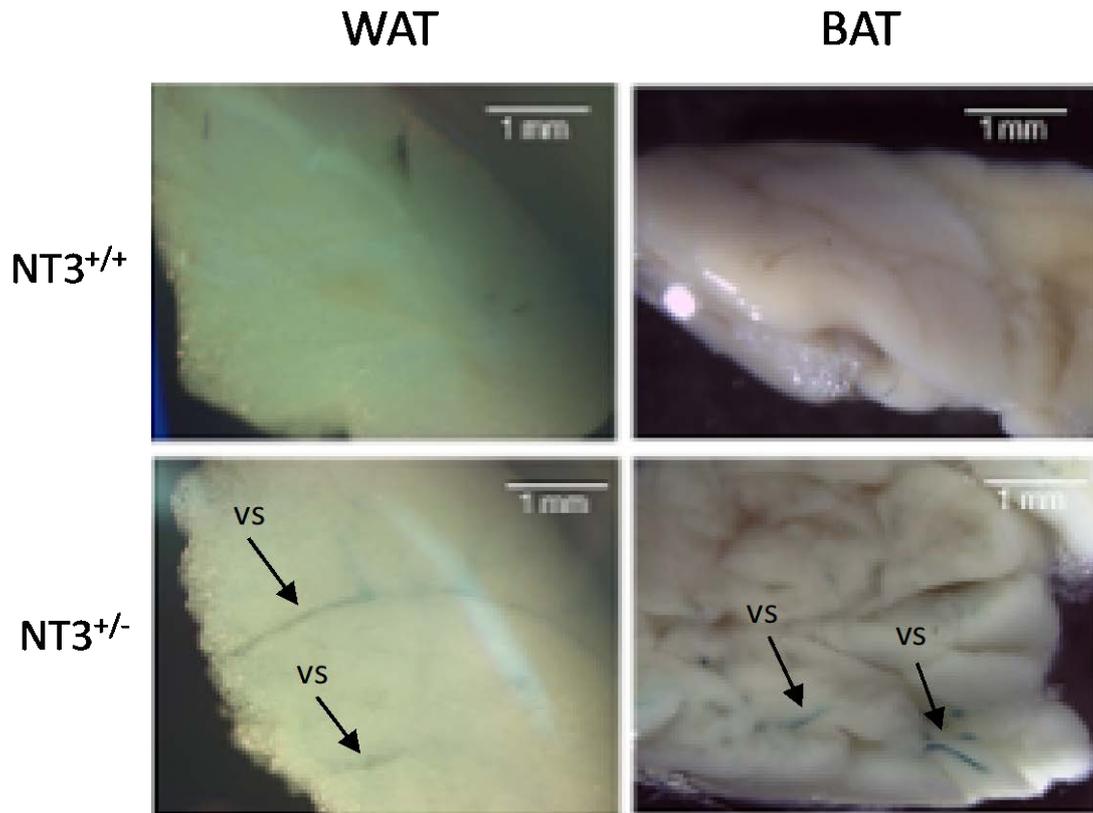


Figura 5. Imágenes representativas de n=3 experimentos de la tinción histoquímica por β -Galactosidasa de tejido adiposo visceral (WAT) y tejido adiposo interescapular (BAT) en ratones modificados genéticamente: ratones heterocigotos NT3^{+/-} y sus controles (NT3^{+/+}). Las estructuras teñidas de azul son aquellas que expresan NT3. Las flechas muestran la actividad β -galactosidasa en vasos sanguíneos (vs). Aumento 2,5X; escala de la barra: 1 mm.

2. EFECTO DE LA NT3 SOBRE LA LIPÓLISIS EN ADIPOCITOS AISLADOS

La presencia del receptor TrkC en adipocitos aislados de rata (Wad), sugiere la existencia de un papel funcional de este receptor en el tejido adiposo, por lo que se estudió su posible actividad en la lipólisis. Para determinar si NT3 vía TrkC tiene efectos en el metabolismo lipídico se aislaron adipocitos de WAT de ratas Wistar de 16 semanas que se incubaron durante 90 min sin (control) o con NT3 (32 ng ml⁻¹ o 96 ng ml⁻¹), el antagonista no selectivo del receptor Trk, K252a (0,2 μM), o con NT3 + K252a (Figura 6). Además, teniendo en cuenta el efecto descrito por los AR-β sobre la lipólisis, los adipocitos se incubaron en paralelo con concentraciones crecientes de isoprenalina (0,1, 1 y 10 μM). En todos los casos, el glicerol producido por cada uno de estos estímulos se comparó con el producido por los adipocitos control, a los que no se les aplicó ningún fármaco.

NT3 activa la lipólisis en adipocitos de rata Wistar de 16 semanas

Los resultados muestran que, en Wad, la isoprenalina produce un aumento concentración dependiente en la formación de glicerol (Figura 6). NT3 (32 ng ml⁻¹) también produce un aumento en la liberación de glicerol similar al producido por isoprenalina 0,1 μM, pero una concentración mayor de NT3 (96 ng ml⁻¹) no produjo una respuesta mayor. El efecto de NT3 fue inhibido en presencia del antagonista de Trk, K252a. A su vez, se comprobó que K252a por sí solo no producía ningún efecto en los niveles de glicerol (Figura 6).

En conjunto estos resultados sugieren que NT3 activa la lipólisis en adipocitos de rata a través de la estimulación del receptor Trk, esta actividad lipolítica parece ser menos eficaz que la inducida por isoprenalina y, por tanto, NT3 debe estar implicado en otras funciones en el tejido adiposo.

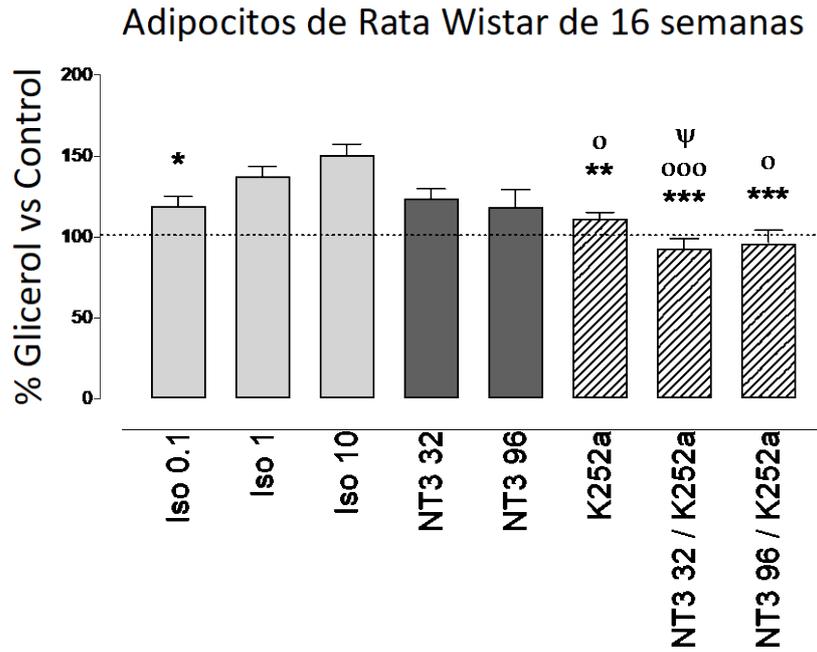


Figura 6. Efecto lipolítico de NT3 vía TrkC en adipocitos viscerales de rata Wistar de 16 semanas (Wad). Se utilizó: isoprenalina (Iso) a concentración de 0,1 μM , 1 μM y 10 μM ; NT3 a concentración 32 y 96 ng ml^{-1} con y sin K252a (0,2 μM); y K252a (0,2 μM). Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido del test de Brown-Forsythe y Welch, siendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs isoprenalina 10 μM , ° $p < 0,05$, °°° $p < 0,001$ vs isoprenalina 1 μM , ψ $p < 0,05$ vs NT3 32 ng ml^{-1} . Resultados expresados como % glicerol liberado vs control y representan la media \pm e.e.m de $n=15$ experimentos.

3. EFECTO DE LA VÍA NT3/TrkC SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS HUMANOS

Analizamos el posible efecto de la vía NT3/TrkC en el proceso de la diferenciación de adipocitos humanos. Para ello, los preadipocitos humanos fueron diferenciados en adipocitos durante 15 días (procedimiento explicado en los apartados 1 y 6 de métodos) en ausencia (control) o presencia de NT3 (32 ng ml⁻¹), K252a (0,2 µM) y NT3 (32 ng ml⁻¹) + K252a (0,2 µM).

3.1. CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA DE LOS ADIPOCITOS TRAS SU DIFERENCIACIÓN EN PRESENCIA DE NT3

NT3 disminuye el tamaño de adipocitos humanos

Se observó que el tratamiento crónico con NT3 (32 ng ml⁻¹) produjo una disminución significativa en el tamaño de los adipocitos respecto a adipocitos control no tratados (Figura 7A y B). Además, esta disminución no se reprodujo cuando los adipocitos fueron diferenciados en presencia de NT3 (32 ng ml⁻¹) junto con el antagonista de Trk, K252a (0,2 µM) o K252a solo (Figura 7A y B).

A su vez, para determinar si el tratamiento con NT3 (32 ng ml⁻¹) producía algún efecto sobre la acumulación de grasa dentro de los adipocitos, se realizaron medidas del diámetro de las gotas lipídicas (LDs, del inglés *lipid droplets*). Tal y como se indica en la Figura 7C, el tratamiento con NT3 no modificó el diámetro de las LDs. Sin embargo, la incubación con K252a o NT3+K252a aumentó significativamente el tamaño de las LDs de los adipocitos (Figura 7C).

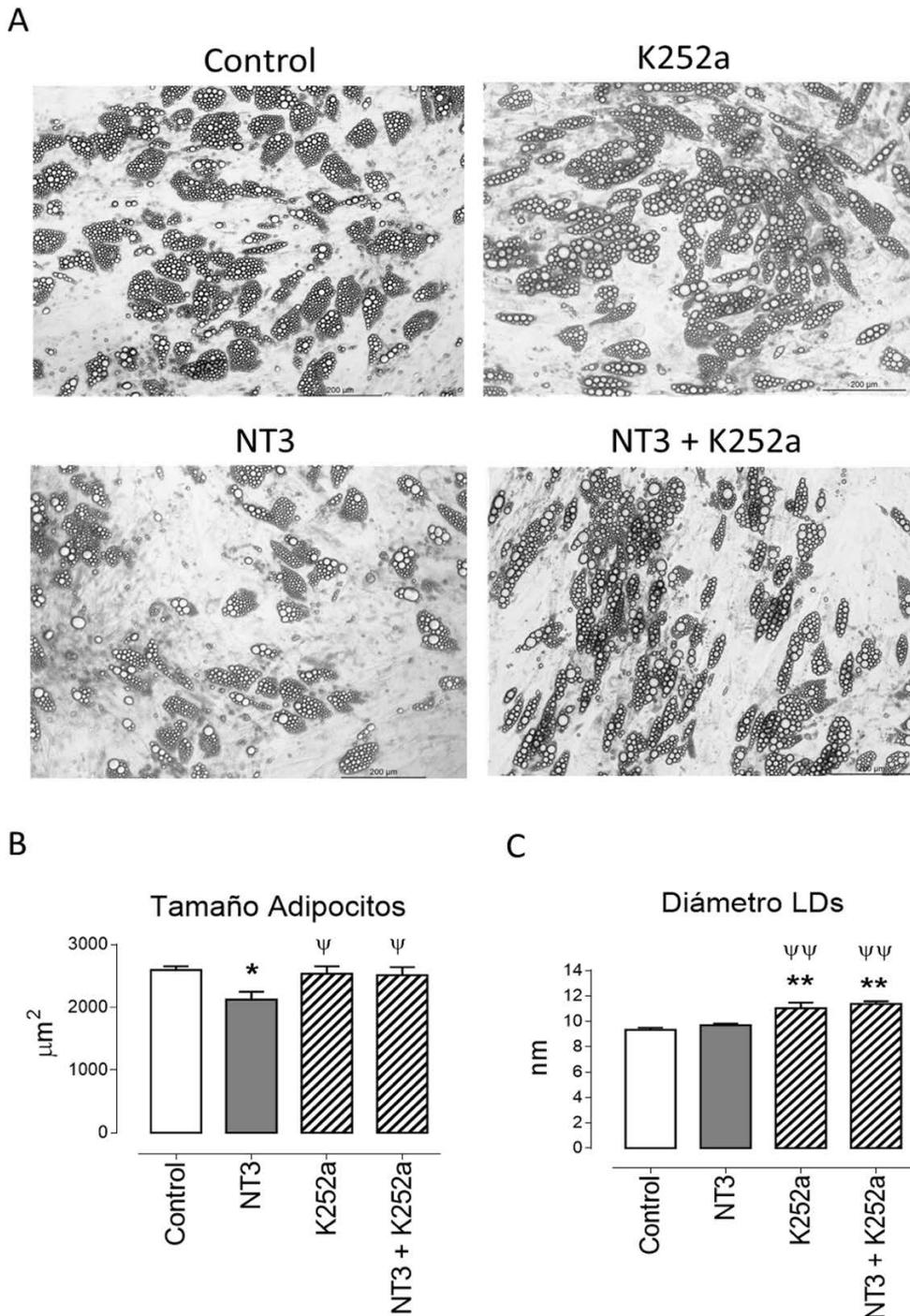


Figura 7. Efectos de NT3 en la morfología de adipocitos humanos diferenciados a partir de preadipocitos humanos. (A) Imágenes representativas de adipocitos diferenciados a partir de preadipocitos en presencia de distintos estímulos: ausencia de estímulo (Control), NT3 (32 ng ml⁻¹), K252a (0,2 µM) y NT3 (32 ng ml⁻¹) + K252a (0,2 µM). Aumento 10X; barra de calibración 200 µm. **(B)** Cuantificación del tamaño de los adipocitos (área, µm²). Para cada experimento se tomaron medidas de 10 adipocitos que se repitieron para 5 campos diferentes. **(C)** Cuantificación del diámetro (nm) de las gotas lipídicas (LDs) de los adipocitos. Para cada experimento se midieron 5 LDs de 5 adipocitos y se repitió para 5 campos diferentes. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido del test Newman-Keuls siendo *p < 0,05, **p < 0,01 vs control, ^ψp < 0,05, ^{ψψ}p < 0,01 vs NT3. Los resultados representan la media ± e.e.m. de n=5 experimentos.

3.2. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE UCP-1 EN LOS ADIPOCITOS TRAS SU DIFERENCIACIÓN EN PRESENCIA DE NT3

Con objeto de determinar si el menor tamaño de los adipocitos maduros humanos tras el proceso de diferenciación a partir de los preadipocitos en presencia de NT3 estaba asociado con un aumento del marcador de los adipocitos pardos, UCP-1 (principal determinante de la termogénesis inducida por frío), se analizó la expresión proteica del mismo en los adipocitos diferenciados en ausencia (control) y presencia de NT3.

La diferenciación de adipocitos en presencia de NT3 aumenta la expresión de UCP1

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento crónico con NT3 (32 ng ml⁻¹) durante el proceso de diferenciación produce un incremento de la expresión proteica de UCP-1 en los adipocitos maduros (Figura 8). Esta observación, podría justificar la disminución de tamaño observada en los adipocitos diferenciados en presencia de NT3 (descrita en el apartado anterior).

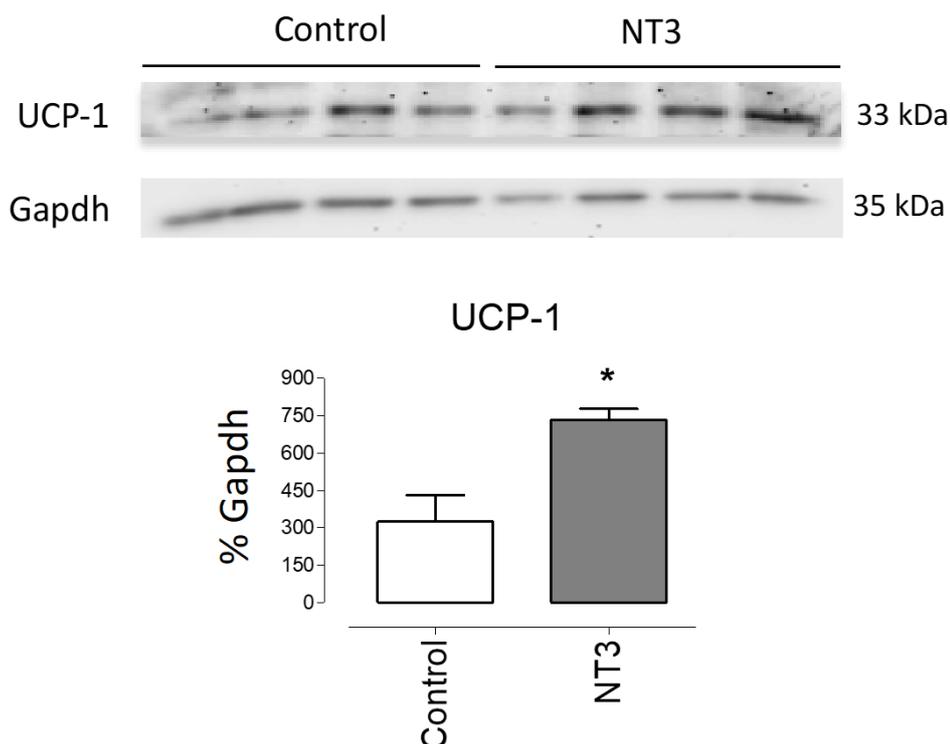


Figura 8. Western Blot y análisis de expresión proteica de UCP-1 en adipocitos humanos diferenciados a partir de preadipocitos humanos en ausencia (control) o presencia de NT3 (32 ng ml⁻¹). (A) Western Blot representativo de UCP-1/Gapdh. (B) Cuantificación de la expresión proteica de UCP-1. Análisis estadístico: t de Student, siendo *p<0,05. Los resultados representan la media ± e.e.m. de n=4.

3.3. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS AR- β TRAS SU DIFERENCIACIÓN EN PRESENCIA DE NT3

En la Figura 9 se muestran los niveles de expresión de los diferentes subtipos de *ADRB*. Se puede observar que los niveles de mRNA del *ADRB1* y *ADRB2* fueron mayores que los de *ADRB3* tanto en preadipocitos como en adipocitos diferenciados. En preadipocitos, los niveles de mRNA del *ADRB3* fueron indetectables (Figura 9C). La diferenciación en presencia de NT3 disminuyó significativamente los niveles de expresión del *ADRB1* (Figura 9A), no modificó la expresión del *ADRB2* (Figura 9B), y produjo una disminución de *ADRB3* que no alcanzó significación estadística. (Figura 9C).

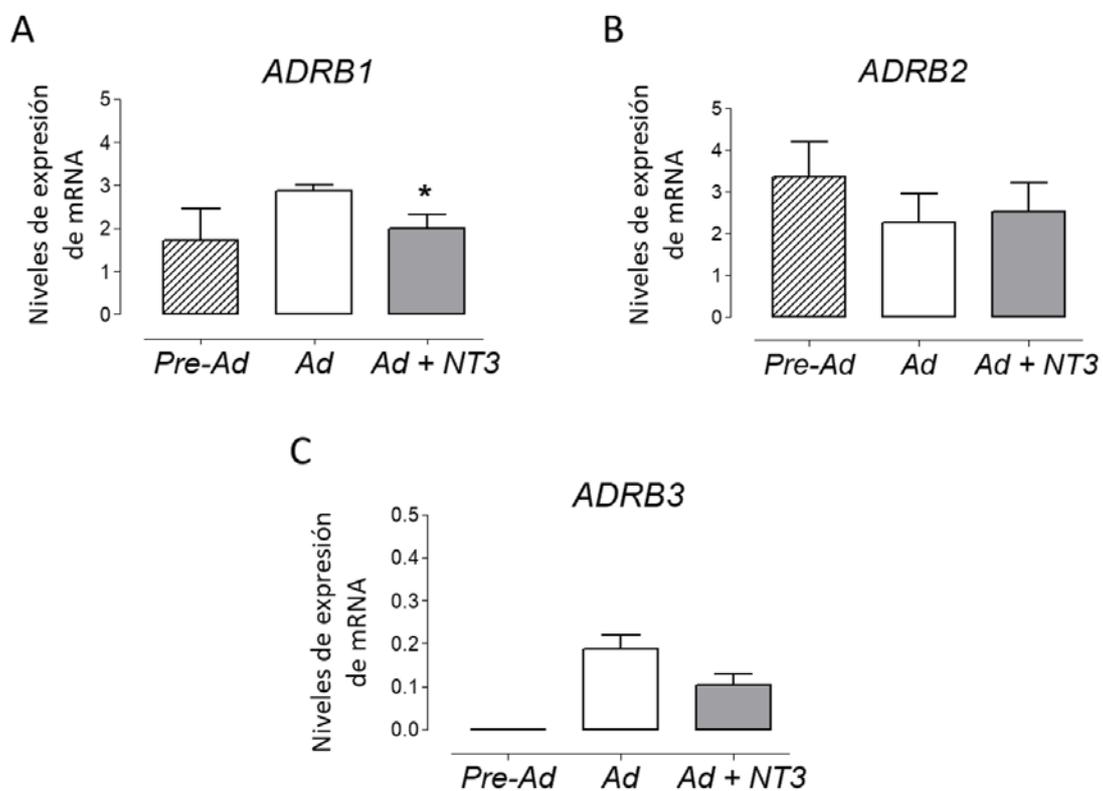


Figura 9. Análisis comparativo de los niveles de expresión génica de los distintos subtipos de AR- β (*ADRB1*, *ADRB2*, *ADRB3*) en preadipocitos (Pre-Ad) y adipocitos humanos diferenciados en ausencia (control, Ad) o presencia de NT3 (32 ng ml⁻¹, Ad + NT3). Análisis estadístico: t de Student, siendo *p<0,05 vs. adipocitos control (Ad). Los valores de mRNA se expresan como $2^{-\Delta Ct} \times 10^4$ y están normalizados usando *GAPDH* como gen de referencia. Los resultados representan la media \pm e.e.m. de n=5 experimentos.

4. EXPRESIÓN GÉNICA Y CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN TEJIDO ADIPOSO DE RATONES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE CON UNA EXPRESIÓN REDUCIDA DE NT3

Con objeto de analizar el papel funcional de NT3 *in vivo* utilizamos ratones modificados genéticamente con una expresión reducida de NT3. Los modelos escogidos para el estudio son dos. En el primer modelo, los ratones son heterocigotos para NT3, los ratones utilizados *Ntf3^{+/-}* (*NT3^{+/-}*) expresan niveles reducidos de NT3. En el segundo modelo, los ratones *Ntf3^{fllox1/fllox2}; Tie-Cre^{+/-}* (eNT3-), tienen delecionada la expresión génica de NT3 en el endotelio. En ambos casos, los ratones usados como control forman parte de las mismas cepas modificadas, pero expresan NT3 en su totalidad, se trata de los ratones *Ntf3^{+/+}* (*NT3^{+/+}*) y *Ntf3^{fllox1/fllox2}; Tie-Cre^{0/0}* (eNT3-), respectivamente.

En primer lugar, se analizó la expresión de los genes estudiados en la presente tesis (*Ntf3*, *Ntrk3*, *Adrb1*, *Adrb2* y *Adrb3*), con objeto de determinar si la expresión reducida de NT3 conlleva cambios en la expresión de su receptor y/o de los subtipos de AR-β. Se analizó, además, si existen diferencias en las medidas antropométricas y bioquímicas de estos animales y, por último, se estudió histológicamente el tejido adiposo para cuantificar posibles cambios en la morfología y el tamaño de los adipocitos. Los dos territorios grasos objeto de estudio son: WAT y BAT.

4.1. EXPRESIÓN GÉNICA DE *Ntf3*, *Ntrk3* Y LOS TRES SUBTIPOS DE *Adrb*

Los ratones con expresión de NT3 endotelial reprimida presentan en WAT y BAT niveles inferiores de mRNA de *Ntf3*, *Ntrk3* y *Adrb3* respecto a sus controles.

En los ratones heterocigotos para NT3 (*NT3^{+/-}*), los datos muestran que, efectivamente, tanto en WAT como en BAT, hay una disminución significativa en los niveles de mRNA para NT3 respecto a sus controles (*NT3^{+/+}*) (Figura 10A y B). No se detectaron diferencias, en WAT ni en BAT, en la expresión génica de *Ntrk3* y de los tres subtipos de *Adrb*: *Adrb1*, *Adrb2* y *Adrb3* (Figura 10A y B).

Los ratones con expresión endotelial de NT3 reprimida (eNT3-), también presentan una disminución significativa en los niveles de mRNA para NT3 respecto a sus controles (eNT3+), tanto en WAT como en BAT (Figura 10C y D). Sin embargo, en ambos territorios

RESULTADOS

adiposos, los ratones eNT3- presentan niveles de *Ntrk3* y *Adrb3* inferiores respecto a sus controles (eNT3+), siendo en todos los casos la diferencia significativa (Figura 10C y D). No se detectaron cambios en los niveles de expresión de *Adrb1* o *Adrb2*, tanto en WAT como en BAT (Figura 10C y D).

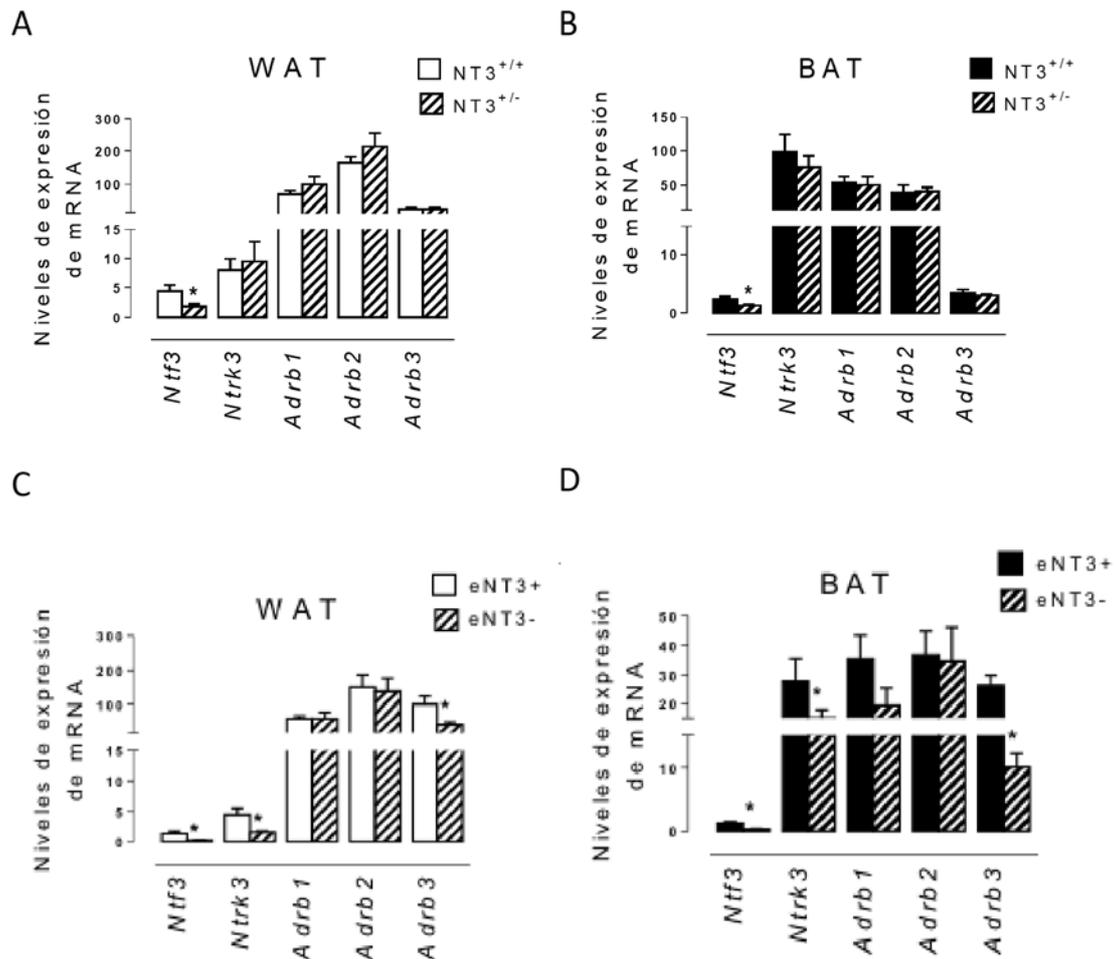


Figura 10. Análisis comparativo de los cambios en los niveles de expresión génica en tejido adiposo visceral (WAT, A y C) e interescapular (BAT, B y D) de ratones modificados genéticamente heterocigotos para NT3 (NT3^{+/-}, n=6,) y sus controles (NT3^{+/+}, n=8) (A y B) y, de ratones sin expresión de NT3 endotelial (eNT3⁻, n=11) y sus controles (eNT3⁺, n=11) (C y D). Expresión génica de *Ntf3*, *Ntrk3* y los 3 subtipos de AR-β (*Adrb1*, *Adrb2* y *Adrb3*). Análisis estadístico: t de Student, siendo *p<0,05 vs controles. Los valores de mRNA se expresan como 2^{-ΔCt} x10⁴ y están normalizados usando *Gapdh* como gen de referencia. Los resultados representan la media ± e.e.m.

4.2. VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Se midieron las siguientes variables antropométricas en los diferentes grupos de animales: edad, talla, peso corporal, peso de los depósitos de grasa (WAT, BAT, KAT) por peso corporal, tamaño de los depósitos de grasa (WAT, BAT, KAT) y perímetro abdominal. Asimismo, como marcadores bioquímicos se analizaron los niveles de colesterol total, cHDL, cLDL, TG y glucosa en sangre. No se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas entre los ratones eNT3⁻ y sus controles, eNT3⁺ ni entre los ratones NT3^{+/-} y sus controles, NT3^{+/+} (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis del peso corporal, depósitos de grasa y marcadores bioquímicos en plasma de ratones modificados genéticamente con expresión deficiente de NT3.

	NT3 +/+ (n=8)	NT3 +/- (n=6)	eNT3+ (n=11)	eNT3- (n=11)
Edad, semanas	35,8 ± 0,4	38,5 ± 2,3	57,1 ± 5,1	53,3 ± 3,0
Peso corporal, gr	38,1 ± 1,7	37,2 ± 2,7	34,3 ± 0,4	31,7 ± 1,2
WAT/peso corporal, gr	1,6 ± 0,5	1,6 ± 0,6	2,5 ± 0,2	2,17 ± 0,6
KAT/Peso corporal, gr	0,1 ± 0,05	0,04 ± 0,03	0,1 ± 0,03	0,2 ± 0,1
BAT/Peso corporal, gr	0,5 ± 0,06	0,4 ± 0,07	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Longitud WAT, cm	3,4 ± 0,5	2,3 ± 0,9	3,9 ± 0,4	2,8 ± 0,6
Longitud BAT, cm	1,6 ± 0,10	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Talla ratón, cm	10,4 ± 0,23	9,0 ± 0,3	9,0 ± 0,3	9,7 ± 0,2
Perímetro abdominal, cm	9,8 ± 0,73	9,5 ± 0,6	10,5 ± 0,0	9,0 ± 0,5
Glucosa, mg/dL	139,2 ± 15,5	160,7 ± 23,4	180,0 ± 13,9	174,2 ± 13,2
Colesterol total, mg/dL	133,4 ± 4,2	129,5 ± 7,1	123,7 ± 13,7	100,5 ± 8,7
cHDL, mg/dL	70,1 ± 4,3	72,7 ± 3,9	52,9 ± 5,3	45,2 ± 5,6
cLDL, mg/dL	49,1 ± 5,5	34,7 ± 5,0	56,6 ± 9,3	40,8 ± 3,4
TG, mg/dL	149,4 ± 24,3	154,0 ± 39,0	77,0 ± 8,5	87,2 ± 10,6

Ratones heterocigotos (NT3^{+/-}) y sus controles (NT3^{+/+}) y ratones sin expresión endotelial (eNT3⁻) y sus controles (eNT3⁺). cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; TG: triglicéridos. Los resultados representan la media ± e.e.m de n experimentos.

4.3. CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y EN LA EXPRESIÓN DE UCP-1 EN TEJIDO ADIPOSO VISCERAL E INTERESCAPULAR

Por último, se analizó si existían cambios morfológicos en el tejido y en los adipocitos de WAT y BAT.

Ambos modelos de ratones modificados genéticamente presentan aumento del tamaño de los adipocitos frente a sus controles.

Los resultados del estudio histológico indican que los ratones heterocigotos para NT3 (NT3^{+/-}) presentaban tanto en WAT como en BAT, un aumento significativo del área de los adipocitos frente a sus controles (NT3^{+/+}) (Figura 11A y B).

El análisis histológico del tejido adiposo de ratones eNT3⁻ y sus controles (eNT3⁺) muestra que los ratones eNT3⁻ presentan también hipertrofia de los adipocitos, detectándose un aumento del área significativo en los dos territorios analizados, WAT y BAT (Figura 11C y D). Además, en los cortes histológicos de BAT puede apreciarse un aumento de las LDs en los ratones eNT3⁻ (Figura 11C).

Es de destacar que, en este grupo de animales (eNT3⁻), el aumento del tamaño de los adipocitos viene acompañado de una disminución en la expresión génica del *Adbl3* en WAT y BAT de ratones eNT3⁻ frente a sus controles, eNT3⁺ (ver apartado 4.1 de resultados, Figura 10C y D).

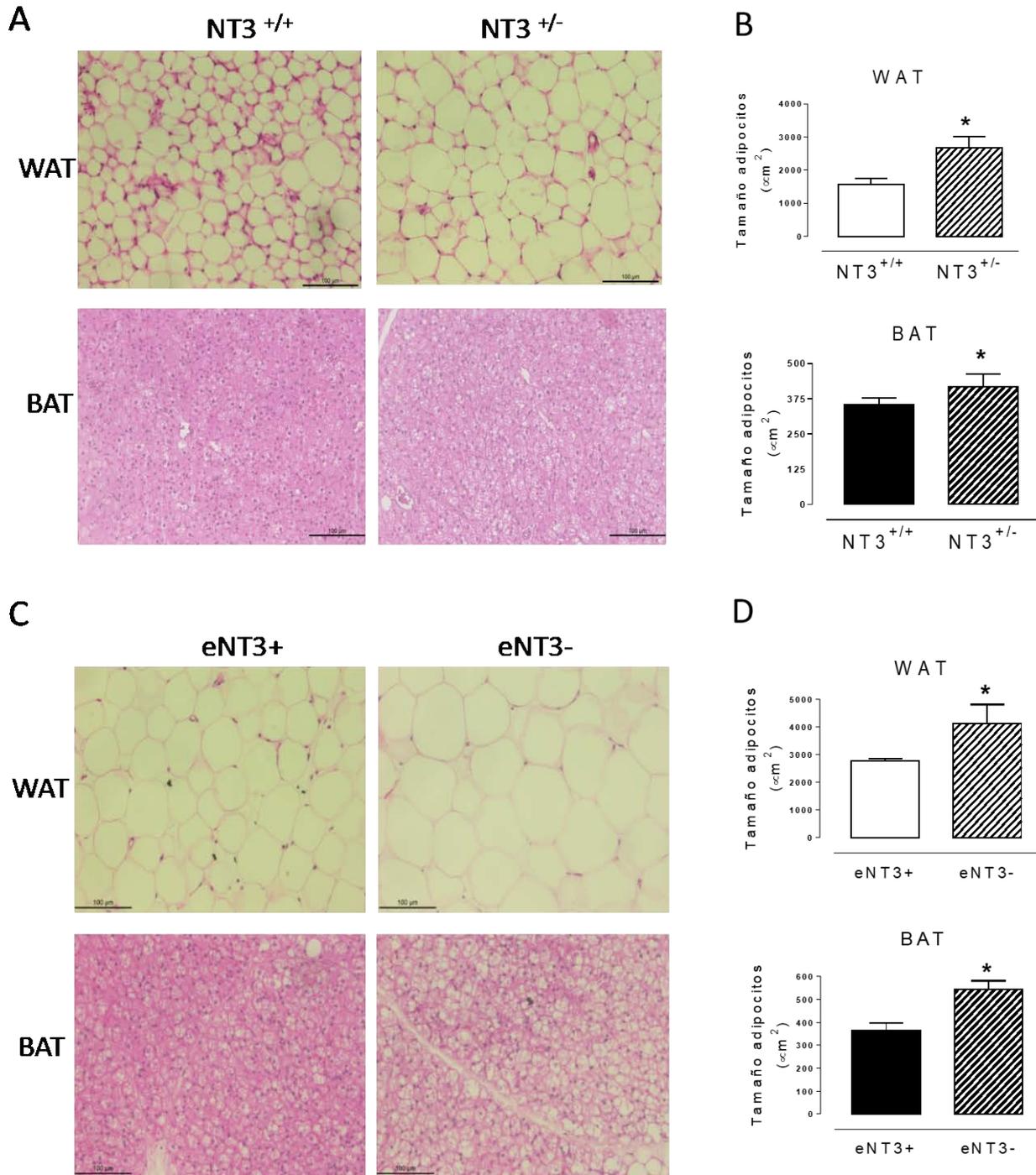


Figura 11. Análisis comparativo de los cambios morfológicos y en el área (μm²) en tejido adiposo visceral (WAT) y tejido adiposo interescapular (BAT) de ratones con expresión endotelial de NT3 reprimida. Cortes representativos de 5μm de grosor de WAT y BAT embebidos en parafina con tinción hematoxilina-eosina de ratones NT3^{+/+} y NT3^{+/-} (**A**) y de ratones eNT3- y eNT3+ (**C**) (aumento 20X; escala barra: 100 μm). Áreas (μm²) de los adipocitos de WAT y BAT de ratones NT3^{+/+} y NT3^{+/-} (**B**) y de ratones eNT3- y eNT3+ (**D**). Análisis estadístico: t de Student, siendo *p<0,05. Los resultados representan la media ± e.e.m. de n=4 ratones; para las áreas se tomaron valores de 100 adipocitos de 5 campos diferentes para cada ratón.

Los ratones con expresión de NT3 endotelial reprimida presentan mayores niveles de UCP-1 en BAT respecto a sus controles.

Finalmente, se analizó si también podían producirse cambios en los niveles de UCP-1 en BAT de estos ratones. En efecto, como muestra la figura 12, los ratones eNT3- presentan una disminución en los niveles de UCP-1 en BAT respecto a sus controles, los ratones eNT3+.

En conjunto estos resultados muestran que NT3 endotelial modula el tamaño y la expresión de UCP-1 en adipocitos no solo *in vitro* sino también *in vivo*.

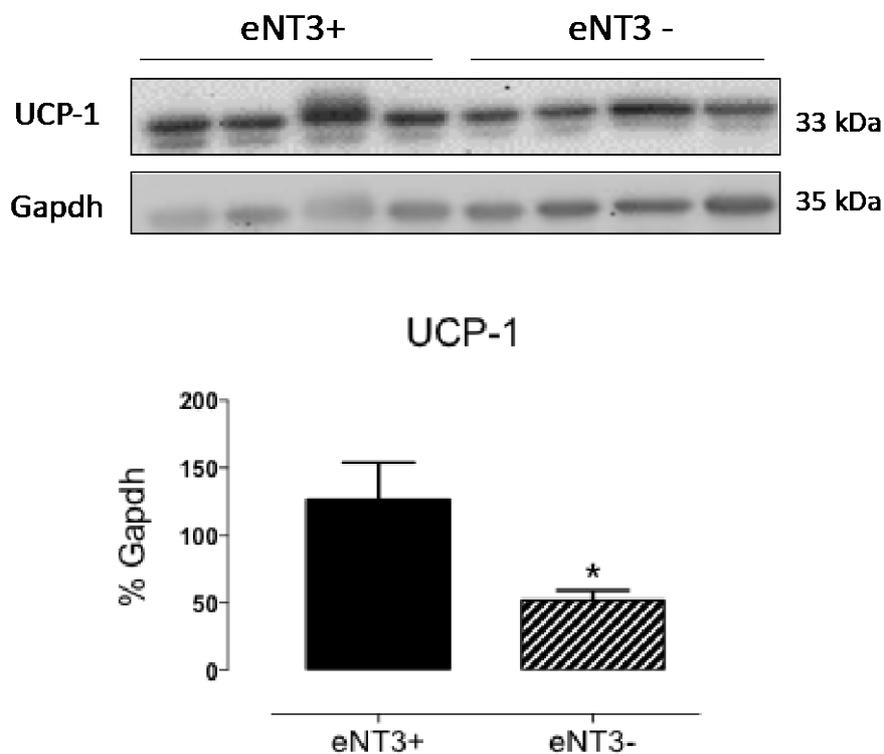


Figura 12. Western Blot representativo y análisis cuantitativo de la expresión proteica de UCP-1/Gapdh en tejido adiposo interescapular (BAT) de ratones modificados genéticamente sin expresión de NT3 endotelial (eNT3-, n=4) y sus controles (eNT3+, n=4). Análisis estadístico: t de Student, siendo *p<0,05 vs controles. Los resultados representan la media ± e.e.m. de n=4.

5. NT3 Y RIESGO CARDIOMETABÓLICO

5.1. NT3 Y RIESGO CARDIOMETABÓLICO EN RATAS ZUCKER

Las ratas Zucker constituyen un modelo genético de obesidad caracterizado por una expresión y actividad disminuidas de los AR- β_3 en el tejido adiposo (Charon et al., 1995). En concreto, se caracterizan por presentar obesidad genética, insulinoresistencia, intolerancia a la glucosa, síndrome metabólico e hiperlipemia (Vickers et al., 2011).

Se evaluó si existían cambios en los niveles de expresión de los genes *Ntf3*, *Ntrk3* y los 3 subtipos de *Adrb* (*Adrb1*, *Adrb2* y *Adrb3*), así como de expresión proteica de NT3 y TrkC en WAT, BAT de ratas Zucker obesas respecto a sus controles.

Además, se evaluó la funcionalidad vascular mediada por el sistema adrenérgico mediante experimentos de contractilidad (activación α_1 adrenérgica) y relajación (activación β adrenérgica) utilizando aorta aislada, así como la función endotelial (relajación por acetilcolina).

En primer lugar, se analizó y comparó el perfil lipídico de ambos grupos de ratas Zucker con el fin de caracterizar las diferencias entre las mismas. No se realizó la determinación de la glucosa dado que el modelo de ratas Zucker no presentan intrínsecamente alteraciones en la glucosa sanguínea. Los parámetros del perfil lipídico se encuentran resumidos en la tabla 11. Al analizar las diferencias, todos los parámetros lipídicos fueron significativamente mayores en las ratas Zucker obesas (Zob) respecto a sus controles (Zc).

Tabla 11. Variables antropométricas y perfil lipídico de un modelo de ratas con síndrome metabólico Zucker: ratas Zucker obesas y sus controles.

	Zucker control (n=5)	Zucker obesas (n=3)
Edad, semanas.	35	35
Peso, gramos	455,2 ± 8,7	612,3 ± 36,2**
TG, mg/dl	221,2 ± 25,9	887 ± 2,0****
Colesterol, mg/dl	160,0 ± 6,6	310,0 ± 12,5****
cHDL, mg/dl	58,6 ± 3,5	104,0 ± 5,5***
Colesterol No-HDL, mg/dl	101,4 ± 3,3	205,3 ± 9,7****

TG:triglicéridos; cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; colesterol no-HDL: colesterol total – cHDL. Datos representados como la media ± e.e.m. Análisis estadístico: t de Student, siendo **p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001.

5.1.1. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE NT3, TrkC Y AR β

La expresión génica de *Adrb3* disminuye en WAT, pero no en BAT de ratas Zucker obesas respecto a sus controles.

De forma similar a lo descrito en las ratas Wistar, los niveles de expresión génica del *Adrb3*, tanto en las ratas Zucker obesas como en sus controles, fueron mucho mayores que los del *Adrb1* y *Adrb2* (Figura 13).

Cuando se analizó si existían cambios en los niveles de expresión de los *Adrb* en ambos grupos de ratas Zucker, vimos que tanto en WAT como en BAT de ratas Zucker obesas se detectó un aumento en los niveles de mRNA del *Adrb2* respecto a sus controles (Figura 13C y D), mientras que no hubo cambios en la expresión del *Adrb1* (Figura 13A y B). Además, las ratas Zucker obesas presentan una disminución del *Adrb3* en WAT (Figura 13E), pero no en BAT (Figura 13F).

En ratas Zucker obesas disminuye la expresión génica de *Ntf3* mientras que aumenta la de *Ntrk3* en WAT, pero no en BAT.

Nuestros resultados demuestran una disminución significativa en los niveles de mRNA de *Ntf3* en WAT y un aumento significativo en BAT de ratas Zucker obesas en comparación con sus controles (Figura 14A y B).

En paralelo, detectamos un aumento significativo en los niveles de expresión génica de *Ntrk3*, en WAT de las ratas Zucker obesas (Figura 14D), sin cambios aparentes en BAT (Figura 14E).

Respecto a la expresión proteica de NT3, de forma similar a lo descrito en las ratas Wistar, se detectaron distintas bandas a, aproximadamente, 20, 25 y 35 kDa, que posiblemente se corresponden a distintas isoformas de NT3. Lo más destacable es el patrón de las bandas en cada uno de los tejidos y para cada grupo de animales.

En WAT, el patrón de expresión de NT3 es similar en las Zucker obesas y en sus controles, observándose bandas a 20 y 25 kDa, pero no a 35 kDa (Figura 14C). Sin embargo, en BAT el patrón de expresión varía entre las Zucker control y las obesas; mientras que en las Zucker control se detecta una banda mayoritaria a 35 kDa, las obesas presentan un patrón similar al descrito en WAT (bandas a 20 y 25 kDa, pero no a 35 kDa) (Figura 14C). Estos resultados sugieren un cambio en el patrón de expresión de la NT3 del BAT de las ratas Zucker obesas que se asemeja al obtenido en WAT

Respecto a la expresión proteica de TrkC se detecta en ambos tipos de tejidos adiposos, de forma similar a lo descrito en las ratas Wistar, una única banda a 110 kDa. Los niveles de expresión se correlacionan con lo descrito para la expresión génica, observándose un aumento en la expresión proteica de TrkC en WAT de ratas Zucker obesas vs sus controles y no detectándose cambios en BAT (Figura 14F).

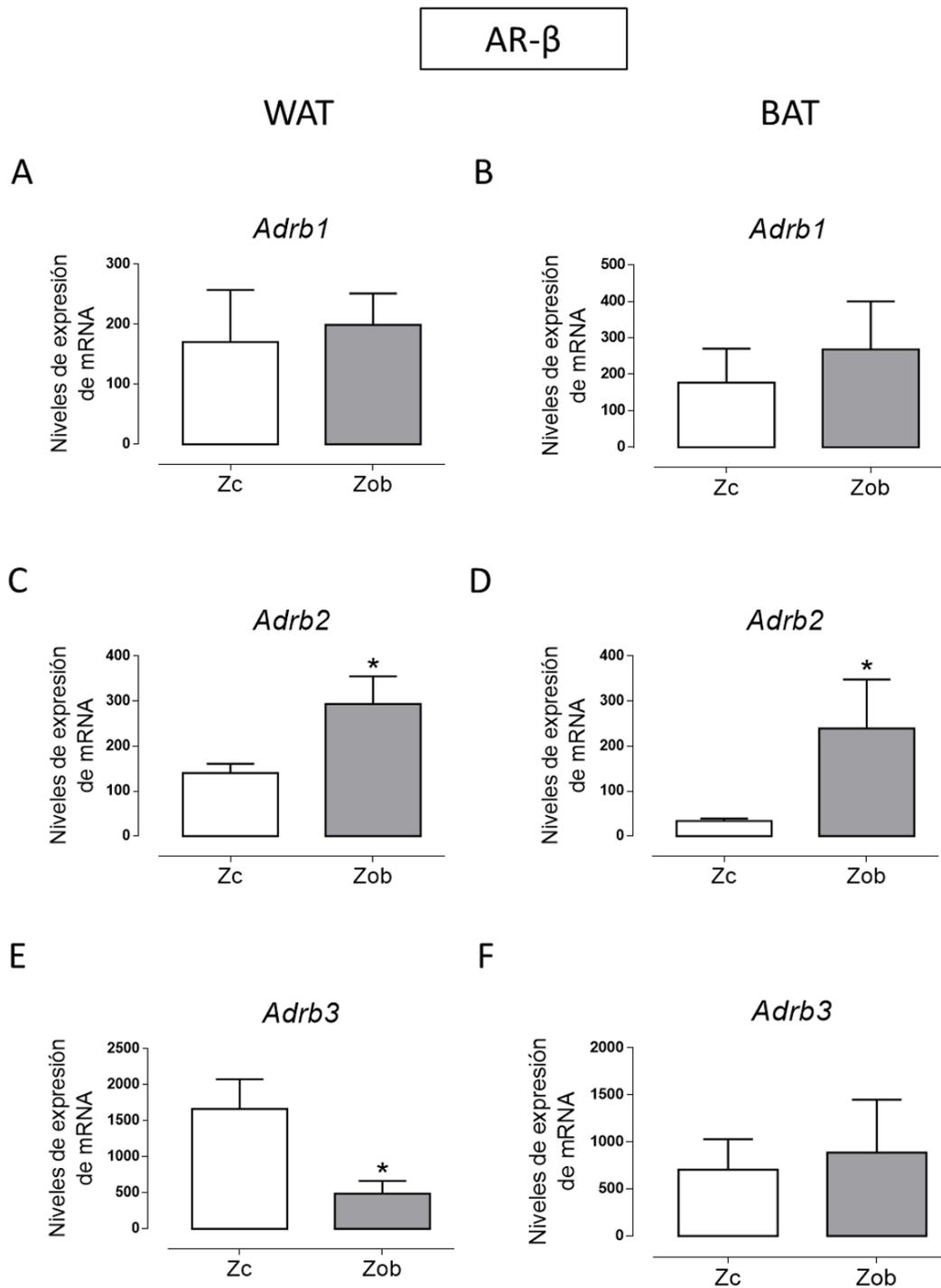


Figura 13. Análisis comparativo de los cambios en los niveles de expresión génica de los 3 subtipos de AR- β (*Adrb1*, *Adrb2*, *Adrb3*) en tejido adiposo visceral (WAT) e interescapular (BAT) de ratas Zucker obesas (Zob, n=3) y sus controles (Zc, n=5). Expresión génica de: *Adrb1* en WAT (A) y BAT (B), *Adrb2* en WAT (C) y BAT (D) y *Adrb3* en WAT (E) y BAT (F). Análisis estadístico: t de Student, siendo * $p < 0,05$. Los valores de mRNA se expresan como $2^{-\Delta Ct} \times 10^4$ y están normalizados usando *Gapdh* como gen de referencia. Los resultados representan la media de n experimentos.

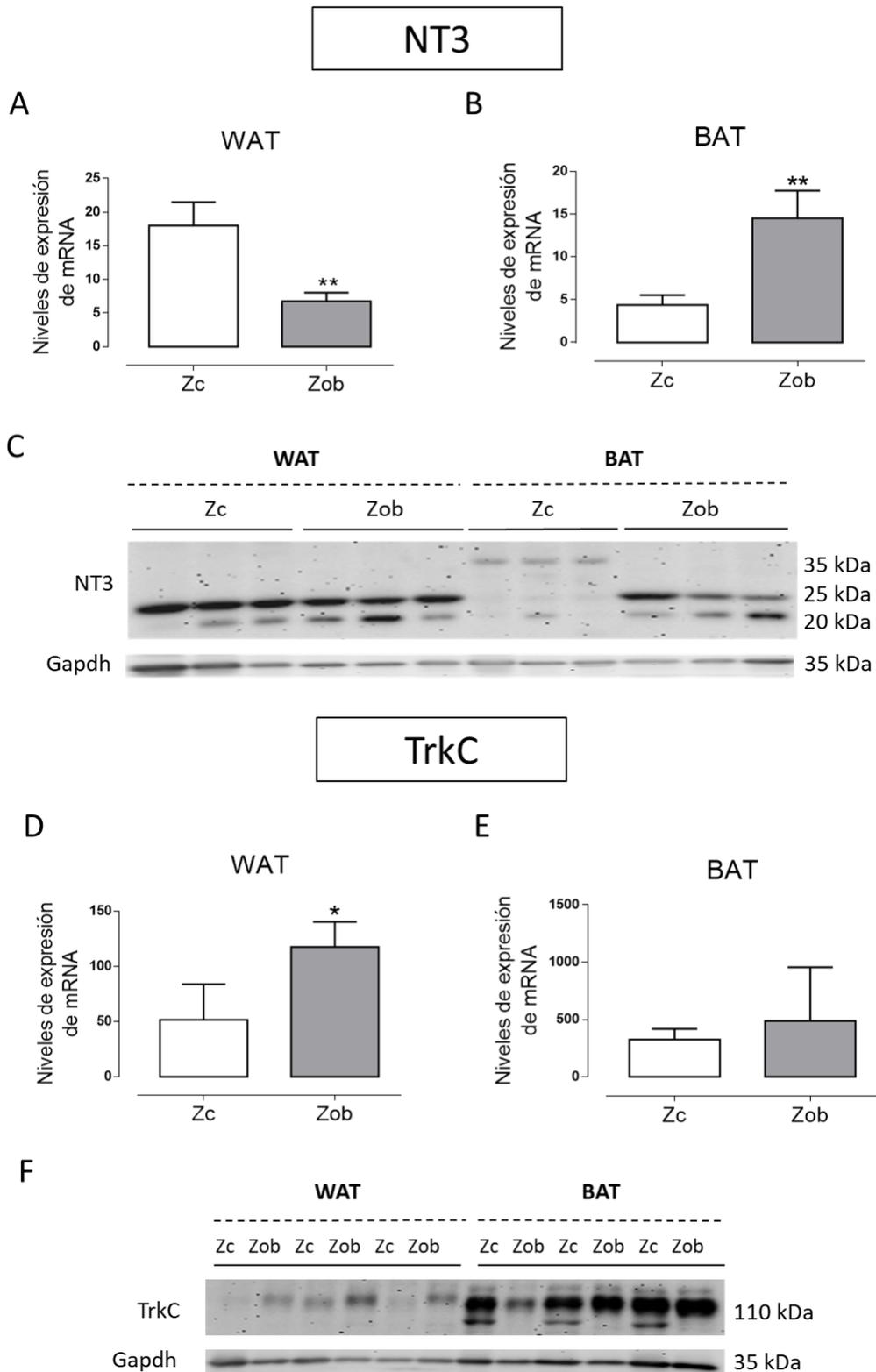
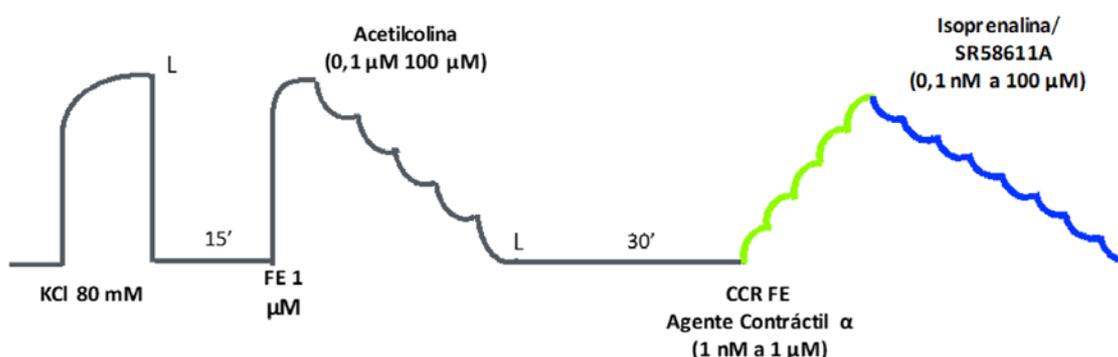


Figura 14. Análisis comparativo de los cambios en los niveles de expresión génica y proteica de NT3 y TrkC en tejido adiposo visceral (WAT) e interescapular (BAT) de ratas Zucker obesas (Zob, n=3) y sus controles (Zc, n=5). Expresión génica en WAT (A, D) y BAT (B, E). Western Blot representativos (C, F). Análisis estadístico: t de Student, siendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Los valores de mRNA se expresan como $2^{-\Delta Ct} \times 10^4$ y están normalizados usando *Gapdh* como gen de referencia. Los resultados representan la media \pm e.e.m de n experimentos.

5.1.2. CAMBIOS EN LA FUNCIONALIDAD VASCULAR

Se realizaron experimentos en anillos de aorta aislados de ratas Zucker obesas y sus controles en baño de órganos. Para examinar la funcionalidad mediada por el sistema adrenérgico se analizó la contracción inducida por la activación de AR- α_1 y la relajación inducida por AR- β y, para determinar la funcionalidad del endotelio se examinó la relajación inducida por acetilcolina. El protocolo experimental utilizado se ha descrito en el apartado 10 de materiales y métodos y se indica en el esquema 1 a continuación.



Esquema 1. Protocolo experimental diseñado para estudiar la contracción mediada por la activación de AR- α_1 (Fenilefrina) y la relajación mediada por la activación de AR- β (isoprenalina, selectivo β_1 y β_2 y SR 58611A selectivo β_3) o por acetilcolina. FE: fenilefrina, CCR: curva concentración-respuesta, L: lavado.

Funcionalidad endotelial

La adición acumulativa de concentraciones crecientes de acetilcolina dio lugar a curvas concentración-respuesta (CCR) de relajación en ambos grupos de animales detectándose diferencias significativas en la potencia (pEC_{50}) pero no en el efecto máximo (E_{max}) entre ratas Zucker obesas y sus controles. (Figura 15A).

Contractilidad mediada por AR- α_1

La fenilefrina (FE: agonista selectivo de AR α_1) dio lugar a CCR de contracción que fueron muy similares en las ratas Zucker obesas y sus controles. No se observan diferencias ni en la potencia (pEC_{50}) ni en el efecto máximo (E_{max}) entre ambos grupos de animales (Figura 15B).

Relajación mediada por AR- β

Se realizaron CCR de relajación en las que se emplearon dos agonistas de AR- β : isoprenalina (selectivo β_1 y β_2) y SR 58611A (selectivo β_3). Para ello, sobre la meseta de

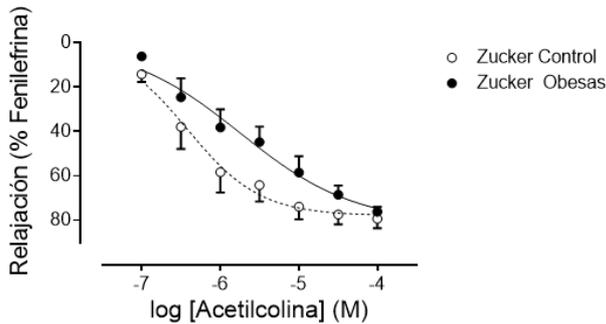
contracción inducida tras la CCR de FE se adicionaron al baño concentraciones acumulativas crecientes de isoprenalina o SR 58611A (Esquema 1).

La isoprenalina relajó de forma concentración-dependiente la contracción inducida por FE (1 μ M) (Figura 15C). En las ratas Zucker obesas el efecto relajante de la isoprenalina fue menor respecto a sus controles, aunque no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas ni en la potencia (pEC_{50}) ni en el efecto máximo (E_{max}) (Figura 15C).

Las CCR de relajación obtenidas al añadir concentraciones acumulativas crecientes de SR 58611A fueron bifásicas tanto en las ratas Zucker obesas como en sus controles (Figura 15D). El análisis de dichas curvas dio lugar a dos poblaciones de receptores, una con alta potencia para el SR 58611A (pEC_{50} 1) que corresponde al subtipo β_3 y otra por la que el SR 58611A tiene una menor potencia (pEC_{50} 2) que corresponde a los AR- β_1 y/o β_2 (Figura 15D). Los resultados muestran que hubo una disminución significativa en la potencia por el sitio de alta afinidad del SR 58611A en las ratas Zucker obesas respecto a sus controles.

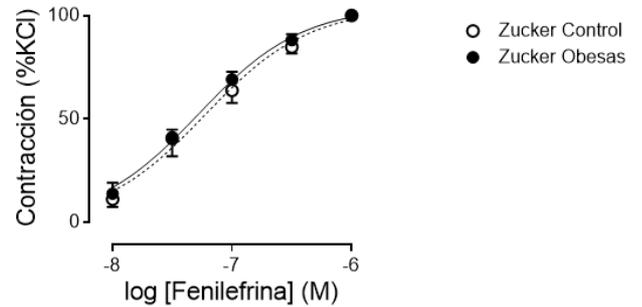
RESULTADOS

A



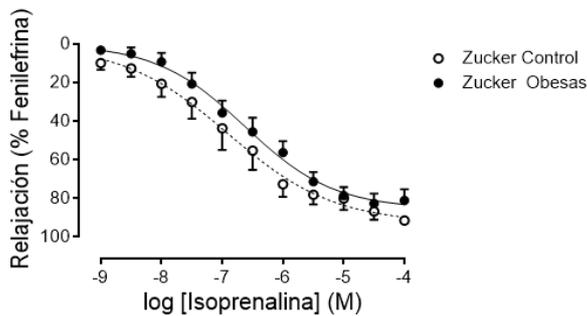
	Emax (% FE)	pEC ₅₀	n
Zucker Controles	77,93 ± 4,41	6,42 ± 0,13	5
Zucker Obesas	81,47 ± 10,92	5,74 ± 0,28*	3

B



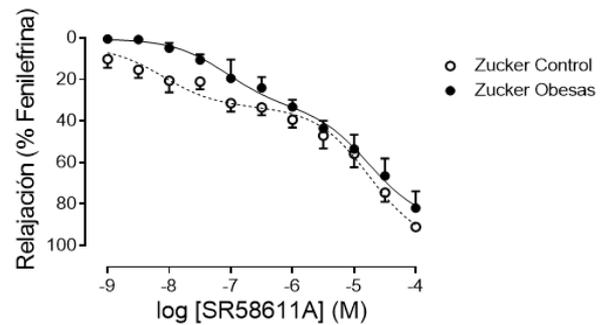
	Emax (% KCl)	pEC ₅₀	n
Zucker Controles	103,70 ± 4,63	7,23 ± 0,07	5
Zucker Obesas	104,40 ± 2,87	7,28 ± 0,05	3

C



	Emax (%FE)	pEC ₅₀	n
Zucker Controles	91,41 ± 2,26	6,90 ± 0,19	5
Zucker Obesas	81,07 ± 5,71	6,62 ± 0,13	3

D



	Emax (%FE)	pEC ₅₀ (1)	% Sitio 1	pEC ₅₀ (2)	n
Zucker Controles	91,04 ± 1,70	8,10 ± 0,27	30,70 ± 3,87	4,75 ± 0,17	4
Zucker Obesas	81,98 ± 8,03	7,07 ± 0,30*	36,72 ± 5,66	4,75 ± 0,25	3

Figura 15. Curvas concentración-respuesta (CCR) con diferentes agonistas y parámetros obtenidos en aorta de ratas Zucker obesas y sus controles. CCR de relajación con: agonista muscarínico acetilcolina (A) agonista α_1 fenilefrina (B) agonista β Isoprenalina (β_1 y β_2 selectivo) (C) y agonista β SR 58611A (β_3 selectivo) (D). pEC₅₀: -log [agonista] (M) necesaria para producir el 50 % del efecto máximo (Emax). pEC₅₀ (1) y (2): pEC₅₀ para sitio de unión de alta y baja potencia. % Sitio 1: porcentaje del sitio de alta potencia. Análisis estadístico: t de Student, *p<0,05. Los resultados representan la media ± e.e.m

5.2. NT3 Y RIESGO CARDIOMETABÓLICO EN HUMANOS

5.2.1. PACIENTES CON NORMO PESO O CON OBESIDAD DE GRADO 1

Se analizó la relación de la vía NT3/TrkC con los factores de riesgo cardiometabólico en la población inicial de pacientes definida en la tabla 9 (apartado 1.2 de resultados), en los que habíamos determinado la expresión de NT3, TrkC y los tres subtipos de AR- β en hAT. Estos pacientes tienen un IMC medio ($25,5 \pm 0,7 \text{ kg/m}^2$) que los sitúa por debajo del umbral de la obesidad, aunque el rango [$19\text{-}32 \text{ kg/m}^2$] incluye desde pacientes con normo peso hasta pacientes con obesidad de grado 1. En cualquier caso, no encontramos pacientes con obesidad moderada-severa.

En primer lugar, se determinaron si existían diferencias en las características demográficas y en el perfil bioquímico de la población según la presencia o no de HTA (normotensos o hipertensos), DM tipo 2 (presencia o ausencia) o según el estilo de vida (sedentario o activo). Todos los datos se recogen en las tablas 12, 13 y 14. En ningún caso se observaron diferencias significativas, salvo por unos mayores niveles de TG en población normotensa con respecto a hipertensa ($p=0,01195$). Por lo que, podemos concluir que las características de la población no difieren significativamente en términos de DM tipo 2, HTA y estilo de vida.

Tabla 12. Características demográficas y perfil bioquímico de todos los pacientes agrupados por la presencia o ausencia de hipertensión arterial.

	Normotensos (n = 13)	Hipertensos (n = 15)	<i>p</i> -valor
Edad, años	77,5 \pm 1,9	70,2 \pm 3,5	0,08766
IMC, kg/m ²	26,3 \pm 1,1	24,8 \pm 1,0	0,32745
Glucosa, mg/dL	97,3 \pm 5,1	96,7 \pm 5,6	0,94061
Colesterol total, mg/dL	183,0 \pm 9,9	181,9 \pm 8,9	0,93277
cHDL, mg/dL	49,4 \pm 2,8	58,2 \pm 5,5	0,16588
cLDL, mg/dL	98,2 \pm 8,3	101,1 \pm 6,5	0,78466
TG, mg/dL	146,4 \pm 22,8	84,5 \pm 6,0	0,01195*

IMC: índice de masa corporal; cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; TG: triglicéridos. Los resultados representan la media \pm e.e.m. Análisis estadístico: t Student, siendo * $p < 0,05$.

Tabla 13. Características demográficas y perfil bioquímico de todos los pacientes agrupados por la presencia o ausencia de diabetes *mellitus*.

	No diabéticos (n = 21)	Diabéticos (n = 7)	<i>p</i> -valor
Edad, años	72,9± 2,4	75,7 ± 4,3	0,56942
IMC, kg/m ²	25,8 ± 0,8	24,7 ± 1,6	0,52029
Glucosa, mg/dL	96,1 ± 3,1	99,6 ± 12,4	0,69902
Colesterol total, mg/dL	184,7 ± 8,0	175,4 ± 10,9	0,54707
cHDL, mg/dL	55,6 ± 4,1	48,8 ± 3,5	0,34822
cLDL, mg/dL	95,0 ± 5,9	112,0 ± 9,1	0,14427
TG, mg/dL	124,4 ± 15,7	84,0 ± 5,2	0,15718

IMC: índice de masa corporal; cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; TG: triglicéridos. Los resultados representan la media ± e.e.m. Análisis estadístico: t Student.

Tabla 14. Características demográficas y perfil bioquímico y de todos los pacientes agrupados por el estilo de vida.

	Activo (n = 18)	Sedentario (n = 10)	<i>p</i> -valor
Edad, años	73,1± 2,9	74,5 ± 3,0	0,75081
IMC, kg/m ²	25,3 ± 1,0	25,9 ± 0,9	0,67988
Glucosa, mg/dL	92,6 ± 3,9	104,9 ± 7,5	0,11677
Colesterol total, mg/dL	184,6 ± 6,7	178,4 ± 14,1	0,65633
cHDL, mg/dL	53,5 ± 3,6	54,4 ± 36,6	0,89070
cLDL, mg/dL	103,8 ± 5,5	90,8 ± 10,8	0,24762
TG, mg/dL	122,9 ± 15,0	98,8 ± 21,4	0,35524

IMC: índice de masa corporal; cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; TG: triglicéridos. Los resultados representan la media ± e.e.m. Análisis estadístico: t Student.

Cambios en los niveles de expresión génica de *NTF3*, *NTRK3* y los 3 subtipos de *ADRB* según su patología (HTA, DM tipo 2) y su estilo de vida

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de mRNA de *NTF3*, *NTRK3* y los 3 subtipos de *ADRB* en función de que los pacientes padecieran o no HTA o DM tipo 2 (resultados no mostrados). Sin embargo, al comparar los cambios en mujeres y hombres en función de su estilo de vida (activo o sedentario) se observó, como se muestra en la Figura 16B, una expresión menor en los niveles de *ADRB2* en los

pacientes con vida sedentaria vs vida activa no obteniéndose diferencias significativas en los otros genes analizados.

Correlación entre los niveles de expresión génica y las variables clínicas

Con objeto de determinar si existe alguna relación entre los niveles de expresión de los genes analizados y las variables clínicas de los pacientes (IMC, glucemia y perfil lipídico) se realizaron correlaciones entre ambos tipos de parámetros.

La expresión génica de *ADRB3* disminuye con el IMC

Se encontró una correlación inversa entre la expresión de *ADRB3* en hAT y el IMC de los pacientes (Figura 16A), pero no se correlaciona con el resto de las variables clínicas (glucosa y parámetros lipídicos).

En cualquier caso, no se obtuvieron correlaciones significativas entre los genes *NTF3* y *NTRK3* con las demás variables clínicas.

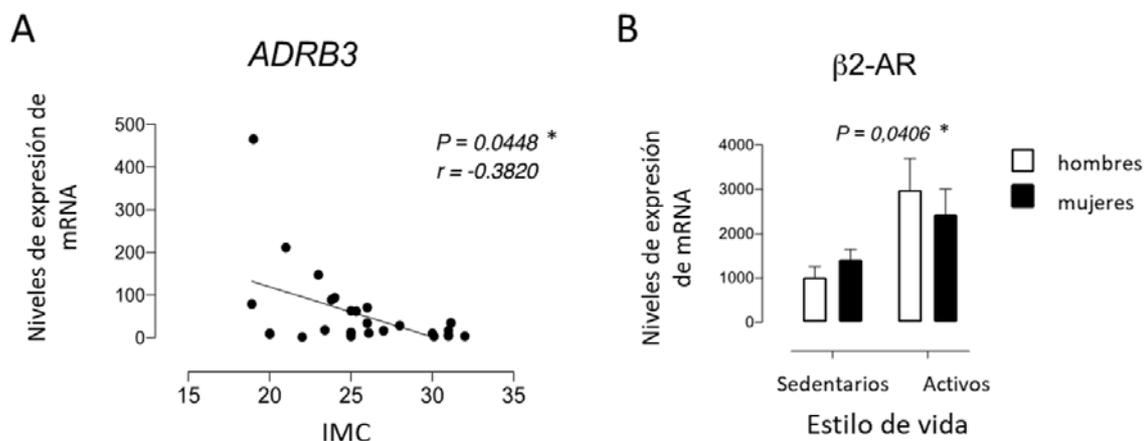


Figura 16. Representación gráfica de la correlación observada entre los niveles de mRNA de de *ADRB3* en tejido adiposo retroperitoneal (hAT) de humanos y el IMC de los pacientes (A). La correlación significativa de Spearman (* $p < 0,05$) se representa como una línea continua. **Niveles de mRNA de *ADRB2* en hAT de hombres y mujeres con vida sedentaria vs activa (B).** Análisis estadístico: ANOVA de dos vías, * $p < 0,05$. Los valores de mRNA se expresan como $2^{-\Delta Ct} \times 10^4$ y están normalizados usando *GAPDH* como gen de referencia. Los resultados representan la media \pm e.e.m. de $n=28$.

5.2.2. PACIENTES CON OBESIDAD MODERADA-SEVERA

A continuación, ampliamos el estudio inicial con un segundo grupo de pacientes con obesidad ($IMC > 35 \text{ kg/m}^2$) sometidos a cirugía bariátrica, analizando el patrón de expresión de NT3, TrkC y los tres subtipos de AR- β en tejido adiposo visceral (hAT) y las correlaciones de estos valores de expresión con las variables clínicas de los pacientes.

Descripción de la población utilizada

Las características de la población están descritas en la tabla 15. Tal y como se observa, la población estudiada no es homogénea respecto al género ya que participan un 73% de mujeres y un 27% de hombres y, además, el porcentaje de pacientes con HTA o DM tipo 2 es también diferente en mujeres (0% ó 9%, respectivamente) respecto a hombres (50% ó 83%, respectivamente), por lo que no se ha podido analizar si existen diferencias en los parámetros clínicos en función del género. Además, debido al tamaño de la muestra y al no ser la población homogénea, tampoco se han podido establecer análisis de la expresión de los genes según la patología (hipertensos o diabéticos) o el estilo de vida.

Tabla 15. Características demográficas y perfil bioquímico de todos los pacientes con obesidad sometidos a cirugía bariátrica y, agrupados por género.

	Total (n=22)	Mujeres (n=16, 72,7%)	Hombres (n=6, 27,3%)
Edad, años	41,0 ± 2,0 [26 – 57]	38,5 ± 2,2 [26-56]	47,6 ± 3,9 [33-57]
IMC, (kg/m²) antes de pérdida ponderal	46,9 ± 1,3 [37 – 63]	47,6 ± 1,6 [37-63]	45,1 ± 2,7 [37-56]
IMC, (kg/m²) previo a la cirugía, tras pérdida ponderal	44,8 ± 1,3 [35– 62]	45,9 ± 1,4 [39-62]	41,8 ± 2,7 [35- 52]
Glucosa, mg/dL	100,6 ± 6,8 [75 – 192]	92,5 ± 4,1 [75-122]	120,7 ± 18,9 [87-192]
HbA1c (%)	5,8 ± 0,2 [5 – 9]	5,5 ± 0,1 [5-6]	6,7 ± 0,6 [6-9]
Insulina, mIU/L	25,2 ± 3,2 [7 – 55]	23,9 ± 3,6 [7-55]	28,6 ± 6,6 [16-51]
HOMA-IR	6,9 ± 1,4 [1– 24]	5,7 ± 1,1 [1-15]	10,0 ± 3,8 [4-24]
TG, mg/dL	103,5 ± 8,4 [55 – 193]	95,1 ± 10,1 [55-193]	124,5 ± 14,6 [68-173]
Colesterol total, mg/dL	152,9 ± 6,1 [109 – 193]	157,8 ± 7,1 [109-193]	140,5 ± 12,1 [110-174]
cLDL, mg/dL	101,2 ± 5,2 [45 – 143]	108,7 ± 5,4 [71 – 143]	82,5 ± 12,2 [45-117]
cHDL, mg/dL	40,6 ± 1,3 [29 – 51]	39,2 ± 1,4 [29-49]	44,0 ± 2,2 [35-51]
Colesterol no-HDL, mg/dL	112,3 ± 5,6 [66 – 150]	118,6 ± 6,4 [74-15]	96,5 ± 10,8 [66-123]
Dislipemia	3 (14%)	1 (6%)	2 (33%)
Hipertensión arterial	3 (14%)	0 (0%)	3 (50 %)
Diabetes mellitus	7 (32%)	2 (12%)	5 (83 %)
Tabaquismo activo	2 (9%)	2 (12%)	0 (0%)
Estilo de vida sedentario	15 (68%)	11 (69%)	4 (67%)

IMC: índice de masa corporal; HbA1c: hemoglobina glicosilada A1c; HOMA-IR: modelo homeostático de resistencia a la insulina; TG:triglicéridos; cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; colesterol no-HDL: Colesterol total – cHDL. Rango entre corchetes para variables cuantitativas y porcentajes entre paréntesis para variables dicotómicas. Los resultados representan la media ± e.e.m.

NTF3 y su receptor TrkC se expresan en tejido adiposo de pacientes con obesidad

En la figura 17 se puede observar que el tejido adiposo de pacientes con obesidad también expresa los cinco genes estudiados (*NTF3*, *NTRK3*, *ADRB1*, *ADRB2* y *ADRB3*). El patrón de expresión es similar al obtenido en tejido adiposo de la población de pacientes inicial sin obesidad relevante (Ver Figura 4A, apartado 1.2 de resultados). Así, la expresión de *NTRK3* es superior a la de *NTF3*, pero la diferencia no llega a ser significativa. Respecto a la expresión de los distintos subtipos de *ADRB*, se confirma que existe una expresión elevada del subtipo *ADRB2* y una expresión muy reducida del *ADRB3* (Figura 17).

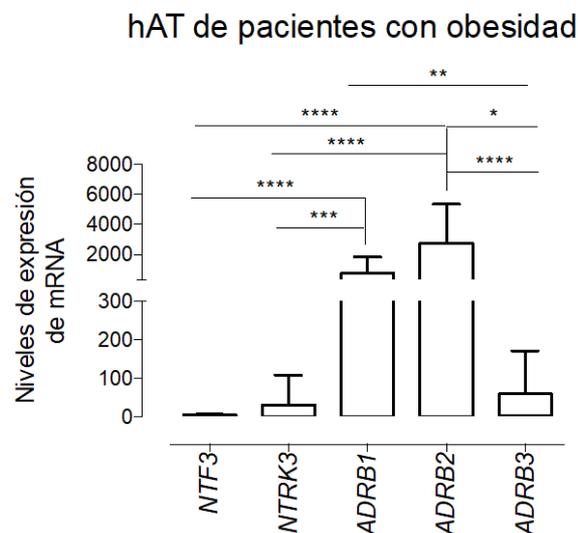


Figura 17. Análisis comparativo de los niveles de expresión de *NTF3*, *NTRK3* y los distintos subtipos de *ADRB* (*ADRB1*, *ADRB2*, *ADRB3*) en tejido adiposo retroperitoneal (hAT) de humanos con obesidad. Niveles de mRNA de *NTF3*, *NTRK3* y los tres subtipos de AR-β en hAT (n=22). Los valores de mRNA se expresan como $2^{-\Delta Ct} \times 10^4$ y están normalizados usando *GAPDH* como gen de referencia. Análisis estadístico: test de Kruskal-Wallis seguido del test de comparación múltiple Dunns, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Los resultados representan la media ± e.e.m.

Aunque se puede observar niveles de expresión menores de *NTF3* y *NTRK3* en la población de obesos vs la población inicial sin obesidad relevante, no se han podido establecer comparaciones válidas ya que hay diferencias importantes entre ambos grupos, más allá del IMC. Así, parten de una indicación de cirugía abdominal de etiología muy diferente (patología neoplásica tumoral vs cirugía bariátrica) y proceden de centros hospitalarios de regiones diferentes. Además, existe una diferencia significativa en la edad de las poblaciones con obesidad ($41 \pm 2,0$, n=22) y sin obesidad relevante ($73,5 \pm 2,1$, n=28) (p<0,001), siendo este uno de los factores que hemos demostrado en la

presente tesis que influye en los niveles de expresión de los genes analizados (ver apartado 6 de resultados).

Por lo tanto, se han realizado correlaciones entre los niveles de expresión génica y las variables clínicas de la población obesa total y de las mujeres que se detallan en el siguiente apartado. Se seleccionaron mujeres con el fin de homogenizar la muestra ya que del total de la población (n=22), la mayoría eran mujeres (n=16). Las variables analizadas fueron: demográficas (IMC), perfil glucídico (glucosa en ayunas, hemoglobina glicosilada A1c [HbA1c], insulina y HOMA-IR) y perfil lipídico (TG, colesterol total, cHDL, cLDL y colesterol no-HDL).

Correlación entre los niveles de expresión génica y las variables clínicas

Ni en la población total ni en el grupo de mujeres se encontraron correlaciones significativas entre el IMC y los diferentes genes estudiados. Tampoco entre los niveles de expresión génica de *NTRK3*, *ADRB1* o *ADRB2* y los diferentes parámetros del perfil glucídico o lipídico (resultados no mostrados). Sin embargo, se detectaron correlaciones significativas entre los niveles de expresión de los genes *NTF3* o *ADRB3* y el perfil glucídico que se detallan a continuación.

La expresión génica de NTF3 disminuye con la insulinemia

Los resultados muestran una correlación inversa y significativa entre los niveles de *NTF3* y los de insulina, tanto en la población total (Figura 18E) como en la de mujeres (Figura 19E). Sin embargo, no se obtuvieron correlaciones significativas con el resto de los parámetros del perfil glucídico (glucosa en ayunas, HbA1c y HOMA-IR) en ninguna de las poblaciones (Figura 18A, C y G; Figura 19A, C y G).

La expresión génica de ADRB3 disminuye con la insulinemia y con HOMA-IR y, con la glucemia o HbA1c

Los resultados muestran una correlación inversa y significativa entre los niveles de *ADRB3* y los niveles de insulina o los de HOMA-IR, tanto en la población total (Figura 18F y 18H, respectivamente) como en la de mujeres (Figura 19F y 19H, respectivamente). Además, la expresión de *ADRB3* se correlacionó de forma inversa y significativa con los niveles de glucosa en la población total (Figura 18B) o con los niveles de HbA1c en el grupo de mujeres (Figura 19D).

Población total

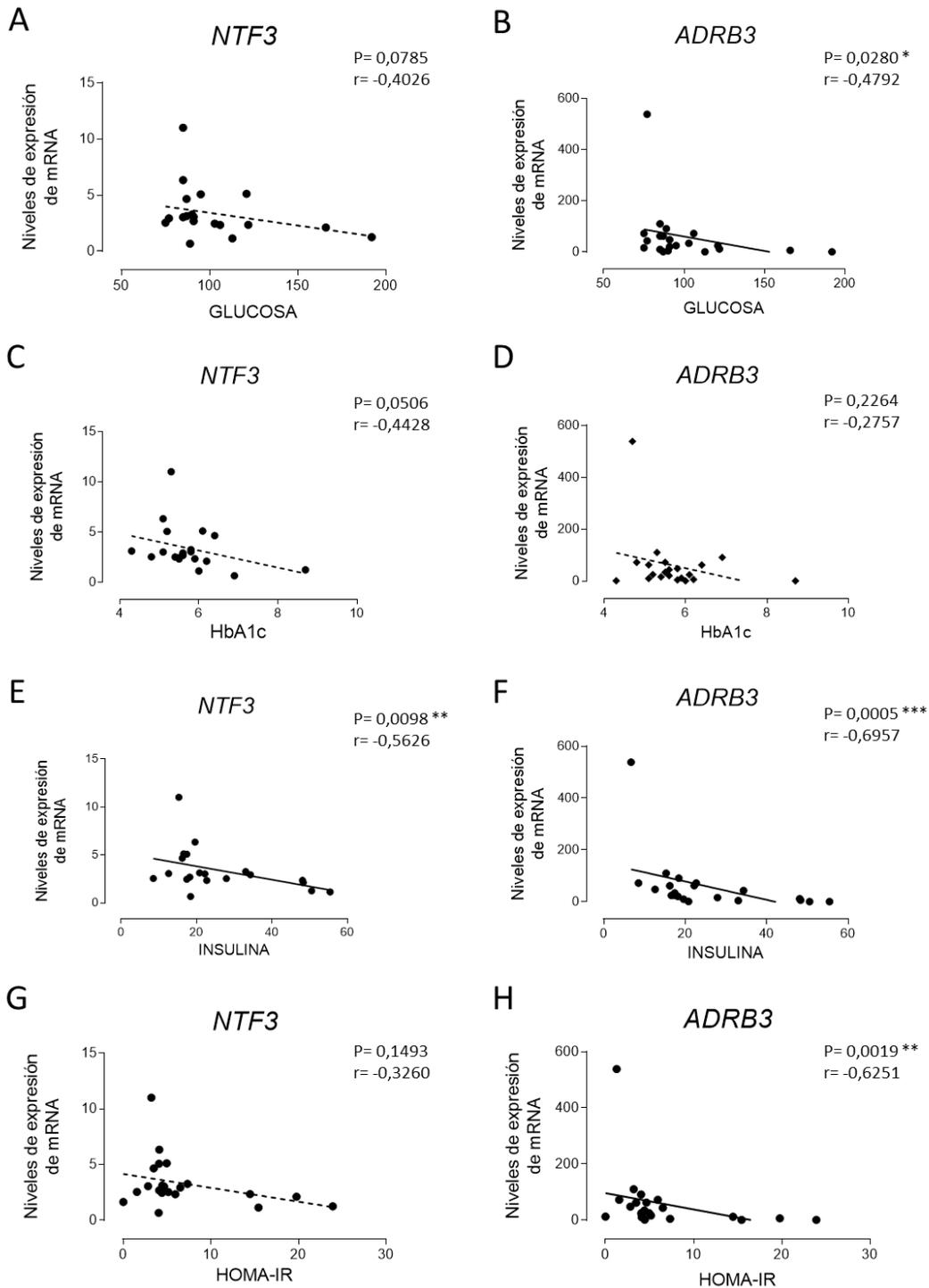


Figura 18. Representación gráfica de las correlaciones observadas entre los niveles de mRNA de *NTF3* y *ADRB3* en tejido adiposo retroperitoneal (hAT) de humanos y el perfil glucídico de los pacientes con obesidad. Se correlacionaron: glucosa en ayunas con niveles de mRNA de *NTF3* (A) y *ADRB3* (B), niveles de HbA1c con *NTF3* (C) y *ADRB3* (D), niveles de insulina con *NTF3* (E) y *ADRB3* (F) y niveles de HOMA-IR con *NTF3* (G) y *ADRB3* (H). La correlación significativa de Spearman (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) se representa como una línea continua. Los valores de mRNA se expresan como $2^{-\Delta Ct} \times 10^4$ y están normalizados usando *GAPDH* como gen de referencia. Los resultados representan la media \pm e.e.m de $n=22$ pacientes.

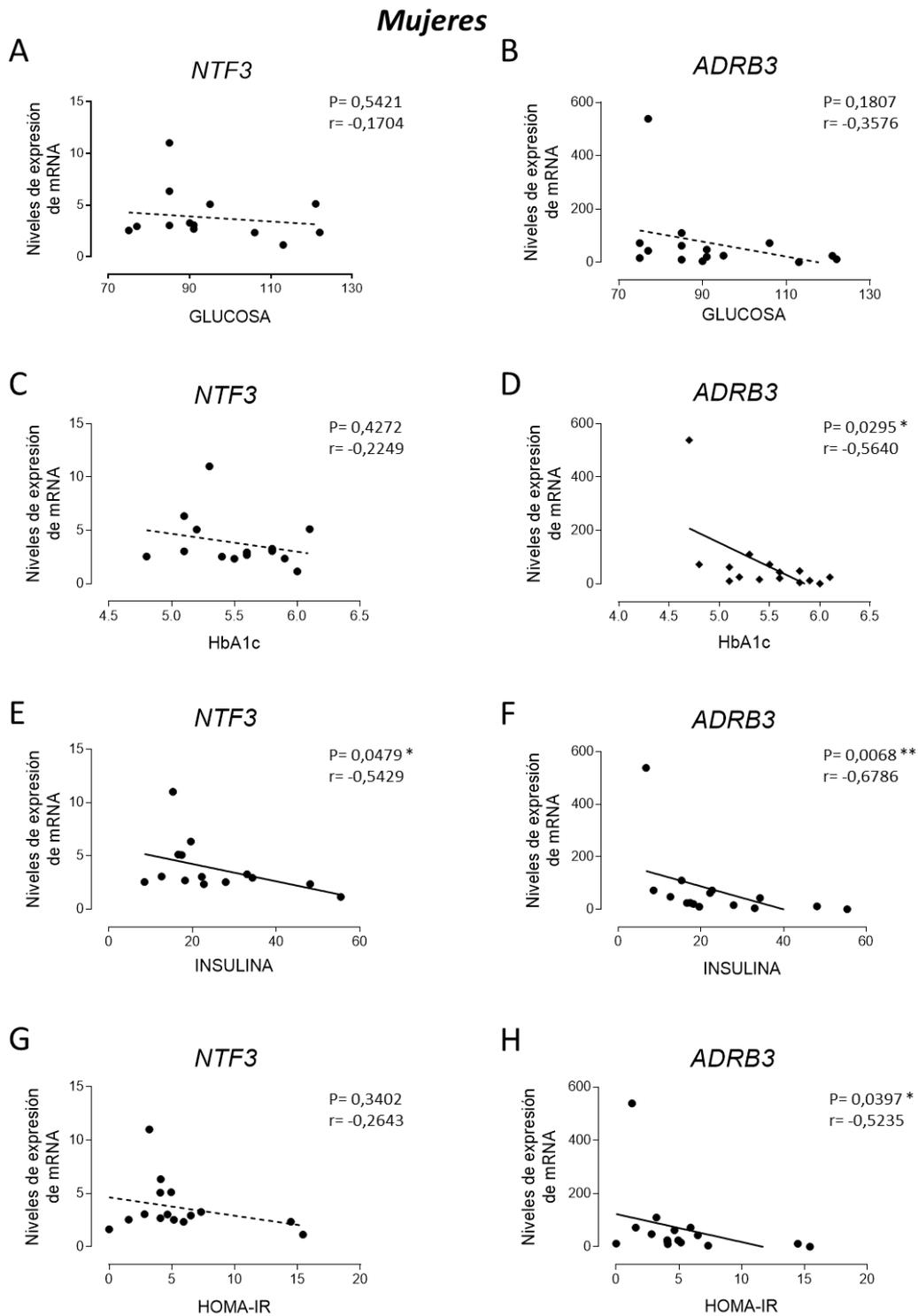


Figura 19. Representación gráfica de las correlaciones observadas entre los niveles de mRNA de *NTF3* y *ADRB3* en tejido adiposo retroperitoneal (hAT) de humanos y el perfil glucídico de los pacientes con obesidad de género femenino. Se correlacionaron: glucosa en ayunas con niveles de mRNA de *NTF3* (A) y *ADRB3* (B), niveles de HbA1c con *NTF3* (C) y *ADRB3* (D), niveles de insulina con *NTF3* (E) y *ADRB3* (F) y niveles de HOMA-IR con *NTF3* (G) y *ADRB3* (H). La correlación significativa de Spearman (*p<0,05 y **p<0,01) se representa como una línea continua. Los valores de mRNA se expresan como $2^{-\Delta Ct} \times 10^4$ y están normalizados usando *GAPDH* como gen de referencia. Los resultados representan la media \pm e.e.m de n=16 pacientes.

6. NT3 Y ENVEJECIMIENTO

6.1. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *Ntf3*, *Ntrk3* Y LOS TRES SUBTIPOS DE *Adrb* EN FUNCIÓN DE LA EDAD EN RATAS WISTAR

La expresión de *Ntf3* y *Adrb3* disminuye en WAT, pero no en BAT de ratas envejecidas

Se compararon los niveles de mRNA de *Ntf3*, *Ntrk3* y los tres subtipos de *Adrb* en WAT y BAT obtenidos de ratas Wistar jóvenes (16 semanas) y de edad avanzada (72 semanas).

Los resultados obtenidos evidencian una disminución significativa en la expresión génica de *Ntf3* y *Adrb3* en WAT de ratas Wistar de edad avanzada (72 semanas) respecto a las jóvenes (16 semanas) (Figura 20A y E), mientras que los niveles de mRNA de *Ntrk3*, *Adrb1* y *Adrb2* no se modifican con la edad (Figura 20B, C y D).

Se realizaron los mismos análisis en BAT, pero no se detectaron cambios con la edad en la expresión para ninguno de los genes estudiados (Figura 21).

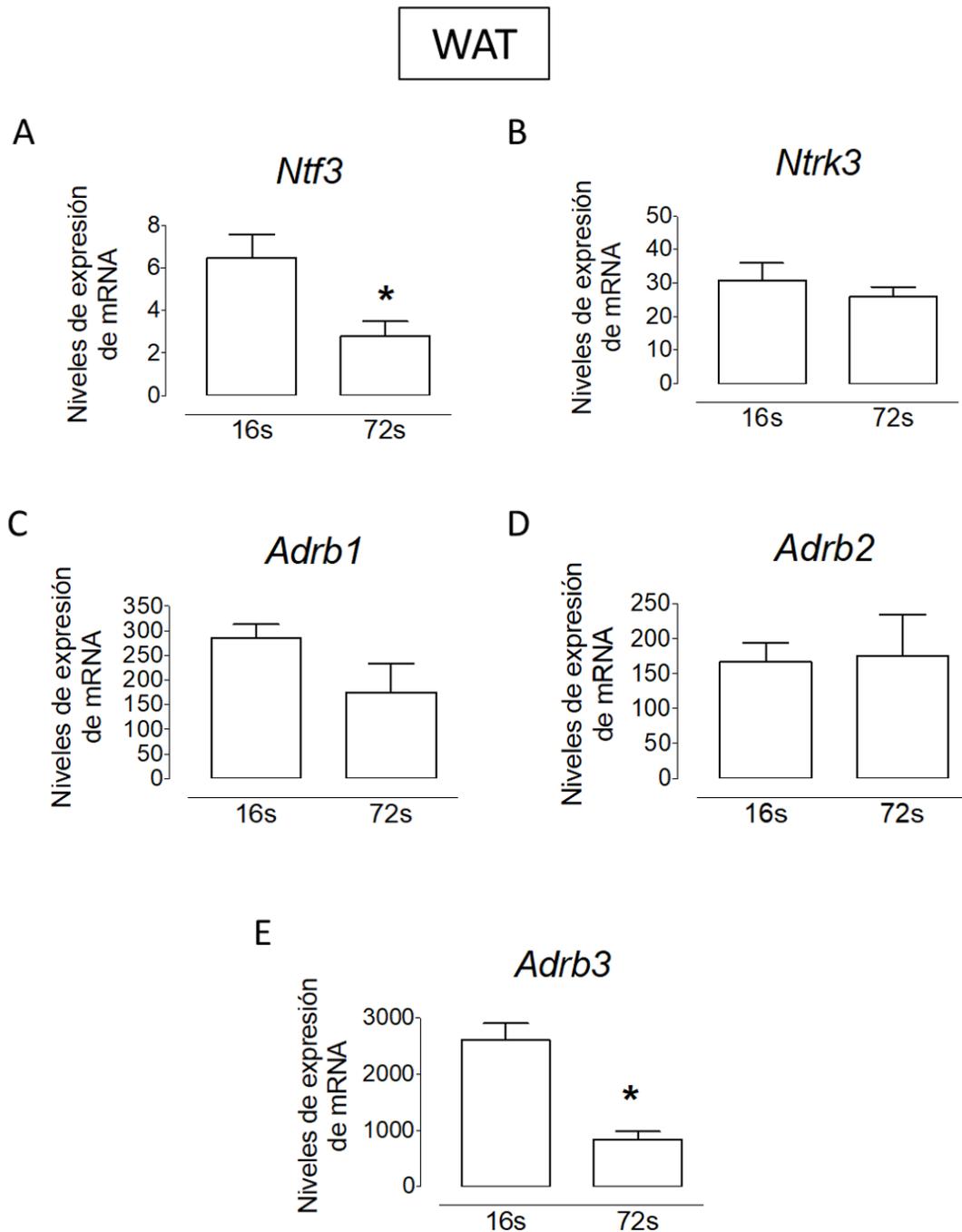


Figura 20. Análisis comparativo de los cambios en los niveles de expresión génica de *Ntf3* (A), *Ntrk3* (B), *Adrb1* (C), *Adrb2* (D) y *Adrb3* (E) en tejido adiposo visceral (WAT) de ratas Wistar en función de la edad (16s: ratas Wistar de 16 semanas, n=14 y 72s: ratas Wistar de 72 semanas, n=5). Análisis estadístico: t de Student, siendo *p<0,05. Los valores de mRNA se expresan como $2^{-\Delta Ct} \times 10^4$ y están normalizados usando *Gapdh* como gen de referencia. Los resultados representan la media \pm e.e.m.

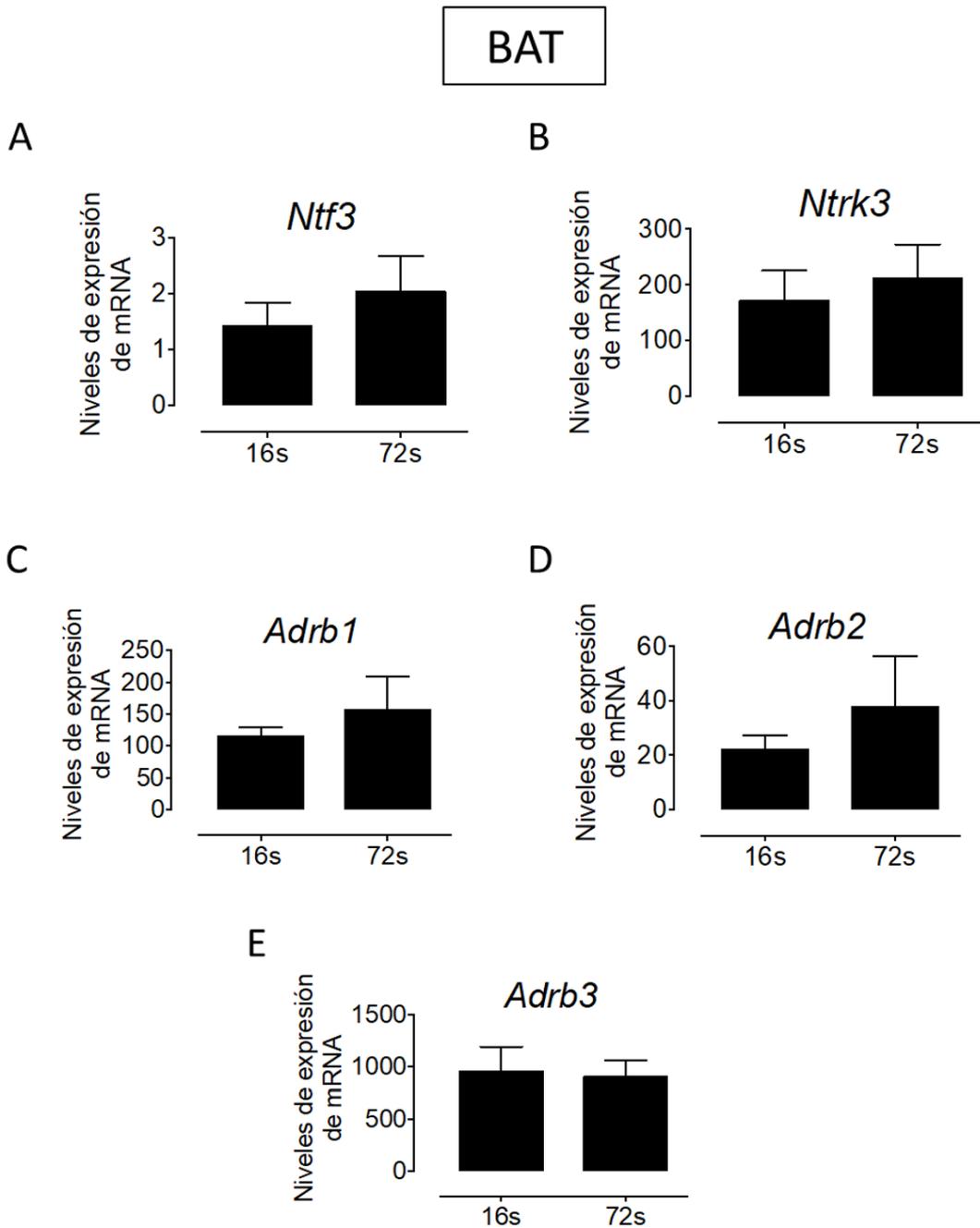


Figura 21. Análisis comparativo de los cambios en los niveles de expresión génica de *Ntf3* (A), *Ntrk3* (B), *Adrb1* (C), *Adrb2* (D) y *Adrb3* (E) en tejido adiposo interescapular (BAT) de ratas Wistar en función de la edad (16s: ratas Wistar de 16 semanas, n=5 y 72s: ratas Wistar de 72 semanas, n=5). Análisis estadístico: t de Student. Los valores de mRNA se expresan como $2^{-\Delta Ct} \times 10^4$ y están normalizados usando *Gapdh* como gen de referencia. Los resultados representan la media \pm e.e.m.

6.2. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *NTF3*, *NTRK3* Y LOS TRES SUBTIPOS DE *ADRB* EN FUNCIÓN DE LA EDAD EN HUMANOS

Analizamos si en nuestra población de humanos inicial sin obesidad relevante (población descrita en la tabla 9 apartado 1.2 de resultados), que presenta un amplio rango de edad [41-90 años], se observaban cambios en la expresión génica dependientes de la edad.

La expresión génica de NTF3 y ADRB3 disminuye con la edad en la población de humanos sin obesidad marcada

Los resultados obtenidos muestran que existe una correlación inversa entre los niveles de expresión de *NTF3* en hAT y la edad de los pacientes (Figura 26A), así como entre los niveles de *ADRB3* y la edad de los pacientes (Figura 26B).

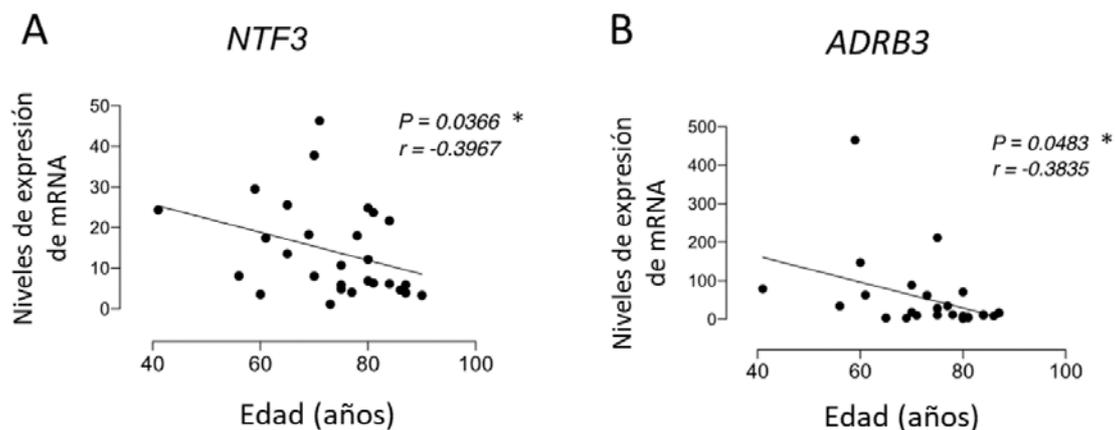


Figura 26. Representación gráfica de la correlación observada entre los niveles de mRNA de *NTF3* en tejido adiposo retroperitoneal (hAT) de humanos y la edad de los pacientes (A) y de *ADRB3* en hAT y la edad de los pacientes (B). La correlación significativa de Spearman (* $p < 0,05$) se representa como una línea continua. Los valores de mRNA se expresan como $2^{-\Delta Ct} \times 10^4$ y están normalizados usando *GAPDH* como gen de referencia. Los resultados representan la media \pm e.e.m de $n=28$ pacientes.

Cuando se analizaron estos mismos parámetros en la población de humanos con obesidad moderada-severa (descrita en la tabla 15 apartado 5.2.2 de resultados) con un rango de edad más estrecho [26-57 años] no se observó ninguna correlación significativa entre los niveles de expresión de los genes estudiados y la edad (resultados no mostrados).

DISCUSIÓN

1. LA VÍA NT3/TrkC ESTÁ PRESENTE EN TEJIDO ADIPOSO HUMANO Y DE ROEDORES

El tejido adiposo es un importante órgano endocrino que se compone de dos tipos principales con funciones antagónicas: el WAT que se encarga del almacenamiento energético, y el BAT, que disipa energía por termogénesis a través del desacoplamiento mitocondrial mediado por UCP-1.

El WAT está pobremente innervado y vascularizado, a diferencia del BAT que está intensamente vascularizado e innervado con fibras noradrenérgicas en contacto directo con los adipocitos pardos (Giordano et al., 2014). Esta innervación simpática actúa sobre los diferentes subtipos de AR presentes en los adipocitos, que son claves para regular funciones como la lipogénesis, lipólisis, metabolismo de la glucosa, termogénesis y la secreción hormonal. En WAT, el SNS a través de la activación de los AR- β es el principal iniciador de la lipólisis (Germack et al., 1997; Robidoux et al., 2004; Bartness et al., 2014; Bordicchia et al., 2014). En BAT, en cambio, la activación β -adrenérgica produce un incremento de expresión y activación de UCP-1 en la membrana mitocondrial interna, que colapsa el gradiente de protones necesario para la síntesis de ATP y el almacenamiento de energía, lo que produce un incremento de la respiración mitocondrial y de la termogénesis (Cannon et al., 2004).

En roedores, los tres subtipos de AR están expresados en el tejido adiposo subcutáneo y visceral, siendo el β_3 el principal responsable de la lipólisis mediada por AR- β en adipocitos blancos maduros (Evans et al., 2019). Sin embargo, parece que los AR- β_3 tienen un papel menos importante en humanos que en roedores, ya que estos están menos expresados y tienen un papel menor en lipólisis (Carpéné et al., 1998; Merlin et al., 2018a, 2018b).

La modulación farmacológica de los AR- β , especialmente el subtipo β_3 , había sido una estrategia prometedora para el tratamiento de la obesidad, y se han hecho muchos esfuerzos para desarrollar un agonista de los AR- β_3 , pero este enfoque no ha resultado exitoso hasta el momento (Carpéné et al., 1998; Michel et al., 2019), por lo que son necesarios nuevos enfoques que permitan regular el tejido adiposo y abran nuevas vías farmacoterapéuticas para abordar el riesgo cardiometabólico.

DISCUSIÓN

Se sabe que NT3 modula el desarrollo y la supervivencia de las neuronas adrenérgicas (Fariñas et al., 1994; 1996; Zhou et al., 1995; Francis et al., 1999; Kirstein y Fariñas, 2002; Keeler et al., 2017), pero su presencia, función y relación con la actividad adrenérgica en tejido adiposo no se conoce hasta el momento, por lo que su estudio constituye el objetivo principal del presente trabajo.

Analizamos en primer lugar la expresión de los tres subtipos de AR- β , de NT3 y su receptor específico TrkC, en tejido adiposo visceral humano (hAT), y en tejido adiposo de rata de distintas procedencias: visceral (WAT), interescapular (BAT), perivascular (VAT) y perirrenal (KAT).

Nuestros resultados confirman una abundante expresión del subtipo β_3 en los distintos tejidos adiposos de rata, siendo en todos ellos el subtipo predominante, tal como se ha descrito anteriormente (Evans et al., 2019). Sin embargo, en hAT existe una expresión significativamente mayor de β_2 y β_1 respecto a β_3 lo que también corrobora estudios previos (Carpéné et al., 1998; Michel et al., 2019).

Determinamos la expresión génica y proteica de NT3 y su receptor TrkC en los mismos tejidos, humanos y de rata. Nuestros resultados sugieren de manera consistente que NT3 y TrkC están presentes en hAT y en los diferentes tipos de tejido adiposo de roedores: BAT, VAT, WAT, y KAT. Es de destacar que la expresión génica de NT3 o TrkC en tejido adiposo es comparable (incluso mayor: TrkC en BAT) a la encontrada en córtex cerebral, el tejido de referencia y donde se describieron inicialmente las NT y sus receptores. Además, el nivel de expresión génica de TrkC en tejido adiposo humano y de rata es comparable al de los AR β , lo que sugiere un papel relevante para el TrkC, receptor específico de la NT3.

Si comparamos la expresión génica en los distintos tipos de tejido adiposo de rata estudiados, vemos que *Ntf3* está menos expresado en BAT y VAT que en WAT y KAT. Por el contrario, *Ntrk3* está más expresado en BAT y VAT respecto a WAT y KAT. Cuando analizamos la expresión proteica mediante inmunoblot, vemos que el anticuerpo específico para TrkC detecta una única banda, de 110 kDa, que corrobora la mayor expresión génica encontrada en BAT y VAT respecto a WAT y KAT. En el caso de la NT3, el anticuerpo utilizado marca distintas bandas de 17 kDa, 25 kDa y entre 30 y 35 kDa. Las distintas bandas podrían corresponder a las formas maduras de NT3 (alrededor de

14-16 kDa) o a sus dímeros (alrededor de 30-35 kDa). Es interesante señalar que también en este caso se observa un patrón de expresión de NT3 similar en BAT y VAT, pero que es diferente al encontrado en WAT y KAT.

Por lo que respecta a los subtipos de AR- β , se observa una menor expresión génica de todos ellos (*Adrb1*, *Adrb2*, *Adrb3*) en BAT y VAT respecto a WAT y KAT, alcanzando significación estadística únicamente respecto a WAT.

Todo esto sugiere una similitud en el patrón de expresión de NT3, TrkC y los tres subtipos de AR- β , entre WAT y KAT, que podemos considerar tejido adiposo blanco, y que, a su vez, es diferente al patrón de expresión encontrado en BAT y VAT que son representativos del tejido adiposo pardo.

Según estos resultados, la expresión de NT3 y AR- β es mayor en tejido adiposo blanco, mientras que la expresión de TrkC es mayor en tejido adiposo pardo, lo que puede tener una implicación en la modulación de la actividad de los adipocitos en estos tejidos y no se había descrito hasta el momento.

Trabajos previos han descrito que el lecho vascular, y más concretamente las células endoteliales, producen gran cantidad de NT3 que facilita el crecimiento de los axones y el desarrollo de la inervación adrenérgica (Caporali et al., 2009; Delgado et al., 2014). Esta localización característica sugiere que NT3 es producida por el endotelio de los vasos que irrigan el tejido adiposo, por lo que la NT3 encontrada podría tener su origen en los microvasos del estroma, y desde ellos, al liberarse, favorecería la inervación simpática del tejido adiposo.

Para comprobar esta hipótesis, analizamos en primer lugar la expresión de NT3 en un modelo de ratón modificado genéticamente, los ratones *Ntf3^{+/-lacZ}*. En estos ratones heterocigotos, se ha reemplazado la región que codifica la proteína NT3 por el gen lacZ, por lo que expresan niveles menores de NT3, pero permiten visualizar su expresión mediante la reacción con β -galactosidasa. Mediante inmunohistoquímica, confirmamos la localización de NT3 en los vasos que irrigan el tejido adiposo de estos ratones tanto el WAT como el BAT. Sin embargo, la presencia de NT3 en los vasos no excluye que también el adipocito sea capaz de producir esta NT. Por ello, analizamos también su expresión en adipocitos aislados de WAT de rata y encontramos *Ntf3*, aunque los niveles

DISCUSIÓN

detectados son significativamente menores a los encontrados en muestras de tejido adiposo. Esto confirma que la NT3 se produce mayoritariamente en el endotelio vascular, pero no aclara si se produce también en los adipocitos o su presencia se debe a microvasos residuales que permanecen en la muestra de adipocitos, aislados por limitaciones en la técnica de aislamiento.

Sin descartar estas posibles limitaciones técnicas, existen dos argumentos que nos permiten suponer la expresión de NT3 en los adipocitos aislados de WAT. En primer lugar, *Ntf3* fue detectada en adipocitos aislados, y la visión de estos al microscopio óptico en fresco no mostró vasos estructurados. En segundo lugar, a pesar de la rica vascularización e inervación de BAT (Cannon y Nedergaard, 2004; Germack et al., 1997), los niveles de *Ntf3* encontrados en él fueron significativamente menores a los encontrados en WAT y KAT.

Independientemente de que el origen de NT3 sea endotelial o además la produzca el propio adipocito, la presencia del TrkC en los adipocitos demuestra la relevancia de la vía NT3/TrkC en la modulación de estas células. En este sentido, niveles de expresión de TrkC en adipocitos aislados de WAT de rata son similares a los encontrados en tejido entero, lo que sostiene que proviene en su mayoría del adipocito aislado, y no de la fracción estromal que se pierde en el proceso de aislamiento.

En suma, estas observaciones sugieren que NT3 tiene su origen principal en la fracción estromal, y concretamente vascular del tejido adiposo, regulando el crecimiento neuronal en dicho tejido a través de su actuación sobre el receptor TrkC presente en los adipocitos.

Para comprobar esta hipótesis, en colaboración con el laboratorio de la Dra. Isabel Fariñas, se determinó la presencia de fibras simpáticas en la proximidad de los vasos, donde encontramos la fuente principal de NT3 (Bové et al., 2021), lo que sugiere que la NT3 liberada por el endotelio puede ejercer un papel importante en el desarrollo y la supervivencia de las neuronas adrenérgicas en el tejido adiposo, regulando el crecimiento de los terminales simpáticos que se encuentran localizadas en la proximidad de los vasos. Pero, además, podría tener un papel *per se* en la actividad del adipocito, ya que su receptor TrkC se encuentra en estas células. Por ello, el siguiente objetivo del

presente trabajo consistió en determinar ese posible papel de la vía NT3/TrkC en el tejido adiposo.

2. NT3 ESTIMULA LA LIPÓLISIS, DISMINUYE EL TAMAÑO DE LOS ADIPOCITOS E INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE UCP-1

La presencia de TrkC en adipocitos sugiere un rol directo de la vía NT3/TrkC en tejido adiposo más allá de la modulación indirecta derivada de su capacidad para desarrollar y mantener la inervación simpática. Para determinar este rol, estudiamos en primer lugar si la NT3 es capaz de modular la lipólisis, una de las funciones principales del tejido adiposo blanco.

En adipocitos aislados de tejido adiposo visceral de rata, observamos que la adición de NT3 incrementa levemente la liberación de glicerol, y a su vez este incremento se ve bloqueado por el K252a, un antagonista no selectivo del receptor Trk (Tapley et al., 1992). Sin embargo, la magnitud de la respuesta observada para NT3, indica que esta no es una función remarcable comparada con el aumento en la actividad lipolítica que produce la activación de los AR- β mediada por isoprenalina. Por tanto, la presencia de NT3 y TrkC en tejido adiposo podría tener otra función.

Previamente, nuestro grupo de investigación demostró que NT3 modula la diferenciación de las células madre neurales en cerebro de ratón adulto (Delgado et al., 2014). Basándonos en esto, hipotetizamos que NT3 podría actuar también modulando la diferenciación de los adipocitos y analizamos esta hipótesis en cultivos de pre-adipocitos humanos que diferenciamos a adipocitos maduros.

De forma consistente comprobamos que los cultivos de pre-adipocitos humanos diferenciados en presencia de NT3 producen adipocitos maduros más pequeños, y que este efecto está mediado por TrkC, ya que la adición de K252a al medio de cultivo lo bloquea. La disminución del tamaño de los adipocitos inducida por NT3 no se acompañó de cambios en el diámetro de las gotículas lipídicas, que resultaron de tamaño similar a las observadas en los adipocitos diferenciados en ausencia de NT3. Por otro lado, K252a por sí solo produjo un incremento del diámetro de las gotas lipídicas no relacionado con la actividad de NT3. Este resultado podría justificarse debido a que K252a es un pan-inhibidor de los receptores Trk, por tanto, la actividad sobre otros subtipos de

receptores Trk podría tener efectos no previstos, aunque son necesarios más experimentos para aclarar este punto.

Además de observar su morfología, determinamos también la expresión de UCP-1, principal determinante de la termogénesis inducida por frío y un marcador característico del BAT y de los adipocitos con fenotipo “pardo” y “*beige*”, que no aparece en los adipocitos de fenotipo “blanco”. Encontramos que los adipocitos humanos diferenciados en presencia de NT3 expresaban UCP-1 en mayor proporción, lo que sugiere un proceso de transformación denominado *browning*, porque implica un cambio hacia un fenotipo de adipocito “pardo”, caracterizado por la presencia de esta proteína en mayor proporción que el fenotipo “*beige*”. Este hallazgo es de sumo interés, pues la habilidad para producir el desacoplamiento de la respiración a través de la activación de UCP-1, representa la posibilidad de su uso en el tratamiento de enfermedades metabólicas, disipando el exceso de energía en forma de calor (Bordicchia et al., 2014; Sepa-Kishi y Ceddia et al., 2018; Arner et al., 2019).

La capacidad de inducir un incremento en la expresión de UCP-1 es la primera consecuencia de la activación de los AR- β , especialmente del subtipo β_3 . Por ello, determinamos si la diferenciación en presencia de NT3 implicaba un cambio significativo en la expresión de los AR- β y era este cambio el responsable de la mayor expresión de UCP-1 encontrada.

Nuestros resultados muestran que la actividad de NT3 sobre la UCP-1 no depende de un incremento de la población de los AR- β , ya que encontramos niveles similares de mRNA de β_2 y β_3 en adipocitos diferenciados en presencia y ausencia de NT3, y niveles menores de β_1 en presencia de NT3. Además, confirmamos que los cultivos de adipocitos humanos muestran una expresión insignificante del subtipo β_3 , incluso después de la diferenciación en presencia de estímulos altamente adipogénicos. (Evans et al., 2019).

Sin embargo, los experimentos de cultivos *in vitro* tienen limitaciones técnicas que dificultan su extrapolación al tejido adiposo *in vivo*. Ello se debe a que la diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos sigue un protocolo que induce la acumulación de lípidos y la formación de adipocitos con apariencia multilocular, sin importar su tejido de origen y desprovisto de los reguladores específicos del tejido que promueven la diferenciación celular y las respuestas metabólicas adaptativas (Collins et al., 2010). Por tanto, los

adipocitos diferenciados con este procedimiento exhiben morfológicamente un fenotipo característico de adipocito pardo (*brite* o *beige* cuando ocurre en WAT), con una mezcla de gotas lipídicas grandes y pequeñas, así como expresión de UCP-1 y AR- β_3 (Evans et al., 2019), lo que no se corresponde exactamente con los tipos observados en el tejido adiposo.

Por este motivo, nuestro siguiente objetivo fue corroborar las observaciones obtenidas en adipocitos humanos cultivados, en un modelo más fisiológico, *in vivo*, usando dos modelos de ratones deficientes en NT3: los ratones heterocigotos para NT3 (NT3+/-), ya utilizados para estudiar la localización tisular de NT3, y los ratones genéticamente modificados para eliminar la expresión de NT3 endotelial (eNT3-). Los resultados obtenidos muestran un incremento del tamaño de los adipocitos en WAT y BAT en ambos modelos en los que existe un déficit de NT3, y, como ocurre con adipocitos humanos, estas diferencias no se pueden atribuir a cambios en los AR- β , ya que su expresión es similar en los ratones NT3+/- y sus controles NT3+/+.

Las células endoteliales son una fuente importante de NT3 (Caporali y Emanuelli, 2009; Delgado et al., 2014). En concordancia con esta idea, la eliminación de la producción de NT3 endotelial produce un fenotipo en el tejido adiposo similar al de ratones heterocigotos para NT3, con adipocitos más voluminosos tanto en WAT como en BAT (*whitening*). Notablemente, la expresión de UCP-1 está además disminuida en los ratones eNT3-, como ocurría también en adipocitos humanos diferenciados en ausencia de NT3, lo que contribuye a dar solidez a estos resultados.

Es bien conocido que los AR- β , especialmente el subtipo β_3 , controlan la transcripción de factores nucleares que incrementan la biogénesis mitocondrial y la expresión de UCP-1 (Susulic et al., 1995; Yoneshiro et al., 2013; Bordicchia et al., 2014; Giordano et al., 2014; Evans et al., 2019).

Sin embargo, la generación de ratones β_3 -KO no producen cambios remarcables en el tejido adiposo (Mattsson et al., 2011), probablemente por redundancia funcional entre los 3 subtipos de AR- β coexpresados en adipocitos (Bachman et al., 2002; Evans et al., 2019). Solo los ratones que pierden los 3 subtipos de AR- β presentan células más grandes en BAT y menores niveles de UCP-1 (Baskin et al., 2018), un fenotipo similar al encontrado en ratones con expresión parcial de NT3 o pérdida de NT3 endotelial.

Por tanto, queda acreditada la importancia de la vía NT3/TrkC en la modulación de la diferenciación de adipocitos y que su impacto puede ser comparable al de la actividad β adrenérgica.

3. NT3 Y RIESGO CARDIOMETABÓLICO

Hemos comprobado la presencia de la vía NT3/TrkC en tejido adiposo humano y su papel modulador en la diferenciación de los adipocitos hacia un fenotipo “pardo”. Queda ahora por determinar si la modulación farmacológica de esta vía puede ser una buena diana terapéutica en la prevención y/o tratamiento del riesgo cardiometabólico y las patologías asociadas.

Aunque la literatura respecto a NT3 y riesgo metabólico es escasa, se han descrito correlaciones controvertidas, aunque significativas, entre niveles plasmáticos de NT3 e IMC o colesterol (total o LDL) de mujeres obesas o pacientes alcohólicos. El primer estudio realizado en mujeres con diferentes grados de adiposidad, obesidad y SM detectó que los niveles de NT3 sérica aumentaban con el IMC, la circunferencia de cadera y la obesidad mórbida (IMC 40 kg/m²), y disminuían cuando aumentaba la concentración de cLDL y cHDL (Bulló et al., 2007). Un estudio posterior realizado en un grupo de pacientes varones y alcohólicos con obesidad confirma la correlación entre niveles plasmáticos de NT3 e IMC, pero contradice el estudio previo al encontrar una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de NT3 y los de cLDL (Popa-Wagner et al., 2013). Estos datos publicados son parcialmente contradictorios por lo que son necesarios nuevos estudios para determinar el papel de la vía NT3/TrkC a nivel metabólico.

Para ello, en el presente trabajo planteamos dos estudios con distinto enfoque. Por una parte, analizamos los cambios en la expresión de NT3 y TrkC en un modelo animal de riesgo cardiometabólico, las ratas Zucker, y por otro, estudiamos que ocurre en un grupo de pacientes con obesidad mórbida.

A. RATAS ZUCKER

Las ratas Zucker son un modelo animal de obesidad genética que se acompaña de insulinoresistencia, intolerancia a la glucosa y dislipemia, pero no se caracterizan por presentar diabetes (Vickers et al., 2011). Trabajamos con un grupo de ratas Zucker obesas y sus controles, y analizamos su perfil metabólico y la expresión de NT3 y TrkC en WAT y BAT. Una de las limitaciones, fue obtener las cifras del cLDL ya que la fórmula de Friedewald no es fiable cuando los TG son mayores de 400 mg/dl, lo que sucedía en nuestras ratas Zucker obesas (Friedewald et al., 1972). Por lo tanto, se calculó el colesterol no-HDL, definido como la diferencia entre el colesterol total y el cHDL. El colesterol no-HDL agrupa todos los subtipos de lipoproteínas de colesterol consideradas aterogénicas, es decir, lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteína(a), lipoproteínas de mediana densidad (IDL), y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Además, se ha sugerido que el colesterol no-HDL determina mejor el riesgo aterogénico que el cLDL (Cui et al., 2001). Nuestros resultados confirman el perfil altamente aterogénico de las ratas Zucker obesas. Cuando analizamos la expresión de los AR- β , encontramos que el subtipo β_3 es el más expresado en WAT y BAT, de forma similar a lo observado en el tejido adiposo de ratas Wistar.

Resultados previos indican que las ratas Zucker obesas se caracterizan por una disminución de la expresión y la actividad del AR- β_3 en BAT (Charon et al., 1995), pero estos autores no analizan lo que ocurre en WAT. Nosotros encontramos una disminución de AR- β_3 en WAT de ratas Zucker obesas respecto a las control, pero no en BAT, lo que no coincide con los resultados obtenidos en BAT por Charon et al (1995). Esta discrepancia puede deberse al método utilizado para determinar los niveles de mRNA, o también a la edad y/o estado metabólico de los animales, ya que las ratas Zucker utilizadas por estos investigadores eran más jóvenes (2 semanas) y en un estadio pre-obesidad.

En paralelo, encontramos un aumento en la expresión de AR- β_2 tanto en WAT como en BAT de ratas Zucker obesas. Desconocemos si este aumento se debe a una compensación funcional entre AR- β , como se ha descrito previamente (Susulic et al., 1995; Bachman et al., 2002; Evans et al., 2019), u obedece a un proceso de regulación

DISCUSIÓN

compleja de los distintos subtipos implicado en los cambios inducidos por la obesidad o responsable de los mismos.

En WAT obtenido de este modelo de ratas Zucker obesas, detectamos un menor nivel de expresión génica de NT3, acompañado de un aumento en la expresión de TrkC, que podría plantearse como un aumento compensatorio de los receptores en respuesta a la disminución de NT3. Estos cambios no se observaron en BAT obtenido de los mismos animales.

Blaszkiwicz et al. (2019) encontraron, en un modelo de ratón con obesidad, una disminución de NT3 en tejido adiposo inguinal (subcutáneo) pero no en BAT, resultados que concuerdan con lo observado en nuestro modelo de rata con síndrome metabólico y podrían estar justificados por una disfunción endotelial derivada de la obesidad.

Respecto a la expresión proteica de NT3, en el inmunoblot realizado con muestras de tejido adiposo de ratas Zucker controles, aparecen bandas diferentes en WAT y BAT, que se asemejan a las encontradas en ratas Wistar. Sin embargo, en las ratas Zucker obesas, llama la atención el cambio en la distribución de las bandas detectado en BAT, ya que adopta el mismo patrón que en WAT, es decir, en BAT de ratas obesas, las proteínas marcadas por el anticuerpo anti- NT3 son muy similares a las observadas en WAT, por lo que podemos suponer que, respecto al patrón de expresión proteica de NT3, el BAT de las ratas obesas ha sufrido un proceso de *whitening*. Aunque no se determinaron los niveles de UCP-1 en este tejido, estos experimentos apoyan las evidencias que sugieren el proceso *whitening* del BAT en los estados de obesidad (Kotzbeck et al., 2018). Además, esto ligaría el papel de NT3 en el tejido adiposo con la patología metabólica propia de las ratas Zucker. Sería interesante profundizar en el futuro en estos cambios, y determinar su implicación en las alteraciones metabólicas propias de la obesidad.

Todos estos resultados nos indican que se ha producido una disminución en la expresión de NT3 en WAT de ratas obesas, acompañado de un aumento de TrkC, mientras que en BAT más que un cambio cuantitativo, lo que se observa es un cambio en el patrón de expresión de las distintas formas (NT, pro-NT, dímeros, ...) que lo asemeja al WAT. Si tenemos en cuenta que la obesidad y el síndrome metabólico se caracterizan por alteraciones en la función endotelial, podemos pensar que es precisamente una disfunción del endotelio la que puede estar implicada en estos cambios. De hecho, hay

estudios indicando que las ratas Zucker obesas tienen insulinoresistencia asociada a disfunción vascular (Moral-Sanz et al., 2011).

En el BAT los cambios son más complejos, y los adipocitos BAT de ratas Zucker obesas adoptan unas características que les asemejan más a los adipocitos WAT por lo que respecta a la expresión proteica de NT3. Estos cambios cualitativos complejos dificultan la comparación cuantitativa de la expresión de NT3 y AR- β_3 en el BAT de las ratas Zucker obesas y sus controles.

Dado que el endotelio es la fuente predominante de NT3 en el tejido adiposo, la disfunción endotelial observada en la obesidad y diabetes podría explicar la pérdida de NT3 que a su vez sería responsable de la neuropatía autonómica y la disminución en la expresión y actividad de AR- β_3 , lo que constituiría un mecanismo de retroalimentación negativa de la actividad lipolítica y/o termogénica del tejido adiposo. Esta hipótesis explicaría la disminución en la expresión de AR- β_3 , tal como habíamos observado en ratones en los que se ha suprimido la expresión endotelial de NT3.

Para profundizar en esta hipótesis, además de estudiar la expresión de AR- β_3 , analizamos su funcionalidad en una serie de experimentos en vasos aislados (aorta) de ratas Zucker controles y obesas, en los que estudiamos también la función endotelial, comparando, en primer lugar, la actividad vasodilatadora de la acetilcolina como un marcador fisiológico de dicha función. Los resultados obtenidos indican que la acetilcolina presenta una menor potencia vasodilatadora en ratas obesas, lo que confirmaría en nuestro grupo de animales, la disfunción endotelial asociada a la obesidad.

Por lo que respecta a los AR- β sabemos que, en aorta de rata, los subtipos β_1 y β_2 están expresados en las tres capas del vaso. β_1 lo hace de forma predominante en la capa media y β_2 en el endotelio (Flacco et al., 2013). Respecto al β_3 , se expresa en lámina elástica y de forma minoritaria en el endotelio. La vasodilatación está mediada por las acciones de AR β_2 y β_3 en el endotelio, junto con el β_2 y el β_1 en el músculo liso, aunque en menor medida (Ferro et al., 2004; Flacco et al., 2013).

Analizamos la actividad de estos receptores utilizando isoprenalina, agonista con afinidad por los subtipos β_1 y β_2 , y SR58611A, agonista con mayor afinidad por el subtipo

β_3 . Aunque se observó una disminución de la actividad vasodilatadora de la isoprenalina en las aortas obtenidas de ratas obesas, la diferencia no llegó a ser significativa. Sin embargo, sí que se obtuvieron diferencias significativas con el agonista del AR- β_3 , observándose en las ratas con obesidad una disminución de la potencia por el sitio de alta afinidad (que se corresponde con el subtipo β_3). Esta observación es congruente con la pérdida de expresión de β_3 , aunque no podemos excluir que pueda deberse a una disminución en la funcionalidad, como consecuencia de alteraciones en cualquiera de los pasos que median su señalización. En este sentido, la vasodilatación inducida por los AR- β esta mediada por dos mecanismos: el primero sería a través de la estimulación de la AC y el consiguiente aumento del AMPc en las células musculares lisas; el segundo sería la activación de óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en las células endoteliales y la liberación de óxido nítrico (Queen y Ferro, 2006). Este último mecanismo está alterado si existe disfunción endotelial y afectaría la vasodilatación inducida por isoprenalina, pues tanto los AR- β_2 como los β_3 presentes en el endotelio, actúan liberando NO. Sin embargo, el aumento en la expresión de AR- β_2 que hemos observado en WAT y BAT, podría producirse también en aorta y mantener la vasodilatación inducida por activación del subtipo β_2 sin cambios significativos (caso de la isoprenalina) a pesar de la disfunción endotelial observada.

En conjunto, los resultados obtenidos en ratas Zucker, indican que en este modelo animal de síndrome metabólico y obesidad se producen alteraciones de la función endotelial, acompañadas de una disminución en la expresión de NT3 endotelial y del AR- β_3 en tejido adiposo visceral de ratas obesas. La disminución de la expresión del subtipo β_3 va acompañada de una disminución de su actividad vasodilatadora. Estos cambios en la expresión de NT3 podrían ser consecuencia de la disfunción endotelial y condicionar una menor expresión de AR- β_3 en tejido adiposo visceral, que observamos en ratas Zucker pero que también habíamos observado en WAT de ratones genéticamente modificados con expresión reprimida de NT3 endotelial (ratones eNT3-).

B. NT3 Y RIESGO CARDIOMETABÓLICO EN HUMANOS

A partir de los resultados obtenidos en el modelo animal de síndrome metabólico, pasamos a estudiar la relación de la vía NT3/TrkC con los factores de riesgo cardiometabólico humano. Para ello, analizamos en primer lugar la posible relación entre esta vía y las variables clínicas características de los pacientes: edad, HTA, glucemia, perfil lipídico, IMC y sedentarismo, en el grupo inicial de pacientes en los que habíamos determinado la expresión de NT3, TrkC y los tres subtipos de AR- β en hAT

Nuestros resultados no muestran correlaciones significativas entre los niveles de expresión de NT3 en hAT y el IMC o el perfil lipídico, como habían descrito previamente (Bulló et al., 2007; Popa-Wagner et al., 2013), ni tampoco con los valores de glucemia. Tampoco encontramos una correlación significativa entre la expresión de TrkC y estos parámetros, aunque nuestro limitado tamaño muestral puede ser un factor limitante que nos impida obtener conclusiones definitivas.

Por lo que respecta a los AR- β vemos que, aunque el subtipo β_2 es el más expresado en hAT, no se correlaciona con ninguna de las variables clínicas estudiadas en este grupo de pacientes, pero encontramos que su expresión en tejido adiposo es significativamente menor en pacientes con un estilo de vida sedentario. Esta observación podría explicar estudios previos que describieron cómo el ejercicio practicado regularmente podría modular los AR- β , aumentando su respuesta termogénica (Bell et al., 2006).

A pesar de su menor expresión respecto a los otros subtipos, nuestros resultados sugieren un papel destacado del AR- β_3 en la funcionalidad del hAT, ya que su expresión génica se correlaciona inversamente con el IMC, lo que no ocurre con los subtipos β_1 o β_2 . Estos resultados coinciden con estudios previos, que han encontrado una estrecha relación entre el AR- β_3 y los cambios de peso corporal a largo plazo (Andersson et al., 2009) y le otorgan un papel relevante en el control de la obesidad.

Pero este resultado tiene la limitación de que nuestro grupo inicial de pacientes se encuentra en un rango de IMC entre [19 a 32 kg/m²], por lo que no incluye pacientes con obesidad de riesgo moderado o alto, por ello, ampliamos el estudio inicial con un

DISCUSIÓN

segundo grupo de pacientes, sometidos a cirugía bariátrica, con un rango de IMC de [35 a 62 kg/m²].

La población de este segundo grupo presenta una obesidad moderada-severa (IMC>35 kg/m²), y no es comparable con la del primer grupo debido a importantes diferencias en sus características, más allá del propio IMC. Ambas poblaciones parten de una indicación de cirugía abdominal de etiología muy diferente: patología neoplásica tumoral versus cirugía bariátrica, lo que conlleva diferencias importantes propias de la patología de base (ej. mayor edad en la primera), comorbilidades (ej. síndrome metabólico en la segunda población), y además proceden de centros hospitalarios de regiones diferentes. Por tanto, estos potenciales factores de confusión podrían derivar en conclusiones erróneas si tratamos de establecer una comparación entre ambos grupos de pacientes.

La población de pacientes con indicación de cirugía bariátrica tampoco es homogénea, ya que existe un predominio de mujeres (72,7%) y existen importantes diferencias en cuanto a variables clínicas entre ambos sexos que comprometen los análisis. Por ejemplo, sólo el 12,5% de las mujeres eran diabéticas (versus 83% de hombres), y ninguna era hipertensa (vs. el 50% de hombres). Debido a ello, y al limitado tamaño muestral (n=22), se analizó la población en conjunto y el subgrupo de mujeres por separado, pero no se pudo realizar un análisis por subgrupos (diabéticos, hipertensos) debido a la falta de potencia estadística y al riesgo de incurrir en sesgos. En este caso, también se analizó el patrón de expresión de todos los genes estudiados (*NTF3*, *NTRK3*, *ADRB1*, *ADRB2* y *ADRB3*) y sus correlaciones con las variables clínicas.

La expresión de AR- β en esta población sigue un patrón similar al del primer grupo, siendo el *ADRB2* el subtipo más expresado, seguido de *ADRB1* y *ADRB3*. También la expresión de *NTF3* y *NTRK3* se confirma en tejido adiposo de pacientes obesos, pudiendo observar niveles de expresión menores que los encontrados en el grupo inicial de pacientes, aunque, como se ha comentado anteriormente, esta comparación no es válida al no cumplir los requisitos de homogeneidad entre grupos.

En los pacientes obesos, por sus características clínicas, y dentro del protocolo asistencial, se determinaron un mayor número de variables relacionadas con el riesgo cardiometabólico, y se estableció si existía una correlación significativa entre la

expresión de los distintos genes y el IMC, el perfil glucídico (glucosa, insulina, HbA1c y HOMA-IR) y el perfil lipídico (colesterol total, cLDL, cHDL y colesterol no-HDL).

A diferencia de lo encontrado en el primer grupo de pacientes, no se observó correlación entre el IMC y el *ADRB3*, lo que podría explicarse si consideramos que todos los pacientes de este grupo poseen condiciones metabólicas definidas como obesidad moderada o grave, con un intervalo de IMC dentro de un rango muy alto (obesidad de grado 2 y 3), por lo que pueden haber superado el intervalo de IMC en el que la expresión de AR- β_3 en tejido adiposo visceral está inversamente relacionada con el IMC. En el grupo inicial, que incluía pacientes con un IMC que va desde la normalidad hasta la obesidad de grado 1, sí encontrábamos esta correlación.

En el grupo de pacientes obesos tampoco encontramos correlaciones entre los genes estudiados y el perfil lipídico, aunque, una vez más, no podemos extraer conclusiones definitivas por la escasa representación de pacientes con dislipemia (n=3, tratados en base a práctica clínica habitual) y la baja alteración del perfil lipídico del grupo en su conjunto. Sería recomendable realizar estudios más amplios, incluyendo una población con mayores grados de dislipemia para valorar si existe alguna relación.

Sin embargo, si se encontró una correlación inversa entre *NTF3* y *ADRB3* en tejido adiposo visceral y la insulinemia, relación que no se estableció en el primer grupo de pacientes por no haberseles determinado este parámetro. Encontramos también una correlación inversa entre *ADRB3* y otros parámetros indicativos de resistencia a la insulina como glucemia y HOMA-IR. Sin embargo, correlacionando *NTF3* con glucemia, HbA1c y HOMA-IR, únicamente se obtuvo una tendencia inversa que no alcanzó grado de significación estadística. Cuando se realizaron las mismas correlaciones en el subgrupo de mujeres, los resultados encontrados fueron iguales para NT3 y similares para el AR- β_3 , donde se encontró correlación inversa significativa con HbA1c, insulina y HOMA-IR.

La obesidad severa es un factor de riesgo clave para el desarrollo de DM tipo 2, siendo la primera causa la resistencia a la insulina del tejido adiposo visceral, el hígado y el músculo esquelético junto con una liberación de insulina alterada en los islotes de Langerhans (Longo et al., 2019). Además, una revisión sistemática con metaanálisis de diferentes estudios observacionales indica que la acumulación de tejido adiposo visceral

DISCUSIÓN

es un claro predictor de la resistencia a la insulina (Zhang M et al., 2015). Por ello, estos resultados que relacionan la NT3 y el AR- β_3 con la insulinemia y el índice que determina la resistencia a la insulina (HOMA-IR), aunque preliminares, abren futuras líneas de investigación que clarifiquen el significado clínico de dicha correlación. En el presente trabajo, la limitación en la obtención de muestras humanas adecuadas para una comparación estadística ha dificultado el llegar a conclusiones firmes en estas cuestiones.

4. NT3 Y ENVEJECIMIENTO

En el apartado anterior analizamos la relación entre la expresión de NT3 y TrkC en tejido adiposo visceral humano y los factores de riesgo cardiometabólico como dislipemia, resistencia a la insulina, obesidad..., queda sin embargo por analizar un importante factor de riesgo que no es prevenible: la edad.

Hemos determinado el origen endotelial de la NT3 que modula la diferenciación de los adipocitos humanos, por lo que la disfunción endotelial asociada al envejecimiento puede ser un factor determinante en la funcionalidad de la vía NT3/TrkC. Para comprobar si la edad repercute en la expresión de NT3, analizamos los resultados obtenidos en el grupo de pacientes sometidos a intervención abdominal, que tienen un amplio rango de edad [41- 90 años], estableciendo que existe una correlación inversa entre los niveles de NT3 y la edad. Esta correlación, estadísticamente significativa, implica que la expresión de NT3 en el tejido adiposo disminuye con la edad, y lo mismo ocurre con el AR- β_3 , mientras que la expresión de TrkC no parece estar relacionada con el envejecimiento. Con este nuevo enfoque, volvemos a encontrar cambios paralelos en la expresión de NT3 y el AR- β_3 en tejido adiposo.

Para confirmar esta relación, estudiamos la expresión de los mismos genes en tejido adiposo WAT y BAT obtenido de un grupo de ratas Wistar jóvenes (16 semanas) y otro grupo de ratas viejas (72 semanas). De forma similar a lo encontrado en tejido adiposo humano, observamos una expresión disminuida de NT3 y AR- β_3 en ratas viejas con respecto a jóvenes.

No es un resultado inesperado, pues es conocido que los tejidos, incluyendo el tejido adiposo, involucionan y/o se vuelven disfuncionales con el envejecimiento.

Está descrito un aumento del WAT (Palmer y Kirkland, 2016), disminución del BAT, y disminución en la capacidad de formación de adipocitos beige a partir de progenitores dentro del WAT (Zoico et al., 2019). No obstante, esta posible relación entre la disminución del AR- β_3 y NT3 en tejido adiposo y cambios en el metabolismo de los lípidos relacionados con la edad previamente descritos (Arner et al., 2019), necesita un estudio más profundo.

DISCUSIÓN

Un trabajo que analizó el impacto de la edad en la innervación del tejido adiposo observó que ratones envejecidos (64 semanas frente a 12 semanas) presentaron una pérdida muy llamativa de la innervación perivascular del tejido adiposo inguinal (subcutáneo), sin alteración de la vasculatura (Blazkiewicz et al., 2019). En nuestro caso, nuestras ratas tenían 72 semanas de edad, por lo que es de suponer que la pérdida de innervación perivascular fuera incluso mayor. El estudio también mostró una disminución de la expresión de NT3 con la edad que, aunque no alcanzó la significación, es congruente con nuestras observaciones. Nosotros observamos esto en nuestra población de pacientes de edad media avanzada y sin obesidad marcada.

Como hemos mencionado, la vasculatura es una de las fuentes principales donde se secreta NT3, y es conocida la disfunción endotelial propia de la edad (Favero et al., 2014; Scioli et al., 2014). Por tanto, es posible que esta disfunción endotelial y tisular propia de la edad contribuya a la disminución de NT3 y del AR- β_3 observada, y que contribuyan a la disfunción autonómica en este tejido.

Estos resultados obtenidos en el grupo inicial de pacientes, no se reproducen en el grupo de pacientes obesos. En esta población, no encontramos correlación entre la expresión de NT3 y la edad. No obstante, en este caso, la ausencia de correlación puede ser debida a que los pacientes se encuentran en un rango de edad medio ($40,98 \pm 2,04$ años) y relativamente estrecho [26-57 años], en el que todavía no sean patentes los mecanismos que subyacen a la disfuncionalidad del tejido adiposo con la edad.

5. RELEVANCIA CLÍNICA DE LOS RESULTADOS

Nuestro estudio es el primero en describir la presencia del patrón NT3/TrkC en tejido adiposo de humanos y roedores, y en demostrar una acción directa de esta vía sobre la regulación de la diferenciación de adipocitos y la expresión de UCP-1, *in vitro* e *in vivo*. Esta evidencia abre nuevas perspectivas para futuras investigaciones sobre el papel de la vía NT3/TrkC en los trastornos cardiometabólicos y la búsqueda de nuevos fármacos que actúen sobre esta diana.

De los resultados obtenidos, tanto *in vitro* como *in vivo*, podemos concluir que la vía NT3/TrkC, presente en el tejido adiposo blanco y pardo, en humanos y en roedores, ejerce un papel modulador en dicho tejido favoreciendo la expresión de UCP-1, y disminuyendo el tamaño de los adipocitos, mientras que la alteración de su función por represión de su expresión conduce a adipocitos de mayor tamaño y con una menor expresión de UCP-1, por tanto, con menor capacidad para disipar energía en forma de calor. Si consideramos que en el tejido adiposo blanco humano encontramos adipocitos *beige*, que provienen de los adipocitos blancos, han sufrido un proceso de "*beiging*" (Wang Z et al., 2021), y comparten características del blanco en cuanto a su capacidad lipolítica, pero también del pardo por expresar UCP-1 y tener capacidad termogénica, podemos suponer que el funcionamiento adecuado de la vía NT3/TrkC favorecerá este proceso de *beiging* y/o evitará el proceso de *whitening*. Este último proceso es característico de la obesidad, y en nuestro caso, lo observamos en el tejido adiposo interescapular (BAT) de las ratas Zucker obesas donde encontramos un perfil de expresión proteica de NT3 más acorde con los adipocitos blancos que con los pardos.

Hemos visto, además, que los cambios en la expresión de NT3 en tejido adiposo van en paralelo con los cambios en la expresión del AR- β_3 , tanto en ratas Zucker como en ratones genéticamente manipulados en los que se suprime la expresión endotelial de NT3 y a su vez se corresponden con cambios del tejido adiposo que sugieren un proceso de *whitening* de los adipocitos. Esto, unido a que la NT3 se produce mayoritariamente en el endotelio vascular, pero actúa sobre receptores TrkC localizados en los adipocitos, nos lleva a pensar que la disfunción endotelial puede ser responsable, al menos en parte, de la pérdida en la expresión de NT3 y esta, a su vez, por regular la inervación simpática

DISCUSIÓN

(Fariñas et al., 1994; 1996; Zhou et al., 1995; Francis et al., 1999; Kirstein et al., 2002; Keeler et al., 2017), conducir a la pérdida de expresión de los AR- β_3 .

Como ya es sabido, los AR- β , y especialmente el subtipo β_3 , controlan la lipólisis y la termogénesis (Evans et al., 2019). También añade importante información el hecho de que, en pacientes obesos, existe una correlación inversa entre los niveles de NT3 o AR- β_3 y la insulinemia, u otras variables relacionadas con la resistencia a la insulina.

Si, como hemos visto en humanos y ratas, la edad es un factor importante que disminuye la expresión de NT3 y TrkC, podríamos suponer que los cambios metabólicos asociados a la edad podrían estar relacionados también con la menor actividad de la vía NT3/TrkC, derivada de una menor liberación endotelial de NT3.

Por todo ello, la modulación farmacológica de esta vía constituye una nueva herramienta terapéutica que debemos explorar para el control del riesgo cardiometabólico.

Hasta ahora, la modulación farmacológica de los AR- β , especialmente el subtipo β_3 , había sido una estrategia prometedora para el tratamiento de la obesidad, y se habían realizado considerables esfuerzos para desarrollar agonistas de los AR- β_3 de utilidad clínica para el tratamiento de la obesidad, pero este enfoque aún no ha tenido éxito (Carpéné et al., 1998; Michel et al., 2019). Sin embargo, mientras que los AR- β_3 desempeñan un papel importante en el control metabólico del tejido adiposo de roedores, en el tejido adiposo humano se expresan en mucha menor proporción y desempeñan sólo un papel menor en la lipólisis (Carpéné et al., 1998; Merlin et al., 2018a, 2018b). A pesar de esto, nuestros resultados sugieren un papel relevante de este subtipo en el control de la obesidad, ya que la expresión de los AR- β_3 , pero no β_1 ni β_2 en hAT, se correlaciona inversamente con el IMC. Curiosamente, una expresión disminuida del subtipo predominante en tejido adiposo humano, el β_2 , se relacionó con una forma de vida sedentaria.

Además, según nuestro trabajo y otros previos (Evans et al., 2019), la expresión y función de los AR- β_3 disminuyen con la edad, la obesidad o la resistencia a la insulina, por lo que es plausible que los pacientes que se beneficiarían más de la activación de los AR- β_3 mediante agonistas selectivos sean menos capaces de responder a ellos. Aunque

nuestros resultados indican que NT3 también disminuye con la edad en tejido adiposo humano y de rata, su receptor específico TrkC no lo hace, por lo que se podría actuar farmacológicamente sobre esa vía en pacientes con una deficiente liberación de NT3. Como la estimulación de TrkC por NT3 imita los efectos de los AR- β sobre la expresión de UCP-1 y el tamaño de los adipocitos en humanos y roedores, un fármaco que actúe selectivamente sobre TrkC, podría ser un objetivo farmacológico prometedor en el tratamiento del riesgo cardiometabólico.

CONCLUSIONES

1. NT3 Y TrkC se expresan en todos los tipos estudiados de tejido adiposo humano y de roedores, siendo el nivel de expresión de TrkC comparable al de los AR- β_3 , principales moduladores de la actividad metabólica de dicho tejido.
2. La vía NT3/TrkC modula la diferenciación de los adipocitos humanos cultivados disminuyendo el tamaño celular y favoreciendo la expresión de UCP-1 (marcador del tejido adiposo pardo, responsable de la termogénesis). Esta acción moduladora sobre los adipocitos se confirma en tejido adiposo blanco y pardo de ratones manipulados genéticamente (NT3^{+/-} o en los que se suprime la expresión endotelial de NT3, eNT3-). En estos modelos, los adipocitos son de mayor tamaño y expresan UCP-1 en menor proporción lo que implica un proceso de “whitening” del tejido adiposo pardo
3. En ratones en los que se suprime la expresión endotelial de NT3, se observa una menor expresión de AR- β_3 en tejido adiposo, lo que sugiere que la disminución en la liberación de NT3 por disfunción endotelial, pueda modificar la actividad β_3 adrenérgica en tejido adiposo.
4. En un modelo animal de síndrome metabólico, la rata Zucker obesa, se observa también menor expresión de NT3 y AR- β_3 en tejido adiposo blanco, mientras que en el tejido adiposo pardo aparecen cambios de expresión proteica de NT3 que concuerdan con un proceso de “whitening” de los adipocitos. Estos cambios van acompañados de disfunción endotelial y menor actividad vasodilatadora del AR- β_3 .
5. En tejido adiposo humano, la expresión de NT3 y AR- β_3 disminuye con la edad y con las variables clínicas relacionadas con la resistencia a la insulina, mientras que la expresión del receptor TrkC no cambia, por lo que una modulación farmacológica de esta vía podría ser interesante para controlar el riesgo cardiometabólico. Son necesarios estudios posteriores para establecer de forma concluyente el interés clínico de esta observación

BIBLIOGRAFÍA

- Ahima, R. S., Saper, C. B., Flier, J. S., & Elmquist, J. K. (2000). Leptin Regulation of Neuroendocrine Systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21(3), 263–307. <https://doi.org/10.1006/FRNE.2000.0197>
- Al-Qudah, M., & Al-Dwairi, A. (2016). Mechanisms and regulation of neurotrophin synthesis and secretion. *Neurosciences*, 21(4), 306–313. <https://doi.org/10.17712/NSJ.2016.4.20160080>
- Andersson, D., Wahrenberg, H., & Löfgren, P. (2009). β 3-Adrenoceptor function and long-term changes in body weight. *International Journal of Obesity*, 33(6), 662–668. <https://doi.org/10.1038/ijo.2009.54>
- Arch, J. R. S. (2011). Challenges in β 3-adrenoceptor agonist drug development: Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism, 2(2), 59–64. <https://doi.org/10.1177/2042018811398517>
- Arch, J. R. S., & Kaumann, A. J. (1993). β 3 and Atypical β -Adrenoceptors. *Medicinal Research Reviews*, 13(6), 663–729. <https://doi.org/10.1002/MED.2610130604>
- Arner, P., Bernard, S., Appelsved, L., Fu, K.-Y., Andersson, D. P., Salehpour, M., Thorell, A., Rydén, M., & Spalding, K. L. (2019). Adipose lipid turnover and long-term changes in body weight. *Nature Medicine*, 25(9), 1385–1389. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0565-5>
- Ascaso, J., Romero, P., Real, J., Priego, A., Valdecabres, C., & Carmena, R. (2001). Insulin resistance quantification by fasting insulin plasma values and HOMA index in a non-diabetic population. *Medicina Clinica*, 117(14), 530–533. [https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(01\)72168-9](https://doi.org/10.1016/S0025-7753(01)72168-9)
- Atkinson, B. J., Griesel, B. A., King, C. D., Josey, M. A., & Olson, A. L. (2013). Moderate GLUT4 Overexpression Improves Insulin Sensitivity and Fasting Triglyceridemia in High-Fat Diet-Fed Transgenic Mice. *Diabetes*, 62(7), 2249. <https://doi.org/10.2337/DB12-1146>
- Bachman, E. S., Dhillon, H., Zhang, C.-Y., Cinti, S., Bianco, A. C., Kobilka, B. K., & Lowell, B. B. (2002). β AR Signaling Required for Diet-Induced Thermogenesis and Obesity Resistance. *Science*, 297(5582), 843–845. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1073160>
- Baglioni, S., Cantini, G., Poli, G., Francalanci, M., Squecco, R., Franco, A. Di, Borgogni, E., Frontera, S., Nesi, G., Liotta, F., Lucchese, M., Perigli, G., Francini, F., Forti, G., Serio, M., & Luconi, M. (2012). Functional Differences in Visceral and Subcutaneous Fat Pads Originate from Differences in the Adipose Stem Cell. *PLOS ONE*, 7(5), e36569. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0036569>
- Barak, Y., Nelson, M. C., Ong, E. S., Jones, Y. Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K. R., Koder, A., & Evans, R. M. (1999). PPAR γ Is Required for Placental, Cardiac, and Adipose Tissue Development. *Molecular Cell*, 4(4), 585–595. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80209-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80209-9)
- Barbacid, M. (1994). The Trk family of neurotrophin receptors. *Journal of Neurobiology*, 25(11), 1386–1403. <https://doi.org/10.1002/NEU.480251107>

BIBLIOGRAFÍA

- Barbatelli, G., Heinzemann, M., Ferrara, P., Morroni, M., & Cinti, S. (1994). Quantitative evaluations of gap junctions in old rat brown adipose tissue after cold acclimation: A freeze-fracture and ultra-structural study. *Tissue and Cell*, 26(5), 667–676. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(94\)90051-5](https://doi.org/10.1016/0040-8166(94)90051-5)
- Bartkowska, K., Gajerska, M., Turlejski, T., & Djavadian, R. (2013). Expression of TrkC receptors in the developing brain of the Monodelphis opossum and its effect on the development of cortical cells. *PloS One*, 8(9), 1–14. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0074346>
- Bartness, T. (2002). Dual innervation of white adipose tissue: some evidence for parasympathetic nervous system involvement. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(9), 1235–1237. <https://doi.org/10.1172/JCI17047>
- Bartness, T. J., & Bamshad, M. (1998). Innervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. *The American Journal of Physiology*, 275(5), R1399-1411. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.1998.275.5.R1399>
- Bartness, T. J., & Song, C. K. (2007). Brain-adipose tissue neural crosstalk. *Physiology & Behavior*, 91(4), 343–351. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2007.04.002>
- Bartness, T. J., Liu, Y., Shrestha, Y. B., & Ryu, V. (2014). Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(4), 473–493. <https://doi.org/10.1016/J.YFRNE.2014.04.001>
- Bartness, T. J., Shrestha, Y. B., Vaughan, C. H., Schwartz, G. J., & Song, C. K. (2010). Sensory and sympathetic nervous system control of white adipose tissue lipolysis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 318(1–2), 34. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2009.08.031>
- Baskin, A. S., Linderman, J. D., Brychta, R. J., McGehee, S., Anflück-Chames, E., Cero, C., Johnson, J. W., O'Mara, A. E., Fletcher, L. A., Leitner, B. P., Duckworth, C. J., Huang, S., Cai, H., Garraffo, H. M., Millo, C. M., Dieckmann, W., Tolstikov, V., Chen, E. Y., Gao, F., ... Cypess, A. M. (2018). Regulation of Human Adipose Tissue Activation, Gallbladder Size, and Bile Acid Metabolism by a β 3-Adrenergic Receptor Agonist. *Diabetes*, 67(10), 2113–2125. <https://doi.org/10.2337/DB18-0462>
- Bastard, J.-P., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, M. J., Caron, M., Vidal, H., Capeau, J., & Feve, B. (2006). Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *European Cytokine Network*, 17(1), 4–12.
- Bell, C., Stob, N. R., & Seals, D. R. (2006). Thermogenic responsiveness to β -adrenergic stimulation is augmented in exercising versus sedentary adults: role of oxidative stress. *The Journal of Physiology*, 570(3), 629–635. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2005.098756>
- Bengtsson, T., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2000). Differential adrenergic regulation of the gene expression of the β -adrenoceptor subtypes β 1, β 2 and β 3 in brown adipocytes. *Biochemical Journal*, 347(3), 643–651. <https://doi.org/10.1042/BJ3470643>

Bhadada, S. V., Patel, B. M., Mehta, A. A., & Goyal, D. R. K. (2011). β 3 Receptors: Role in Cardiometabolic Disorders. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, 2(2), 65. <https://doi.org/10.1177/2042018810390259>

Birnbaum, T., Roider, J., Schankin, C., Padovan, C., Schichor, C., Goldbrunner, R., & Straube, A. (2007). Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *Journal of Neuro-Oncology*, 83(3), 241–247. <https://doi.org/10.1007/S11060-007-9332-4>

Blaszkiwicz, M., Willows, J. W., Dubois, A. L., Waible, S., DiBello, K., Lyons, L. L., Johnson, C. P., Paradie, E., Banks, N., Motyl, K., Michael, M., Harrison, B., & Townsend, K. L. (2019). Neuropathy and neural plasticity in the subcutaneous white adipose depot. *PLOS ONE*, 14(9), e0221766. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0221766>

Bonnet, F. P. (1981). Fat Cell Size and Number in Obese Children. In F. P. Bonnet. (Ed.), *Adipose Tissue in Childhood* (1st ed., pp. 133–1154). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429260346-9>

Bordicchia, M., Pocognoli, A., D’Anzeo, M., Siquini, W., Minardi, D., Muzzonigro, G., Dessi-Fulgheri, P., & Sarzani, R. (2014). Nebivolol induces, via β 3 adrenergic receptor, lipolysis, uncoupling protein 1, and reduction of lipid droplet size in human adipocytes. *Journal of Hypertension*, 32(2), 389–396. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000024>

Bothwell, M. (2014). NGF, BDNF, NT3, and NT4. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 220, 3–15. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5_1

Bothwell, M. (2016). Recent advances in understanding neurotrophin signaling. *F1000Research*, 5, 1885. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8434.1>

Bové, M., Monto, F., Guillem-Llobat, P., Ivorra, M. D., Noguera, M. A., Zambrano, A., Sirerol-Piquer, M. S., Requena, A. C., García-Alonso, M., Tejerina, T., Real, J. T., Fariñas, I., & D’Ocon, P. (2021). NT3/TrkC Pathway Modulates the Expression of UCP-1 and Adipocyte Size in Human and Rodent Adipose Tissue. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 630097. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2021.630097/PDF>

Bowers, R. R., Festuccia, W. T. L., Song, C. K., Shi, H., Migliorini, R. H., & Bartness, T. J. (2004). Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell number. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(55–6), 1167–1175. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00558.2003>

Boyko, E. J., Fujimoto, W. Y., Leonetti, D. L., & Newell-Morris, L. (2000). Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes: a prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care*, 23(4), 465–471. <https://doi.org/10.2337/DIACARE.23.4.465>

Brito, N. A., Brito, M. N., & Bartness, T. J. (2008). Differential sympathetic drive to adipose tissues after food deprivation, cold exposure or glucoprivation. *American Journal of Physiology*.

BIBLIOGRAFÍA

Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 294(5), 1445–1452. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00068.2008>

Bronnikov, G., Bengtsson, T., Kramarova, L., Golozoubova, V., Cannon, B., & Nedergaard, J. (1999). β 1 to β 3 Switch in Control of Cyclic Adenosine Monophosphate during Brown Adipocyte Development Explains Distinct β -Adrenoceptor Subtype Mediation of Proliferation and Differentiation. *Endocrinology*, 140(9), 4185–4197. <https://doi.org/10.1210/ENDO.140.9.6972>

Bronnikov, G., Houstek, J., & Nedergaard, J. (1992). β -Adrenergic, cAMP-mediated stimulation of proliferation of brown fat cells in primary culture: Mediation via β 1 but not via β 3 adrenoceptors. *Journal of Biological Chemistry*, 267(3), 2006–2013. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)46046-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)46046-2)

Bukowiecki, L., Collet, A. J., Folley, N., Guay, G., & Jahjah, L. (1982). Brown adipose tissue hyperplasia: a fundamental mechanism of adaptation to cold and hyperphagia. *American Journal of Physiology*, 242(6), 353–359. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.1982.242.6.E353>

Bulló, M., Peeraully, M., Trayhurn, P., Folch, J., & Salas-Salvadó, J. (2007). Circulating nerve growth factor levels in relation to obesity and the metabolic syndrome in women. *European Journal of Endocrinology*, 157(3), 303–310. <https://doi.org/10.1530/EJE-06-0716>

Butte, M., Hwang, P., Mobley, W., & Fletterick, R. (1998). Crystal structure of neurotrophin-3 homodimer shows distinct regions are used to bind its receptors. *Biochemistry*, 37(48), 16846–16852. <https://doi.org/10.1021/BI981254O>

Cannon, B., & Nedergaard, J. (1978). Energy dissipation in brown fat. *Experientia. Supplementum*, 32, 107–111. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-5559-4_12

Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews*, 84(1), 277–359. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00015.2003>

Cannon, B., Nedergaard, J., Lundberg, J. M., Hökfelt, T., Terenius, L., & Goldstein, M. (1986). “Neuropeptide tyrosine” (NPY) is co-stored with noradrenaline in vascular but not in parenchymal sympathetic nerves of brown adipose tissue. *Experimental Cell Research*, 164(2), 546–550. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(86\)90052-2](https://doi.org/10.1016/0014-4827(86)90052-2)

Cao, W., Daniel, K. W., Robidoux, J., Puigserver, P., Medvedev, A. V., Bai, X., Floering, L. M., Spiegelman, B. M., & Collins, S. (2004). p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is the Central Regulator of Cyclic AMP-Dependent Transcription of the Brown Fat Uncoupling Protein 1 Gene. *Molecular and Cellular Biology*, 24(7), 3057–3067. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.7.3057-3067.2004>

Cao, W., Medvedev, A. V., Daniel, K. W., & Collins, S. (2001). β -Adrenergic Activation of p38 MAP Kinase in Adipocytes: cAMP INDUCTION OF THE UNCOUPLING PROTEIN 1 (UCP1) GENE REQUIRES p38 MAP KINASE. *Journal of Biological Chemistry*, 276(29), 27077–27082. <https://doi.org/10.1074/JBC.M101049200>

Cao, Y., Wang, H., & Zeng, W. (2018). Whole-tissue 3D imaging reveals intra-adipose sympathetic plasticity regulated by NGF-TrkA signal in cold-induced beiging. *Protein & Cell*, 9(6), 527–539. <https://doi.org/10.1007/S13238-018-0528-5>

Caporali, A., & Emanuelli, C. (2009). Cardiovascular actions of neurotrophins. *Physiological Reviews*, 89(1), 279–308. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00007.2008>

Carey, A. L., Formosa, M. F., Van Every, B., Bertovic, D., Eikelis, N., Lambert, G. W., Kalff, V., Duffy, S. J., Cherk, M. H., & Kingwell, B. A. (2012). Ephedrine activates brown adipose tissue in lean but not obese humans. *Diabetologia*, 56(1), 147–155. <https://doi.org/10.1007/S00125-012-2748-1>

Carpéné, C., Bousquet-mélou, A., Galitzky, J., Berlan, M., & Lafontan, M. (1998). Lipolytic Effects of β 1-, β 2-, and β 3-Adrenergic Agonists in White Adipose Tissue of Mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 839(1), 186–189. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1998.TB10756.X>

Carpéné, C., Galitzky, J., Fontana, E., Atgié, C., Lafontan, M., & Berlan, M. (1999). Selective activation of β 3-adrenoceptors by octopamine: comparative studies in mammalian fat cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 359(4), 310–321. <https://doi.org/10.1007/PL00005357>

Caserta, F., Tchkonina, T., Civelek, V. N., Prentki, M., Brown, N. F., McGarry, J. D., Forse, R. A., Corkey, B. E., Hamilton, J. A., & Kirkland, J. L. (2001). Fat depot origin affects fatty acid handling in cultured rat and human preadipocytes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 280(2), E238–E247 <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.2001.280.2.E238>

Chalazonitis, A. (2004). Neurotrophin-3 in the development of the enteric nervous system. *Progress in Brain Research*, 146, 243–263. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(03\)46016-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)46016-0)

Chaldakov, G. N., Fiore, M., Ghenev, P. I., Beltowski, J., Rančić, G., Tunçel, N., & Aloe, L. (2014). Triactome: Neuro–Immune–Adipose Interactions. Implication in Vascular Biology. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00130>

Chaldakov, G. N., Fiore, M., Stankulov, I. S., Hristova, M., Antonelli, A., Manni, L., Ghenev, P. I., Angelucci, F., & Aloe, L. (2001). NGF, BDNF, leptin, and mast cells in human coronary atherosclerosis and metabolic syndrome. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 109(4), 357–360. <https://doi.org/10.1076/APAB.109.4.357.4249>

Chaldakov, G. N., Fiore, M., Stankulov, I. S., Manni, L., Hristova, M. G., Antonelli, A., Ghenev, P. I., & Aloe, L. (2004). Neurotrophin presence in human coronary atherosclerosis and metabolic syndrome: a role for NGF and BDNF in cardiovascular disease? *Progress in Brain Research*, 146, 279–289. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(03\)46018-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)46018-4)

Chaldakov, G. N., Fiore, M., Tonchev, A. B., & Aloe, L. (2010). Neuroadipology: A novel component of neuroendocrinology. *Cell Biology International*, 34(10), 1051–1053. <https://doi.org/10.1042/CBI20100509>

BIBLIOGRAFÍA

Chaldakov, G., Tonchev, A., & Aloe, L. (2009). NGF and BDNF: from nerves to adipose tissue, from neurokines to metabokines. *Rivista Di Psichiatria*, 44(2), 79–87.

Chao, M. V. (2003). Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(4), 299–309. <https://doi.org/10.1038/NRN1078>

Charon, C., Krief, S., Diot-Dupuy, F., Strosberg, A. D., Laurent, J., & Bazin, R. (1995). Early alterations in the brown adipose tissue adenylate cyclase system of pre-obese Zucker rat fa/fa pups: Decreased G-proteins and β 3-adrenoceptor activities. *Biochemical Journal*, 312(3), 781–788. <https://doi.org/10.1042/BJ3120781>

Chawla, A., Nguyen, K. D., & Sharon Goh, Y. P. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(11), 738–749. <https://doi.org/10.1038/nri3071>

Chernogubova, E., Hutchinson, D. S., Nedergaard, J., & Bengtsson, T. (2005). α 1- and β 1-Adrenoceptor Signaling Fully Compensates for β 3-Adrenoceptor Deficiency in Brown Adipocyte Norepinephrine-Stimulated Glucose Uptake. *Endocrinology*, 146(5), 2271–2284. <https://doi.org/10.1210/EN.2004-1104>

Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. (2016). Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 7, 30. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2016.00030>

Chondronikola, M., Volpi, E., Børsheim, E., Porter, C., Saraf, M. K., Annamalai, P., Yfanti, C., Chao, T., Wong, D., Shinoda, K., Labbé, S. M., Hurren, N. M., Cesani, F., Kajimura, S., & Sidossis, L. S. (2016). Brown Adipose Tissue Activation Is Linked to Distinct Systemic Effects on Lipid Metabolism in Humans. *Cell Metabolism*, 23(6), 1200–1206. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2016.04.029>

Christian, M. (2015). Transcriptional fingerprinting of “browning” white fat identifies NRG4 as a novel adipokine. *Adipocyte*, 4(1), 50. <https://doi.org/10.4161/ADIP.29853>

Chusyd, D. E., Wang, D., Huffman, D. M., & Nagy, T. R. (2016). Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. *Frontiers in Nutrition*, 3, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2016.00010>

Cinti, S. (1999). Adipose tissues and obesity. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, 104(2), 37–51. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10450668/>

Cinti, S. (2005). The adipose organ. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 73(1), 9–15. <https://doi.org/10.1016/J.PLEFA.2005.04.010>

Cinti, S. (2010). Plasticity of the Adipose Organ. *Adipose Tissue in Health and Disease*, 49–67. <https://doi.org/10.1002/9783527629527.CH3>

Cinti, S. (2018). Adipose Organ Development and Remodeling. *Comprehensive Physiology*, 8(4), 1357–1431. <https://doi.org/10.1002/CPHY.C170042>

- Cinti, S. (2019). Anatomy and physiology of the nutritional system. *Molecular Aspects of Medicine*, 68, 101–107. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2019.04.001>
- Cinti, S., Frederich, R. C., Zingaretti, M. C., De Matteis, R., Flier, J. S., & Lowell, B. B. (1997). Immunohistochemical Localization of Leptin and Uncoupling Protein in White and Brown Adipose Tissue. *Endocrinology*, 138(2), 797–804. <https://doi.org/10.1210/ENDO.138.2.4908>
- Cirulli, F., Pistillo, L., De Acetis, L., Alleva, E., & Aloe, L. (1998). Increased number of mast cells in the central nervous system of adult male mice following chronic subordination stress. *Brain, Behavior, and Immunity*, 12(2), 123–133. <https://doi.org/10.1006/BRBI.1998.0505>
- Clary, D., & Reichardt, L. (1994). An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(23), 11133–11137. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.23.11133>
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E.-M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D., & Warwick, C. (2016). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1: DGXI of the European Commission. *Laboratory Animals*, 30(4), 293–316. <https://doi.org/10.1258/002367796780739871>
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R., & Hamburger, V. (1954). A NERVE GROWTH-STIMULATING FACTOR ISOLATED FROM SARCOM AS 37 AND 180. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 40(10), 1014–1018. <https://doi.org/10.1073/PNAS.40.10.1014>
- Collins, S. (2011). β -Adrenoceptor Signaling Networks in Adipocytes for Recruiting Stored Fat and Energy Expenditure. *Frontiers in Endocrinology*, 2. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2011.00102>
- Collins, S., & Surwit, R. S. (2001). The beta-adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis. *Recent Progress in Hormone Research*, 56, 309–328. <https://doi.org/10.1210/RP.56.1.309>
- Collins, S., Cao, W., & Robidoux, J. (2004). Learning New Tricks from Old Dogs: β -Adrenergic Receptors Teach New Lessons on Firing Up Adipose Tissue Metabolism. *Molecular Endocrinology*, 18(9), 2123–2131. <https://doi.org/10.1210/ME.2004-0193>
- Collins, S., Daniel, K. W., Rohlf, E. M., Ramkumar, V., Taylor, I. L., & Gettys, T. W. (1994). Impaired expression and functional activity of the beta 3- and beta 1-adrenergic receptors in adipose tissue of congenitally obese (C57BL/6J ob/ob) mice. *Molecular Endocrinology*, 8(4), 518–527. <https://doi.org/10.1210/MEND.8.4.7914350>
- Collins, S., Yehuda-Shnaidman, E., & Wang, H. (2010). Positive and negative control of Ucp1 gene transcription and the role of β -adrenergic signaling networks. *International Journal of Obesity*, 34(1), S28–S33. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.180>

BIBLIOGRAFÍA

Cousin, B., Cinti, S., Morroni, M., Raimbault, S., Ricquier, D., Penicaud, L., & Casteilla, L. (1992). Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: Molecular and morphological characterization. *Journal of Cell Science*, 103(4), 931–942. <https://doi.org/10.1242/JCS.103.4.931>

Cui, Y., Blumenthal, R. S., Flaws, J. A., Whiteman, M. K., Langenberg, P., Bachorik, P. S., & Bush, T. L. (2001). Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol Level as a Predictor of Cardiovascular Disease Mortality. *Archives of Internal Medicine*, 161(11), 1413–1419. <https://doi.org/10.1001/ARCHINTE.161.11.1413>

Cypess, A. M., Chen, Y.-C., Sze, C., Wang, K., English, J., Chan, O., Holman, A. R., Tal, I., Palmer, M. R., Kolodny, G. M., & Kahn, C. R. (2012). Cold but not sympathomimetics activates human brown adipose tissue in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(25), 10001–10005. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1207911109>

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., & Kahn, C. R. (2009). Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *The New England Journal of Medicine*, 360(15), 1509–1517. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA0810780>

Cypess, A. M., Weiner, L. S., Roberts-Toler, C., Elía, E. F., Kessler, S. H., Kahn, P. A., English, J., Chatman, K., Trauger, S. A., Doria, A., & Kolodny, G. M. (2015). Activation of Human Brown Adipose Tissue by a β 3-Adrenergic Receptor Agonist. *Cell Metabolism*, 21(1), 33. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2014.12.009>

Dallner, O. S., Chernogubova, E., Brolinson, K. A., & Bengtsson, T. (2006). β 3-Adrenergic Receptors Stimulate Glucose Uptake in Brown Adipocytes by Two Mechanisms Independently of Glucose Transporter 4 Translocation. *Endocrinology*, 147(12), 5730–5739. <https://doi.org/10.1210/EN.2006-0242>

Dardeno, T. A., Chou, S. H., Moon, H. S., Chamberland, J. P., Fiorenza, C. G., & Mantzoros, C. S. (2010). Leptin in human physiology and therapeutics. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(3), 377–393. <https://doi.org/10.1016/J.YFRNE.2010.06.002>

De Jong, J. M. A., Wouters, R. T. F., Boulet, N., Cannon, B., Nedergaard, J., & Petrovic, N. (2017). The β 3-adrenergic receptor is dispensable for browning of adipose tissues. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 312(6), E508–E518. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00437.2016/ASSET/IMAGES/MEDIUM/ZH10041777260001.GIF>

De Matteis, R., Arch, J. R., Petroni, M. L., Ferrari, D., Cinti, S., & Stock, M. J. (2002). Immunohistochemical identification of the beta(3)-adrenoceptor in intact human adipocytes and ventricular myocardium: effect of obesity and treatment with ephedrine and caffeine. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 26(11), 1442–1450. <https://doi.org/10.1038/SJ.IJO.0802148>

De Simone, R., Alleva, E., Tirassa, P., & Aloe, L. (1990). Nerve growth factor released into the bloodstream following intraspecific fighting induces mast cell degranulation in adult male mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 4(1), 74–81. [https://doi.org/10.1016/0889-1591\(90\)90008-E](https://doi.org/10.1016/0889-1591(90)90008-E)

DeFronzo, R., & Ferrannini, E. (1991). Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, 14(3), 173–194. <https://doi.org/10.2337/DIACARE.14.3.173>

Deinhardt, K., & Chao, M. V. (2014). Trk receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 220, 103–119. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5_5

Delgado, A. C., Ferrón, S. R., Vicente, D., Porlan, E., Perez-Villalba, A., Trujillo, C. M., D'Ocón, P., & Fariñas, I. (2014). Endothelial NT-3 Delivered by Vasculature and CSF Promotes Quiescence of Subependymal Neural Stem Cells through Nitric Oxide Induction. *Neuron*, 83(3), 572–585. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2014.06.015>

Després, J. (2012). Abdominal obesity and cardiovascular disease: is inflammation the missing link? *The Canadian Journal of Cardiology*, 28(6), 642–652. <https://doi.org/10.1016/J.CJCA.2012.06.004>

Din, M., Raiko, J., Saari, T., Kudomi, N., Tolvanen, T., Oikonen, V., Teuho, J., Sipilä, H. T., Savisto, N., Parkkola, R., Nuutila, P., & Virtanen, K. A. (2016). Human brown adipose tissue [15O]O₂ PET imaging in the presence and absence of cold stimulus. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 43(10), 1878–1886. <https://doi.org/10.1007/S00259-016-3364-Y>

Donovan, M. J., Miranda, R. C., Kraemer, R., McCaffrey, T. A., Tessarollo, L., Mahadeo, D., Sharif, S., Kaplan, D. R., Tsoulfas, P., Parada, L., Toran-Allerand, C. D., Hajjar, D. P., & Hempstead, B. L. (1995). Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells: Regulation of expression in response to injury. *American Journal of Pathology*, 147(2), 309–324.

Duncan, R., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., & Sul, H. (2007). Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annual Review of Nutrition*, 27, 79–101. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NUTR.27.061406.093734>

El-Gharbawy, A. H., Adler-Wailes, D. C., Mirch, M. C., Theim, K. R., Ranzenhofer, L., Tanofsky-Kraff, M., & Yanovski, J. A. (2006). Serum brain-derived neurotrophic factor concentrations in lean and overweight children and adolescents. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(9), 3548–3552. <https://doi.org/10.1210/JC.2006-0658>

Elkabes, S., Schaar, D., Dreyfus, C., & Black, I. (1995). Developmental regulation of neurotrophin-3 and trk C splice variants in optic nerve glia in vivo. *Neuroscience*, 66(4), 879–889. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00630-N](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00630-N)

Elks, C., & Francis, J. (2010). Central adiposity, systemic inflammation, and the metabolic syndrome. *Current Hypertension Reports*, 12(2), 99–104. <https://doi.org/10.1007/S11906-010-0096-4>

BIBLIOGRAFÍA

Ernande, L., Stanford, K. I., Thoonen, R., Zhang, H., Clerte, M., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J., Bloch, K. D., Buys, E. S., & Scherrer-Crosbie, M. (2016). Relationship of brown adipose tissue perfusion and function: a study through β 2-adrenoreceptor stimulation. *Journal of Applied Physiology*, 120(8), 825. <https://doi.org/10.1152/JAPPLPHYSIOL.00634.2015>

Ernfors, P., Ibáñez, C. F., Ebendal, T., Olson, L., & Persson, H. (1990). Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: Developmental and topographical expression in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(14), 5454–5458. <https://doi.org/10.1073/PNAS.87.14.5454>

Esteve Ràfols, M. (2014). Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinología y Nutrición*, 61(2), 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2013.03.011>

Evans, B. A., Merlin, J., Bengtsson, T., & Hutchinson, D. S. (2019). Adrenoceptors in white, brown, and brite adipocytes. *British Journal of Pharmacology*, 176(14), 2416–2432. <https://doi.org/10.1111/BPH.14631>

Farhadi, H., Mowla, S., Petrecca, K., Morris, S., Seida, N., & Murphy, R. (2000). Neurotrophin-3 sorts to the constitutive secretory pathway of hippocampal neurons and is diverted to the regulated secretory pathway by coexpression with brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(11), 4059–4068. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-11-04059.2000>

Fariñas, I., Jones, K. R., Backus, C., Wang, X.-Y., & Reichardt, L. F. (1994). Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3. *Nature*, 369(6482), 658–661. <https://doi.org/10.1038/369658a0>

Fariñas, I., Yoshida, C., Backus, C., & Reichardt, L. (1996). Lack of neurotrophin-3 results in death of spinal sensory neurons and premature differentiation of their precursors. *Neuron*, 17(6), 1065–1078. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80240-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80240-8)

Faust, I. M., & Miller, W. H. (1981). Effects of diet and environment on adipocyte development. *International Journal of Obesity*, 5(6), 593–596.

Favero, G., Paganelli, C., Buffoli, B., Rodella, L. F., & Rezzani, R. (2014). Endothelium and Its Alterations in Cardiovascular Diseases: Life Style Intervention. *BioMed Research International*, 2014, 801896. <https://doi.org/10.1155/2014/801896>

Fenner, B. M. (2012). Truncated TrkB: Beyond a dominant negative receptor. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 23(1–2), 15–24. <https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2012.01.002>

Fenzl, A., & Kiefer, F. W. (2014). Brown adipose tissue and thermogenesis. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 19(1), 25–37. <https://doi.org/10.1515/HMBCI-2014-0022>

Fernandes, G. W., Ueta, C. B., Fonseca, T. L., Gouveia, C. H. A., Lancellotti, C. L., Brum, P. C., Christoffolete, M. A., Bianco, A. C., & Ribeiro, M. O. (2014). Inactivation of the adrenergic

receptor $\beta 2$ disrupts glucose homeostasis in mice. *Journal of Endocrinology*, 221(3), 381–390. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0526>

Ferro, A., Coash, M., Yamamoto, T., Rob, J., Ji, Y., & Queen, L. (2004). Nitric oxide-dependent $\beta 2$ -adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt. *British Journal of Pharmacology*, 143(3), 397. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0705933>

Fiore, M., Chaldakov, G., & Aloe, L. (2009). Nerve growth factor as a signaling molecule for nerve cells and also for the neuroendocrine-immune systems. *Reviews in the Neurosciences*, 20(2), 133–145. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2009.20.2.133>

Flacco, N., Segura, V., Perez-Aso, M., Estrada, S., Seller, J., Jiménez-Altayó, F., Noguera, M., D’Ocon, P., Vila, E., & Ivorra, M. (2013). Different β -adrenoceptor subtypes coupling to cAMP or NO/cGMP pathways: implications in the relaxant response of rat conductance and resistance vessels. *British Journal of Pharmacology*, 169(2), 413. <https://doi.org/10.1111/BPH.12121>

Francis, N., Farinas, I., Brennan, C., Rivas-Plata, K., Backus, C., Reichardt, L., & Landis, S. (1999). NT-3, like NGF, Is Required for Survival of Sympathetic Neurons, but Not Their Precursors. *Developmental Biology*, 210(2), 411–427. <https://doi.org/10.1006/DBIO.1999.9269>

Fredriksson, J. M., Lindquist, J. M., Bronnikov, G. E., & Nedergaard, J. (2000). Norepinephrine induces vascular endothelial growth factor gene expression in brown adipocytes through a beta-adrenoreceptor/cAMP/protein kinase A pathway involving Src but independently of Erk1/2. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13802–13811. <https://doi.org/10.1074/JBC.275.18.13802>

Fredriksson, J. M., Nikami, H., & Nedergaard, J. (2005). Cold-induced expression of the VEGF gene in brown adipose tissue is independent of thermogenic oxygen consumption. *FEBS Letters*, 579(25), 5680–5684. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2005.09.044>

Friedewald, W. T., Levy, R. I., & Fredrickson, D. S. (1972). Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18(6), 499–502. <https://doi.org/10.1093/CLINCHEM/18.6.499>

Friedman, W., Ernfors, P., & Persson, H. (1991). Transient and persistent expression of NT-3/HDNF mRNA in the rat brain during postnatal development. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 11(6), 1577–1584. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-06-01577.1991>

Frontini, A., & Cinti, S. (2010). Distribution and Development of Brown Adipocytes in the Murine and Human Adipose Organ. *Cell Metabolism*, 11(4), 253–256. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2010.03.004>

Frontini, A., Rousset, S., Cassard-Doulcier, A.-M., Zingaretti, C., Ricquier, D., & Cinti, S. (2007). Thymus Uncoupling Protein 1 Is Exclusive to Typical Brown Adipocytes and Is Not Found in Thymocytes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 55(2), 183–189. <https://doi.org/10.1369/JHC.6A7013.2006>

BIBLIOGRAFÍA

Galic, S., Oakhill, J. S., & Steinberg, G. R. (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 316(2), 129–139. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2009.08.018>

Garofalo, M. A. R., Kettelhut, I. C., Roselino, J. E. S., & Migliorini, R. H. (1996). Effect of acute cold exposure on norpinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 60(3), 206–208. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(96\)00037-9](https://doi.org/10.1016/0165-1838(96)00037-9)

Garretson, J. T., Szymanski, L. A., Schwartz, G. J., Xue, B., Ryu, V., & Bartness, T. J. (2016). Lipolysis sensation by white fat afferent nerves triggers brown fat thermogenesis. *Molecular Metabolism*, 5(8), 626–634. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2016.06.013>

Gawronska-Kozak, B., Staszkiwicz, J., Gimble, J. M., & Kirk-Ballard, H. (2014). Recruitment of fat cell precursors during long-term high fat diet in C57BL/6J mice is fat depot specific. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 22(4), 1091. <https://doi.org/10.1002/OBY.20671>

Gealekman, O., Guseva, N., Hartigan, C., Apotheker, S., Gorgoglione, M., Gurav, K., Tran, K.-V., Straubhaar, J., Nicoloso, S., Czech, M. P., Thompson, M., Perugini, R. A., & Corvera, S. (2011). Depot-Specific Differences and Insufficient Subcutaneous Adipose Tissue Angiogenesis in Human Obesity. *Circulation*, 123(2), 186–194. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.970145>

Generini, S., Tuveri, M. A., Cerinic, M. M., Mastinu, F., Manni, L., & Aloe, L. (2004). Topical application of nerve growth factor in human diabetic foot ulcers. A study of three cases. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 112(9), 542–544. <https://doi.org/10.1055/S-2004-821313>

Germack, R., Starzec, A. B. A., Vassy, R., & Perret, G. Y. G. (1997). β -Adrenoceptor subtype expression and function in rat white adipocytes. *British Journal of Pharmacology*, 120(2), 201–210. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0700885>

Geroldi, D., Minorette, P., & Emanuele, E. (2006). Brain-derived neurotrophic factor and the metabolic syndrome: More than just a hypothesis. *Medical Hypotheses*, 67(1), 195–196. <https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2006.02.001>

Gesta, S., Tseng, Y.-H., & Kahn, C. R. (2007). Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell*, 131(2), 242–256. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.10.004>

Ghaben, A. L., & Scherer, P. E. (2019). Adipogenesis and metabolic health. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(4), 242–258. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0093-z>

Gibon, J., & Barker, P. A. (2017). Neurotrophins and Proneurotrophins: Focus on Synaptic Activity and Plasticity in the Brain. *Neuroscientist*, 23(6), 587–604. <https://doi.org/10.1177/1073858417697037>

Giordano, A., Frontini, A., & Cinti, S. (2008). Adipose organ nerves revealed by immunohistochemistry. *Methods in Molecular Biology*, 456, 83–95. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-245-8_6

Giordano, A., Frontini, A., Castellucci, M., & Cinti, S. (2004). Presence and distribution of cholinergic nerves in rat mediastinal brown adipose tissue. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 52(7), 923–930. <https://doi.org/10.1369/JHC.3A6246.2004>

Giordano, A., Morroni, M., Carle, F., Gesuita, R., Marchesi, G. F., & Cinti, S. (1998). Sensory nerves affect the recruitment and differentiation of rat periovarian brown adipocytes during cold acclimation. *Journal of Cell Science*, 111(Pt 17), 2587–2594. <https://doi.org/10.1242/jcs.111.17.2587>

Giordano, A., Murano, I., Mondini, E., Perugini, J., Smorlesi, A., Severi, I., Barazzoni, R., Scherer, P. E., & Cinti, S. (2013). Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2423–2436. <https://doi.org/10.1194/JLR.M038638>

Giordano, A., Smorlesi, A., Frontini, A., Barbatelli, G., & Cinti, S. (2014). White, brown and pink adipocytes: The extraordinary plasticity of the adipose organ. *European Journal of Endocrinology*, 170(5). <https://doi.org/10.1530/EJE-13-0945>

Gray, J., Yeo, G. S. H., Cox, J. J., Morton, J., Adlam, A.-L. R., Keogh, J. M., Yanovski, J. A., Gharbawy, A. El, Han, J. C., Tung, Y. C. L., Hodges, J. R., Raymond, F. L., O’Rahilly, S., & Farooqi, I. S. (2006). Hyperphagia, Severe Obesity, Impaired Cognitive Function, and Hyperactivity Associated With Functional Loss of One Copy of the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Gene. *Diabetes*, 55(12), 3366–3371. <https://doi.org/10.2337/DB06-0550>

Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A., Eckel, R. H., Franklin, B. A., Gordon, D. J., Krauss, R. M., Savage, P. J., Sidney C. Smith, J., Spertus, J. A., & Costa, F. (2005). Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*, 112(17), 2735–2752. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.169404>

Guerra, C., Koza, R. A., Yamashita, H., Walsh, K., & Kozak, L. P. (1998). Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control effects on body weight and adiposity. *Journal of Clinical Investigation*, 102(2), 412–420. <https://doi.org/10.1172/JCI3155>

Guilherme, A., Henriques, F., Bedard, A. H., & Czech, M. P. (2019). Molecular pathways linking adipose innervation to insulin action in obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(4), 207–225. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0165-y>

Hallböök, F., Ibáñez, C. F., & Persson, H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in xenopus ovary. *Neuron*, 6(5), 845–858. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90180-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90180-8)

BIBLIOGRAFÍA

Han, J. C., Liu, Q.-R., Jones, M., Levinn, R. L., Menzie, C. M., Jefferson-George, K. S., Adler-Wailes, D. C., Sanford, E. L., Lacbawan, F. L., Uhl, G. R., Rennert, O. M., & Yanovski, J. A. (2008). Brain-derived neurotrophic factor and obesity in the WAGR syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 359(9), 918–927. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA0801119>

Hao, Q., Yadav, R., Basse, A. L., Petersen, S., Sonne, S. B., Rasmussen, S., Zhu, Q., Lu, Z., Wang, J., Audouze, K., Gupta, R., Madsen, L., Kristiansen, K., & Hansen, J. B. (2015). Transcriptome profiling of brown adipose tissue during cold exposure reveals extensive regulation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 308(5), E380–E392. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00277.2014>

Harrington, A. W., Hillaire, C. St., Zweifel, L. S., Glebova, N. O., Philippidou, P., Halegoua, S., & Ginty, D. D. (2011). Recruitment of actin modifiers to TrkA endosomes governs retrograde NGF signaling and survival. *Cell*, 146(3), 421. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.07.008>

Hayashi, T., Boyko, E. J., Leonetti, D. L., McNeely, M. J., Newell-Morris, L., Kahn, S. E., & Fujimoto, W. Y. (2003). Visceral Adiposity and the Risk of Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes Care*, 26(3), 650–655. <https://doi.org/10.2337/DIACARE.26.3.650>

Heeren, J., & Scheja, L. (2018). Brown adipose tissue and lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 29(3), 180–185. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000504>

Heinonen, S., Muniandy, M., Buzkova, J., Mardinoglu, A., Rodríguez, A., Frühbeck, G., Hakkarainen, A., Lundbom, J., Lundbom, N., Kaprio, J., Rissanen, A., & Pietiläinen, K. H. (2016). Mitochondria-related transcriptional signature is downregulated in adipocytes in obesity: a study of young healthy MZ twins. *Diabetologia*, 60(1), 169–181. <https://doi.org/10.1007/S00125-016-4121-2>

Himms-Hagen, J., Hogan, S., & Zaror-Behrens, G. (1986). Increased brown adipose tissue thermogenesis in obese (ob/ob) mice fed a palatable diet. *The American Journal of Physiology*, 250(3 Pt 1), E274–E281. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.1986.250.3.E274>

Hirsch, J., & Batchelor, B. (1976). Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clinics in Endocrinology and Metabolism*, 5(2), 299–311. [https://doi.org/10.1016/S0300-595X\(76\)80023-0](https://doi.org/10.1016/S0300-595X(76)80023-0)

Hofer, M. M., & Barde, Y. A. (1988). Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death in vivo. *Nature*, 331(6153), 261–262. <https://doi.org/10.1038/331261A0>

Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., & Barde, Y. A. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature*, 344(6264), 339–341. <https://doi.org/10.1038/344339A0>

Hristova, M. G. (2013). Metabolic syndrome—from the neurotrophic hypothesis to a theory. *Medical Hypotheses*, 81(4), 627–634. <https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2013.07.018>

Hristova, M., & Aloe, L. (2006). Metabolic syndrome – Neurotrophic hypothesis. *Medical Hypotheses*, 66(3), 545–549. <https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2005.08.055>

Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 677–736. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.24.1.677>

Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2003). Trk receptors: Roles in neuronal signal transduction. In *Annual Review of Biochemistry*, 72, 609–642. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629>

Huang, H., Song, T.-J., Li, X., Hu, L., He, Q., Liu, M., Lane, M. D., & Tang, Q.-Q. (2009). BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12670–12675. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906266106>

Huh, J. Y., Park, Y. J., Ham, M., & Kim, J. B. (2014). Crosstalk between Adipocytes and Immune Cells in Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Dysregulation in Obesity. *Molecules and Cells*, 37(5), 365–371. <https://doi.org/10.14348/MOLCELLS.2014.0074>

Ip, N. Y., Ibanez, C. F., Nye, S. H., McClain, J., Jones, P. F., Gies, D. R., Belluscio, L., Le Beau, M. M., Espinosa, R., Squinto, S. P., Persson, H., & Yancopoulos, G. D. (1992). Mammalian neurotrophin-4: Structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7), 3060–3064. <https://doi.org/10.1073/PNAS.89.7.3060>

Jimenez, M., Barbatelli, G., Allevi, R., Cinti, S., Seydoux, J., Giacobino, J.-P., Muzzin, P., & Preitner, F. (2003). β 3-Adrenoceptor knockout in C57BL/6J mice depresses the occurrence of brown adipocytes in white fat. *European Journal of Biochemistry*, 270(4), 699–705. <https://doi.org/10.1046/J.1432-1033.2003.03422.X>

Jimenez, M., Léger, B., Canola, K., Lehr, L., Arboit, P., Seydoux, J., Russell, A. P., Giacobino, J.-P., Muzzin, P., & Preitner, F. (2002). β 1/ β 2/ β 3-adrenoceptor knockout mice are obese and cold-sensitive but have normal lipolytic responses to fasting. *FEBS Letters*, 530(1–3), 37–40. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03387-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03387-2)

Jones, K. R., & Reichardt, L. F. (1990). Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(20), 8060–8064. <https://doi.org/10.1073/PNAS.87.20.8060>

Jungbluth, S., Bailey, K., & Barde, Y. A. (1994). Purification and characterisation of a brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-3 (BDNF/NT-3) heterodimer. *European Journal of Biochemistry*, 221(2), 677–685. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1994.TB18780.X>

Kalinovich, A. V., de Jong, J. M. A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2017). UCP1 in adipose tissues: two steps to full browning. *Biochimie*, 134, 127–137. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2017.01.007>

BIBLIOGRAFÍA

Kang, J. G., & Park, C. Y. (2011). The Actions of PPARgamma Agonists on the Various Target Organs. *The Korean Journal of Obesity*, 20(4), 161–169.

Karpe, F., & Pinnick, K. E. (2014). Biology of upper-body and lower-body adipose tissue—link to whole-body phenotypes. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(2), 90–100. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.185>

Kawaguchi-Manabe, H., Ieda, M., Kimura, K., Manabe, T., Miyatake, S., Kanazawa, H., Kawakami, T., Ogawa, S., Suematsu, M., & Fukuda, K. (2007). A novel cardiac hypertrophic factor, neurotrophin-3, is paradoxically downregulated in cardiac hypertrophy. *Life Sciences*, 81(5), 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.05.024>

Keeler, A. B., Suo, D., Park, J., & Deppmann, C. D. (2017). Delineating neurotrophin-3 dependent signaling pathways underlying sympathetic axon growth along intermediate targets. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 82, 66-75. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.04.011>

Khan, T., Muise, E. S., Iyengar, P., Wang, Z. V., Chandalia, M., Abate, N., Zhang, B. B., Bonaldo, P., Chua, S., & Scherer, P. E. (2009). Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Molecular and cellular biology*, 29(6), 1575–1591. <https://doi.org/10.1128/MCB.01300-08>

Kim, J. I., Huh, J. Y., Sohn, J. H., Choe, S. S., Lee, Y. S., Lim, C. Y., Jo, A., Park, S. B., Han, W., & Kim, J. B. (2015). Lipid-overloaded enlarged adipocytes provoke insulin resistance independent of inflammation. *Molecular and Cellular Biology*, 35(10), 1686–1699. <https://doi.org/10.1128/MCB.01321-14>

Kirstein, M., & Fariñas, I. (2002). Sensing life: regulation of sensory neuron survival by neurotrophins. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 59(11), 1787–1802. <https://doi.org/10.1007/PL00012506>

Klaus, S., Seivert, A., & Boeuf, S. (2001). Effect of the β 3-adrenergic agonist CI316,243 on functional differentiation of white and brown adipocytes in primary cell culture. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1539(1–2), 85–92. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(01\)00093-3](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(01)00093-3)

Klein, R., Silos-Santiago, I., Smeyne, R. J., Lira, S. A., Brambilla, R., Bryant, S., Zhang, L., Snider, W. D., & Barbacid, M. (1994). Disruption of the neurotrophin-3 receptor gene *trkC* eliminates la muscle afferents and results in abnormal movements. *Nature*, 368(6468), 249–251. <https://doi.org/10.1038/368249a0>

Knittle, J. L., Timmers, K., Ginsberg-Fellner, F., Brown, R. E., & Katz, D. P. (1979). The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. *The Journal of Clinical Investigation*, 63(2), 239–246. <https://doi.org/10.1172/JCI109295>

Kotzbeck, P., Giordano, A., Mondini, E., Murano, I., Severi, I., Venema, W., Cecchini, M. P., Kershaw, E. E., Barbatelli, G., Haemmerle, G., Zechner, R., & Cinti, S. (2018). Brown adipose tissue

whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. *Journal of Lipid Research*, 59(5), 784–794. <https://doi.org/10.1194/JLR.M079665>

Krief, S., Lönnqvist, F., Raimbault, S., Baude, B., Spronsen, A. Van, Arner, P., Strosberg, A. D., Ricquier, D., & Emorine, L. J. (1993). Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *The Journal of Clinical Investigation*, 91(1), 344–349. <https://doi.org/10.1172/JCI116191>

Kuk, J. L., Katzmarzyk, P. T., Nichaman, M. Z., Church, T. S., Blair, S. N., & Ross, R. (2006). Visceral Fat Is an Independent Predictor of All-cause Mortality in Men. *Obesity*, 14(2), 336–341. <https://doi.org/10.1038/OBY.2006.43>

Kwok, K. H. M., Lam, K. S. L., & Xu, A. (2016). Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(3), e215. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.5>

Labbé, S. M., Mouchiroud, M., Caron, A., Secco, B., Freinkman, E., Lamoureux, G., Gélinas, Y., Lecomte, R., Bossé, Y., Chimin, P., Festuccia, W. T., Richard, D., & Laplante, M. (2016). mTORC1 is Required for Brown Adipose Tissue Recruitment and Metabolic Adaptation to Cold. *Scientific Reports*, 6(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/srep37223>

Lafontan, M., & Berlan, M. (1995). Fat Cell α 2-Adrenoceptors: The Regulation of Fat Cell Function and Lipolysis. *Endocrine Reviews*, 16(6), 716–738. <https://doi.org/10.1210/EDRV-16-6-716>

Lamballe, F., Smeyne, R. J., & Barbacid, M. (1994). Developmental expression of trkC, the neurotrophin-3 receptor, in the mammalian nervous system. *Journal of Neuroscience*, 14(1), 14–28. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-01-00014.1994>

Lamballe, F., Tapley, P., & Barbacid, M. (1993). trkC encodes multiple neurotrophin-3 receptors with distinct biological properties and substrate specificities. *EMBO Journal*, 12(8), 3083–3094. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1993.TB05977.X>

Langin, D. (2006). Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacological Research*, 53(6), 482–491. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2006.03.009>

Langin, D., Portillo, M. P., Saulnier-Blache, J. S., & Lafontan, M. (1991). Coexistence of three β -adrenoceptor subtypes in white fat cells of various mammalian species. *European Journal of Pharmacology*, 199(3), 291–301. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(91\)90492-9](https://doi.org/10.1016/0014-2999(91)90492-9)

Larsen, T. M., Toubro, S., van Baak, M. A., Gottesdiener, K. M., Larson, P., Saris, W. H., & Astrup, A. (2002). Effect of a 28-d treatment with L-796568, a novel β 3-adrenergic receptor agonist, on energy expenditure and body composition in obese men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(4), 780–788. <https://doi.org/10.1093/AJCN/76.4.780>

Lebrun, B., Bariohay, B., Moyse, E., & Jean, A. (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and food intake regulation: A minireview. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 126, 30–38. <https://doi.org/10.1016/J.AUTNEU.2006.02.027>

BIBLIOGRAFÍA

- Lee, M. J., Wu, Y., & Fried, S. K. (2013). Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2012.10.001>
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., & Hempstead, B. L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 294(5548), 1945–1948. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1065057>
- Lee, Y.H., Petkova, A. P., Konkar, A. A., & Granneman, J. G. (2015). Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. *The FASEB Journal*, 29(1), 286–299. <https://doi.org/10.1096/FJ.14-263038>
- Lefterova, M. I., Zhang, Y., Steger, D. J., Schupp, M., Schug, J., Cristancho, A., Feng, D., Zhuo, D., Stoeckert, C. J., Liu, X. S., & Lazar, M. A. (2008). PPAR γ and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes & Development*, 22(21), 2941–2952. <https://doi.org/10.1101/GAD.1709008>
- Lessmann, V., Gottmann, K., & Malsangio, M. (2003). Neurotrophin secretion: Current facts and future prospects. *Progress in Neurobiology*, 69(5), 341–374. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(03\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(03)00019-4)
- Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science*, 237(4819), 1154–1162. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.3306916>
- Levin, B. E., & Sullivan, A. C. (1986). Beta-1 receptor is the predominant beta-adrenoreceptor on rat brown adipose tissue. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 236(3), 681–688.
- Lewin, G. R., & Barde, Y. A. (1996). Physiology of the neurotrophins. *Annual Review of Neuroscience*, 19, 289–317. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NE.19.030196.001445>
- Lidell, M. E. (2018). Brown Adipose Tissue in Human Infants. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 251, 107–123. https://doi.org/10.1007/164_2018_118
- Lin, M., Das, I., Schwartz, G., Tsoulfas, P., Mikawa, T., & Hempstead, B. (2000). Trk C receptor signaling regulates cardiac myocyte proliferation during early heart development in vivo. *Developmental Biology*, 226(2), 180–191. <https://doi.org/10.1006/DBIO.2000.9850>
- Liu, A., McLaughlin, T., Liu, T., Sherman, A., Yee, G., Abbasi, F., Lamendola, C., Morton, J., Cushman, S. W., Reaven, G. M., & Tsao, P. S. (2009). Differential Intra-abdominal Adipose Tissue Profiling in Obese, Insulin-resistant Women. *Obesity Surgery*, 19(11), 1564. <https://doi.org/10.1007/S11695-009-9949-9>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>

Longo, F. M., & Massa, S. M. (2013). Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: A strategy for the treatment of neurological disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(7), 507–525. <https://doi.org/10.1038/NRD4024>

Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G., Beguinot, F., & Miele, C. (2019). Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2358. <https://doi.org/10.3390/IJMS20092358>

Lönnqvist, F., Krief, S., Strosberg, A. D., Nyberg, Björn, Emorine, L. J., & Arner, P. (1993). Evidence for a functional β 3-adrenoceptor in man. *British Journal of Pharmacology*, 110(3), 929–936. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.1993.TB13902.X>

Lowell, B. B., S-Susulic, V., Hamann, A., Lawitts, J. A., Himms-Hagen, J., Boyer, B. B., Kozak, L. P., & Flier, J. S. (1993). Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature*, 366(6457), 740–742. <https://doi.org/10.1038/366740a0>

Lynes, M. D., Leiria, L. O., Lundh, M., Bartelt, A., Shamsi, F., Huang, T. L., Takahashi, H., Hirshman, M. F., Schlein, C., Lee, A., Baer, L. A., May, F. J., Gao, F., Narain, N. R., Chen, E. Y., Kiebish, M. A., Cypess, A. M., Blüher, M., Goodyear, L. J., ... Tseng, Y.-H. (2017). The cold-induced lipokine 12,13-diHOME promotes fatty acid transport into brown adipose tissue. *Nature Medicine*, 23(5), 631–637. <https://doi.org/10.1038/nm.4297>

Maisonpierre, P. C., Friedman, B., Alderson, R. F., Wiegand, J., Furth, E., Lindsay, M., Yancopoulos, D., Belluscio, L., Wiegand, S. J., Furth, M. E., Lindsay, R. M., & Yancopoulos, G. D. (1990). NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron*, 5(4), 501–509. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90089-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90089-X)

Marangoni, R. G., Korman, B. D., Wei, J., Wood, T. A., Graham, L. V., Whitfield, M. L., Scherer, P. E., Tourtellotte, W. G., & Varga, J. (2015). Myofibroblasts in Murine Cutaneous Fibrosis Originate From Adiponectin-Positive Intradermal Progenitors. *Arthritis & Rheumatology*, 67(4), 1062–1073. <https://doi.org/10.1002/ART.38990>

Martinelli, M. P., & Camargos, ER. (2016). Neurotrophic Factors and Heart Diseases. *Journal of Cardiology and Therapy*, 3(1), 483–491. <https://doi.org/10.17554/J.ISSN.2309-6861.2015.03.109>

Martinez-Hervas, S., Argente, C., Garcia-Jodar, J., Priego, A., Real, J. T., Carratala, A., Carmena, R., & Ascaso, J. F. (2011). Misclassification of subjects with insulin resistance and associated cardiovascular risk factors by homeostasis model assessment index. Utility of a postprandial method based on oral glucose tolerance test. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 60(5), 740–746. <https://doi.org/10.1016/J.METABOL.2010.07.024>

Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), 412–419. <https://doi.org/10.1007/BF00280883>

BIBLIOGRAFÍA

Mattsson, C. L., Csikasz, R. I., Chernogubova, E., Yamamoto, D. L., Hogberg, H. T., Amri, E.-Z., Hutchinson, D. S., & Bengtsson, T. (2011). β 1-Adrenergic receptors increase UCP1 in human MADS brown adipocytes and rescue cold-acclimated β 3-adrenergic receptor-knockout mice via nonshivering thermogenesis. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 301(6), 1108–1118. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00085.2011>

Meloni, M., Cesselli, D., Caporali, A., Mangialardi, G., Avolio, E., Reni, C., Fortunato, O., Martini, S., Madeddu, P., Valgimigli, M., Nikolaev, E., Kaczmarek, L., Angelini, G. D., Beltrami, A. P., & Emanuelli, C. (2015). Cardiac nerve growth factor overexpression induces bone marrow-derived progenitor cells mobilization and homing to the infarcted heart. *Molecular Therapy*, 23(12), 1854–1866. <https://doi.org/10.1038/MT.2015.167>

Menn, B., Timsit, S., Calothy, G., & Lamballe, F. (1998). Differential expression of TrkC catalytic and noncatalytic isoforms suggests that they act independently or in association. *Journal of Comparative Neurology*, 401(1), 47–64. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19981109\)401:1<47::aid-cne4>3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19981109)401:1<47::aid-cne4>3.0.co;2-c)

Menn, B., Timsit, S., Represa, A., Mateos, S., Calothy, G., & Lamballe, F. (2000). Spatiotemporal expression of noncatalytic TrkC NC2 isoform during early and late CNS neurogenesis: A comparative study with TrkC catalytic and p75(NTR) receptors. *European Journal of Neuroscience*, 12(9), 3211–3223. <https://doi.org/10.1046/J.1460-9568.2000.00215.X>

Merlin, J., Sato, M., Chia, L. Y., Fahey, R., Pakzad, M., Nowell, C. J., Summers, R. J., Bengtsson, T., Evans, B. A., & Hutchinson, D. S. (2018a). Rosiglitazone and a β 3-adrenoceptor agonist are both required for functional browning of white adipocytes in culture. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 249. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00249/FULL>

Merlin, J., Sato, M., Nowell, C., Pakzad, M., Fahey, R., Gao, J., Dehvari, N., Summers, R. J., Bengtsson, T., Evans, B. A., & Hutchinson, D. S. (2018b). The PPAR γ agonist rosiglitazone promotes the induction of brite adipocytes, increasing β -adrenoceptor-mediated mitochondrial function and glucose uptake. *Cellular Signalling*, 42, 54–66. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2017.09.023>

Michel, M. C., Bond, R. A., & Summers, R. J. (2019). Adrenoceptors—New roles for old players. *British Journal of Pharmacology*, 176(14), 2339–2342. <https://doi.org/10.1111/BPH.14701>

Moller, D., & Flier, J. (1991). Insulin resistance--mechanisms, syndromes, and implications. *The New England Journal of Medicine*, 325(13), 938–948. <https://doi.org/10.1056/NEJM199109263251307>

Montó, F., Oliver, E., Vicente, D., Rueda, J., Agüero, J., Almenar, L., Ivorra, M. D., Baretino, D., & D'Ocon, P. (2012). Different expression of adrenoceptors and GRKs in the human myocardium depends on heart failure etiology and correlates to clinical variables. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 303(3), 368–376. <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.01061.2011>

Moral-Sanz, J., Menendez, C., Moreno, L., Moreno, E., Cogolludo, A., & Perez-Vizcaino, F. (2011). Pulmonary arterial dysfunction in insulin resistant obese Zucker rats. *Respiratory Research*, 12(1), 51. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-51>

Morotti, A., Mila, S., Accornero, P., Tagliabue, E., & Ponzetto, C. (2002). K252a inhibits the oncogenic properties of Met, the HGF receptor. *Oncogene*, 21(32), 4885–4893. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1205622>

Morrone, M., Barbatelli, G., Zingaretti, M. C., & Cinti, S. (1995). Immunohistochemical, ultrastructural and morphometric evidence for brown adipose tissue recruitment due to cold acclimation in old rats. *International Journal of Obesity*, 19(2), 126–131.

Nakagomi, A., Okada, S., Yokoyama, M., Yoshida, Y., Shimizu, I., Miki, T., Kobayashi, Y., & Minamino, T. (2015). Role of the central nervous system and adipose tissue BDNF/TrkB axes in metabolic regulation. *NPJ Aging and Mechanisms of Disease*, 1, 15009. <https://doi.org/10.1038/NPJAMD.2015.9>

Nakajima, I., Yamaguchi, T., Ozutsumi, K., & Aso, H. (1998). Adipose tissue extracellular matrix: Newly organized by adipocytes during differentiation. *Differentiation*, 63(4), 193–200. <https://doi.org/10.1111/J.1432-0436.1998.00193.X>

Nguyen, N. L. T., Xue, B., & Bartness, T. J. (2018). Sensory denervation of inguinal white fat modifies sympathetic outflow to white and brown fat in Siberian hamsters. *Physiology & Behavior*, 190, 28–33. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2018.02.019>

Okamatsu-Ogura, Y., Fukano, K., Tsubota, A., Uozumi, A., Terao, A., Kimura, K., & Saito, M. (2013). Thermogenic Ability of Uncoupling Protein 1 in Beige Adipocytes in Mice. *PLOS ONE*, 8(12), e84229. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0084229>

Oliver, E., Rovira, E., Montó, F., Valldecabres, C., Julve, R., Muedra, V., Ruiz, N., Barettono, D., & D'Ocon, P. (2010). β -Adrenoceptor and GRK3 expression in human lymphocytes is related to blood pressure and urinary albumin excretion. *Journal of Hypertension*, 28(6), 1281–1289. <https://doi.org/10.1097/HJH.0B013E3283383564>

Olsen, J. M., Csikasz, R. I., Dehvari, N., Lu, L., Sandström, A., Öberg, A. I., Nedergaard, J., Stone-Elander, S., & Bengtsson, T. (2017). β 3-Adrenergically induced glucose uptake in brown adipose tissue is independent of UCP1 presence or activity: Mediation through the mTOR pathway. *Molecular Metabolism*, 6(6), 611–619. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2017.02.006>

Olsen, J. M., Sato, M., Dallner, O. S., Sandström, A. L., Pisani, D. F., Chambard, J.-C., Amri, E.-Z., Hutchinson, D. S., & Bengtsson, T. (2014). Glucose uptake in brown fat cells is dependent on mTOR complex 2–promoted GLUT1 translocation. *Journal of Cell Biology*, 207(3), 365–374. <https://doi.org/10.1083/JCB.201403080>

Ouellet, V., Routhier-Labadie, A., Bellemare, W., Lakhali-Chaieb, L., Turcotte, E., Carpentier, A. C., & Richard, D. (2011). Outdoor Temperature, Age, Sex, Body Mass Index, and Diabetic Status Determine the Prevalence, Mass, and Glucose-Uptake Activity of ^{18}F -FDG-Detected BAT in

BIBLIOGRAFÍA

Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(1), 192–199. <https://doi.org/10.1210/JC.2010-0989>

Palko, M., Coppola, V., & Tessarollo, L. (1999). Evidence for a role of truncated trkC receptor isoforms in mouse development. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(2), 775–782. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-02-00775.1999>

Palmer, A. K., & Kirkland, J. L. (2016). Aging and adipose tissue: potential interventions for diabetes and regenerative medicine. *Experimental Gerontology*, 86, 97–105. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2016.02.013>

Pasarica, M., Gowronska-Kozak, B., Burk, D., Remedios, I., Hymel, D., Gimble, J., Ravussin, E., Bray, G. A., & Smith, S. R. (2009). Adipose tissue collagen VI in obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(12), 5155–5162. <https://doi.org/10.1210/JC.2009-0947>

Pedraza, C., Podlesniy, P., Vida, N., Arévalo, J., Lee, R., Hempstead, B., Ferrer, I., Iglesias, M., & Espinet, C. (2005). Pro-NGF isolated from the human brain affected by Alzheimer's disease induces neuronal apoptosis mediated by p75NTR. *The American Journal of Pathology*, 166(2), 533–543. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62275-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62275-4)

Peirce, V., & Vidal-Puig, A. (2013). Regulation of glucose homeostasis by brown adipose tissue. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 1(4), 353–360. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70055-X](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70055-X)

Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., & Wellman, C. L. (1995). Characteristics of BDNF-induced weight loss. *Experimental Neurology*, 131(2), 229–238. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(95\)90045-4](https://doi.org/10.1016/0014-4886(95)90045-4)

Pereira, M. M. A., Mahú, I., Seixas, E., Martínéz-Sánchez, N., Kubasova, N., Pirzgalska, R. M., Cohen, P., Dietrich, M. O., López, M., Bernardes, G. J. L., & Domingos, A. I. (2017). A brain-sparing diphtheria toxin for chemical genetic ablation of peripheral cell lineages. *Nature Communications*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms14967>

Pierleoni, C., Verdenelli, F., Castellucci, M., & Cinti, S. (1998). Fibronectins and basal lamina molecules expression in human subcutaneous white adipose tissue. *European Journal of Histochemistry*, 42(3), 183–188.

Plikus, M. V., Guerrero-Juarez, C. F., Ito, M., Li, Y. R., Dedhia, P. H., Zheng, Y., Shao, M., Gay, D. L., Ramos, R., Hsi, T.-C., Oh, J. W., Wang, X., Ramirez, A., Konopelski, S. E., Elzein, A., Wang, A., Supapannachart, R. J., Lee, H.-L., Lim, C. H., ... Cotsarelis, G. (2017). Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science*, 355(6326), 748–752. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAI8792>

Poissonnet, C. M., Burdi, A. R., & Garn, S. M. (1984). The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early Human Development*, 10(1–2), 1–11. [https://doi.org/10.1016/0378-3782\(84\)90106-3](https://doi.org/10.1016/0378-3782(84)90106-3)

Popa-Wagner, A., Furczyk, K., Richter, J., Irmisch, G., & Thome, J. (2013). Neurotrophin levels at admission did not change significantly upon alcohol deprivation and were positively correlated with the BMI and LDL levels. *Journal of Molecular Psychiatry*, 1(1), 20. <https://doi.org/10.1186/2049-9256-1-20>

Quach, J. M., Walker, E. C., Allan, E., Solano, M., Yokoyama, A., Kato, S., Sims, N. A., Gillespie, M. T., & Martin, T. J. (2011). Zinc Finger Protein 467 Is a Novel Regulator of Osteoblast and Adipocyte Commitment. *Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4186–4198. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.178251>

Quartu, M., Serra, M., Manca, A., Follesa, P., Ambu, R., & Del Fiacco, M. (2003). High affinity neurotrophin receptors in the human pre-term newborn, infant, and adult cerebellum. *International Journal of Developmental Neuroscience : The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 21(6), 309–320. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(03\)00086-8](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(03)00086-8)

Queen, L., & Ferro, A. (2006). Beta-adrenergic receptors and nitric oxide generation in the cardiovascular system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(9), 1070–1083. <https://doi.org/10.1007/S00018-005-5451-2>

Rabizadeh, S., Ye, X., Sperandio, S., Wang, J. J., Ellerby, H. M., Ellerby, L. M., Giza, C., Andrusiak, R. L., Frankowski, H., Yaron, Y., Moayeri, N. N., Rovelli, G., Evans, C. J., Butcher, L. L., Nolan, G. P., Assa-Munt, N., & Bredesen, D. (2000). Neurotrophin dependence domain: a domain required for the mediation of apoptosis by the p75 neurotrophin receptor. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 15(3), 215–229. <https://doi.org/10.1385/JMN:15:3:215>

Radziejewski, C., Robinson, R. C., DiStefano, P. S., & Taylor, J. W. (1992). Dimeric structure and conformational stability of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Biochemistry*, 31(18), 4431–4436. <https://doi.org/10.1021/BI00133A007>

Redman, L. M., de Jonge, L., Fang, X., Gamlin, B., Recker, D., Greenway, F. L., Smith, S. R., & Ravussin, E. (2007). Lack of an Effect of a Novel β 3-Adrenoceptor Agonist, TAK-677, on Energy Metabolism in Obese Individuals: A Double-Blind, Placebo-Controlled Randomized Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(2), 527–531. <https://doi.org/10.1210/JC.2006-1740>

Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1473), 1545–1564. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2006.1894>

Revelli, J. P., Preitner, F., Samec, S., Muniesa, P., Kuehne, F., Boss, O., Vassalli, J. D., Dulloo, A., Seydoux, J., Giacobino, J. P., Huarte, J., & Ody, C. (1997). Targeted gene disruption reveals a leptin-independent role for the mouse beta3-adrenoceptor in the regulation of body composition. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(5), 1098–1106. <https://doi.org/10.1172/JCI119620>

BIBLIOGRAFÍA

Ricquier, D. (2017). UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: A personal contribution and a historical perspective. *Biochimie*, 134, 3–8. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2016.10.018>

Ricquier, D., Mory, G., Nechad, M., & Hémon, P. (1978). Effects of cold adaptation and re-adaptation upon the mitochondrial phospholipids of brown adipose tissue. *Journal de Physiologie*, 74(8), 695–702.

Rios, M., Fan, G., Fekete, C., Kelly, J., Bates, B., Kuehn, R., Lechan, R. M., & Jaenisch, R. (2001). Conditional Deletion Of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Postnatal Brain Leads to Obesity and Hyperactivity. *Molecular Endocrinology*, 15(10), 1748–1757. <https://doi.org/10.1210/MEND.15.10.0706>

Robidoux, J., Martin, T. L., & Collins, S. (2004). β -Adrenergic Receptors and Regulation of Energy Expenditure: A Family Affair. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 297–323. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHARMTOX.44.101802.121659>

Robinson, R., Radziejewski, C., Stuart, D., & Jones, E. (1995). Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer. *Biochemistry*, 34(13), 4139–4146. <https://doi.org/10.1021/bi00013a001>

Rosell, M., Kaforou, M., Frontini, A., Okolo, A., Chan, Y.-W., Nikolopoulou, E., Millership, S., Fenech, M. E., MacIntyre, D., Turner, J. O., Moore, J. D., Blackburn, E., Gullick, W. J., Cinti, S., Montana, G., Parker, M. G., Christian, M., S, M., ME, F., ... M, C. (2014). Brown and white adipose tissues: intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 306(8). <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00473.2013>

Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., Spiegelman, B. M., & Mortensen, R. M. (1999). PPAR γ Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue In Vivo and In Vitro. *Molecular Cell*, 4(4), 611–617. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80211-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80211-7)

Ruderman, N., Chisholm, D., Pi-Sunyer, X., & Schneider, S. (1998). The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes*, 47(5), 699–713. <https://doi.org/10.2337/DIABETES.47.5.699>

Ryan, V. H., German, A. J., Wood, I. S., Hunter, L., Morris, P., & Trayhurn, P. (2008). NGF Gene Expression and Secretion by Canine Adipocytes in Primary Culture: Upregulation by the Inflammatory Mediators LPS and TNF α . *Hormone and Metabolic Research*, 40(12), 861–868. <https://doi.org/10.1055/S-0028-1083782>

Sackmann-Sala, L., Berryman, D. E., Munn, R. D., Lubbers, E. R., & Kopchick, J. J. (2012). Heterogeneity Among White Adipose Tissue Depots in Male C57BL/6J Mice. *Obesity*, 20(1), 101–111. <https://doi.org/10.1038/OBY.2011.235>

Salans, L., Horton, E., & Sims, E. (1971). Experimental obesity in man: cellular character of the adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, 50(5), 1005–1011. <https://doi.org/10.1172/JCI106570>

Sanchez-Gurmaches, J., & Guertin, D. A. (2014). Adipocyte lineages: Tracing back the origins of fat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(3), 340–351. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2013.05.027>

Saponaro, C., Gaggini, M., Carli, F., & Gastaldelli, A. (2015). The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients*, 7(11), 9453. <https://doi.org/10.3390/NU7115475>

Sbarbati, A., Morroni, M., Zancanaro, C., & Cinti, S. (1991). Rat interscapular brown adipose tissue at different ages: A morphometric study. *International Journal of Obesity*, 15(9), 581–587.

Schulz, T. J., Huang, P., Huang, T. L., Xue, R., McDougall, L. E., Townsend, K. L., Cypess, A. M., Mishina, Y., Gussoni, E., & Tseng, Y.-H. (2013). Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature*, 495(7441), 379–383. <https://doi.org/10.1038/nature11943>

Scioli, M. G., Bielli, A., Arcuri, G., Ferlosio, A., & Orlandi, A. (2014). Ageing and microvasculature. *Vascular Cell*, 6(1), 19. <https://doi.org/10.1186/2045-824X-6-19>

Seidah, N., Benjannet, S., Pareek, S., Chrétien, M., & Murphy, R. (1996). Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Letters*, 379(3), 247–250. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01520-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01520-5)

Semple, R. K., Savage, D. B., Cochran, E. K., Gorden, P., & O'Rahilly, S. (2011). Genetic Syndromes of Severe Insulin Resistance. *Endocrine Reviews*, 32(4), 498–514. <https://doi.org/10.1210/ER.2010-0020>

Sepa-Kishi, D. M., & Ceddia, R. B. (2018). White and beige adipocytes: are they metabolically distinct? *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 33(2). <https://doi.org/10.1515/HMBCI-2018-0003>

Shabalina, I. G., Petrovic, N., de Jong, J. M. A., Kalinovich, A. V., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2013). UCP1 in Brite/Beige Adipose Tissue Mitochondria Is Functionally Thermogenic. *Cell Reports*, 5(5), 1196–1203. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2013.10.044>

Shan, T., Xiong, Y., Zhang, P., Li, Z., Jiang, Q., Bi, P., Yue, F., Yang, G., Wang, Y., Liu, X., & Kuang, S. (2016). Lkb1 controls brown adipose tissue growth and thermogenesis by regulating the intracellular localization of CRTC3. *Nature Communications*, 7, 12205. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS12205>

Shao, M., Hepler, C., Vishvanath, L., MacPherson, K. A., Busbuso, N. C., & Gupta, R. K. (2017). Fetal development of subcutaneous white adipose tissue is dependent on Zfp423. *Molecular Metabolism*, 6(1), 111–124. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2016.11.009>

Shi, F., & Collins, S. (2017). Second messenger signaling mechanisms of the brown adipocyte thermogenic program: an integrative perspective. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 31(2). <https://doi.org/10.1515/HMBCI-2017-0062>

Shuster, A., Patlas, M., Pinthus, J. H., & Mourtzakis, M. (2012). The clinical importance of visceral adiposity: A critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. *British Journal of Radiology*, 85(1009), 1–10. <https://doi.org/10.1259/BJR/38447238>

Silos-Santiago, I., Fagan, A. M., Garber, M., Fritsch, B., & Barbacid, M. (1997). Severe Sensory Deficits but Normal CNS Development in Newborn Mice Lacking TrkB and TrkC Tyrosine Protein Kinase Receptors. *European Journal of Neuroscience*, 9(10), 2045–2056. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.1997.TB01372.X>

Skaper, S. D. (2018). Neurotrophic factors: An overview. *Methods in Molecular Biology*, 1727, 1–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6_1

Smith, S. R., Lovejoy, J. C., Greenway, F., Ryan, D., deJonge, L., Bretonne, J. de la, Volafova, J., & Bray, G. A. (2001). Contributions of total body fat, abdominal subcutaneous adipose tissue compartments, and visceral adipose tissue to the metabolic complications of obesity. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 50(4), 425–435. <https://doi.org/10.1053/META.2001.21693>

Snijder, M. B., Dekker, J. M., Visser, M., Bouter, L. M., Stehouwer, C. D. A., Yudkin, J. S., Heine, R. J., Nijpels, G., & Seidell, J. C. (2004). Trunk Fat and Leg Fat Have Independent and Opposite Associations With Fasting and Postload Glucose Levels. *Diabetes Care*, 27(2), 372–377. <https://doi.org/10.2337/DIACARE.27.2.372>

Soloveva, V., Graves, R. A., Rasenick, M. M., Spiegelman, B. M., & Ross, S. R. (1997). Transgenic Mice Overexpressing the β 1-Adrenergic Receptor in Adipose Tissue Are Resistant to Obesity. *Molecular Endocrinology*, 11(1), 27–38. <https://doi.org/10.1210/MEND.11.1.9870>

Song, M. J., Kim, K. H., Yoon, J. M., & Kim, J. B. (2006). Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346(3), 739–745. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2006.05.170>

Sornelli, F., Fiore, M., Chaldakov, G. N., & Aloe, L. (2007). Brain-derived neurotrophic factor: a new adipokine. *Biomedical Reviews*, 18, 85–88. <https://doi.org/10.14748/BMR.V18.72>

Sornelli, F., Fiore, M., Chaldakov, G. N., & Aloe, L. (2009). Adipose tissue-derived nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor: results from experimental stress and diabetes. *General Physiology and Biophysics*, 28 Spec No, 179–183.

Sposato, V., Manni, L., Chaldakov, G. N., & Aloe, L. (2007). Streptozotocin-induced diabetes is associated with changes in NGF levels in pancreas and brain. *Archives Italiennes de Biologie*, 145(2), 87–97. <https://doi.org/10.4449/AIB.V145I2.867>

Stanford, K. I., Middelbeek, R. J. W., Townsend, K. L., An, D., Nygaard, E. B., Hitchcox, K. M., Markan, K. R., Nakano, K., Hirshman, M. F., Tseng, Y.-H., & Goodyear, L. J. (2013). Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(1), 215–223. <https://doi.org/10.1172/JCI62308>

Steiner, D. F., Tager, H. S., Chan, S. J., Nanjo, K., Sanke, T., & Rubenstein, A. H. (1990). Lessons Learned From Molecular Biology of Insulin-Gene Mutations. *Diabetes Care*, 13(6), 600–609. <https://doi.org/10.2337/DIACARE.13.6.600>

Stephens, M., Ludgate, M., & Rees, D. A. (2011). Brown fat and obesity: the next big thing? *Clinical Endocrinology*, 74(6), 661–670. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2265.2011.04018.X>

Stern, J., Johnson, P. R., Greenwood, M. R. C., Zucker, L. M., & Hirsch, J. (1972). Insulin Resistance and Pancreatic Insulin Release in the Genetically Obese Zucker Rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine, 139(1), 66–69. <https://doi.org/10.3181/00379727-139-36078>

Strissel, K. J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J. W., DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A. S., & Obin, M. S. (2007). Adipocyte Death, Adipose Tissue Remodeling, and Obesity Complications. *Diabetes*, 56(12), 2910–2918. <https://doi.org/10.2337/DB07-0767>

Su, Y. W., Chung, R., Ruan, C. S., Chim, S. M., Kuek, V., Dwivedi, P. P., Hassanshahi, M., Chen, K. M., Xie, Y., Chen, L., Foster, B. K., Rosen, V., Zhou, X. F., Xu, J., & Xian, C. J. (2016). Neurotrophin-3 Induces BMP-2 and VEGF Activities and Promotes the Bony Repair of Injured Growth Plate Cartilage and Bone in Rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, 31(6), 1258–1274. <https://doi.org/10.1002/JBMR.2786>

Sundström, J., Vallhagen, E., Risérus, U., Byberg, L., Zethelius, B., Berne, C., Lind, L., & Ingelsson, E. (2006). Risk Associated With the Metabolic Syndrome Versus the Sum of Its Individual Components. *Diabetes Care*, 29(7), 1673–1674. <https://doi.org/10.2337/DC06-0664>

Susulic, V. S., Frederich, R. C., Lawitts, J., Tozzo, E., Kahn, B. B., Harper, M.-E., Himms-Hagen, J., Flier, J. S., & Lowell, B. B. (1995). Targeted Disruption of the β 3-Adrenergic Receptor Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 270(49), 29483–29492. <https://doi.org/10.1074/JBC.270.49.29483>

Tang, Q., & Lane, M. D. (2012). Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 715–736. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-052110-115718>

Tapley, P., Lamballe, F., & Barbacid, M. (1992). K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene*, 7(2), 371–381.

Tauris, J., Gustafsen, C., Christensen, E., Jansen, P., Nykjaer, A., Nyengaard, J., Teng, K. K., Schwarz, E., Ovesen, T., P, M., & CM, P. (2011). Proneurotrophin-3 may induce Sortilin-dependent death in inner ear neurons. *The European Journal of Neuroscience*, 33(4), 622–631. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2010.07556.X>

Tavernier, G., Jimenez, M., Giacobino, J.-P., Hulo, N., Lafontan, M., Muzzin, P., & Langin, D. (2005). Norepinephrine Induces Lipolysis in $\beta 1/\beta 2/\beta 3$ -Adrenoceptor Knockout Mice. *Molecular Pharmacology*, 68(3), 793–799. <https://doi.org/10.1124/MOL.105.014670>

Tchkonia, T., Tchoukalova, Y. D., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Karagiannides, I., Forse, R. A., Koo, A., Stevenson, M., Chinnappan, D., Cartwright, A., Jensen, M. D., & Kirkland, J. L. (2005). Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 288(1), 267–277. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00265.2004>

Tchoukalova, Y. D., Votruba, S. B., Tchkonia, T., Giorgadze, N., Kirkland, J. L., & Jensen, M. D. (2010). Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(42), 18226–18231. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1005259107>

Tessarollo, L., Tsoulfas, P., Donovan, M. J., Palko, M. E., Blair-Flynn, J., Hempstead, B. L., & Parada, L. F. (1997). Targeted deletion of all isoforms of the *trkC* gene suggests the use of alternate receptors by its ligand neurotrophin-3 in neuronal development and implicates *trkC* in normal cardiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), 14776–14781. <https://doi.org/10.1073/PNAS.94.26.14776>

Tessarollo, L., Tsoulfas, P., Martin-Zanca, D., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., & Parada, L. F. (1993). *trkC*, a receptor for neurotrophin-3, is widely expressed in the developing nervous system and in non-neuronal tissues. *Development (Cambridge, England)*, 118(2), 463–475.

Tessarollo, L., Vogel, K. S., Palko, M. E., Reid, S. W., & Parada, L. F. (1994). Targeted mutation in the neurotrophin-3 gene results in loss of muscle sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(25), 11844–11848. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.25.11844>

Thoenen, H. (1991). The changing scene of neurotrophic factors. *Trends in Neurosciences*, 14(5), 165–170. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(91\)90097-E](https://doi.org/10.1016/0166-2236(91)90097-E)

Tonello, C., Giordano, A., Cozzi, V., Cinti, S., Stock, M. J., Carruba, M. O., & Nisoli, E. (1999). Role of sympathetic activity in controlling the expression of vascular endothelial growth factor in brown fat cells of lean and genetically obese rats. *FEBS Letters*, 442(2–3), 167–172. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01627-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01627-5)

Tontonoz, P., Hu, E., & Spiegelman, B. M. (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR $\gamma 2$, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 79(7), 1147–1156. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90006-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90006-X)

Trayhurn, P. (2013). Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity. *Physiological Reviews*, 93(1), 1–21. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00017.2012>

Trayhurn, P., & Beattie, J. H. (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60(3), 329–339. <https://doi.org/10.1079/PNS200194>

Trayhurn, P., Hoggard, N., Mercer, J., & Rayner, D. (1999). Leptin: fundamental aspects. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 23(Suppl 1), 22–28. <https://doi.org/10.1038/SJ.IJO.0800791>

Truzzi, F., Marconi, A., Lotti, R., Dallaglio, K., French, L., Hempstead, B., & Pincelli, C. (2008). Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *The Journal of Investigative Dermatology*, 128(8), 2031–2040. <https://doi.org/10.1038/JID.2008.21>

Tsoufas, P., Soppet, D., Escandon, E., Tessarollo, L., Mendoza-Ramirez, J., Rosenthal, A., Nikolics, K., & Parada, L. (1993). The rat trkC locus encodes multiple neurogenic receptors that exhibit differential response to neurotrophin-3 in PC12 cells. *Neuron*, 10(5), 975–990. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90212-A](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90212-A)

Ueta, C. B., Fernandes, G. W., Capelo, L. P., Fonseca, T. L., Maculan, F. D., Gouveia, C. H., Brum, P. C., Christoffolete, M. A., Aoki, M. S., Lancellotti, C. L., Kim, B., Bianco, A. C., & Ribeiro, M. O. (2012). $\beta(1)$ Adrenergic receptor is key to cold- and diet-induced thermogenesis in mice. *The Journal of Endocrinology*, 214(3), 359–365. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0155>

Unger, T. J., Calderon, G. A., Bradley, L. C., Sena-Esteves, M., & Rios, M. (2007). Selective Deletion of Bdnf in the Ventromedial and Dorsomedial Hypothalamus of Adult Mice Results in Hyperphagic Behavior and Obesity. *Journal of Neuroscience*, 27(52), 14265–14274. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3308-07.2007>

Vega, J. A., García-Suárez, O., Hannestad, J., Pérez-Pérez, M., & Germanà, A. (2003). Neurotrophins and the immune system. *Journal of Anatomy*, 203(1), 1–19. <https://doi.org/10.1046/J.1469-7580.2003.00203.X>

Verboven, K., Wouters, K., Gaens, K., Hansen, D., Bijnen, M., Wetzels, S., Stehouwer, C. D., Goossens, G. H., Schalkwijk, C. G., Blaak, E. E., & Jocken, J. W. (2018). Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese humans. *Scientific Reports*, 8(1), 4677. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-22962-X>

Vickers, S. P., Jackson, H. C., & Cheetham, S. C. (2011). The utility of animal models to evaluate novel anti-obesity agents. *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1248–1262. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2011.01245.X>

Villarroya, J., Cereijo, R., & Villarroya, F. (2013). An endocrine role for brown adipose tissue? *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 305(5), 567–572. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00250.2013>

BIBLIOGRAFÍA

Vitali, A., Murano, I., Zingaretti, M. C., Frontini, A., Ricquier, D., & Cinti, S. (2012). The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *Journal of Lipid Research*, 53(4), 619–629. <https://doi.org/10.1194/JLR.M018846>

Wagner, N., Wagner, K. D., Theres, H., Englert, C., Schedl, A., & Scholz, H. (2005). Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1. *Genes and Development*, 19(21), 2631–2642. <https://doi.org/10.1101/gad.346405>

Wajchenberg, B. L. (2000). Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. *Endocrine Reviews*, 21(6), 697–738. <https://doi.org/10.1210/EDRV.21.6.0415>

Wajchenberg, B. L., Giannella-Neto, D., Silva, M. E. R. da, & Santos, R. F. (2002). Depot-Specific Hormonal Characteristics of Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue and their Relation to the Metabolic Syndrome. *Hormone and Metabolic Research*, 34(11–12), 616–621. <https://doi.org/10.1055/S-2002-38256>

Waldén, T. B., Hansen, I. R., Timmons, J. A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2012). Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, “brite,” and white adipose tissues. *Endocrinology and Metabolism*, 302(1), E19–31. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00249.2011>

Wang, F., Mullican, S. E., DiSpirito, J. R., Peed, L. C., & Lazar, M. A. (2013). Lipoatrophy and severe metabolic disturbance in mice with fat-specific deletion of PPAR γ . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46), 18656–18661. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1314863110>

Wang, G. X., Zhao, X. Y., & Lin, J. D. (2015). The brown fat secretome: metabolic functions beyond thermogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(5), 231–237. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2015.03.002>

Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K., & Scherer, P. E. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature Medicine*, 19(10), 1338–1344. <https://doi.org/10.1038/NM.3324>

Wang, Z., Xuefeng, Y., & Yong, C. (2021). Recruitment of Thermogenic Fat: Trigger of Fat Burning. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 696505. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.696505>

Wikstrom, J. D., Mahdavian, K., Liesa, M., Sereda, S. B., Si, Y., Las, G., Twig, G., Petrovic, N., Zingaretti, C., Graham, A., Cinti, S., Corkey, B. E., Cannon, B., Nedergaard, J., & Shirihai, O. S. (2014). Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure. *The EMBO Journal*, 33(5), 418–436. <https://doi.org/10.1002/EMBJ.201385014>

Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W. D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P., & Spiegelman, B. M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150(2), 366–376. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.05.016>

Wu, Z., Rosen, E. D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A. E., McKeon, C., Darlington, G. J., & Spiegelman, B. M. (1999). Cross-Regulation of C/EBP α and PPAR γ Controls the Transcriptional Pathway of Adipogenesis and Insulin Sensitivity. *Molecular Cell*, 3(2), 151–158. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80306-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80306-8)

Wueest, S., Rapold, R. A., Rytka, J. M., Schoenle, E. J., & Konrad, D. (2009). Basal lipolysis, not the degree of insulin resistance, differentiates large from small isolated adipocytes in high-fat fed mice. *Diabetologia*, 52(3), 541–546. <https://doi.org/10.1007/S00125-008-1223-5>

Xu, B., Goulding, E. H., Zang, K., Cepoi, D., Cone, R. D., Jones, K. R., Tecott, L. H., & Reichardt, L. F. (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nature Neuroscience*, 6(7), 736–742. <https://doi.org/10.1038/nn1073>

Yamanaka, M., Itakura, Y., Inoue, T., Tsuchida, A., Nakagawa, T., Noguchi, H., & Taiji, M. (2006). Protective effect of brain-derived neurotrophic factor on pancreatic islets in obese diabetic mice. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 55(10), 1286–1292. <https://doi.org/10.1016/J.METABOL.2006.04.017>

Yamauchi, J., Chan, J., & Shooter, E. (2004). Neurotrophins regulate Schwann cell migration by activating divergent signaling pathways dependent on Rho GTPases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(23), 8774–8779. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0402795101>

Yang, A., & Mottillo, E. P. (2020). Adipocyte lipolysis: from molecular mechanisms of regulation to disease and therapeutics. *Biochemical Journal*, 477(5), 985–1008. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190468>

Yano, H., Torkin, R., Martin, L. A., Chao, M. V., & Teng, K. K. (2009). Proneurotrophin-3 is a neuronal apoptotic ligand: Evidence for retrograde-directed cell killing. *Journal of Neuroscience*, 29(47), 14790–14802. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2059-09.2009>

Ye, L., Wu, J., Cohen, P., Kazak, L., Khandekar, M. J., Jedrychowski, M. P., Zeng, X., Gygi, S. P., & Spiegelman, B. M. (2013). Fat cells directly sense temperature to activate thermogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(30), 12480–12485. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1310261110>

Yeo, G. S. H., Connie Hung, C.-C., Rochford, J., Keogh, J., Gray, J., Sivaramakrishnan, S., O'Rahilly, S., & Farooqi, I. S. (2004). A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nature Neuroscience*, 7(11), 1187–1189. <https://doi.org/10.1038/nn1336>

Yoneshiro, T., Ogawa, T., Okamoto, N., Matsushita, M., Aita, S., Kameya, T., Kawai, Y., Iwanaga, T., & Saito, M. (2013). Impact of UCP1 and β 3AR gene polymorphisms on age-related changes in brown adipose tissue and adiposity in humans. *International Journal of Obesity*, 37(7), 993–998. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.161>

BIBLIOGRAFÍA

Youn, Y., Feng, J., Tessarollo, L., Ito, K., & Sieber-Blum, M. (2003). Neural crest stem cell and cardiac endothelium defects in the TrkC null mouse. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 24(1), 160–170. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00125-8](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00125-8)

Youngstrom, T. G., & Bartness, T. J. (1998). White adipose tissue sympathetic nervous system denervation increases fat pad mass and fat cell number. *The American Journal of Physiology*, 275(5), R1488-1493. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.1998.275.5.R1488>

Zanin, J., Abercrombie, E., & Friedman, W. (2016). Proneurotrophin-3 promotes cell cycle withdrawal of developing cerebellar granule cell progenitors via the p75 neurotrophin receptor. *ELife*, 5, e16654. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.16654>

Zhang, J., Shi, Q., Yang, P., Xu, X., Chen, X., Qi, C., Zhang, J., Lu, H., Zhao, B., Zheng, P., Zhang, P., & Liu, Y. (2012). Neuroprotection of neurotrophin-3 against focal cerebral ischemia/reperfusion injury is regulated by hypoxia-responsive element in rats. *Neuroscience*, 222, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2012.07.023>

Zhang, M., Hu, T., Zhang, S., & Zhou, L. (2015). Associations of Different Adipose Tissue Depots with Insulin Resistance: A Systematic Review and Meta-analysis of Observational Studies. *Scientific Reports*, 5, 18495. <https://doi.org/10.1038/SREP18495>

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J. M., Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425–432. <https://doi.org/10.1038/372425a0>

Zhou, X., & Rush, R. (1995). Sympathetic neurons in neonatal rats require endogenous neurotrophin-3 for survival. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(10), 6521–6530. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-10-06521.1995>

Zoico, E., Rubele, S., De Caro, A., Nori, N., Mazzali, G., Fantin, F., Rossi, A., & Zamboni, M. (2019). Brown and beige adipose tissue and aging. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 368. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2019.00368/FULL>

Zwick, R. K., Guerrero-Juarez, C. F., Horsley, V., & Plikus, M. V. (2018). Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metabolism*, 27(1), 68–83. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2017.12.002>

ANEXOS

DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIÓN AGRARIA Y GANADERÍA

Ciutat Administrativa 9 d'Octubre
Castán Tobeñas, 77. Edif. B3 P2 46018 VALENCIA

AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2014/VSC/PEA/00117

Vista la solicitud realizada en fecha 25 de julio de 2014 con nº reg. entrada 14906 por D^a. Pilar Campíns Falcó Vicerrectora de Investigación y Política Científica de la Universidad de Valencia, centro usuario **ES460780001001**, para realizar el procedimiento:

“Neurotrofina-3, nueva diana terapéutica en patología cardiovascular”

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Sanidad y Bienestar Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2014/VSC/PEA/00117 tipo 2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universidad de Valencia-Estudio General**

Responsable del proyecto: **Pilar D'Ocon Navaza**

Establecimiento: **Sección de producción animal SCSIE (Campus de Burjassot)**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, 6 de agosto de 2014

El director general de Producción Agraria y Ganadería

José Miguel Ferrer Arranz



D. Fernando A. Verdú Pascual, Profesor Titular de Medicina Legal y Forense, y Secretario del Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que el Comité Ético de Investigación en Humanos, en la reunión celebrada el día 14 de mayo de 2014, una vez estudiado el proyecto de investigación titulado:

“Neurotrofina-3, nueva diana terapéutica en patología cardiovascular”, número de procedimiento H1396873322007, cuya investigadora responsable es Dña. Pilar d'Ocón Navaza, ha acordado informar favorablemente el mismo dado que se respetan los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a veintisiete de mayo de dos mil catorce.

FERNANDO ALEJO|VERDU|
PASCUAL

2014.05.27 09:40:55

+02'00'

