

POSIBLE ROL DE LAS NEUREGULINAS EN LA  
FISIOLOGÍA DEL TEJIDO ADIPOSOS EN  
ASOCIACIÓN CON OBESIDAD Y DIABETES  
MELLITUS TIPO 2

**Cristina Martinez**

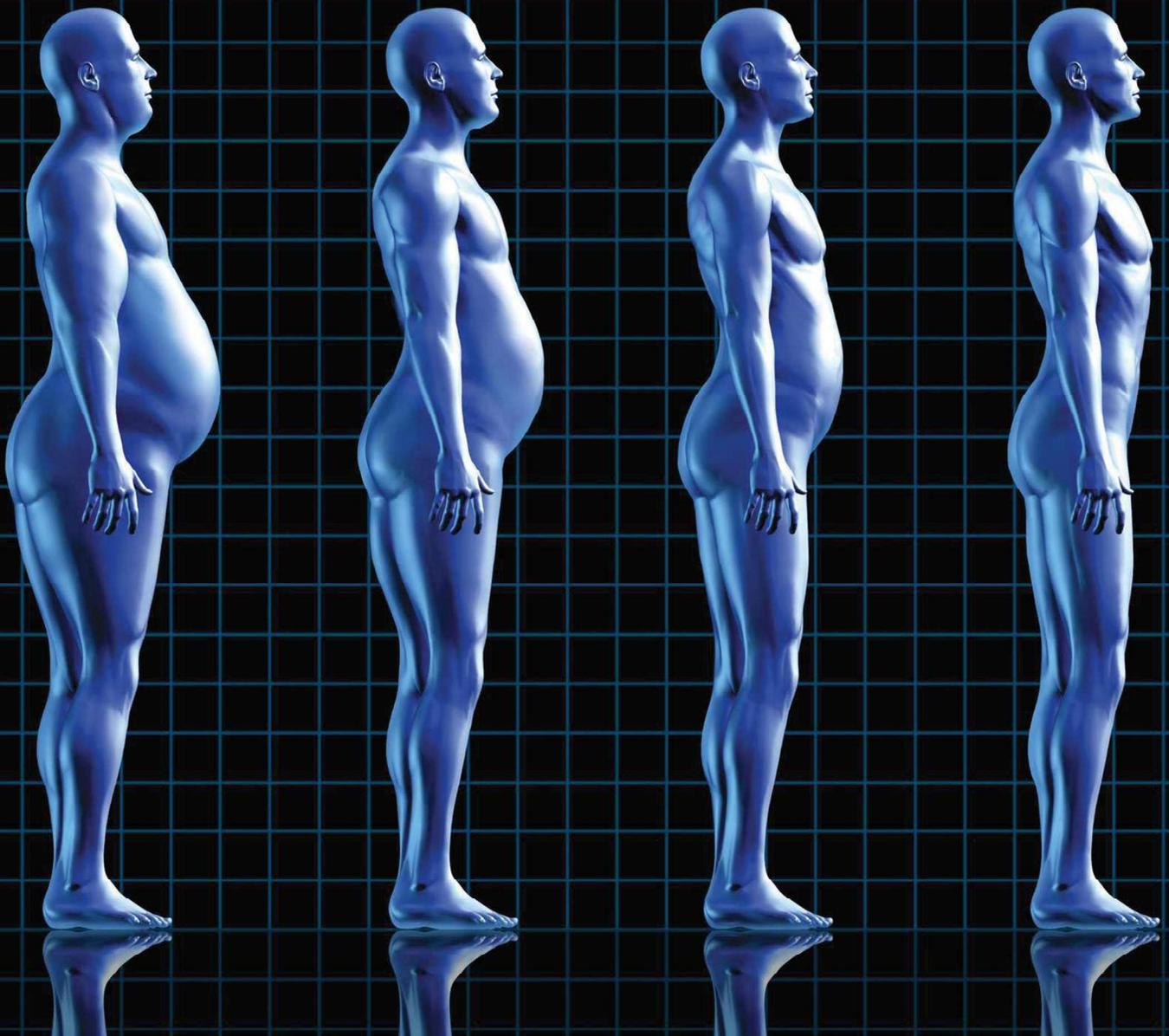


<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ca>

Aquesta obra està subjecta a una llicència Creative Commons Reconeixement

Esta obra está bajo una licencia Creative Commons Reconocimiento

This work is licensed under a Creative Commons Attribution licence



POSIBLE ROL DE LAS NEUREGULINAS  
EN LA FISIOLÓGÍA DEL TEJIDO ADIPOSO  
EN ASOCIACIÓN CON OBESIDAD Y  
DIABETES MELLITUS TIPO 2

Cristina Martinez

2023



**TESIS DOCTORAL**

**POSIBLE ROL DE LAS NEUREGULINAS EN LA FISIOLÓGÍA  
DEL TEJIDO ADIPOSEO EN ASOCIACIÓN CON OBESIDAD Y  
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

**Cristina Martinez**

**2023**





## TESIS DOCTORAL

Posible rol de las neuregulinas en la fisiología del tejido adiposo en asociación con obesidad y diabetes mellitus tipo 2

**Cristina Martinez**

2023

Programa de Doctorado en Biología Molecular, Biomedicina y Salud

**Director**

Jose Maria Moreno Navarrete, Ph. D

**Tutor y Co-director:**

Prof. José Manuel Fernández-Real Lemos, Ph. D, M.D.

**Co-director**

Wifredo Ricart Engel, Ph. D, M.D.

Memoria presentada para optar al título de doctora por la Universidad de Girona

Tesis doctoral presentada por compendio de artículos





**Dr José María Moreno Navarrete**, investigador del Institut de Recerca Biomèdica de Girona (IDIBGI), de la Unitat de Endocrinologia y Nutrición (UDEN) e investigador CIBER de la Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN, ISCIII).

**Prof. José Manuel Fernández-Real Lemos**, jefe de grupo en el Institut de Recerca Biomèdica de Girona (IdiBGi), de la Unitat de Endocrinologia y Nutrición (UDEN), investigador líder del CIBER de la Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN, ISCIII), y profesor de Medicina en la Universidad de Girona (UdG)

**Dr. Wifredo Ricart**, jefe de la Unitat de Endocrinologia y Nutrición (UDEN), investigador en el Institut de Recerca Biomèdica de Girona (IdiBGi) y profesor de Medicina en la Universidad de Girona (UdG). Actualmente jubilado.

Certifican:

Que el presente trabajo, titulado “Posible rol de neuregulina en la fisiología del tejido adiposo en asociación con obesidad y diabetes mellitus tipo 2”, que presenta **Cristina Martínez** para la obtención del título de doctora, ha sido realizado bajo nuestra dirección y cumple los requisitos para poder optar a este título.

Dr. José María Moreno Navarrete

Dr. José-Manuel Fernández-Real Lemos

Dr. Wifredo Ricart Engel

Girona, 2023



A mi pequeña gran familia



## LISTA DE PUBLICACIONES CIENTIFICAS

1. Ferran Comas\*, Cristina Martínez\*, Mònica Sabater, Francisco Ortega, Jessica Latorre, Francisco Díaz-Sáez, Julian Aragonés, Marta Camps ,Anna Gumà, Wifredo Ricart, José Manuel Fernández-Real and José María Moreno-Navarrete **Neuregulin 4 Is a Novel Marker of Beige Adipocyte Precursor Cells in Human Adipose Tissue** *Frontiers in Physiology* doi: 10.3389/fphys.2019.00039 .

Publicado: 31 enero 2019

\*These authors have contributed equally to this work and share first authorship.

*FACTOR DE IMPACTO: 4.75 (Q1, Physiology)*

2. Cristina Martínez\*, Jessica Latorre\*, María Arnoriaga-Rodríguez, Aina Lluch, Núria Oliveras-Cañellas, Francisco Díaz-Sáez, Julian Aragonés, Marta Camps, Anna Gumà, Wifredo Ricart, José Manuel Fernández-Real, José María Moreno-Navarrete. **Neuregulin 4 impacts on insulin sensitivity in humans and impairs mitochondrial respiration in HepG2 cells.** *Front. Physiol.* 13:950791.doi: 10.3389/fphys.2022.950791

Publicado: 15 septiembre 2022

\*These authors have contributed equally to this work and share first authorship.

*FACTOR DE IMPACTO: 4.75 (Q1, Physiology)*

3. Jessica Latorre \*; Cristina Martinez \*; Francisco Ortega; Núria Oliveras-Cañellas; Francisco Díaz-Sáez, Julian Aragonés, Marta Camps, Anna Gumà, Wifredo Ricart, José Manuel Fernández-Real, José María Moreno-Navarrete. **The relevance of EGFR, ErbB receptors and neuregulins in human adipocytes and adipose tissue in obesity** *Biomedicine & Pharmacotherapy* Volume 156, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113972>

Publicado: 09 noviembre 2022

\*These authors have contributed equally to this work and share first authorship.

*FACTOR DE IMPACTO: 7.4 (Q1, Experimental Medicine & Phamacology)*



## ABREVIACIONES

AREG:	Anfiregulina
ATP:	Adenosin trifosfato
BTC:	Betacelulina
C/EBP:	Proteínas de unión a potenciadores de CCAAT
CEPT:	Proteína de transferencia a éster a colesterol
CMM:	Células madre mesenquimales
DM1:	Diabetes mellitus tipo 1
DM2:	Diabetes mellitus tipo 2
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR:	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EHNA:	Esteato-hepatitis no alcohólica
EPGN:	Mitógeno epitelial
EREG:	Epiregulina
ERBB:	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
GLUT4	Proteína transportadora de glucosa 4
HBEGF:	Factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina
HDL:	Lipoproteína de alta densidad
IL:	Interleuquina
IMC:	Índice de masa corporal
LDL:	Lipoproteína de baja densidad
mi-RNA:	Micro ARN
MAPK:	Proteína quinasa activada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos

NGF	Factor de crecimiento nervioso
NRG:	Neuregulina
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PAI-1:	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PCR:	Proteína C reactiva
PDK1:	Piruvato deshidrogenasa kinasa 1
PI3K:	Fosfatidilinositol 3 quinasa
PKB:	Protein quinasa B
PKCzeta:	Protein quinasa C zeta
PPAR:	Receptores activados por proliferadores peroxisomales
RBP4:	Proteína de union a retinol 4
RTK:	Receptores tirosín quinasa
SM:	Síndrome metabólico
SNS	Sistema nervioso sistémico
SREBP-2:	Proteína 2 de unión a elementos reguladores de esteroles
TA:	Tejido adiposo
TAB:	Tejido adiposo blanco
TAM:	Tejido adiposo marron
TGFB:	Factor de crecimiento transformante beta
TNFa:	Factor de necrosis tumoral a
UCP:	Proteína desacoplante
VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular
VLDL:	Lipoproteína de muy baja densidad
WT:	Wild type

## INDICE

LISTA DE PUBLICACIONES

ABREVIACIONES

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

SUMMARY 1

RESUMEN 3

RESUM 5

INTRODUCCION 7

1 OBESIDAD 8

1.1 ENFOQUE GLOBAL DE LA OBESIDAD 8

1.2 DEFINICION DE OBESIDAD 10

1.3 ETIOPATOGENIA DE LA OBESIDAD 11

1.4 COMORBILIDADES ASOCIADAS A LA OBESIDAD 12

1.4.1 SINDROME METABOLICO 13

1.4.2 DIABETES MELLITUS 2 13

1.4.3 RESISTENCIA A LA INSULINA 14

2 TEJIDO ADIPOSO 16

2.1 DEFINICION DE TEJIDO ADIPOSO 16

2.2 COMPOSICION DEL TEJIDO ADIPOSO 19

2.3 TEJIDO ADIPOSO BLANCO 20

2.4 TEJIDO ADIPOSO MARRON 24

2.5 TEJIDO ADIPOSO BEIGE 25

2.6 DIFERENCIACION ADIPOCITARIA O ADIPOGÉNESIS 26

2.7 TEJIDO ADIPOSO Y OBESIDAD: EL PAPEL DE LAS CITOQUINAS 30

3 RESISTENCIA A LA INSULINA 32

4 RECEPTORES HER/ERBB 36

4.1 ESTRUCTURA Y ACTIVACION 37

4.2 LIGANDOS DE LOS RECEPTORES HER/ErbB 38

4.3 SEÑALIZACION HER/ErbB 38

4.4 ERBB2, EGFR Y ADIPOGENESIS 39

5 NEUREGULINAS 40

5.1 ESTUDIOS PREVIOS CON NEUREGULINAS 43

5.1.1 EXPERIMENTOS IN VITRO 43

5.1.2 EXPERIMENTOS NRG CIRCULANTE 47

6 CONSIDERACIONES ÉTICAS 48

HIPOTESIS Y OBJETIVOS	50
7 HIPOTESIS	52
8 OBJETIVOS	52
PUBLICACIONES	54
9 PUBLICACION 1	56
10 PUBLICACION 2	70
11 PUBLICACION 3	82
DISCUSION GENERAL	102
CONCLUSIONES	118
BIBLIOGRAFIA	122

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Datos sobre la obesidad a nivel mundial según la OMS .....	8
Figura 2. Factores asociados a la obesidad.....	9
Figura 3. Mecanismos de la expansión del TA.....	12
Figura 4. Principales diferencias entre grasa blanca y parda.....	17
Figura 5. Diferenciación de la célula madre mesenquimal a diferentes tipos celulares.....	18
Figura 6. Distribución de TAB y TAM en el cuerpo humano.....	19
Figura 7. Tejido adiposo marron teñido con tricómico de Masson .....	20
Figura 8. Imagen adipocito blanco .....	20
Figura 9. Procesos fisiológicos y metabólicos regulados por el TAB .....	23
Figura 10. Imagen adipocitos marrones.....	24
Figura 11. Tipos de adipocitos .....	26
Figura 12. Diferenciación de CMM hacia todos los posibles tipos celulares especializados .....	27
Figura 13. Diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos .....	29
Figura 14. Vía de señalización de la insulina .....	33
Figura 15. Tejido adiposo blanco e inflamación .....	36
Figura 16. Representación esquemática de los receptores ErbBs.....	37
Figura 17. Esquema de las principales vías de señalización y efectos biológicos .....	39
Figura 18. Estructura de las diferentes neuregulinas.....	42
Figura 19. Acciones protectoras de las neuregulinas sobre diferentes tejidos.....	46
Figure 20. Efectos de la secreción de neuregulina 4 (NRG4) de adipocitos marrones y blancos en tejidos diana.....	47



## LISTA DE TABLAS

Table 1. Clasificación de la obesidad según la OMS.....	11
Table 2. Adipocinas secretadas por TAB y función fisiológica.....	23



## SUMMARY

Different studies link the metabolic alterations of obesity with imbalances in neuregulin 4 levels. In this study we hypothesize that signaling of neuregulin isoforms (NRG) produced through ERBB receptors in human adipose tissue could impact on adipose tissue physiology and insulin sensitivity in obese patients. To test this hypothesis, we aimed to investigate the possible relationship between neuregulins and ERBB receptors in adipose tissue and circulating NRG4 with obesity and insulin sensitivity in humans. The results obtained indicated that *NRG4* mRNA was significantly elevated in visceral adipose tissue (VAT) compared to subcutaneous (SAT), positively correlated with BMI and thermogenic markers and negatively correlated with adipogenic and inflammatory genes. In SAT, NRG4 was negatively correlated with insulin resistance and positively correlated with the gene expression of *UCP1*, *UCP3* and *TMEM26*, which are browning markers of white adipose tissue. Serum NRG4 levels were positively correlated with insulin resistance and inflammatory markers. In vitro experiments in HepG2 demonstrated that the administration of recombinant human NRG1 and NRG4 reduced mitochondrial respiration and the expression of genes related to gluconeogenesis and mitochondrial biogenesis. Next, we analyzed the association between other neuregulins and ERBB receptors, and we observed a significant increase in the expression of *ERBB2* and *ERBB4* in obesity and an association of *EGFR* and *NRG2* with adipogenic genes regardless of obesity. Indeed, EGFR silencing in human adipocytes negatively impact adipogenesis, while NRG2 overexpression increases the expression of some adipogenic genes.

Taken together, the findings obtained indicated that NRG4 in humans could be a marker of beige adipocytes in adipose tissue, while circulating levels would be associated with insulin resistance possibly through impaired mitochondrial function. In this study, we also observed the importance of EGFR and ERBB2 in the physiology of human adipose tissue, confirming the adipogenic role of EGFR and suggesting NRG2 as a possible endogenous EGFR ligand with a hypothesized role in human adipogenesis. Current data suggest that EGFR induction in human adipose tissue could ameliorate obesity-associated adipose tissue dysfunction, while ERBB2 inhibition could exert anti-obesity effects.



## RESUMEN

Diferentes estudios vinculan las alteraciones metabólicas de la obesidad con desbalances en los niveles de neuregulina 4. En este estudio hipotetizamos que la señalización de las isoformas de neuregulina (NRG) producida a través de receptores ERBB en tejido adiposo humano podría impactar en su fisiología y en la sensibilidad a la insulina en pacientes obesos. Para probar esta hipótesis, hemos planteado investigar la posible relación entre las neuregulinas y los receptores ERBB en tejido adiposo y la NRG4 circulante con la obesidad y sensibilidad a la insulina en humanos. Los resultados obtenidos indicaron que *NRG4* ARNm estaba significativamente elevada en tejido adiposo visceral (VAT) comparado con subcutáneo (SAT), se correlacionó positivamente con el IMC y marcadores termogénicos y negativamente con genes adipogénicos e inflamatorios. En SAT, *NRG4* se correlacionó negativamente con resistencia a la insulina y positivamente con la expresión génica de *UCP1*, *UCP3* y *TMEM26* que son marcadores de “browning” del tejido adiposo blanco. Los niveles de *NRG4* sérica se correlacionaban positivamente con resistencia a la insulina y marcadores inflamatorios. Experimentos in vitro en HepG2 demostraron que la administración de *NRG1* y *NRG4* humana recombinante reducía la respiración mitocondrial y la expresión de genes relacionados con la gluconeogénesis y la biogénesis mitocondrial. Cuando analizamos la asociación entre otras neuregulinas y los receptores ERBB, observamos un incremento significativo en la expresión de *ERBB2* y *ERBB4* en obesidad y una asociación de *EGFR* y *NRG2* con genes adipogénicos independientemente de la obesidad. De hecho, el silenciamiento de *EGFR* en adipocitos humanos impacta negativamente en la adipogénesis, mientras que la sobreexpresión de *NRG2* incrementa la expresión de algunos genes adipogénicos.

En conjunto, los hallazgos obtenidos indicaron que en humanos *NRG4* podría ser un marcador de adipocitos beige en tejido adiposo, mientras que los niveles circulantes se asociarían a resistencia a la insulina posiblemente a través del deterioro de la función mitocondrial. En este estudio también observamos la importancia de *EGFR* y *ERBB2* en la fisiología del tejido adiposo humano, confirmando el papel adipogénico de *EGFR* y sugiriendo la *NRG2* como un posible ligando *EGFR* endógeno con un papel hipotético en la adipogénesis humana. Los datos actuales sugieren que la inducción de *EGFR* en el tejido adiposo humano podría mejorar la disfunción del tejido adiposo asociada a la obesidad, mientras que la inhibición de *ERBB2* podría ejercer efectos contra la obesidad.



## RESUM

Diferents estudis vinculen les alteracions metabòliques de l'obesitat amb desequilibris en els nivells de neuregulina 4. En aquest estudi hipotetitzem que la senyalització de les isoformes de neuregulina (NRG) produïda a través de receptors ERBB en teixit adipós humà, podria impactar en la seva fisiologia i en sensibilitat a la insulina en pacients obesos. Per provar aquesta hipòtesi, hem plantejat investigar la possible relació entre les neuregulines i els receptors ERBB en teixit adipós i la NRG4 circulant amb l'obesitat i la sensibilitat a la insulina en humans. Els resultats obtinguts van indicar que NRG4 estava significativament elevada en teixit adipós visceral (VAT) comparat amb subcutani (SAT), es va correlacionar positivament amb l'IMC i marcadors termogènics i negativament amb gens adipogènics i inflamatoris. A SAT, NRG4 es va correlacionar negativament amb resistència a la insulina i positivament amb l'expressió gènica d'*UCP1*, *UCP3* i *TMEM26* que són marcadors de "browning" del teixit adipós blanc. Els nivells de NRG4 sèrica es correlacionaven positivament amb resistència a la insulina i marcadors inflamatoris. Experiments in vitro a HepG2 van demostrar que l'administració de NRG1 i NRG4 humana recombinant redueix la respiració mitocondrial i l'expressió de gens relacionats amb la gluconeogènesi i la biogènesi mitocondrial. Quan analitzem l'associació entre altres neuregulines i els receptors ERBB, observem un increment significatiu en l'expressió d'*ERBB2* i *ERBB4* en obesitat i una associació d'*EGFR* i *NRG2* amb gens adipogènics independentment de l'obesitat. De fet, el silenciament d'*EGFR* en adipòcits humans impacta negativament en l'adipogènesi, mentre que la sobreexpressió de *NRG2* incrementa l'expressió d'alguns gens adipogènics.

En conjunt, les troballes obtingudes van indicar que en humans, NRG4 podria ser un marcador d'adipòcits beige en teixit adipós, mentre que els nivells circulants s'associarien a resistència a la insulina possiblement a través del deteriorament de la funció mitocondrial. En aquest estudi també observem la importància d'*EGFR* i *ERBB2* en la fisiologia del teixit adipós humà, confirmant el paper adipogènic d'*EGFR* i suggerint la *NRG2* com un possible lligant *EGFR* endogen amb un paper hipotètic en l'adipogènesi humana. Les dades actuals suggereixen que la inducció d'*EGFR* al teixit adipós humà podria millorar la disfunció del teixit adipós associada a l'obesitat, mentre que la inhibició d'*ERBB2* podria exercir efectes contra l'obesitat.



# **INTRODUCCIÓN**





# 1. OBESIDAD

## 1.1. Enfoque global de la obesidad

La obesidad es un problema de salud pública creciente en todo el mundo, una enfermedad epidémica del siglo XXI en los países desarrollados (Figura 1). Se estima que alrededor de 1500 millones de adultos en el mundo padecen sobrepeso y entre estos, 200 millones de hombres y 300 millones de mujeres tienen obesidad. La prevalencia de padecer obesidad es mayor en las mujeres y aumenta con la edad y destacar que en ciertos países, la tasa de obesidad ha superado el 50% de la población (en Qatar, Tonga, Kuwait, Kiribati, Micronesia, Libia y Samoa).

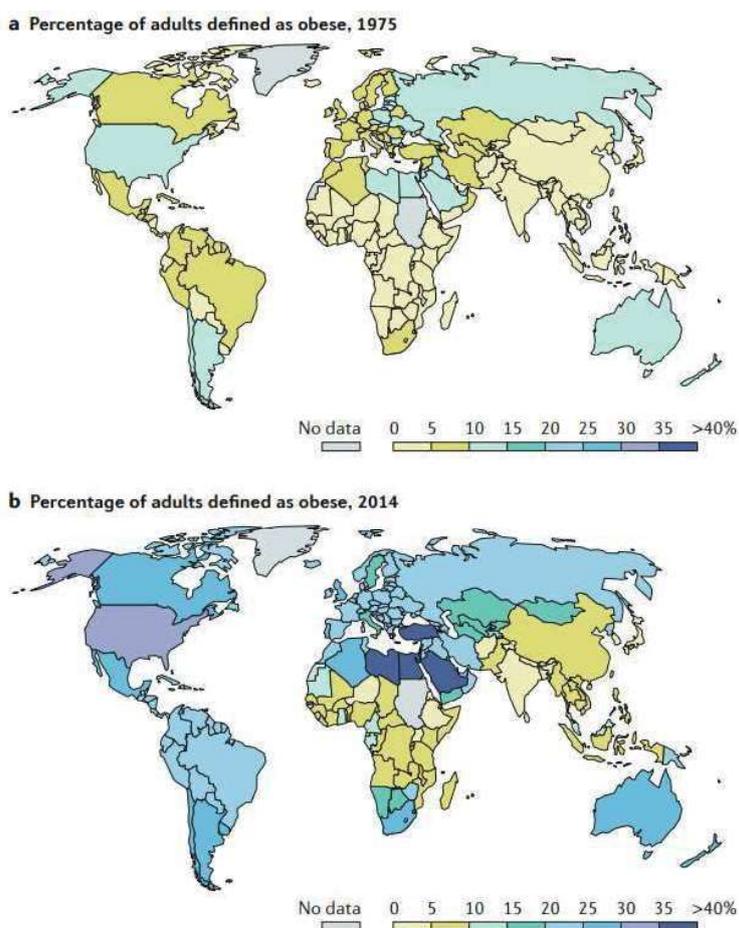


Figura 1: Datos sobre la obesidad a nivel mundial según la O.M.S.. Representa la prevalencia de obesidad en los diferentes países del mundo según una escala de colores. Porcentaje de adultos definidos como obesos por país en 1975 (parte a) y 2014 (parte b). El número de adultos con obesidad aumentó sustancialmente entre 1975 y 2014

Los datos más preocupantes los encontramos en la población más joven, ya que desde 1980 está aumentando la tasa de sobrepeso y obesidad en niños y adolescentes; en países desarrollados alrededor del 25% y en países en vías de desarrollo alrededor del 13%<sup>1</sup>. Un exceso de ingesta energética<sup>2</sup>, baja actividad física<sup>3</sup>, aumento del tiempo frente a la pantalla<sup>4</sup> y otros factores contribuyen a esta gran problemática (Figura 2)

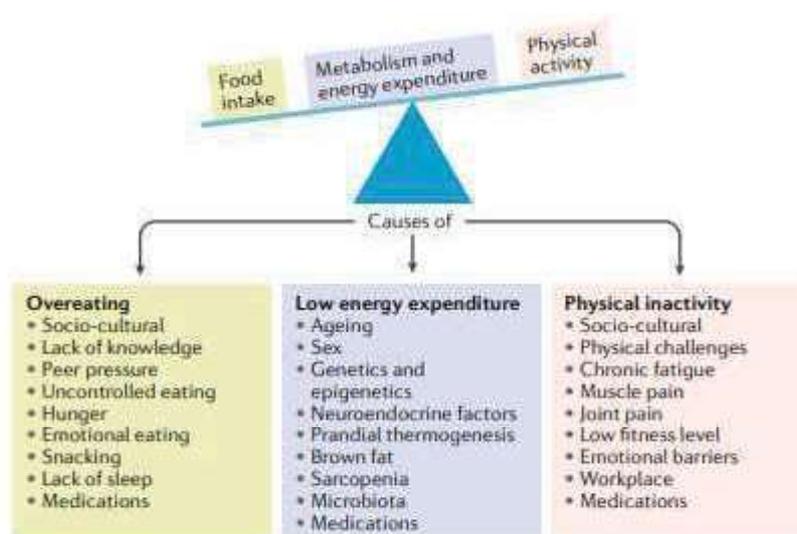


Figura 2: Factores que pueden influir en el balance energético positivo crónico, por lo tanto, causando posteriormente la obesidad. El aumento de peso puede resultar de una combinación de mayor ingesta de energía, baja actividad física y reducción del gasto de energía (Sharma, A. M. & Padwal, R. Obesity is a sign - overeating is a symptom: an aetiological framework for the assessment and management of obesity. *Obes. Rev.* 11, 362-370 (2010))

El sobrepeso y la obesidad se padecen cuando existe un exceso de acumulación de grasa que puede acarrear otras enfermedades crónicas que son factores de riesgo para la salud, como son la diabetes, la hipertensión arterial, las enfermedades cardiovasculares, apnea del sueño, el cáncer y en otra esfera se encuentran los trastornos mentales o estados depresivos de diferente magnitud derivados de un elevado peso. Esta relación provoca un aumento en la mortalidad de las personas obesas. Se estimó que la obesidad está asociada con 3,4 millones de muertes.

La obesidad también se asocia con desempleo, desventajas sociales y reducción de la productividad socioeconómica, por lo que cada vez más, va creando carga económica al país. Hasta ahora, las estrategias de prevención y tratamiento de la obesidad, tanto a nivel individual como poblacional, no han tenido éxito a largo plazo. El estilo de vida e intervenciones conductuales destinadas a reducir la ingesta de calorías y aumentar el gasto de energía tienen una eficacia limitada debido a efectos hormonales y metabólicos complejos y persistentes.

Controlar la obesidad es difícil, es complicado conseguir una pérdida de peso y aún más sostenerla en el tiempo. Cuando los cambios en el estilo de vida no consiguen alcanzar el objetivo, se añaden medicamentos, sin embargo, la mayoría de estos medicamentos no han sido aprobados para su uso a largo plazo, suelen provocar la pérdida de un 10% del peso y dejan de producir efecto. Además, la interrupción de estos medicamentos lleva a recuperar el peso en la mayoría de los pacientes, por lo que un cambio en el estilo de vida es imprescindible. Reducir la carga de la obesidad requiere enfoques que combinen intervenciones individuales con cambios en el ambiente y en la sociedad.

## 1.2. Definición de obesidad

La obesidad es una epidemia mundial asociada a un mayor riesgo de diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y varios tipos de cáncer y es el resultado de un balance energético positivo que se produce cuando la ingesta de energía es superior a la que se gasta y provoca una excesiva expansión y disfunción del tejido adiposo blanco<sup>5</sup>.

La disfunción del tejido adiposo asociada a la obesidad se caracteriza por una acumulación y almacenamiento excesivo de carbohidratos y lípidos en el cuerpo (a nivel regional, global o ambos), generando nuevos adipocitos y provocando un aumento de marcadores de senescencia e inflamación celular y es en consecuencia, un contribuyente a la progresión de la resistencia a la insulina y otros trastornos metabólicos asociados con la obesidad como la hiperglucemia y la dislipidemia<sup>6,7,8</sup>

La obesidad se define por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad caracterizada por una acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo perjudicial para la salud y que incluye tanto un exceso de grasa corporal total (que puede ser estimado en adultos mediante el Índice de Masa Corporal (IMC)) (Tabla 1), como una distribución anormal y localizada alrededor de la región abdominal (que puede ser identificada mediante el Índice Cintura - Cadera (ICM)) de la grasa. El primer organismo mundial a considerar la obesidad una enfermedad fue la American Medical Association en 2013.

El IMC, también conocido como Índice de Quetelet (Lambert AJ Quetelet, 1796-1874), es el parámetro antropométrico más ampliamente utilizado para determinar el sobrepeso y la obesidad en población adulta<sup>9</sup>. Estrechamente relacionado con el porcentaje de grasa corporal, se determina mediante la fórmula  $IMC = \text{peso} / (\text{altura})^2$ , donde el peso en kilogramos se divide por el cuadrado de la altura en metros.

La utilización del BMI para clasificar el estado de obesidad se basa en asociaciones epidemiológicas entre este índice y la morbilidad y mortalidad que lleva asociadas <sup>10</sup>

<b>Clasificación</b>	<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Riesgo Asociado a la salud</b>
Normo Peso	18.5 - 24.9	PROMEDIO
Exceso de Peso	≥ 25	LIGERAMENTE AUMENTADO
Sobrepeso o Pre Obeso	25 - 29.9	LIGERAMENTE AUMENTADO
Obesidad Grado I o moderada	30 - 34.9	AUMENTO MODERADO
Obesidad Grado II o severa	35 - 39.9	AUMENTO SEVERO
Obesidad Grado III o mórbida	≥ 40	AUMENTO MUY SEVERO

*Tabla 1. Clasificación de la obesidad según la OMS*

Se acepta como clasificación para el grado de obesidad, ya que la forma de obtenerlo es rápida, sencilla, no invasiva y económica, se relaciona con el porcentaje de grasa corporal y se ha demostrado una estrecha relación con los problemas de salud asociados a la obesidad. Según Picot J y colaboradores, el riesgo de mortalidad global aumenta en un 50% para un IMC de 30 en comparación a un individuo normo peso y se duplica a partir de un IMC de 35, siguiendo a partir de ahí una relación lineal <sup>11</sup>

La OMS define el sobrepeso en adultos con un IMC igual o superior a 25 kg / m<sup>2</sup>, y la obesidad con un IMC igual o superior a 30 kg / m<sup>2</sup> (OMS, 2008).

La obesidad mórbida es el diagnóstico clínico que se aplica a aquellos pacientes que presentan un peso corporal de más de 45 kg por encima de su peso ideal en función de la edad, altura, constitución y sexo, o un valor de IMC igual o mayor a 40 kg / m<sup>2</sup>.

### 1.3. Etiopatogenia de la obesidad

La obesidad es una enfermedad multifactorial y multisistémica caracterizada por el crecimiento anormal y desproporcionado de los depósitos de grasa corporal. En su etiología se mezclan factores, tanto genéticos como ambientales, que condicionan un desequilibrio entre almacenamiento y consumo calórico, favorable al primero. El excedente de calorías ingeridas, en relación a las necesidades, son transformadas y almacenadas en forma de tejido adiposo dando lugar a obesidad, cuando esta acumulación se convierte excesiva y supone un riesgo para la salud (Figura 3).

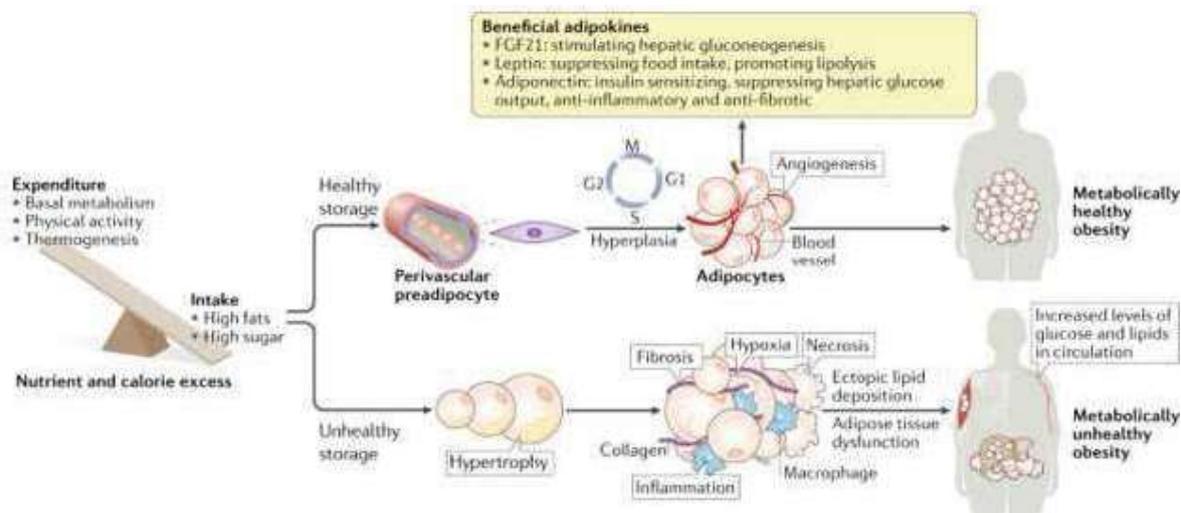


Figura 3: Mecanismos de la expansión del TA

A pesar que la base sea este desbalance energético, la etiopatogenia de la obesidad es mucho más compleja. Existe un gran número de estudios que sugieren que la patogenia de la obesidad va más allá del desbalance energético.

Exceptuando un 1% de los casos en los que la obesidad puede ser explicada por una patología de base (enfermedades endocrinológicas como el síndrome de Cushing, enfermedades neurológicas o alteraciones genéticas como el síndrome De Prader-Willi, o secundaria a fármacos, entre otros), en el 99% de los casos, la obesidad presenta un origen multifactorial entre factores intrínsecos: genéticos, fisiológicos y metabólicos, y factores extrínsecos: patrones culturales y sociales afines a cada individuo

#### 1.4. Comorbilidades asociadas a la obesidad

La obesidad como el sobrepeso están ligadas a enfermedades crónicas, no sólo en relación con las enfermedades cardiovasculares, sino también con otros problemas frecuentes como la dislipidemia<sup>20,21</sup>, hipertensión arterial, insulino-resistencia y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Estos factores están íntimamente asociados al tejido adiposo y a su distribución corporal.

#### 1.4.1 Síndrome Metabólico

El denominado síndrome metabólico (SM) se caracteriza por un conjunto de factores de riesgo para la salud que incluyen una excesiva acumulación de grasa visceral (u obesidad central), desórdenes en las concentraciones de lípidos circulantes, dislipidemia y hipertrigliceridemia que a nivel hepático provoca esteato hepatitis no alcohólica (EHNA), hipertensión arterial<sup>12,13</sup>, resistencia a la insulina, un estado protrombótico crónico (caracterizado por una elevada concentración de fibrinógeno y otros factores plasmáticos de coagulación), un estado inflamatorio sostenido (definido por las altas concentraciones de proteína C-reactiva, IL-6 y TNF-a, entre otras citocinas, no vinculadas a ninguna causa local o inflamación aguda) y el desarrollo de algunos tipos de cáncer como el de colon, mama, páncreas, vesícula biliar o endometrio entre otros<sup>14,15</sup>

El síndrome metabólico lleva el problema de la obesidad a su máximo exponente y la consecuencia previsible es, entre otros, la DM2, graves problemas cardiovasculares y la muerte prematura.

Un aumento en la producción de mediadores pro inflamatorios y moléculas del sistema inmune por parte del tejido adiposo hipertrófico y disfuncional del sujeto obeso parece ser la clave para explicar estas asociaciones <sup>16</sup>

Los pacientes con SM comúnmente tienen una gran acumulación de grasa en el hígado y resistencia a la insulina (IR) hepática. El hígado es responsable de dos de los componentes clave más probablemente relacionados con SM: aumento de glucosa plasmática en ayunas y de VLDL (very low density lipoprotein), lipoproteína de muy baja densidad que transporta triglicéridos a los tejidos <sup>17,18</sup> Además, el hígado graso puede liberar al mismo tiempo muchos otros biomarcadores de riesgo cardiovascular, como la proteína C reactiva (PCR), el fibrinógeno y factores de coagulación <sup>19</sup>, por lo tanto, el hígado es un determinante clave de los trastornos metabólicos que conducen a SM.

#### 1.4.2 Diabetes Mellitus tipo 2

Por otro lado, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), también conocida como diabetes no insulino dependiente, es una enfermedad crónica considerada la pandemia del siglo XXI. Se trata de una patología mucho más común que la de tipo 1, y supone del 80% al 90% de los casos de diabetes. En general, comienza a partir de los 40 años (conocida como la diabetes del adulto)<sup>22</sup> y en la década de los 50 a los 60 se instaura de manera gradual.

Se prevé que estas cifras de prevalencia e incidencia aumenten en los próximos años por circunstancias relacionadas con el progresivo envejecimiento de la población, el incremento de las tasas de obesidad, seguimiento de dietas no saludables, vida sedentaria y la progresiva urbanización e industrialización

La Diabetes tipo 2 se caracteriza por una alteración del metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas, bien por falta de secreción de insulina o por disminución de la sensibilidad tisular a esta hormona. Como consecuencia, los pacientes sufren un estado de hiperglucemia continuo. Este aumento de glucemia produce pérdida de glucosa por la orina (glucosuria), deshidratación y si se trata de una hiperglucemia crónica provoca lesiones tisulares, incrementando el riesgo de infarto de miocardio, ictus, retinopatía y ceguera, así como isquemia y gangrena de las extremidades <sup>23</sup>

Los criterios diagnósticos de esta enfermedad, según la American Diabetes Association (ADA) 2022, son valores de glucosa plasmática en ayunas  $\geq 126$  mg/ml, valores de HbA1c  $\geq 6,5$  %, proteína que refleja las glucemias correspondientes a los 3 meses previos) y/o una glucemia plasmática a las 2 horas del test de sobrecarga oral a la glucosa  $\geq 200$  mg/ml.

La diabetes es la cuarta causa de muerte en la mayoría de los países desarrollados, pero también es una nueva epidemia para los países en vía de desarrollo y aquellas naciones recientemente industrializadas. Los informes de la OMS (Organización Mundial de la Salud) y de la Federación Internacional de la Diabetes revelan un aumento notable del número total de personas que padecen diabetes en todo el mundo en la última década. Mientras la cifra era de 285 millones de personas en 2010, esta alcanzó los 463 millones (o el 8,3 %) en 2019, siendo uno de cada 11 adultos los que padece diabetes en el mundo, cifra que se ha duplicado desde finales del siglo pasado.

#### 1.4.3 Resistencia a la Insulina.

La insulina es una hormona polipeptídica, sintetizada y secretada por las células  $\beta$  pancreáticas localizadas en los islotes de Langerhans que desempeña un papel predominante en el metabolismo de la glucosa. Esta hormona tiene como los principales órganos diana<sup>25</sup>

- El hígado, donde favorece la captación de la glucosa, la síntesis de glucógeno en el periodo postprandial e inhibe la gluconeogénesis.
- El músculo esquelético, tejido que promueve la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno.

- El tejido adiposo donde favorece la captación de la glucosa e inhibe la lipólisis. Además, la insulina potencia la transformación del exceso de glucosa en triacilglicéridos, estimulando la diferenciación de los preadipocitos <sup>12</sup>.

Generalmente, la resistencia a la insulina en la DM2 está asociada a la obesidad (más de un 90% de diabéticos sufren obesidad, sobretodo abdominal), lo que supone un factor de riesgo para la misma<sup>24</sup>. Esta alteración está íntimamente asociada a la pérdida de sensibilidad de muchos tejidos del cuerpo a la acción de esta hormona, o lo que es lo mismo, una falta de respuesta biológica a niveles normales de insulina, sobre todo en los tejidos insulino-dependientes como es el hígado, tejido adiposo y músculo. En sus primeras fases, debido a la falta de efecto de la insulina, el páncreas comienza a producir más insulina para conseguir mantener los niveles de glucosa en sangre estables (hiperinsulinemia compensadora). Esta hiperinsulinemia facilita la ganancia de peso en grasa (lipogénesis), lo que unido al sedentarismo y otros factores acaban provocando unos niveles de glucosa en sangre elevados. Esto probablemente genera una retroalimentación positiva (“círculo vicioso”), ya que al aumentar los niveles de glucosa aumentan los niveles de insulina y esto a su vez aumenta la resistencia a ésta, llevando a un fracaso pancreático, donde las células  $\beta$  comienzan a deteriorarse lo que conlleva una menor capacidad de secreción insulínica <sup>11,12, 25</sup>. La etiología de esta disfunción aún no está establecida, varios estudios consideran que existe un componente genético de carácter poligénico.

Si el exceso de peso (principalmente el que se acumula en la cintura), la falta de ejercicio y la alimentación no se corrigen, la resistencia a la insulina puede ir aumentando hasta producir una Diabetes Mellitus (tipo 2), definida como: valores de glucemia igual o mayores a 126 mg/dL en ayunas (o igual o mayores de 200 mg/dl tras una sobrecarga oral de glucosa, o en cualquier momento en presencia de síntomas); o de hemoglobina glicosilada igual o mayor a 6,5%. No obstante, la falta de ejercicio y la mala alimentación son los responsables de un aumento en la incidencia de enfermedades relacionadas con ésta<sup>25</sup>. La OMS ha calculado que en los últimos dos décadas se ha triplicado el número de personas afectadas por la resistencia a la insulina.

## 2. TEJIDO ADIPOSO

### 2.1 Definición tejido adiposo

El tejido adiposo (TA) es un tejido conjuntivo especializado en el almacenamiento de lípidos. Se puede considerar como un tejido conectivo un tanto atípico puesto que posee muy poca matriz extracelular. Su origen embrionario son las células mesenquimáticas derivadas del mesodermo, las cuales dan también lugar al resto de tejidos conectivos. El tejido adiposo está presente en todos los mamíferos y en algunas especies de animales no mamíferos. Su capacidad para almacenar lípidos depende de sus células, los adipocitos, que pueden contener en su citoplasma grandes gotas de grasa. La grasa es un buen almacén de energía puesto que tiene aproximadamente el doble de densidad calórica que los azúcares o las proteínas. Estos almacenes se emplean para proporcionar moléculas energéticas a otros tejidos o para generar directamente calor. Los adipocitos se agrupan estrechamente y en gran número para formar el tejido adiposo, aunque también se pueden encontrar dispersos en el tejido conectivo laxo.

Otra forma de almacenamiento de energía se realiza en el hígado y músculo en forma de glucógeno. La glucosa es la fuente principal de combustible para nuestras células. Cuando el cuerpo no necesita usar la glucosa para generar energía, la almacena en el hígado y los músculos en forma de glucógeno. La función principal del glucógeno hepático es la de mantener la concentración de glucosa en sangre, por lo que, ante una demanda de glucosa por parte de otros órganos o tejidos, el hígado descompondrá el glucógeno en glucosa para cubrir requerimientos metabólicos. Esta síntesis de glucógeno, en particular el glucógeno hepático, está regulado por mecanismos hormonales; la adrenalina y glucagón estimula la glucogenolisis y la insulina estimula la glucogenogénesis, por lo que la glucemia estará regulada fundamentalmente por el hígado, serán sus reservas y su capacidad de síntesis o hidrolisis los que mantendrán la homeostasis glucémica. Hasta la mitad del siglo XX se pensaba que el tejido adiposo sólo participaba en el almacenaje energético, y por ello no atrajo mayor interés. En la actualidad, se sabe que no sólo almacena energía, sino que también controla el metabolismo corporal a través de la liberación de hormonas, citocinas, proteínas, lípidos específicos y mi-ARNs.

El tejido adiposo se clasifica en diferentes tipos: el formado por grasa blanca (o unilocular), cuyos adipocitos presentan una gran gota de lípidos, y el formado por grasa parda (o multilocular).

El color blanco (a veces amarillento) o pardo se refiere al color de la grasa en su estado fresco. Ambos tipos de grasa tienen características particulares (Figura 4).

Principales diferencias entre grasa blanca y grasa parda

Características	Grasa blanca	Grasa parda
Localización principal	Sucutánea, abdominal, inguinal, perirrenal, retroperitoneal, gonadal, en torno a órganos, otros lugares de modo disperso	Interescapular (bebés), axilar, perineal, paravertebral, cervical, dispersa en arterias y alrededor de órganos
Color	Blanca, amarillenta, marfil	Marrón, rojo variable a rosada
Vascularización	Vascularizada	Muy vascularizada
Inervación	Sistema nervioso simpático y parasimpático (inervación media)	Sistema nervioso simpático (muy inervada)
Organización tisular	Muy empaquetada en lóbulos pequeños	Organización lobular
Adipocito	Esférico, oval, 25 a 200 $\mu\text{m}$ , unilocular con una sola gota de grasa, núcleo aplanado, semilunar y excéntrico, citoplasma muy delgado, mitocondrias escasas, cantidad normal de retículo endoplasmático.	Poligonal, 15-60 $\mu\text{m}$ , multilocular con muchas gotas de grasa, núcleo redondeado a ovalado, citoplasma abundante, abundantes mitocondrias, poco retículo endoplasmático.
Presencia de células inmunes	Abundantes	Escasas

Figura 4. Principales diferencias entre la grasa blanca y la grasa parda (modificado de Fruhbeck et al., 2009).

El origen de los diferentes tipos de adipocitos quizá sea uno de sus aspectos menos conocidos. Aunque los dos tipos de grasa derivan de células madre mesenquimáticas, lo hacen a partir de poblaciones diferentes. De hecho, la grasa parda comparte progenitor con las células musculares, no así la blanca (Figura 5)<sup>118</sup>

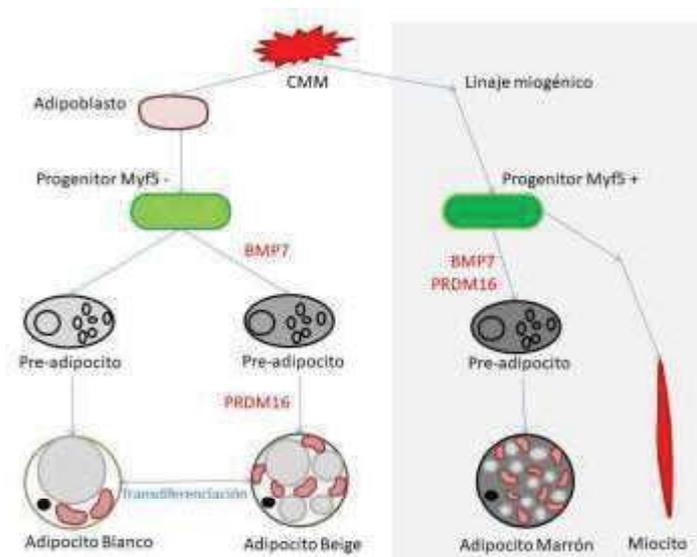


Figura 5. Diferenciación de la célula madre mesenquimal a diferentes tipos celulares. Estudios recientes apoyan la teoría de que no existe un precursor común para los preadipocitos blancos y marrones. Los preadipocitos marrones presentan una « firma miogénica ». Sin embargo, los adipocitos marrones inmersos en masas del TAB parece que provienen de un precursor diferente que los localizados en las masas del TAM. Estos adipocitos inmersos en el TAB con expresión de UCP-1 se han denominado «adipocitos beige» y son especialmente sensibles a la hormona irisina<sup>107</sup>

En la mayoría de las especies, el almacén de lípidos tiene lugar en el tejido adiposo blanco (TAB). En humanos, se encuentra disperso en el organismo. A nivel intraabdominal encontramos los mayores depósitos alrededor del omento (omental), del intestino (mesentérico) y de las áreas perirrenales (retroperitoneal) y a nivel subcutáneo, la grasa se localiza sobretodo a nivel de las nalgas, los muslos y abdomen. Pero además de estos depósitos mayoritarios existen otras áreas en el organismo donde encontramos TAB, distinguiendo depósitos a nivel pericardial, perivascular o periarterial, periarticular, retro-orbital, intramuscular, médula ósea y cara. Actualmente se sabe que las diversas localizaciones del TAB tiene características metabólicas y endocrinas diferentes.

El tejido adiposo marrón (TAM), a diferencia del TAB, sólo lo encontramos en mamíferos. En humanos encontramos TAM en el feto y en el recién nacido localizado a nivel axilar, cervical, perirrenal y periadrenal y en humanos adultos se encuentra principalmente en la región paracervical, supraclavicular y paravertebral (Figura 6)

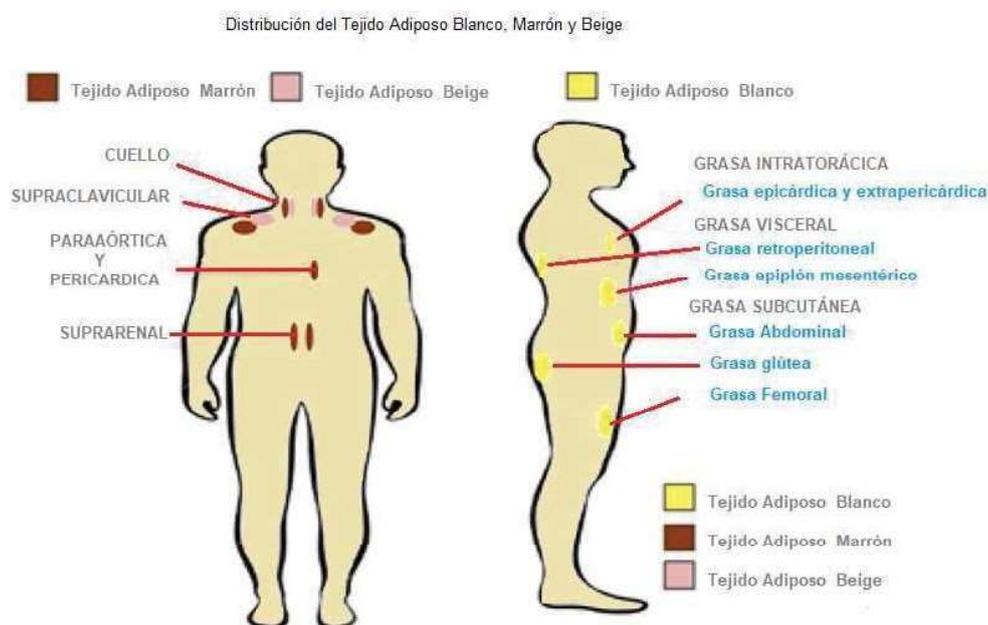


Figura 6. Distribución de TAB y TAM en el cuerpo humano. La acumulación de TAM se encuentra alrededor de la cintura y caderas, brazos y piernas, y presenta el mayor porcentaje de tejido adiposo en el cuerpo humano. El TAB subcutáneo incluye depósitos que se encuentran entre los músculos anteriores del cuello; en la pared abdominal anterior y en la zona inguinal. El TAB perivascular se puede encontrar alrededor de la aorta, la arteria carótida común y la arteria braquiocefálica; en la grasa pericárdica anterior y alrededor de la arteria coronaria epicárdica. TAB también se puede encontrar alrededor de riñón, glándula suprarrenal, páncreas e hígado<sup>230</sup>.

Se ha observado que la cantidad de TAM disminuye con la edad y se correlaciona inversamente con el IMC. El porcentaje de personas jóvenes en los que se encuentra TAM es más elevado que en personas de edad avanzada, aunque su actividad disminuye en jóvenes con sobrepeso u obesos<sup>119</sup>. Estos estudios parecen evidenciar definitivamente que el TAM tiene un papel en el metabolismo energético de humanos adultos y el hecho de que se encuentre en menor cantidad en individuos con sobrepeso u obesos podría apuntar a una nueva diana para el tratamiento de la obesidad.

## 2.2 Composición del tejido adiposo

El tejido adiposo se caracteriza por una marcada heterogeneidad celular: entre sus componentes celulares, se encuentran adipocitos, preadipocitos, fibroblastos, células endoteliales, células madre mesenquimales (CMM) capaces de diferenciarse en varios tipos celulares, células reguladoras T, macrófagos<sup>28,29</sup>, etc. En general, el tejido adiposo (TA) está compuesto por aproximadamente un tercio de adipocitos maduros, mientras que el resto es una combinación de diferentes tipos celulares.

### 2.3 Tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco o unilocular que forma la grasa blanca está presente en todos los mamíferos y es el tejido graso predominante. Las células que forman este tejido, los adipocitos, son células redondeadas muy grandes, de más de 100  $\mu$ m de diámetro, que poseen una sola y gran gota de grasa, la cual ocupa prácticamente todo el citoplasma, de ahí el nombre de unilocular. Tanto el núcleo como el resto de los componentes citoplasmáticos ocupan un fino espacio periférico, próximo a la membrana plasmática (Figura 7 y 8)

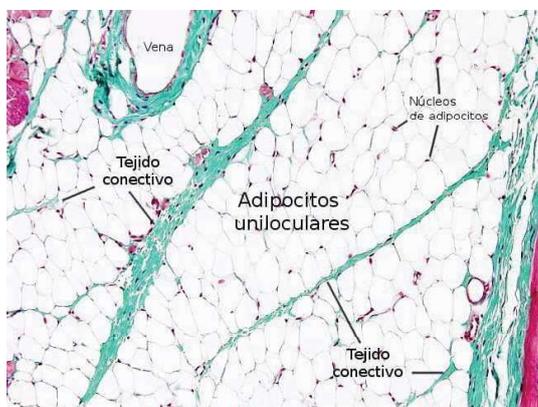


Figura 7. Tejido adiposo blanco teñido con tricrómico de Masson. (Fuente: Atlas de histología vegetal y animal)

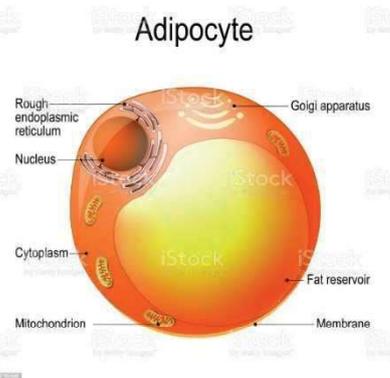


Figura 8. Imagen adipocito blanco

Es frecuente observar en animales bien alimentados, adipocitos que presentan numerosas gotas de grasa, dispersos entre otros que son claramente uniloculares. Todas esas gotitas de grasa se condensarán en una sola cuando el adipocito madure. Es decir, los adipocitos de la grasa blanca pueden pasar por un periodo multilocular durante su fase de diferenciación. También, en mucha menor cantidad, se pueden observar adipocitos denominados beige, posiblemente derivados de los propios adipocitos blancos, con las mismas características que los adipocitos de grasa parda.

El TAB es el principal tejido de almacén de energía del organismo, además de atribuírsele la función de aislamiento y protección mecánica para algunos órganos vitales. Los adipocitos maduros del TAB muestran el perfil de expresión requerido para la síntesis de triacilgliceroles, captación de glucosa y lipogénesis, así como de lipólisis. Este fenotipo permite que cuando el aporte de energía al organismo es excesivo y/o el gasto energético disminuye, el exceso de energía se deposite eficientemente en el TAB en forma de triacilgliceroles.

Por otro lado, frente a una situación de escasez de ingesta energética y/o incremento del gasto energético el TAB moviliza los depósitos de lípidos liberando ácidos grasos y glicerol que a través de la sangre son transportados a los tejidos, donde serán oxidados para obtener energía.

El TAB tradicionalmente ha sido considerado un tejido poco activo, pero hoy se sabe que es altamente dinámico sintetizando y secretando numerosos factores, no solo lipídicos sino también proteicos, que intervienen en la regulación de un amplio rango de procesos fisiológicos y metabólicos.

A pesar de que a finales de la década de los ochenta ya se describe que el TAB secreta hormonas esteroideas, no es hasta 1994 —con el descubrimiento de la leptina, factor saciante sintetizado predominantemente por el TAB— que se reconoce a este tejido como órgano endocrino.

Posteriormente se han identificado numerosos factores liberados por el TAB con funciones autocrinas, paracrinas y endocrinas.

De las numerosas sustancias secretadas por el TAB, los ácidos grasos son cuantitativamente las moléculas más importantes y son liberados en periodos de balance energético negativo, como en el ayuno. Otras moléculas de naturaleza lipídica son también secretadas por el TAB, incluyendo prostanooides —sintetizados por el propio tejido—, colesterol y retinol —que se almacenan para ser liberados posteriormente— y hormonas esteroideas (esteroides sexuales y glucocorticoides), que en el TAB pueden experimentar transformaciones de formas inactivas a activas o viceversa, con un importante papel autocrino y paracrino. Aparte de sustancias de naturaleza lipídica, el tejido adiposo secreta un número considerable de factores proteicos (se han descrito más de 50) que se designan bajo la denominación común de adipocinas.

De forma estricta, el término «adipocina» debería utilizarse para designar las proteínas que son sintetizadas y secretadas por el adipocito. Sin embargo, de forma genérica se utiliza para referirse a las proteínas sintetizadas y secretadas por el TAB en su conjunto, aunque su síntesis principal sea a cargo de otros tipos celulares presentes en el tejido, como los macrófagos infiltrados, localizadas en la fracción del estroma vascular de tejido adiposo. En el TAB la abundancia de macrófagos está relacionada con su tamaño, y existe una correlación directa entre el tamaño del TAB y el número de macrófagos infiltrados en este tejido, de forma que en el TAB de individuos obesos existe una mayor cantidad de macrófagos que en el de individuos con normopeso<sup>131</sup>

Estos macrófagos son los principales responsables de la secreción de citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-4, IL-13 y MCP-1), muchas de ellas relacionadas con el sistema inmunitario.

La inflamación crónica presente en la obesidad, junto con la mayor infiltración de macrófagos en el TAB, indica la existencia de una relación estrecha entre el sistema inmunitario y la obesidad. (Tabla 2).

Las adipocinas son muy diversas en cuanto a la estructura química y a la función fisiológica. Incluyen proteínas que intervienen en la regulación de la ingesta y del balance energético (leptina), en la regulación de la presión sanguínea (angiotensinógeno), en la hemostasia vascular (PAI-1), en el metabolismo lipídico (RBP-4, IL-1), en la homeostasis glucídica (adiponectina, resistina, visfatina), en la angiogénesis (VEGF, proteína señalizadora implicada en la vasculogénesis y en la angiogénesis), así como factores de crecimiento (TGFB) y proteínas de fase aguda y respuesta al estrés (haptoglobulina, a1-acid glycoprotein) que se encuentran en hígado<sup>95</sup>.

Una de las citoquinas de mayor relevancia secretada por el tejido adiposo blanco es la adiponectina, proteína cuya concentración plasmática está reducida en individuos obesos y diabéticos y sus niveles están inversamente relacionados con la resistencia a la insulina. Está implicada en el metabolismo energético, estimula la oxidación de ácidos grasos, reduce los triglicéridos plasmáticos y mejora el metabolismo de la glucosa mediante aumento de la sensibilidad a la insulina. La IL-6 y el TNF- $\alpha$  son citoquinas proinflamatorias que pueden contribuir a la resistencia a la insulina y a la inflamación sistémica. La resistina es un aparente biomarcador de inflamación y un mediador potencial de las enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad. La leptina es conocida como la hormona supresora del apetito. La secreción de angiotensinógeno puede contribuir a una hipertensión arterial. Por último, la secreción de PAI-1 podría promover un estado protrombótico.

Como ya se ha señalado, son muchas las adipocinas que se han descrito, con un amplio e importante papel regulador a distintos niveles fisiológicos. En la Figura 9 y Tabla 2 se enumeran algunas de las adipocinas y su principal función. Cabe señalar que esta función endocrina no es exclusiva del TAB, ya que muchos de estos factores son también sintetizados por el TAM.

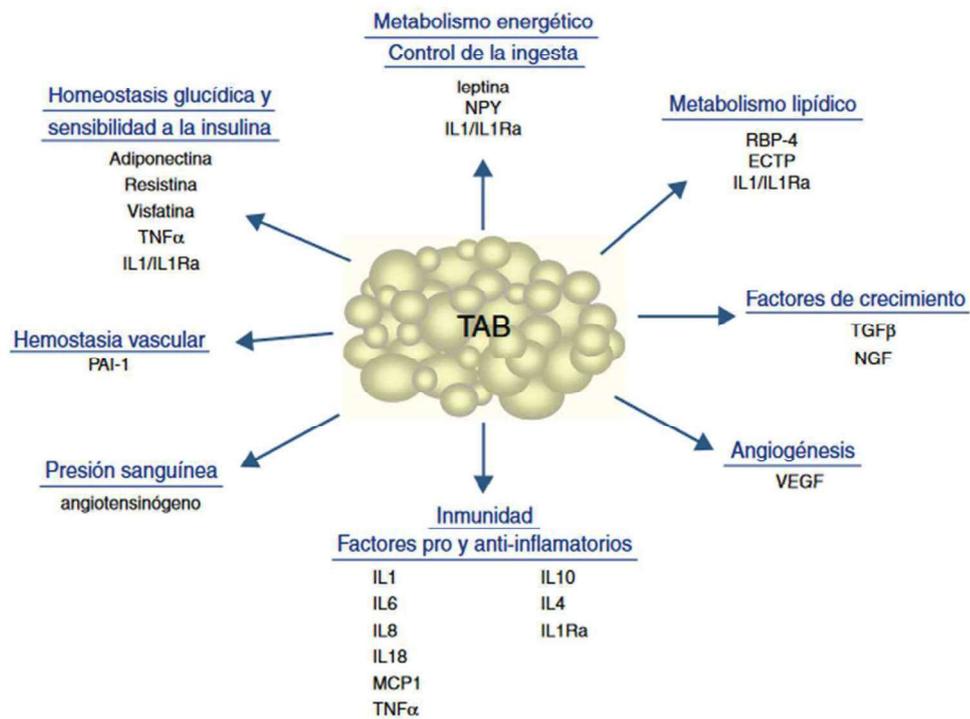


Figura 9. Procesos fisiológicos y metabólicos regulados por el TAB mediante la secreción de adipocinas. CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol; IL1: interleucina-1; IL1Ra: antagonista del receptor de la interleucina-1; IL4: interleucina-4; IL6: interleucina-6; IL8: interleucina-8; IL10: interleucina-10; IL18: interleucina-18; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1; NGF: factor de crecimiento nervioso; NPY: neuropéptido Y; RBP-4: proteína ligadora de retinol-4; TGF $\beta$ : factor de crecimiento transformante B; TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular (Esteve Ràfols M. Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinol Nutr.* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.endonu.2013.03.011>)

Adipocina	Función
Leptina	Control de la ingesta, deposición de grasa, inflamación
Neuropéptido Y (NPY)	Proliferación de preadipocitos
Adiponectina	Sensibilidad a la insulina, inflamación
Resistina	Sensibilidad a la insulina, inflamación
Visfatina	Sensibilidad a la insulina, inflamación
Omentina	Sensibilidad a la insulina
Vasplina	Sensibilidad a la insulina
Apelina	Homeostasis vascular (vasodilatación), ¿sensibilidad a la insulina?
Adipsina	Inflamación
Proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP)	Metabolismo lipídico
Lipoproteína lipasa (LPL)	Metabolismo lipídico
Lipasa sensible a las hormonas (HSL)	Metabolismo lipídico
Apolipoproteína E (ApoE)	Metabolismo lipídico
Proteína ligadora de retinol-4 (RBP-4)	Metabolismo lipídico
Angiotensinógeno	Homeostasis vascular
Angiotensina II	Homeostasis vascular
Enzima convertidora de angiotensina (ACE)	Homeostasis vascular
Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1)	Homeostasis vascular
Interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18)	Inflamación; la IL-1 $\beta$ también interviene en el metabolismo energético, en la sensibilidad a la insulina y en el control de la ingesta
Proteína C reactiva (CRP)	Inflamación
Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )	Inflamación, sensibilidad a la insulina
Proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1)	Incorporación de macrófagos al tejido
Molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1)	Activación de macrófagos
Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)	Angiogénesis
Factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ )	Migración y adhesión celular, crecimiento y diferenciación tisular
Factor de crecimiento insulínico de tipo I (IGF-I)	Metabolismo lipídico, sensibilidad a la insulina
Factor de crecimiento nervioso (NGF)	Crecimiento y diferenciación tisular
Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)	Proliferación y diferenciación, angiogénesis
Prostaglandina E2	Homeostasis vascular, inflamación
Prostaglandina I2	Homeostasis vascular, inflamación

TABLA 2. Adipocinas secretadas por el tejido adiposo blanco y función fisiológica (Esteve Ràfols M. Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinol Nutr.* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.endonu.2013.03.011>)

Hemos visto que las adipoquinas ó adipocitoquinas son proteínas metabólicamente activas y desempeñan una función muy importante en la regulación de procesos metabólicos y que la mayoría éstas pueden ser sintetizadas por cualquiera de los componentes celulares del tejido adiposo: adipocitos, preadipocitos, células del sistema inmune, células endoteliales y fibroblastos, aunque algunas son productos específicos de un solo tipo celular. Estos productos de secreción pueden tener efectos locales (actividad autocrina), influir en la fisiología de órganos adyacentes como son corazón, vasos sanguíneos u otros (efecto paracrino) o en órganos muy distantes, vía sanguínea (efecto endocrino). El perfil secretor en condiciones fisiológicas normales tendría un efecto de homeostasis metabólica (Figura 9)<sup>95</sup>. A través de estas señales, se coordina información sobre reservas energéticas, apetito, gasto energético, sensibilidad a hormonas claves del metabolismo como la insulina, entre otras. De esta manera, se integran funciones del tejido adiposo con otros órganos como páncreas, tubo digestivo, hígado y cerebro. Sin embargo, en condiciones de obesidad este perfil secretor se modifica, estableciendo una comunicación alterada entre los diferentes órganos.

#### 2.4 Tejido adiposo marrón

En 1551 Conrad Gesner, al describir el tejido interescapular de marmota, observó que la grasa parda constituía un tejido distinto al tejido adiposo blanco (TAB) [Gesner et al., 1551]. Si bien hasta 1817 se pensó que formaba parte del timo y que tenía una función endocrina, posteriormente se generalizó la idea de que era un tejido graso modificado cuya función se limitaba a ser un depósito de grasa. A principios de siglo se retomó la creencia de un papel endocrino del tejido, pero no fue hasta principios de los 60 cuando se demostró su función termogénica [revisión Trayhurn & Nicholls, 1986].

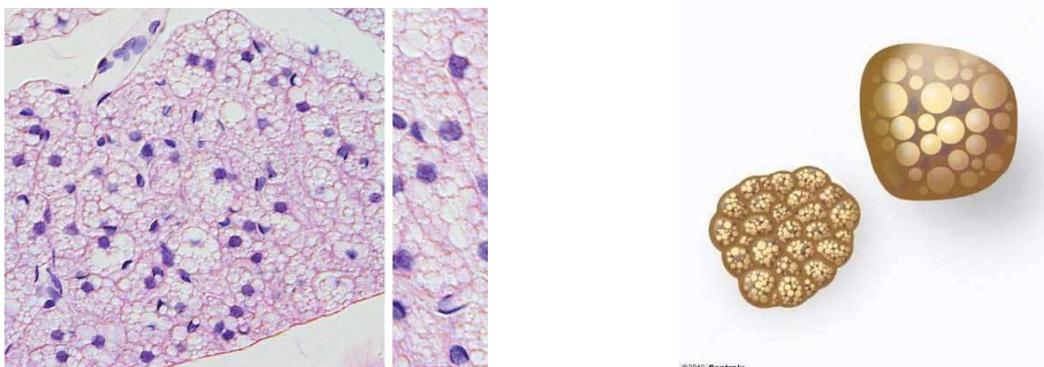


Figura 10: Adipocitos marrones. Células grasas con coloración oscura debido a su gran contenido en MITOCONDRIAS. Contienen muchas gotas o vacuolas lipídicas pequeñas. Almacenan lípidos que las mitocondrias pueden convertir directamente en energía en forma de calor. (Fuente: Atlas de histología vegetal y animal)

La célula predominante en este tejido es el adipocito pardo. Los adipocitos de la grasa parda se organizan en lóbulos separados por tejido conectivo y se caracterizan por presentar en su citoplasma un núcleo localizado en posición central y numerosos depósitos multiloculares de triglicéridos. Contiene un elevado número de mitocondrias con una membrana interna muy desarrollada, y esto es lo que confiere al tejido su elevada capacidad respiratoria (Figura 10).

El resto de orgánulos del adipocito pardo quedan reducidos a un pequeño espacio citoplásmico, y aunque existen muchos ribosomas libres, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi de estas células son prácticamente inexistentes [Afzelius, 1970].

Cuando el tejido se inactiva, los depósitos de triglicéridos se expanden y funden hasta formar una única gota lipídica que pasa a abarcar gran parte del citoplasma. Este tejido tiene una alta irrigación sanguínea, que junto con el elevado número de mitocondrias que poseen los adipocitos, proporcionan un color marrón o pardo. De ahí el nombre de grasa parda.

El tejido adiposo pardo no tiene como misión almacenar grasa como reserva energética metabólica, sino que esta grasa se emplea para generar calor, confirmándose que el TAM tiene la función fisiológica de metabolizar los ácidos grasos produciendo calor.

Esta función específica del TAM está sustentada por la elevada proporción en sus mitocondrias de la Uncoupling Protein-1 (UCP-1), proteína que cortocircuita el acoplamiento de la cadena respiratoria a la ATP sintetasa, permitiendo de esta forma la producción de calor.

En la mayoría de los mamíferos la grasa parda es abundante en el periodo perinatal y va desapareciendo durante el crecimiento hasta quedar localizada en unas pocas zonas del cuerpo de los adultos. Las diferencias funcionales y el equilibrio entre el TAB y el TAM contribuyen al mantenimiento del balance energético del organismo.

## 2.5 Tejido adiposo brite (beige)

Recientemente se ha descubierto un tercer tipo de grasa: beige o brite (brown in white), que es inducido en depósitos localizados de grasa blanca, sin embargo, expresa UCP1 y otros marcadores termogénicos típicos de la grasa parda, teniendo características anatómicas y funcionales intermedias entre un adipocito blanco y uno pardo, por lo tanto, tiene capacidad termogénica aunque en menor medida que los adipocitos marrones (Figura 11).

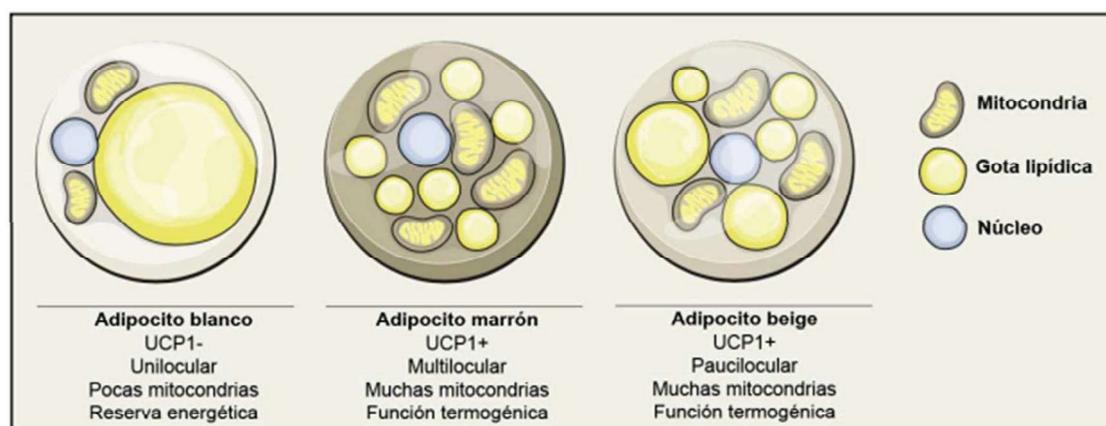


Figura 11. Tipos de adipocitos. Dibujo representativo de los 3 tipos de adipocitos o células grasas. El adipocito blanco es el tipo mayoritario, actúa como reserva energética, y se caracteriza por tener una única vacuola lipídica muy grande (unilocular) y poca densidad mitocondrial. En cambio, el adipocito marrón es multilocular, posee muchas mitocondrias ricas en UCP1 y es el principal responsable de la termogénesis. Por último, el adipocito beige es un tipo celular inducible, que sólo se genera en respuesta a la estimulación B-adrenérgica. Presenta muchas vacuolas lipídicas de mediano tamaño (paucilocular), un número alto de mitocondrias ricas en UCP1, y juega también un papel muy relevante en la termogénesis.

Estos sitios de tejido adiposo similar al pardo se localizan donde normalmente se esperaría encontrar TAB y se ven influenciados por la activación crónica de receptores adrenérgicos de tipo  $\beta_3$  o por exposición prolongada al frío, la cual inicia procesos de activación termogénica.

Los depósitos lipídicos de los adipocitos beige han sido descritos como pauciloculares, ya que tienen un depósito intermedio entre unilocular y multilocular; además, a diferencia de los adipocitos pardos, los adipocitos beige expresan niveles más bajos de UCP-1 que solo aumentan si la exposición al frío es crónica o ante la estimulación por catecolaminas. Se ha demostrado en modelos animales que los adipocitos blancos pueden sufrir un proceso de adaptación para pasar a ser adipocitos similares a los pardos, con depósitos lipídicos multiloculares y función termogénica sobre todo en depósitos supraclaviculares. Se puede producir la transformación de adipocito blanco en beige y viceversa, que dependerá de señales como frío, ejercicio físico, activación del sistema nervioso simpático (SNS), entre otros. La transdiferenciación del adipocito blanco en beige se conoce como *browning*<sup>27</sup>.

## 2.6 Diferenciación de adipocitos o adipogénesis

La adipogénesis es el proceso por el cual una célula madre mesenquimal (CMM) se diferencia a células adipocitas.

La primera etapa se caracteriza por el compromiso de la CMM a un preadipocito y la segunda, precedida por una expansión clonal mitótica, es la diferenciación del preadipocito a una célula adipocita. Muchos eventos contribuyen al compromiso de una CMM al linaje de las células adipocitas, incluyendo la coordinación de una red compleja de factores de transcripción, cofactores y productos intermedios de señalización de numerosas vías (Figura 12).

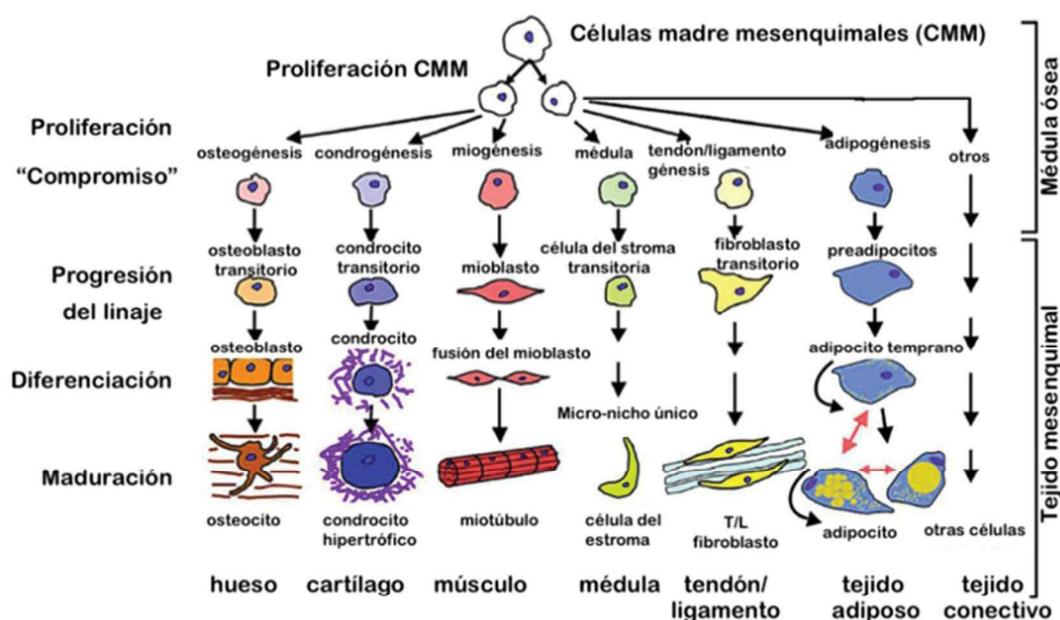


Figura 12. Diferenciación de CMM hacia todos los posibles tipos celulares especializados (Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: build-ing blocks for molecular medicine in the 21st century. Trends Mol Med, 2001; 7: 259-64)

Los preadipocitos son células de tamaño pequeño de morfología parecida al fibroblasto que tras la estimulación adecuada, van a derivar en adipocitos maduros. La masa de tejido adiposo en el adulto viene determinada por el incremento del tamaño de los adipocitos (hipertrofia) hasta un determinado punto y del incremento del número de adipocitos (hiperplasia). El volumen de adipocitos refleja el balance entre lipogénesis y lipólisis, mientras que su número es reflejo del equilibrio entre proliferación, la diferenciación y la apoptosis de los preadipocitos.

El proceso de diferenciación de preadipocitos a adipocitos se ha estudiado ampliamente en diversos modelos celulares murinos de preadipocitos blancos (3T3-L1, 3T3-F442A) y líneas inmortales de preadipocitos marrones<sup>97</sup>. Así, en el proceso de transición de preadipocito a adipocito maduro se describe 4 estadios. En primer lugar, se da una parada de la proliferación inducida mediante una inhibición por contacto indicando que se ha llegado a la confluencia, y a partir de este momento el preadipocito está comprometido a diferenciarse en adipocito.

Sigue una expansión clonal que se induce por señales hormonales y que está representada por unas cuantas divisiones mitóticas con la finalidad de sincronizar el ciclo celular. Se describe un estadio de diferenciación temprana, donde la división celular se detiene y se empiezan expresar genes característicos de adipocito, iniciándose la acumulación de lípidos.

Finalmente, la morfología típica de adipocito se alcanza con la fase de diferenciación terminal, induciéndose la transcripción de genes típicos de adipocitos maduros (Figura 13).

La coordinación de estos estadios se encuentra bajo el control de una compleja cascada transcripcional de factores reguladores en la que juegan un papel fundamental el receptor nuclear PPAR $\alpha$  y diversos miembros de la familia de factores de transcripción C/EBP<sup>98</sup>. Se ha demostrado que PPAR $\alpha$  es necesario para la diferenciación de los adipocitos y también para el mantenimiento de la diferenciación. Cuando se silencia PPAR $\alpha$  en adipocitos 3T3-L1 ya diferenciados, se induce dediferenciación con pérdida de lípidos y disminución de la expresión de los marcadores de adipocitos maduros<sup>99</sup>. De las 2 isoformas de PPAR $\alpha$ , es PPAR $\alpha$ 2 la que se expresa preferentemente en el tejido adiposo<sup>99</sup>. La familia de factores de transcripción C/EBP incluye 5 miembros: C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ , C/EBP $\epsilon$  y CHOP. Se ha observado una expresión secuencial de estos factores durante la diferenciación adipocitaria, de forma que se requiere la expresión temprana de C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$ , los cuales van a promover la expresión de C/EBP $\alpha$  y PPAR $\alpha$ , esenciales para la diferenciación total de los adipocitos<sup>99</sup>.

La expresión de C/EBP $\beta$  parece ser, pues, fundamental en los primeros estadios de diferenciación; así, animales deficientes en C/EBP $\beta$  muestran una masa reducida de tejido adiposo<sup>100</sup>. En contraste, C/EBP $\alpha$  se requiere para la adipogénesis junto con PPAR $\alpha$ , aunque éste último parece ser dominante en el proceso <sup>101</sup> (Figura 13).

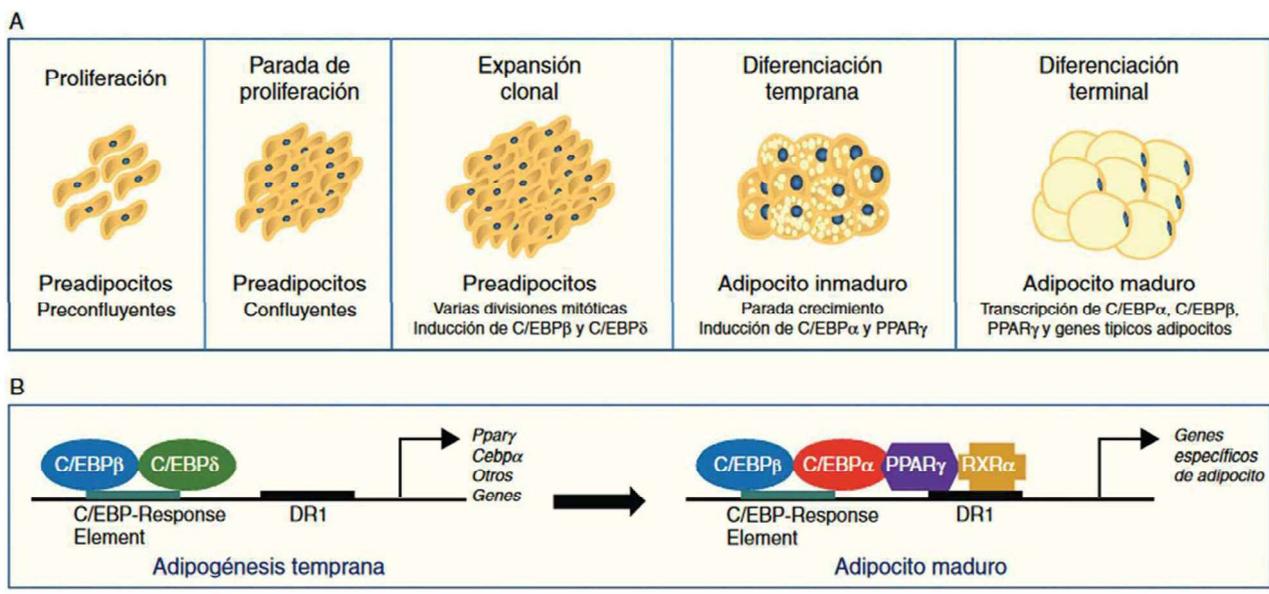


Figura 13. Diferenciación de preadipocitos a adipocitos. A) Esquema del proceso de transición de preadipocito a adipocito maduro indicando los diferentes estadios. B) Modelo secuencial del control transcripcional durante la adipogénesis (Esteve Ràfols M. Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinol Nutr.* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.endonu.2013.03.011>)

El conocimiento del proceso de diferenciación de preadipocitos a adipocitos es, pues, esencial para poder dar respuesta a problemas como la obesidad. Se ha observado que preadipocitos procedentes del TAB de diferentes localizaciones corporales muestran características específicas cuando estos son cultivados in vitro. En humanos se ha descrito que los preadipocitos procedentes de TAB subcutáneo abdominal muestran mayor capacidad de proliferación, diferenciación y menor susceptibilidad a la apoptosis que preadipocitos cuyo origen es TAB omental<sup>102,103</sup>, permitiendo diferenciar una población de preadipocitos de proliferación rápida y otros de proliferación lenta.

La presencia de dos subpoblaciones de preadipocitos con características diferentes, pero con capacidad de diferenciarse podría constituir un mecanismo mediante el cual se explicaría la plasticidad en el desarrollo del tejido adiposo, pudiéndose regular la abundancia de cada subpoblación en respuesta a estímulos concretos, por ejemplo, a citocinas proinflamatorias.

Tanto en humanos como en roedores se ha observado que con la edad los depósitos de TAM van siendo reemplazados por TAB.

También en determinadas situaciones, como estimulación adrenérgica o exposición al frío, se incrementa el número de adipocitos marrones inmersos en el TAB<sup>104,105,106</sup>.

Existe, pues, una marcada plasticidad entre el TAB y el TAM que induce a pensar en la posibilidad que entre la heterogeneidad de las células del estroma vascular del TAB existan también preadipocitos determinados a diferenciarse en adipocitos marrones.

El control del número de cada uno de estas poblaciones y de su diferenciación específica podría proporcionar nuevos tratamientos para la obesidad y sus complicaciones.

Estudios recientes muestran que los adipocitos marrones que aparecen inmersos en el TAB, tanto en roedores como en el caso de los humanos, tienen características diferentes a los adipocitos marrones de localizaciones típicas de TAM. De esta forma, parece ser que existirían 2 tipos distintos de TAM. Por un lado tendríamos el TAM clásico, cuyos adipocitos tendrían una «firma miogénica» (Myf-5-lineage), y por otro lado las células positivas para UCP-1 que emergen en las masas de TAB y que no tienen una firma miogénica. Este segundo tipo de adipocitos marrones muestran un perfil de expresión muy parecido a los adipocitos blancos con una expresión de UCP-1 basal baja, pero responden al estímulo  $\beta$ -adrenérgico incrementando la expresión de UCP-1 igual que los adipocitos marrones. A estas células brown-like inmersas en el TAB sin marca miogénica se las ha denominado «adipocitos beige» y son especialmente sensibles a la hormona irisina <sup>107</sup> (Figura 5)

## 2.7 Tejido adiposo y obesidad: el papel de las citoquinas.

La creciente incidencia de alteraciones metabólicas asociadas al desarrollo de obesidad y diabetes mellitus tipo 2 (DM2) ha sido de gran interés para el estudio de las contribuciones endocrinas del tejido adiposo.

Conforme avanza el entendimiento de las funciones del tejido adiposo, se ha reconocido que este tejido no tiene funciones homogéneas, sino variadas en función de su composición histológica, capacidad de almacenamiento graso, localización corporal y su papel en la regulación de la homeostasis metabólica del organismo. Asimismo, se ha comprendido que las diferencias existentes en la distribución del tejido adiposo correlacionan con riesgo cardiometabólico de manera diferencial y explican la correlación de la disfunción del tejido adiposo con la aparición de enfermedades metabólicas y cardiovasculares.

Dado el acelerado acúmulo de conocimientos sobre metabolismo humano en años recientes, el papel del tejido adiposo en la regulación sistémica de la homeostasis de nutrientes y energía en la fisiología normal va obteniendo mayor claridad.

En la actualidad, se postula que la actividad de las hormonas producidas por el tejido adiposo, las adipocinas, interactúan con señales hormonales provenientes de otros tejidos endocrinos y nerviosos que mantienen un sistema de comunicación que informa del estado nutricional del individuo al sistema nervioso y tejidos periféricos para regular la homeostasis energética del organismo.

El tejido adiposo de los pacientes obesos se caracteriza por una hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos y por cambios en sus funciones metabólicas; está demostrado que el tejido adiposo es el mayor productor de adipoquinas inflamatorias en estas condiciones. Estas adipoquinas inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1) incrementadas en TA en paciente obeso, contribuyen en gran medida a los trastornos metabólicos de estos pacientes potenciando la resistencia a la insulina.

Una de las principales citoquinas producidas por el tejido adiposo es la adiponectina, liberada al torrente circulatorio a elevadas concentraciones y nexos de unión entre obesidad, resistencia a la insulina y enfermedades cardiovasculares. Regula el metabolismo energético del organismo al estimular la oxidación de ácidos grasos, reducir los triglicéridos plasmáticos y mejorar el metabolismo de la glucosa mediante un aumento de la sensibilidad a la insulina.

Las adipoquinas ó adipocitoquinas son proteínas metabólicamente activas y desempeñan una función muy importante en la regulación de procesos metabólicos. La mayoría de las adipoquinas pueden ser sintetizadas por cualquiera de los componentes celulares del tejido adiposo: adipocitos, preadipocitos, células del sistema inmune, células endoteliales y fibroblastos, aunque algunas son productos específicos de un solo tipo celular. A través de las señales producidas por las adipoquinas, se coordina información sobre reservas energéticas, apetito, gasto energético, sensibilidad a hormonas claves del metabolismo como la insulina, entre otras. De esta manera, se integran funciones del tejido adiposo con otros órganos como páncreas, tubo digestivo, hígado y cerebro. Sin embargo, en condiciones de obesidad este perfil secretor se modifica, estableciendo una comunicación alterada entre los diferentes órganos.

A la función endocrina del TAB, contribuyen, además de los adipocitos, otras células presentes en el mismo, como los macrófagos. Los adipocitos maduros constituyen la fuente principal de leptina y de adiponectina; los macrófagos proporcionan prácticamente la totalidad de TNF $\alpha$  y de resistina.

Las células del estroma y las vasculares sintetizan: interleuquinas, prostaglandina E2 y factor de crecimiento endotelial (EGF).

Estas sustancias son responsables de las interacciones entre el tejido adiposo, el muscular, la corteza adrenal y los sistemas nerviosos central y simpático. Participan en el control del balance energético del organismo, la sensibilidad a la insulina, la regulación de la presión arterial, la respuesta inmune, angiogénesis, hemostasis y metabolismo lipídico.

### 3. RESISTENCIA A LA INSULINA

La vía de acción de la insulina comienza con la unión de la hormona a su receptor en la superficie celular, seguida por la autofosforilación del receptor en varios de sus residuos de tirosina<sup>30</sup>. Posteriormente el modo de acción intracelular de la insulina es mediado a través de dos vías principales: la vía de la fosfatidil inositol 3 kinasa (PI3K)- AKT/Proteína Kinasa B (PKB) y la vía de la Proteína Kinasa activada por mitógeno-Ras (MAPK). La vía PI3K-AK/PKB es importante para la mayoría de las acciones metabólicas de la insulina (aumento del transporte de glucosa al interior de las células, aumento de la síntesis de glucógeno, mayor lipogénesis, menor gluconeogénesis y menor lipólisis)<sup>26</sup>. El sustrato IRS-1, que es fosforilado por el receptor autofosforilado de la insulina, activa la PI3K uniéndose a su dominio SH2. La PI3K activada genera fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato (IP3), un segundo mensajero lipídico, que activa varias serina/treonina Kinasas dependientes de IP3, incluyendo la AKT/PKB.

La vía de la MAPK media las acciones mitogénicas de la insulina (proliferación, diferenciación y supervivencia celular)<sup>31,32</sup> (Figura 14)

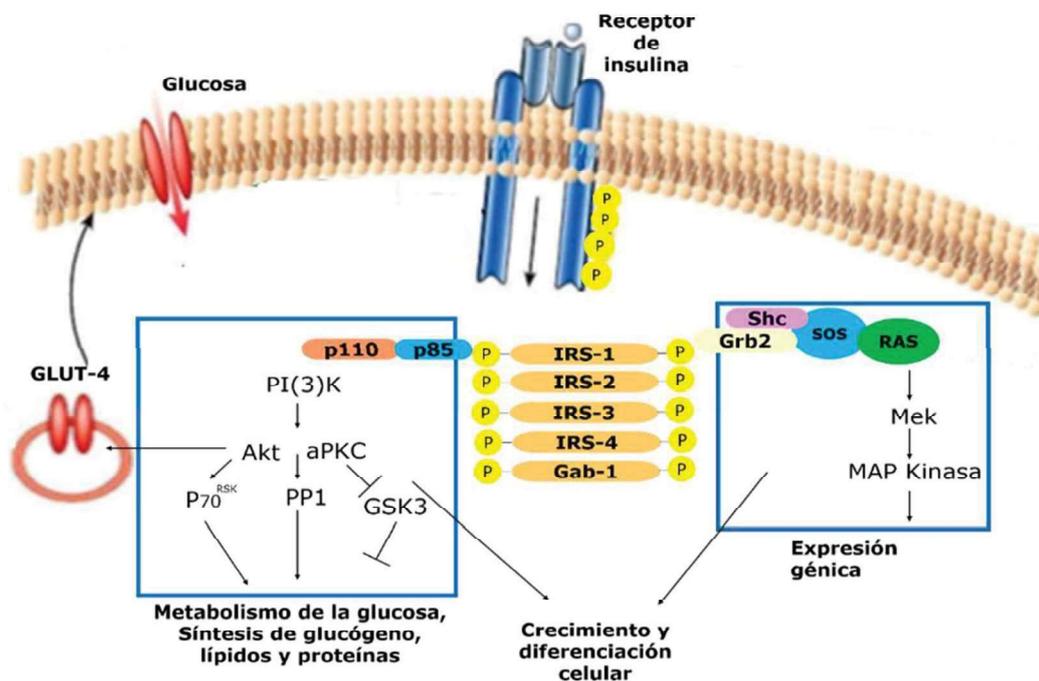


FIGURA 14: Vía de señalización de la insulina La unión de la insulina al RI inicia la cascada de señalización IRB/IRS-1/PI3K/Akt modulando la exocitosis del GLUT4. La vía mitogénica señala a través del eje IRB/Grb2/Ras/Mek/Erk (Modificada de Saltiel & Kahn, 2001)

En el músculo esquelético, la insulina incrementa el transporte de glucosa, permitiendo la entrada de glucosa y la síntesis de glucógeno. En el hígado, la insulina promueve la síntesis de glucógeno y la lipogénesis de novo mientras que inhibe la gluconeogénesis. En el tejido adiposo esta hormona suprime la lipólisis y promueve la captación de glucosa y la lipogénesis <sup>33,34,35</sup>

Se conoce como insulino-resistencia (IR) la condición patofisiológica de una respuesta reducida a la insulina en diferentes tejidos u órganos: hígado, músculo esquelético, tejido adiposo entre otros <sup>36</sup> Todos los procesos estimulados por la insulina se ven disminuidos y todos los procesos que son inhibidos por esta hormona resultan aumentados en el estado de IR.

El desorden metabólico más común del tejido adiposo es la obesidad, definida como un índice de masa corporal (IMC) mayor o igual a 30 kg/m<sup>2</sup>. El desbalance energético entre una mayor ingesta energética y un menor gasto energético a largo plazo llevan al adipocito a presentar una respuesta de hiperplasia y de hipertrofia con el consiguiente aumento de tejido adiposo <sup>37</sup>

Los adipocitos en estado de obesidad, presentan una alteración en su función, particularmente de su función endocrina <sup>34,38</sup> El tejido adiposo en individuos obesos y en modelos animales de la obesidad está infiltrado por un gran número de macrófagos, de células T CD8<sup>+</sup> proinflamatorias y se observa un cambio hacia una mayor relación de linfocitos CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> <sup>39,40</sup>

La infiltración de macrófagos en el tejido adiposo resulta del influjo de los monocitos, principalmente atraídos por la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) producida por parte de los adipocitos disfuncionales <sup>41,42</sup> Además de un número aumentado de macrófagos en el TA, la obesidad induce un cambio fenotípico en estas células, pues pasan de un estado M2 anti-inflamatorio a un estado M1 pro-inflamatorio<sup>43</sup>. La citoquina TNF- $\alpha$  promueve este cambio en los macrófagos <sup>44</sup>.

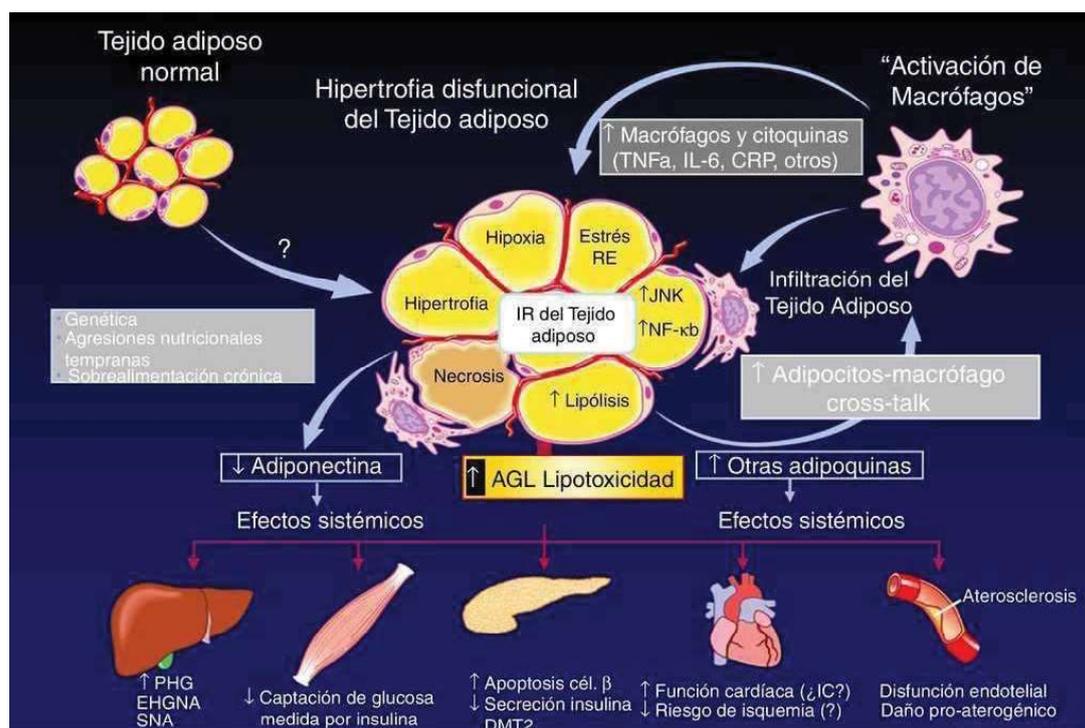
Los adipocitos disfuncionales y especialmente los macrófagos M1 presentan una producción aumentada de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, IL-1 $\beta$ ) que ocasionan un estado inflamatorio crónico de bajo grado y que se caracteriza por niveles locales y sistémicos aumentados de citoquinas proinflamatorias <sup>45,46,47</sup>. Los macrófagos M1 son los que secretan principalmente las citoquinas pro-inflamatorias. El contenido de macrófagos del tejido adiposo se correlaciona positivamente con el tamaño del adipocito y con la masa corporal (estando ambas variables aumentadas en la obesidad) y la expresión de citoquinas pro-inflamatorias deriva principalmente de los macrófagos y secundariamente de los adipocitos<sup>31</sup>. En este reclutamiento y activación de los macrófagos participan también linfocitos efectores CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>TH1<sup>48</sup>.

La citoquina TNF- $\alpha$  es una potente hormona proinflamatoria producida principalmente por macrófagos residentes en el tejido adiposo y en menor grado por los adipocitos. En humanos el nivel de esta hormona es mayor en el plasma y en el TA de individuos obesos y los niveles circulantes disminuyen con la pérdida de peso <sup>42,49</sup>. TNF- $\alpha$  induce resistencia a la insulina (IR) atenuando la fosforilación de IRS-1 en el músculo esquelético y en el TA<sup>39</sup>. Esta hormona también estimula la lipólisis y la secreción de los ácidos grasos por parte del TA y también disminuye los niveles de la adiponectina, una hormona que mantiene la sensibilidad a la insulina. La adiponectina aumenta la entrada y la oxidación de los ácidos grasos en el músculo e inhibe la gluconeogénesis hepática <sup>39</sup>.

El estado inflamatorio adipocítico con un patrón de citoquinas pro-inflamatorias causa un aumento de la lipólisis adipocítica y un nivel aumentado de ácidos grasos libres (AGL) en sangre. El principal causante de este efecto es el TNF- $\alpha$ , que suprime la expresión de la perilipina, una proteína que evita la lipólisis a nivel del adipocito<sup>50,51</sup>. En el estado de IR, causado por la obesidad, disminuye la activación de la enzima lipoproteín-lipasa por parte de la insulina, por lo que los remanentes de quilomicrones y de VLDL quedan con niveles mayores de triglicéridos al retornar al hígado<sup>42,52</sup>.

La combinación de unos remanentes ricos en triglicéridos y un mayor nivel de ácidos grasos circulantes ocasiona que al hígado retorne una mayor cantidad de ácidos grasos de lo habitual. Todo ello favorece la acumulación de lípidos a nivel hepático. Entonces los TAG acumulados y también utilizados en la síntesis de VLDL provienen de tres fuentes: remanentes de VLDL y de quilomicrones, lipogénesis hepática y ácidos grasos sanguíneos.

Las tres fuentes se incrementan en la IR dando lugar a una mayor producción de VLDL del tipo VLDL1, más cargada de TAG<sup>53</sup>. A pesar de la mayor producción de VLDL hepática, ante una mayor cantidad de TAG, siempre se acumula grasa a nivel hepático y este fenómeno ocurriendo en forma crónica lleva a la aparición del hígado graso no alcohólico. Este trastorno va desde la simple acumulación de TAG en los hepatocitos hasta el desarrollo de la forma más desarrollada de cirrosis con posible progresión a cáncer hepatocelular y muerte, pasando por la esteatosis con inflamación lobulillar y la fibrosis<sup>54,55,56</sup>.



Rev Argent Endocrinol Metab. 2017;54:109-23

Figura 15: El tejido adiposo blanco e inflamación: consecuencias endocrino-metabólicas. AGL: ácido graso libre; CRP: proteína C reactiva; DMT2: diabetes mellitus de tipo 2; EHGNA: enfermedad de hígado graso no alcohólica; IR: insulinorresistencia; JUNK: Janus kinase; NF- $\kappa$ B: NF kappa B; PHG: producción de glucosa hepática; RE: retículo endoplasmático; SMA: esteatohepatitis no alcohólica. Fuente: Adaptado de: Cusi K. Current Diabetes Reports. 2010;10:306.

#### 4. RECEPTORES HER/ERBB

La familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (ERBB o HER) tiene un papel crucial en el desarrollo, proliferación y diferenciación celular, estando presente en todos los organismos multicelulares<sup>89,90</sup>. En condiciones fisiológicas, la activación de estos receptores celulares está controlada por sus ligandos, que son miembros de la familia del EGF (factor de crecimiento epidérmico)<sup>71</sup>

Los receptores EGFR son proteínas transmembrana glicosiladas que pertenecen a la subclase I de receptores tirosina quinasa (RTKs)<sup>68,69,82</sup>. Los miembros de esta familia de receptores son: EGFR, ERBB1 o HER1; Neu, ERBB2 o HER2; ERBB3 o HER3; y, ERBB4 o HER4.

El EGFR, fue el primer miembro de la familia de receptores HER que se describió. Se identificó como una proteína de membrana que se fosforilaba en presencia de EGF<sup>57,58</sup>, promoviendo la proliferación de las células epiteliales<sup>59</sup>.

El aislamiento y caracterización del cDNA que codifica este receptor permitió relacionarlo con la tumorigénesis, al comprobar que el oncogén aviar v-erbB, correspondía en realidad a una versión mutada del EGFR <sup>82,83</sup>. Un año después, se describió la secuencia de otro posible RTK amplificado en carcinomas mamarios humanos y que presentaba una gran homología con EGFR y v-erbB, el cual se denominó HER2<sup>84,85</sup>.

Posteriormente, se describieron ERBB3/HER3<sup>86</sup> y ERBB4/HER4<sup>87</sup>, que también se encuentran relacionados con procesos tumorigénicos.

#### 4.1. Estructura y activación

Los receptores ErbB, como la mayoría de los RTKs, son glicoproteínas de membrana que presentan una estructura compuesta por tres módulos: una region extracelular (a la que se une el ligando), una región transmembrana y una larga cola citoplasmática (que contiene el dominio quinasa seguido de secuencias reguladoras no catalíticas con residuos de tirosina fosforilables)<sup>71</sup> (Figura 16)

La activación de los receptores ErbB se da por dimerización, tras la unión del ligando o por la sobreexpresión del receptor. La dimerización puede ocurrir entre dos receptores idénticos (homodimerización) o entre diferentes miembros de la familia (heterodimerización), particularmente EGFR, ErbB 3 y ErbB 4 con ErbB 2<sup>60</sup>

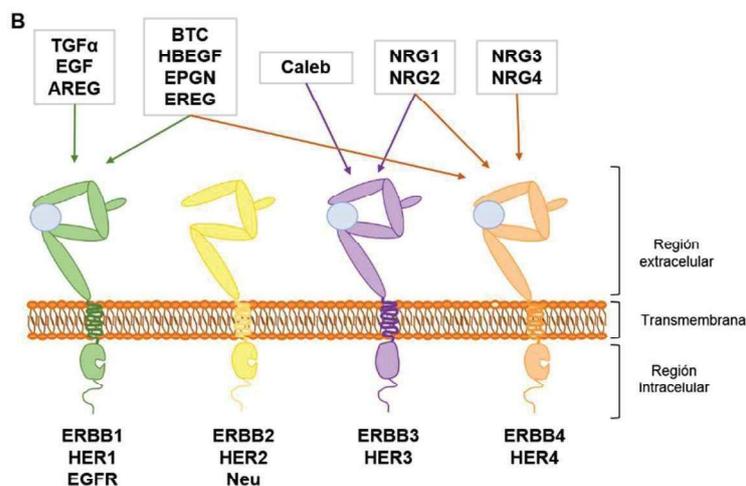


FIGURA 16: Representación esquemática de los receptores HER y descripción de los ligandos de la familia del EGF con que interaccionan<sup>231</sup>

## 4.2 Ligandos de los receptores ErbB

Los ligandos de los receptores ErbB presentan una región común, denominada dominio EGF, que da nombre a esta familia de ligandos<sup>61</sup>. El dominio EGF está formado por 40 a 50 aminoácidos, incluyendo seis cisteínas que establecen tres puentes disulfuro entre sí<sup>62,63,64</sup>. Se ha descrito que este dominio sería suficiente para la activación de los receptores ErbB <sup>61,65</sup>. En mamíferos, se conocen hasta 40 ligandos de la familia del EGF, que se diferencian en función de su afinidad por los distintos receptores ErbB <sup>66,67</sup>. Los ligandos EGF, TGF $\alpha$  (factor de crecimiento transformación de tipo alfa) y AREG (anfiregulina) se unen específicamente a EGFR.

La BTC (betacelulina), el HBEGF (factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina), la EREG (epiregulina) y el EPGN (epigen mitógeno epitelial) muestran afinidad dual por EGFR y ErbB4. La NRG1 (neuregulina 1) y NRG2 tienen capacidad de unión a ErbB3 y ErbB4, en cuanto que la NRG3 y NRG4, se unen a ErbB4. Específicamente a ErbB3 se une el ligando CSPG5 (proteoglicano 5 condroitín sulfato) o caleb (Figura 13).

Los distintos ligandos van a promover patrones específicos de fosforilación de los receptores HER, lo que a su vez dicta la duración de la señalización y las respuestas celulares <sup>67,70,71</sup>

No se conoce ligando específico para el receptor ErbB2 y ErbB3 no tiene acción catalítica, por lo que su actividad quinasa dependerá de la heterodimerización con otros receptores

## 4.3. Señalización Neuregulina-Receptor

La afinidad de unión de la neuregulina a ErbB3 aumenta con la presencia de ErbB2<sup>109</sup>. Además, cuando se coexpresa con ErbB3 o ErbB4, la neuregulina induce la fosforilación de tirosina del receptor ErbB2 <sup>62,92,93,94</sup>. Este es el resultado de la heterodimerización de ErbB2 con ErbB3 o ErbB4 y posterior fosforilación cruzada del receptor.

La activación de los receptores HER permite su interacción con diferentes moléculas adaptadoras que desencadena una red de cascadas de señalización intracelular<sup>88</sup>

Las dos rutas de señalización principales activadas por todos los receptores HER son la vía de PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) y las vías de MAPKs (proteínas quinasa activadas por mitógeno) <sup>69,91</sup>, implicadas en proliferación, supervivencia celular y diferenciación (Figura 17)

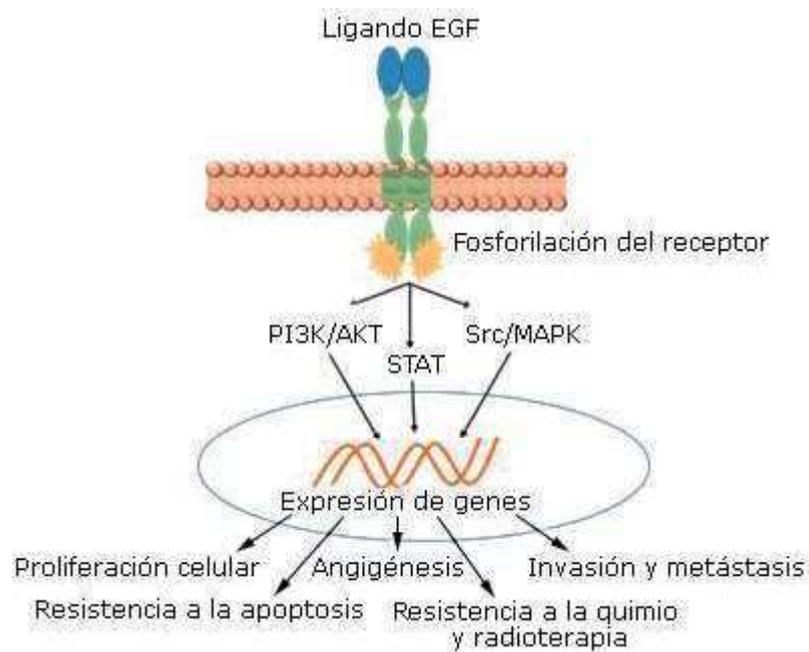


Figura 17: Esquema de las principales vías de señalización y sus efectos biológicos<sup>232</sup>

#### 4.4 ErbB2, EGFR y adipogenesis

La expresión del receptor EGF se ha estudiado en los últimos años principalmente por estar involucrado en la proliferación y progresión maligna. EGF es el componente más potente para llegar al crecimiento exponencial necesario para alcanzar la confluencia e iniciar la diferenciación adipocitaria.

Estudios *in vitro* con preadipocitos de ratón informan que la activación de ErbB estimula la adipogénesis y otros que la inhiben. Hay 2 estudios que reconcilian estas observaciones; Adachi et Al<sup>225</sup> en el que postulan que la activación del receptor EGFR puede tener ambos efectos y depende del estado de diferenciación del adipocito y los resultados del estudio de Harrington et Al<sup>226</sup>, en el que observan estimulación de adipogenesis a bajas concentraciones de EGFR e inhibición a concentraciones altas. Estudios en muestras humanas refuerzan la observación que la activación de EGFR puede provocar ambos efectos, estimulación e inhibición.

En el estudio llevado a cabo por Rogers et al<sup>205</sup>, la expresión de ErbB1 en tejido adiposo subcutáneo estaba disminuido en pacientes obesos con resistencia a insulina.

La inhibición de la actividad quinasa de ErbB1 impide la adipogénesis de adipocitos *in vitro* indicando que ErbB1 juega un papel importante en el mantenimiento de la función del tejido adiposo en pacientes con sensibilidad a la insulina. Se postula que más que una expansión del TA, el problema radica en la disfuncionalidad del mismo. La correlación observada de ErbB1 y PPAR $\alpha$ , hace pensar que al verse inhibida la cascada

de diferenciación adipocitaria, la falta de esterificación de AG por parte de adipocitos maduros hace que se acumule en otros órganos provocando con el tiempo, esta resistencia a la insulina. Además, PPAR $\alpha$  es un factor de transcripción relacionado con la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de glucosa, por lo que a menor expresión, mayor RI.

En otros estudios *in vitro*, se ha observado, que la expresión de ErbB2 está 10 veces aumentada durante la proliferación celular pero inhibida durante la diferenciación<sup>221</sup>. Estos resultados están en línea con las observaciones de Adachi et al<sup>225</sup>, en que se postulaba que la expresión del receptor depende del estado de diferenciación del adipocito.

Otras observaciones de estudios realizados por Pagano et al<sup>227</sup> revelan que el heterodímero formado por ErbB1 y ErbB2 tras unión de ligando, al inhibirse la actividad quinasa con tirfostinas, se vio una disminución en la proliferación adipocitaria y aumento de la actividad adipogénica, lo que apunta a un posible papel en la adipogénesis<sup>228,229</sup>.

## 5. NEUREGULINAS

Las neuregulinas (NRGs) pertenecen al grupo de factores de crecimiento polipeptídicos de la familia del EGF, que participan en diversos procesos fisiológicos como el desarrollo del corazón y del sistema nervioso<sup>61,72,73,74,75,76</sup>.

Las NRGs actúan uniéndose a la región extracelular de los receptores HER, particularmente HER3 y HER4<sup>77,78</sup>. Tras la unión de la NRG, los receptores dimerizan, especialmente con HER2<sup>77,78,79</sup>, y esto activa una compleja red de señalización intracelular<sup>80</sup>. Las NRGs se identificaron por primera vez entre los años 1992 y 1993. Dos grupos que trabajaban en la búsqueda de un ligando para HER2 aislaron la NRG del medio de cultivo de células de cáncer de mama, siendo capaz de activar HER2<sup>62,81,92</sup>.

Posteriormente se descubrió que la NRG no era un ligando de HER2, pero promovía su fosforilación tras unirse a HER3 o HER4<sup>64,81</sup>.

En estos mismos años, otros grupos identificaron la NRG como un factor que estimuló la proliferación de células de Schwann<sup>110,111</sup> y que proporciona la estimulación de la síntesis de los receptores de la acetilcolina, principal neurotransmisor en el desarrollo de sinapsis neuromusculares<sup>74</sup>.

Se han descrito cuatro genes que codifican para NRG, y, a partir de estos, mediante splicing alternativo del mRNA se generan más de 32 isoformas diferentes de esta proteína en mamíferos.

Todas las isoformas de las NRGs presentan un dominio EGF capaz de interactuar con los receptores HER y, la mayoría de ellas, son sintetizadas como formas unidas a la membrana, denominadas genéricamente proNRG<sup>74,112,113</sup> (Figura14)

Además de sus distintas estructuras y secuencias de aminoácidos de cada dominio, las múltiples isoformas de NRG presentan diferencias en su distribución tisular, potencia, especificidad de receptor y función biológica.

Las proteínas codificadas por los genes NRG1 y NRG2 son capaces de unirse y activar a los receptores HER3 y HER4 <sup>114</sup> mientras que las formas codificadas por NRG3 y NRG4 actúan únicamente como ligandos del receptor HER4 <sup>115</sup>.

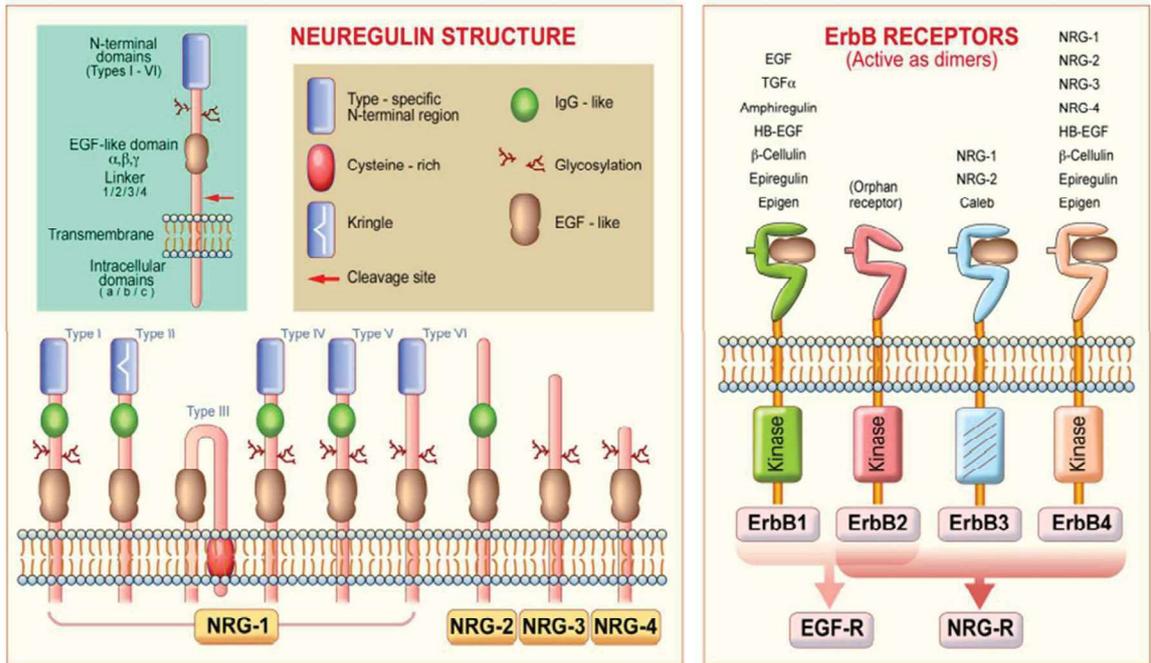


FIGURA 18: Estructura de las diferentes neuregulinas. Estructura de la neuregulina (NRG) y unión a los receptores ErbB. Los productos del gen NRG comparten una firma característica para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) dominio, que se encuentra en la región extracelular que diferencia a esta subfamilia de otros miembros de la familia EGF. Todos los miembros de la familia EGF son ligandos de los receptores ErbB, aunque con distintas especificidades y afinidades, siendo ErbB3 y ErbB4 los receptores de unión a NRG. Las isoformas de NRG-1 se han clasificado en los tipos I-VI sobre la base de las diferencias en la región distal NH2-terminal. Por lo tanto, las isoformas inicialmente conocidas como actividad inductora del receptor de acetilcolina, heregulina, y el factor de diferenciación Neu pertenecen a las isoformas de tipo I, que tienen un dominio similar a la inmunoglobulina; El factor de crecimiento glial pertenece a las isoformas tipo II, que tienen un dominio kringle; y el factor derivado de los nervios sensoriales y motores pertenece a las isoformas de tipo III, que tienen un dominio rico en cisteína. Estructural variaciones en el sitio COOH-terminal del dominio EGF y en el sitio enlazador (1, 2, 3 y 4), así como en la longitud de la región intracelular (a, b y c), determine su identificación nominativa (es decir, NRG-1 a). HB-EGF, factor de crecimiento similar a EGF que se une a heparina (Imagen extraída de Gumà et al., 2010)

El gen NRG1 fue el primero de la familia que se describió, consta de 21 exones localizados en el brazo corto del cromosoma 8 (8p22-p11)<sup>116,117</sup>. Las isoformas de NRG1 han sido las más ampliamente estudiadas y caracterizadas debido a su importancia en el correcto desarrollo embrionario y a su implicación en diferentes procesos patológicos<sup>72,73,118,119,120</sup>.

En la mayoría de los casos, la NRG2 es una proteína transmembrana que se encuentra expresada en neuronas del sistema nervioso central y en el corazón, aunque se han detectado formas solubles<sup>114,122</sup>. Su gen humano consta de 12 exones localizados en el brazo largo del cromosoma 5 (5q23-q33)<sup>123</sup>.

Está implicada en la inducción de la proliferación y en el control de la diferenciación celular <sup>124,125</sup> pero ya se ha descrito su capacidad de inhibición de células endoteliales a través de un mecanismo independiente del dominio EGF y de receptores HER <sup>126</sup>. Presentan el dominio inmunoglobulina y, a pesar de tener una estructura básica similar a la NRG1, éstas presentan importantes diferencias en su secuencia de aminoácidos<sup>75</sup>.

El gen que codifica la NRG3 se localiza en la región q22-q23 del cromosoma 10<sup>127</sup>. Se han descritos tres isoformas de la NRG3, que presentan poca homología con las demás proteínas de la familia, excepto en la región yuxtamembrana. La NRG3 ha sido implicada en trastornos neuropsiquiátricos como esquizofrenia y de desarrollos cognitivos<sup>128,129</sup>. NRG3 promueve la morfogénesis mamaria temprana y actúa durante la especificación celular, teniendo implicación en el cáncer de mama<sup>130</sup>.

La NRG4 es codificada por el gen que se identificó en el brazo corto del cromosoma 15 (15q23-q24) y es la forma menos homóloga cuando se comparan los cuatro genes<sup>131</sup>. En ratones, se ha demostrado que el tejido adiposo marrón (TAM) controla la lipogénesis hepática a través de la secreción de NRG4, y que ratones deficientes de NRG4 con alto contenido de grasa corporal, aumentaron aún más su peso, así como exhibieron una exacerbación de la resistencia a la insulina y esteatosis hepática <sup>132,133</sup>.

## 5.1 Estudios previos con Neuregulinas

Hemos visto que las neuregulinas son miembros de la gran familia de proteínas de factores de crecimiento epidérmico (EGF), codificadas por cuatro genes diferentes (NRG1-4) que codifican múltiples isoformas caracterizadas por la presencia de un dominio similar a EGF que media su actividad biológica a través de la unión a los receptores. tirosina quinasa ErbB3 y ErbB4 <sup>134,135</sup>. En los últimos años se ha investigado el papel de las neuregulinas en el balance energético, el metabolismo de la glucosa y los lípidos, y su implicación en el síndrome metabólico.

### 5.1.1 Experimentos in vitro

En las células del músculo esquelético, la administración de neuregulina recombinante estimuló la captación de glucosa en las células musculares<sup>136</sup> en un mecanismo alternativo independiente de la insulina, activando las vías PI3K, PDK1 y PKCzeta.

Estudios en miocitos cultivados indicaron que la NRG1 promovió la glucosa y oxidación de palmitato, potenciando la capacidad oxidativa mitocondrial en el músculo, aumentando la mitocondriogénesis y en consecuencia, mejorando la sensibilidad a la insulina<sup>137</sup>. NRG participa en la activación del transporte de la glucosa y su metabolismo induce capacidad oxidativa y sensibilidad a la insulina en el músculo<sup>138</sup>. NRG1 es liberado por el músculo durante la contracción y su rápido efecto aumenta la captación de glucosa muscular es esencial para preservar el glucógeno y el ATP contenido durante el ejercicio<sup>139</sup>. Este efecto parece ser local ya que un episodio agudo de ejercicio no cambia los niveles en suero de NRG-1 durante 30 min de ejercicio<sup>140</sup>. Se ha demostrado que los receptores ErbB se expresan en los miocitos esqueléticos, siendo NRG1 clave para el desarrollo del músculo esquelético, la miogénesis y la regulación del metabolismo muscular al estimular la utilización de glucosa<sup>136,137,141,142,143</sup> y en la proliferación de cardiomiocitos durante la regeneración cardíaca<sup>144</sup>.

En el hígado, la neuregulina 1 (Nrg1) y la neuregulina 4 (Nrg4) redujeron la gluconeogénesis y la lipogénesis y aumentaron la oxidación de ácidos grasos, mejorando la sensibilidad sistémica a la insulina y la tolerancia a la glucosa<sup>132,142,145,146,147</sup>. De hecho, la vía de señalización Nrg4/ErbB4 protege a los hepatocitos de la muerte celular inducida por estrés, evitando la progresión de esteatosis a esteatohepatitis<sup>148</sup>. Además, se ha visto que la administración intraperitoneal de un recombinante bioactivo .

NRG1 también tiene efectos agudos incrementando la utilización de glucosa hepática de una manera independiente de la insulina, lo que permite mejorar la respuesta a una prueba de tolerancia a la glucosa en ratas<sup>149</sup>. Este efecto se ve afectado en las ratas diabéticas grasas debido a la pérdida parcial de la expresión de ErbB3 en el hígado.

En células de cáncer de mama humano, la unión de NRG1 a ERBB4 activa SREBP-2 y condujo a una mayor expresión de genes relacionados con la biosíntesis de colesterol y la captación de LDL<sup>150</sup>. Un estudio reciente demostró que la eliminación de ErbB4 aceleró el desarrollo de obesidad, dislipidemia, esteatosis hepática, hiperglucemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina después de 24 semanas con una dieta baja en grasas<sup>151</sup>.

Resultados previos en tejido adiposo, se ha observado que la administración de Nrg4 (un ligando específico para ErbB4 involucrado en el crecimiento de neuritas) en adipocitos murinos de la línea 3T3-L1 inhibió la lipogénesis e indujo el pardeamiento y la captación de glucosa, pero no

ejerció ningún efecto sobre la adipogénesis y la lipólisis<sup>132</sup>. La Nrg4, es altamente expresada en el tejido adiposo, enriquecida en grasa parda y marcadamente aumentada durante la diferenciación de adipocitos. De hecho, Nrg4 ha sido propuesto como un marcador de la actividad del tejido adiposo marrón (TAM) en ratones, siendo altamente expresado en la actividad TAM inducida por frío y el pardeamiento del tejido adiposo blanco (TAB)<sup>132,152</sup>. NRG4 se expresó en adipocitos marrones completamente diferenciados, pero no en preadipocitos, y aumentó durante la diferenciación de adipocitos marrones<sup>132,152</sup>. Los experimentos in vitro mostraron que NRG4 derivado de adipocitos marrones podría promover el crecimiento de neuritas en el tejido adiposo, aumentando la inervación simpática, mejorando la actividad de TAM y el oscurecimiento de TAB<sup>152</sup>.

La modulación de la actividad del tejido adiposo marrón y el oscurecimiento del tejido adiposo blanco se ha propuesto como una estrategia terapéutica prometedora en el tratamiento de los trastornos metabólicos asociados a la obesidad<sup>107,147,153,154,155</sup> con la intención de mejorar la sensibilidad a la insulina<sup>154,155</sup> y la esteatosis hepática entre otros.

Sin embargo, Wang et al. (2014) informaron que a pesar de la abundante expresión de Nrg4 en TAM, parece prescindible para la respuesta de hipotermia inducida por frío, siendo Ucp1 y Dio2 inducidos en un grado similar por la exposición al frío en ratones WT y NRG4KO. Estos hallazgos indicaron que Nrg4 podría no participar directamente en la termogénesis de TAM.

La obesidad inducida por la dieta condujo a una disminución significativa de la expresión del gen Nrg4 en TAB pero no en TAM<sup>132,146,157</sup> en ratones. Un estudio reciente también mostró que la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) inducida por la dieta resultó en una reducción significativa de Nrg4 tanto en TAM como en TAB<sup>148</sup>.

Estos estudios realizados en ratones sugirieron que el Nrg4 derivado del tejido adiposo podría ejercer efectos positivos sobre los trastornos metabólicos asociados a la obesidad, mejorando la glucosa, tolerancia y sensibilidad a la insulina y atenuando la inflamación del tejido adiposo y del hígado<sup>132,146,156</sup>. Hasta la elaboración de esta tesis, solo un estudio en humanos ha investigado los niveles de ARNm de NRG4 en el tejido adiposo en asociación con la masa de grasa corporal, el contenido de lípidos en el hígado y la tolerancia a la glucosa<sup>132</sup>.

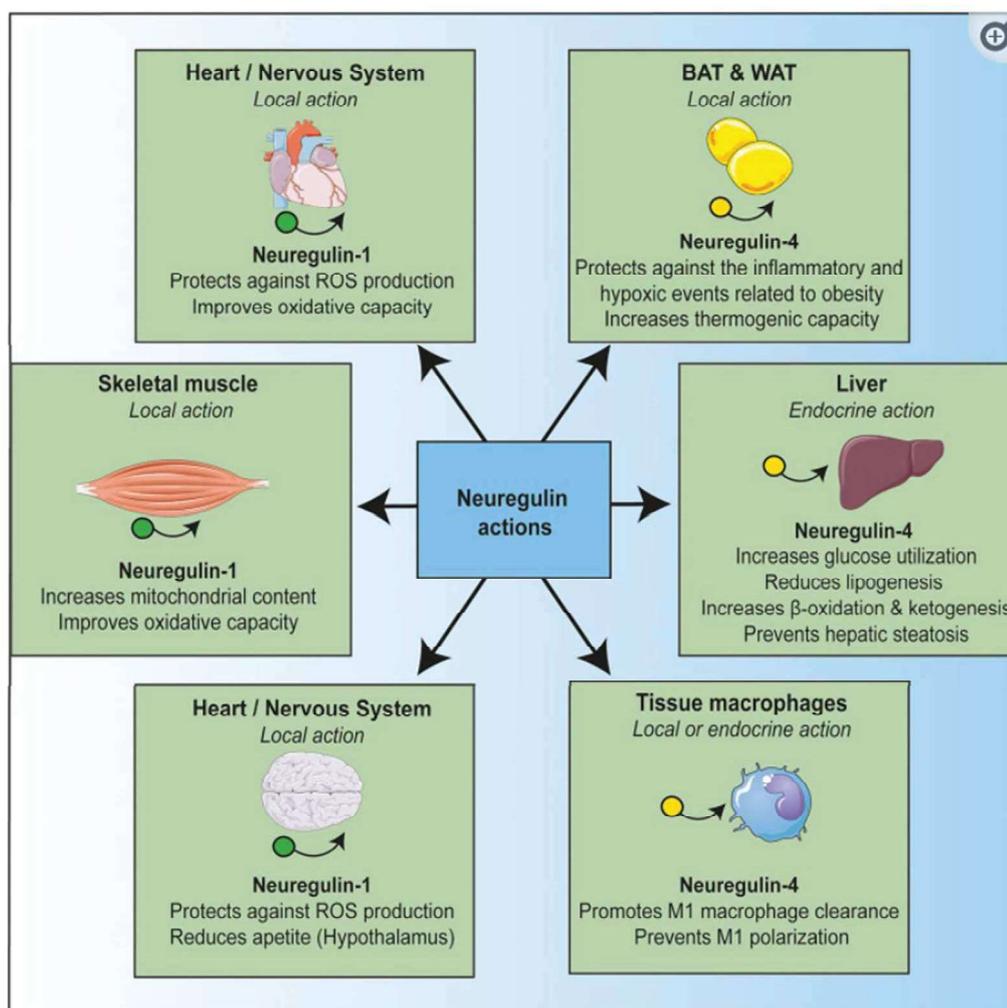


Figura 19. Acciones protectoras de la neurregulina sobre diferentes tejidos. La neurregulina, actuando localmente o como un factor endocrino, protege contra el estrés metabólico y la inflamación de una manera que está estrechamente relacionada con la función mitocondrial<sup>135</sup>.

Los efectos de la secreción de neurregulina 4 (NRG4) de adipocitos marrones y blancos en tejidos diana se muestra en Figura 16. NRG4 tiene mayor expresión en los adipocitos marrones en comparación con los blancos. NRG4 podría, de forma autocrina/paracrina, regular la función del tejido adiposo. La secreción de NRG4 de los adipocitos puede estimular el crecimiento de neuritas de neuronas simpáticas, que a su vez pueden contribuir a la activación del tejido adiposo pardo (BAT) a través de la liberación de catecolaminas inducida por frío (o por otros estímulos).

La secreción de NRG4 inhibe la lipogénesis hepática de novo y la expresión de genes implicados en la lipogénesis en el hígado NRG4 podría facilitar la inducción de beige/brite a partir de adipocitos blancos. Lo más probable es que NRG4 ejerza su efecto sobre otras células y tejidos diana que expresan receptores ErbB/HER.

La figura fue modificada de Pfeifer<sup>169</sup> y se basa en datos de Wang et al.<sup>132</sup>, Rosell et al.<sup>152</sup>, Guo et al.<sup>170</sup> y Pellegrinelli et al.<sup>171</sup>.

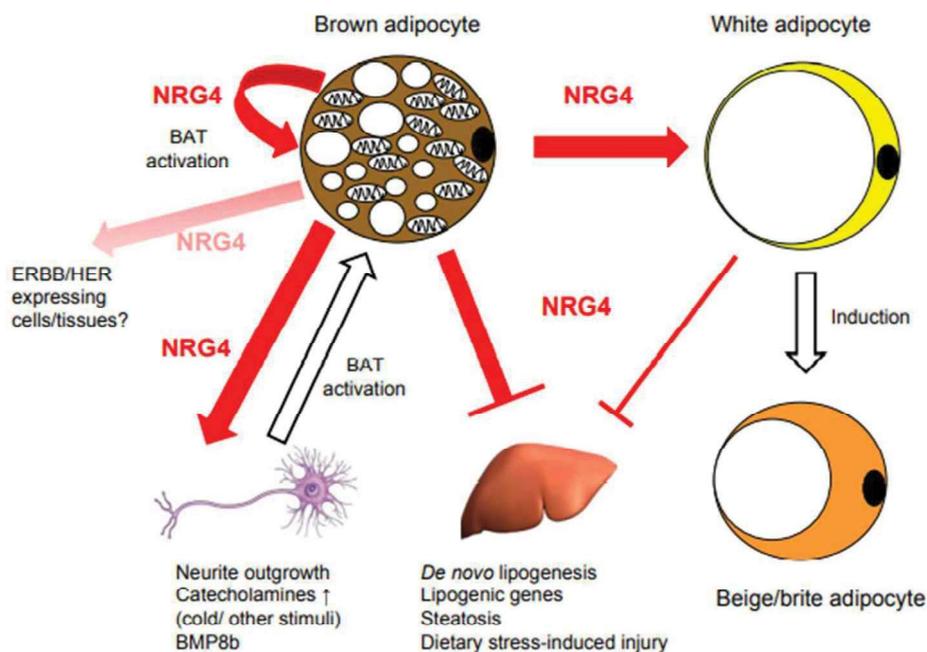


Figura 20: Efectos de la secreción de neurregulina 4 (NRG4) de adipocitos marrones y blancos en tejidos diana. (Figura modificada de Pfeifer<sup>169</sup> y se basa en datos de Wang et al.<sup>132</sup>, Rosell et al.<sup>152</sup>, Guo et al.<sup>170</sup> y Pellegrinelli et al.<sup>171</sup>)

### 5.1.2 Experimentos NRG circulante

NRG actúa localmente de manera forma auto y/o paracrina. Sin embargo, NRG también está presente en la sangre, y se ha propuesto como un biomarcador para patologías cardiovasculares y uso terapéutico<sup>157,158</sup>, al proteger las células de la degeneración e inducir proliferación.

La Diabetes Mellitus Tipo2 se caracteriza por hiperglucemia, una condición causada por la resistencia a la insulina en los tejidos diana de esta hormona, es decir, en músculo, hígado y tejido adiposo. Un informe reciente (Wang, 2014), indica que una isoforma de NRG, NRG-4, se expresa y se secreta en gran parte por TAM y TAB, mostrando una expresión reducida en la obesidad humana como consecuencia de niveles de citocinas proinflamatorias aumentadas que inhiben su expresión. NRG-4 tiene efectos distales sobre el metabolismo hepático, reduciendo la lipogénesis y protegiendo contra la resistencia a la insulina inducida por la dieta.

Por lo tanto, en lugar de un factor de crecimiento local, la neuregulina aparece como factor endocrino, probablemente como adipocina, y una expresión y función alterada tienen consecuencias metabólicas que pueden conducir a la manifestación de la obesidad y el tipo 2 diabetes.

La administración de neuregulina recombinante en ratas grasas diabéticas Zucker mejoró la tolerancia a la glucosa a través de la activación de la vía de señalización ErbB3/PI3K/PKB en el hígado, pero no en el músculo<sup>159</sup>. Además, un estudio reciente demostró que se requiere NRG4 para la captación de glucosa inducida por insulina en células 3T3-L1 de ratón<sup>160</sup>. La regulación a la baja inducida por NRG4 o ErbB4 provocó resistencia a la insulina y esteatosis hepática en ratones alimentados con una dieta alta en grasas<sup>132,161,162,163</sup>, lo que respalda la importancia de la señalización de NRG4-ErbB4 en la prevención de trastornos metabólicos asociados con la obesidad.

En humanos, la asociación entre NRG4 y la resistencia a la insulina asociada a la obesidad y la esteatosis hepática es menos clara y controvertida. Algunos estudios demostraron una asociación inversa entre la concentración de NRG4 circulante y las características del síndrome metabólico o la presencia de enfermedad del hígado graso no alcohólico<sup>164,165</sup>. Otras investigaciones informaron niveles elevados de NRG4 en pacientes con diabetes tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa u obesidad<sup>166,167,168</sup>. Chen et al analizaron NRG4 sérico en 310 sujetos (83 con tolerancia normal a la glucosa, 129 con prediabetes y 96 con diabetes tipo 2). El NRG4 circulante aumentó significativamente en los grupos de prediabéticos y diabéticos<sup>168</sup>.

Kurek Eken et al también describieron niveles séricos elevados de NRG4 en mujeres con diabetes mellitus gestacional en asociación con un IMC elevado, glucosa a las 2 h de una prueba de tolerancia oral a la glucosa y HOMA-IR<sup>167</sup>. Kang et al también encontraron niveles séricos elevados de NRG4 en participantes con sobrepeso (IMC medio  $27 \pm 4,02$  kg/m<sup>2</sup>) y diabetes tipo 2 en comparación con participantes sin obesidad (IMC medio  $24,1 \pm 2,65$  kg/m<sup>2</sup>). De manera consistente, un metanálisis reciente, en el que se incluyeron siete estudios, concluyó que el NRG4 circulante se asoció con alteraciones en el metabolismo de la glucosa y la obesidad<sup>168</sup>.

## 6. CONSIDERACIONES ETICAS

Los estudios se han realizado siguiendo las recomendaciones del Comité Ético del Hospital de Girona “Dr Josep Trueta”. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético del Hospital de Girona “Dr Josep Trueta”. Todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito de acuerdo con la Declaración de Helsinki, después de que se les explicara el propósito del estudio.



# **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**



## 7. HIPOTESIS

Las NRGs son factores de crecimiento que, en su mayoría, son sintetizadas como formas transmembrana, que pueden ser procesadas, liberándose las formas solubles activas. Estas proteínas actúan uniéndose a los receptores ErbBs desencadenando la activación de diversas vías de señalización intracelular. Según las evidencias de estudios en ratones la NRG4 tiene efectos positivos en la prevención de trastornos metabólicos asociados a obesidad.

**La hipótesis de este trabajo:** la expresión de las isoformas de neuregulina (NRG) en tejido adiposo mejora su fisiología y se asocia a sensibilidad a la insulina en pacientes obesos. Por tanto, la expresión de NRG a través de receptores ErbB modula el balance energético, el metabolismo de glucosa y lípidos.

## 8. OBJETIVOS

Para probar esta hipótesis, se plantean los siguientes objetivos:

- Investigar la relación potencial entre NRG4 en tejido adiposo humano y marcadores de adipocitos marrón/beige, obesidad y sensibilidad a la insulina
- Investigar la posible relación entre el NRG4 circulante y los trastornos metabólicos asociados a la obesidad en sujetos no diabéticos con una amplia gama de adiposidad
- Investigar la expresión de receptores ErbB y neuregulinas en tejido adiposo subcutáneo y visceral humano en relación con la obesidad y la resistencia a la insulina



# **PUBLICACIONES**



# Neuregulin 4 Is a Novel Marker of Beige Adipocyte Precursor Cells in Human Adipose Tissue

*Ferran Comas, Cristina Martínez, Mònica Sabater, Francisco Ortega , Jessica Latorre, Francisco Díaz-Sáez, Julian Aragonés, Marta Camps ,Anna Gumà , Wifredo Ricart , José Manuel Fernández-Real and José María Moreno-Navarrete*

**FACTOR IMPACTO:** 4755 (Q1, Frontiers in Physiology)

El objetivo de este estudio ha sido:



Investigar la relación potencial entre NRG4 en tejido adiposo humano y marcadores de adipocitos marrón/beige, obesidad y sensibilidad a la insulina







# Neuregulin 4 Is a Novel Marker of Beige Adipocyte Precursor Cells in Human Adipose Tissue

Ferran Comas<sup>1,2†</sup>, Cristina Martínez<sup>1†</sup>, Mònica Sabater<sup>1,2</sup>, Francisco Ortega<sup>1,2</sup>, Jessica Latorre<sup>1,2</sup>, Francisco Díaz-Sáez<sup>3,4</sup>, Julian Aragonés<sup>5,6</sup>, Marta Camps<sup>3,4</sup>, Anna Gumà<sup>3,4</sup>, Wifredo Ricart<sup>1,2,7</sup>, José Manuel Fernández-Real<sup>1,2,7</sup> and José María Moreno-Navarrete<sup>1,2,7\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Institut d'Investigació Biomèdica de Girona, Girona, Spain,

<sup>2</sup> CIBEROBN (CB06/03/010), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, <sup>3</sup> Department of Biochemistry and Molecular

Biomedicine, Faculty of Biology, Institute of Biomedicine of the University of Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>4</sup> CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, <sup>5</sup> Research Unit, Hospital of Santa Cristina, Research Institute Princesa, Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain, <sup>6</sup> CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, Carlos III Health Institute, Madrid, Spain, <sup>7</sup> Department of Medicine, University of Girona, Girona, Spain

## OPEN ACCESS

Edited by:  
Paula Oliver,

Universidad de les Illes Balears, Spain

Reviewed by:  
Rushita Bagchi,

University of Colorado Denver,  
United States

Yongguo Li,  
Technische Universität München,  
Germany

\*Correspondence:

José María Moreno-Navarrete  
jmoreno@idibgi.org

†These authors have contributed  
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to  
Integrative Physiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Physiology

Received: 17 August 2018

Accepted: 14 January 2019

Published: 31 January 2019

Citation:

Comas F, Martínez C, Sabater M,  
Ortega F, Latorre J, Díaz-Sáez F,  
Aragonés J, Camps M, Gumà A,  
Ricart W, Fernández-Real JM and  
Moreno-Navarrete JM (2019)

Neuregulin 4 Is a Novel Marker  
of Beige Adipocyte Precursor Cells  
in Human Adipose Tissue.

Front. Physiol. 10:39.

doi: 10.3389/fphys.2019.00039

**Background:** Nrg4 expression has been linked to brown adipose tissue activity and browning of white adipocytes in mice. Here, we aimed to investigate whether these observations could be translated to humans by investigating *NRG4* mRNA and markers of brown/beige adipocytes in human visceral (VAT) and subcutaneous adipose tissue (SAT). We also studied the possible association of *NRG4* with insulin action.

**Methods:** SAT and VAT *NRG4* and markers of brown/beige (*UCP1*, *UCP3*, and *TMEM26*)-related gene expression were analyzed in two independent cohorts ( $n = 331$  and  $n = 59$ ). Insulin resistance/sensitivity was measured using HOMA<sub>IR</sub> and glucose infusion rate during euglycemic hyperinsulinemic clamp.

**Results:** In both cohort 1 and cohort 2, *NRG4* and thermogenic/beige-related gene expression were significantly increased in VAT compared to SAT. Adipogenic-related genes followed an opposite pattern. In cohort 1, VAT *NRG4* gene expression was positively correlated with BMI and expression of *UCP1*, *UCP3*, *TMEM26*, and negatively with adipogenic (*FASN*, *PPARG*, and *SLC2A4*)- and inflammatory (*IL6* and *IL8*)-related genes. In SAT, *NRG4* gene expression was negatively correlated with HOMA<sub>IR</sub> and positively with *UCP1* and *TMEM26* gene expression. Multiple linear regression analysis revealed that expression of *TMEM26* gene was the best predictor of *NRG4* gene expression in both VAT and SAT. Specifically, *NRG4* and *TMEM26* gene expression was significantly increased in VAT, but not in SAT stromal vascular fraction cells ( $p < 0.001$ ). In cohort 2, the significant association between *NRG4* and *TMEM26* gene expression in both VAT and SAT was confirmed, and SAT *NRG4* gene expression also was positively correlated with insulin action and the expression of *UCP1*.

**Conclusion:** Current findings suggest *NRG4* gene expression as a novel marker of beige adipocytes in human adipose tissue.

**Keywords:** obesity, neuregulin 4, browning, adipose tissue, insulin sensitivity

## INTRODUCTION

The modulation of brown adipose tissue activity and browning of white adipose tissue has been proposed as a promising therapeutic strategy in the treatment of obesity-associated metabolic disturbances (Wu et al., 2012; Bartelt and Heeren, 2014; Hepler et al., 2017; Rabhi et al., 2018; Zhang S. et al., 2018), with the intention of improving insulin sensitivity (Hepler et al., 2017; Rabhi et al., 2018) and hepatic steatosis (Huang et al., 2017), among others.

Several studies pointed to neuregulins as an important family of ligands that regulate diverse aspects of glucose and lipid metabolism and energy balance. In skeletal muscle cells, recombinant neuregulin administration stimulated glucose uptake in muscle cells (Suárez et al., 2001) in an alternative insulin-independent mechanism, activating PI3K, PDK1, and PKCzeta pathways (Cantó et al., 2004), and promoted glucose and palmitate oxidation, enhancing mitochondrial oxidative capacity (Cantó et al., 2007). In liver, neuregulin 1 (Nrg1) and neuregulin 4 (Nrg4) reduced gluconeogenesis and lipogenesis and increased fatty acid oxidation, improving systemic insulin sensitivity and glucose tolerance (Wang et al., 2014; Ennequin et al., 2015; Ma et al., 2016; Chen et al., 2017; Zhang P. et al., 2018). In fact, the Nrg4/ErbB4 signaling pathway protects hepatocytes from stress-induced cell death, preventing the steatosis to steatohepatitis progression (Guo et al., 2017). In human breast cancer cells, NRG1 binding to ERBB4 activates SREBP-2 and led to increased expression of LDL uptake- and cholesterol biosynthesis-related genes (Haskins et al., 2015). A recent study demonstrated that ErbB4 deletion accelerated the development of obesity, dyslipidemia, hepatic steatosis, hyperglycemia, hyperinsulinemia and insulin resistance after 24 week on a medium-fat diet (Zeng et al., 2018). Nrg4, a specific ligand for ErbB4 involved in neurite growth, administration in 3T3-L1 adipocytes inhibited lipogenesis and induced browning and glucose uptake, but did not exert any effects on adipogenesis and lipolysis (Zenget al., 2018). In fact, Nrg4 has been proposed as a marker of brown adipose tissue (BAT) activity in mice, being highly expressed in cold-induced BAT activity and white adipose tissue (WAT) browning (Rosell et al., 2014; Wang et al., 2014). NRG4 was expressed in fully differentiated brown adipocytes, but not in preadipocytes, and increased during brown adipocyte differentiation (Rosell et al., 2014; Wang et al., 2014). *In vitro* experiments showed that brown adipocytes-derived NRG4 might promote the growth of neurites in adipose tissue, increasing sympathetic innervation, enhancing BAT activity and browning of WAT (Rosell et al., 2014). However, Wang et al. (2014) reported that despite the abundant expression of Nrg4 in BAT, it seems dispensable for cold-induced hypothermia response, being Ucp1 and Dio2 induced to similar extent by cold exposure in WT and NRG4KO mice. These findings indicated that Nrg4 did not directly participate in BAT thermogenesis.

Diet-induced obesity led to a significant decreased Nrg4 gene expression in WAT but not BAT (Wang et al., 2014; Ma et al., 2016; Chen et al., 2017) in mice. A recent study also showed that diet-induced non-alcoholic steatohepatitis (NASH) resulted in a significant reduced Nrg4 in both BAT and WAT

(Guo et al., 2017). These studies suggested that adipose tissue-derived Nrg4 could exert positive effects on obesity associated metabolic disturbances (Wang et al., 2014; Ma et al., 2016; Chen et al., 2017; Guo et al., 2017), improving glucose tolerance and insulin sensitivity and attenuating adipose tissue and liver inflammation (Wang et al., 2014; Ma et al., 2016; Chen et al., 2017; Guo et al., 2017).

In humans, only one study investigates *NRG4* mRNA levels in adipose tissue in association with body fat mass, liver lipid content and glucose tolerance (Wang et al., 2014), but no previous studies investigated the relationship between NRG4 and markers of adipose tissue browning in human adipose tissue. Since previous mice studies demonstrated that NRG4 was a marker of BAT activity and browning of WAT (Rosellet al., 2014; Wang et al., 2014; Ma et al., 2016; Chen et al., 2017), in the present study we aimed to investigate the potential relationship between human adipose tissue NRG4 and markers of brown/beige adipocytes. Furthermore, the impact of adipose tissue NRG4 on human obesity and insulin sensitivity was also evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

### Human Adipose Tissue Samples

In cohort 1, a group of 331 [155 visceral (VAT) and 176 subcutaneous (SAT) adipose tissues] (Cohort 1) from participants with normal body weight and different degrees of obesity, with body mass index (BMI) within 20 and 68 kg/m<sup>2</sup>, were analyzed. In a second cohort of morbidly obese (BMI > 35 kg/m<sup>2</sup>) subjects with different degrees of insulin action [measured using hyperinsulinemic-euglycemic clamp (Moreno-Navarrete et al., 2013)], VAT (*n* = 34) and SAT (*n* = 25) samples (Cohort 2) were studied. Altogether these subjects were recruited at the Endocrinology Service of the Hospital of Girona “Dr Josep Trueta.” All subjects were of Caucasian origin and reported that their body weight had been stable for at least 3 months before the study. Subjects were studied in the post-absorptive state. BMI was calculated as weight (in kg) divided by height (in m) squared. They had no systemic disease other than obesity and all were free of any infections in the previous month before the study. Liver diseases (specifically tumoral disease and HCV infection) and thyroid dysfunction were specifically excluded by biochemical work-up. Samples and data from patients included in this study were partially provided by the *FATBANK* platform promoted by the *CIBEROBN* and coordinated by the *IDIBGI Biobank* (Biobank *IDIBGI*, B.0000872), integrated in the Spanish National Biobanks Network and they were processed following standard operating procedures with the appropriate approval of the Ethics, External Scientific and *FATBANK* Internal Scientific Committees.

### Ethics Statement

This study was carried out in accordance with the recommendations of the ethical committee of the Hospital of Girona “Dr Josep Trueta.” The protocol was approved by the ethical committee of the Hospital of Girona “Dr Josep Trueta.”

All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki, after the purpose of the study was explained to them.

AT samples were obtained from SAT and VAT depots during elective surgical procedures (cholecystectomy, surgery of abdominal hernia and gastric bypass surgery). Adipose tissue samples were washed, fragmented and immediately flash-frozen in liquid nitrogen before being stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

The isolation of adipocyte and stromal vascular fraction cells (SVF) was performed from 17 SAT and 20 VAT non-frozen adipose tissue samples. These samples were washed three to four times with phosphate-buffered saline (PBS) and suspended in an equal volume of PBS supplemented with 1% penicillin-streptomycin and 0.1% collagenase type I prewarmed to  $37^{\circ}\text{C}$ . The tissue was placed in a shaking water bath at  $37^{\circ}\text{C}$  with continuous agitation for 60 min and centrifuged for 5 min at 400 *g* at room temperature. The supernatant, containing mature adipocytes, was recollected. The pellet was identified as the SVF. Isolated mature adipocytes and SVF stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for gene expression analysis.

## Analytical Methods

Serum glucose concentrations were measured in duplicate by the glucose oxidase method using a Beckman glucose analyser II (Beckman Instruments, Brea, CA, United States). Intraassay and interassay coefficients of variation were less than 4% for all these tests. HDL cholesterol was quantified by a homogeneous enzymatic colorimetric assay through the cholesterol esterase/cholesterol oxidase/peroxidase reaction (Cobas HDLC3). Total serum triglycerides were measured by an enzymatic, colorimetric method with glycerol phosphate oxidase and peroxidase (Cobas TRIGL). We used a Roche Hitachi Cobas c 711 instrument to perform the determinations.

## RNA Expression

RNA purification was performed using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, Izasa SA, Barcelona, Spain) and the integrity was checked by the Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, United States). Gene expression was assessed by real time PCR using a LightCycler<sup>®</sup> 480 Real-Time PCR System

(Roche Diagnostics SL, Barcelona, Spain), using TaqMan<sup>®</sup> and SYBR green technology suitable for relative genetic expression quantification. The RT-PCR reaction was performed in a final volume of 12  $\mu\text{l}$ . The cycle program consisted of an initial denaturing of 10 min at  $95^{\circ}\text{C}$  then 40 cycles of 15 s denaturing

phase at  $95^{\circ}\text{C}$  and 1 min annealing and extension phase at  $60^{\circ}\text{C}$ . A threshold cycle (Ct value) was obtained for each amplification curve and a  $\Delta\text{Ct}$  value was first calculated by subtracting the Ct value for human cyclophilin A (*PPIA*) RNA from the Ct value for each sample. Fold changes compared with the endogenous control were then determined by calculating  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ , so that gene expression results are expressed as expression ratio relative to *PPIA* gene expression according to the manufacturer's guidelines. *PPIA* Ct values in both SAT and VAT were comparable ( $23.48 \pm 0.81$  in SAT vs.  $23.49 \pm 1.28$  in VAT,  $p = 0.9$ ,  $n = 152$ ). Primer/probe sets used were: neuregulin 4 (*NRG4*, Hs00163592\_m1), fatty acid synthase (*FASN*, Hs00188012\_m1),

peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARG*, Hs00234592\_m1), solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 (*SLC2A4* or *GLUT4*, Hs00168966\_m1), perilipin 1 (*PLIN1*, Hs00160173\_m1), PPARG coactivator 1 alpha (*PPARGC1A*, Hs00173304\_m1), uncoupling protein 1 (*UCP1*, Hs01084772\_m1), uncoupling protein 3 (*UCP3*, Hs01106052\_m1), transmembrane protein 26 (*TMEM26*, Hs00415619\_m1), interleukin 6 (*IL6*, Hs00174131\_m1), C-X-C motif chemokine ligand 8 (*CXCL8* or also named IL8, Hs00174103\_m1), and peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (4333763, *PPIA* as endogenous control).

## Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using the SPSS 12.0 software. Unless otherwise stated, descriptive results of continuous variables are expressed as mean and SD for Gaussian variables or median and interquartile range for non-Gaussian variables. Parameters that did not fulfill normal distribution criteria were log transformed to improve symmetry for subsequent analyses. The relation between variables was analyzed by simple correlation (using Spearman's and Pearson's tests) and multiple linear regression analyses. ANOVA and unpaired Student's *t*-tests were used to compare clinical variables and gene expression relative to obesity and type 2 diabetes (T2D).

## RESULTS

Representative Ct values of analyzed genes were shown in **Table 1**.

### Cohort 1

Anthropometric and clinical data from cohort 1 were detailed in **Table 2**. Similar to thermogenic/beige-related gene expression, *NRG4* was significantly increased in VAT compared to SAT, whereas adipogenesis-related genes followed an opposite gene expression pattern (**Figure 1A**). In cohort 1, VAT *NRG4* gene expression was significantly increased in participants with obesity (**Table 2**), but no significant differences were found between non-diabetic obese and obese participants with T2D (**Table 2**).

TABLE 1 | Representative Ct values of analyzed genes.

	Mean $\pm$ SD
<i>PPIA</i>	23.22 $\pm$ 0.25
<i>FASN</i>	25.91 $\pm$ 1.83
<i>PPARG</i>	29.49 $\pm$ 0.85
<i>SLC2A4</i>	27.71 $\pm$ 0.53
<i>PLIN1</i>	22.78 $\pm$ 0.49
<i>PPARGC1A</i>	30.86 $\pm$ 0.71
<i>UCP1</i>	36.82 $\pm$ 0.91
<i>UCP3</i>	34.11 $\pm$ 0.65
<i>TMEM26</i>	34.16 $\pm$ 0.95
<i>IL6</i>	31.81 $\pm$ 2.28
<i>IL8</i>	30.89 $\pm$ 1.92
<i>NRG4</i>	35.57 $\pm$ 0.99

TABLE 2 | Anthropometric and clinical characteristics according to obesity and T2D in cohort 1.

	Non-obese	Obese	Obese + T2D	<i>p</i>
N	54	88	34	
Age (years)	47.4 ± 10.1	45.6 ± 10.5	47.2 ± 9.5	0.5
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.4 ± 3.8	43.9 ± 7.4*	44.7 ± 4.1*	<0.0001
Fasting glucose (mg/dl) <sup>a</sup>	86 (80–94)	93 (84–100.5)	126 (93.5–169.5)*#	<0.0001
HOMA <sub>IR</sub> ( <i>n</i> = 56) <sup>a</sup>	1.18 (0.79–1.76)	2.06 (1.44–3.39)	5.59 (3.93–7.05)*#	0.001
Total-cholesterol (mg/dl) <sup>a</sup>	199 (174–219)	193 (167.5–218.7)	182 (166–214)	0.5
HDL-cholesterol (mg/dl) <sup>a</sup>	64.5 (50.7–77.5)	55 (45.5–62.6)	50.1 (42–62)*	0.04
LDL-cholesterol (mg/dl) <sup>a</sup>	114.5 (88.7–135.5)	116.8 (97.5–134.7)	101.5 (89.5–137.7)	0.5
Fasting triglycerides (mg/dl) <sup>a</sup>	79.5 (57.7–101.2)	98 (75–132)	136 (89.5–164.5)*#	<0.0001
VAT <i>NRG4</i> (RU) × 10 <sup>-3a</sup>	1.26 (0.217–4.11)	3.59 (2.24–5.56)*	4.58 (2.54–6.52)*	0.001
SAT <i>NRG4</i> (RU) × 10 <sup>-3a</sup>	0.141 (0.061–0.239)	0.168 (0.095–0.381)	0.083 (0.057–0.155)	0.2

VAT, visceral adipose tissue; SAT, subcutaneous adipose tissue; T2D, type 2 diabetes; HOMA<sub>IR</sub>, homeostasis model assessment – insulin resistance index; RU, relative gene expression units.

<sup>a</sup>Median and interquartile range.

\**p* < 0.05 compared to non-obese participants after performing Bonferroni post hoc test.

#*p* < 0.05 compared to obese participants after performing Bonferroni post hoc test.

Bold values mean that *p*-value reached statistical significance.

No significant differences were observed on SAT *NRG4* gene expression according to obesity or T2D. In VAT, *NRG4* gene expression was positively correlated with BMI, and negatively correlated with adipogenic-related genes (*FASN*, *PPARG*, and *SLC2A4*) (Table 3). Interestingly, *NRG4* gene expression was significantly positively associated with expression of brown/beige adipocyte activity-related (*UCP1*, *UCP3*, and *TMEM26*) and negatively with inflammatory-related (*IL6* and *IL8*) genes (Table 3 and Figure 2A). In SAT, *NRG4* gene expression was negatively correlated with HOMA<sub>IR</sub> and positively with *UCP1* and *TMEM26* gene expression (Table 3 and Figure 2B).

In multiple linear regression analysis, *TMEM26* ( $\beta = 0.58$ ,  $p < 0.0001$ ; model adjusted  $R^2 = 0.37$ ,  $p < 0.0001$ ), *UCP3* ( $\beta = 0.24$ ,  $p = 0.03$ ; model adjusted  $R^2 = 0.13$ ,  $p = 0.001$ ), *IL6* ( $\beta = -0.32$ ,  $p = 0.01$ ; model adjusted  $R^2 = 0.16$ ,  $p = 0.001$ ), *IL8* ( $\beta = -0.36$ ,  $p = 0.008$ ; model adjusted  $R^2 = 0.17$ ,  $p < 0.0001$ ), *FASN* ( $\beta = -0.42$ ,  $p = 0.001$ , model adjusted  $R^2 = 0.12$ ,  $p = 0.001$ ) and *PPARG* ( $\beta = -0.38$ ,  $p = 0.005$ ; model adjusted  $R^2 = 0.11$ ,  $p = 0.008$ ) significantly contributed to the variance of *NRG4* gene expression in VAT after controlling for BMI. In SAT, *TMEM26* ( $\beta = 0.77$ ,  $p < 0.0001$ ; model adjusted  $R^2 = 0.61$ ,  $p < 0.0001$ ) significantly contributed to the variance of *NRG4* gene expression after controlling for BMI. Multiple linear regression analysis revealed that expression of *TMEM26* gene was the best predictor of *NRG4* gene expression in both VAT and SAT.

In addition, correlations between *UCP1*, a specific marker of brown adipocytes, and clinical and metabolic parameters were also explored. No significant correlation between SAT or VAT *UCP1* gene expression and BMI, fasting glucose, HOMA<sub>IR</sub>, total-, LDL- and HDL-cholesterol, and fasting triglycerides were observed. VAT, but not SAT, *UCP1* was positively correlated with *SLC2A4* ( $r = 0.43$ ,  $p < 0.0001$ ), *PPARGC1A* ( $r = 0.36$ ,  $p = 0.001$ ) and *UCP3* ( $r = 0.31$ ,  $p = 0.005$ ) gene expression.

In adipose tissue fractions, *NRG4* and *TMEM26*, but not *UCP1*, gene expression was significantly increased in visceral SVFs compared to visceral adipocytes, subcutaneous SVFs and subcutaneous adipocytes (Figure 2C).

## Cohort 2

To examine the findings replication of cohort 1 excluding the effects of obesity, an independent cohort (cohort 2) composed of morbidly subjects with different degrees of insulin action has been analyzed. Anthropometric and clinical data from cohort 2 were detailed in Table 4. Similar to cohort 1, *NRG4* and thermogenic/beige-related gene expression was increased in VAT (Figure 1B). No significant differences on SAT or VAT *NRG4* gene expression according to glucose tolerance or T2D were found. VAT *NRG4* gene expression were associated with expression of *TMEM26* gene (Table 5), and SAT *NRG4* with insulin sensitivity (M) and expression of *SLC2A4*, *UCP1* and *TMEM26* genes (Table 5).

## DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study showing a significant relationship between *NRG4* and *TMEM26* gene expression in human adipose tissue. Interestingly, this association was found in both VAT and SAT, and validated in a second independent cohort. *TMEM26* has been described as a specific marker of brite/beige adipocytes (Wu et al., 2012; Torriani et al., 2016; Finlin et al., 2017). We also found positive associations among *NRG4* and markers of thermogenic activity (characteristic of both brown and beige adipocytes) such as expression of *UCP1* and *UCP3* genes. In addition, VAT *NRG4* gene expression was negatively correlated with expression of white lipogenic/adipogenic (*FASN* and *PPARG*)- and inflammatory (*IL6* and *IL8*)-related genes, even after controlling for BMI. Since beige adipocytes have less lipogenic capacity compared to white adipocytes (Aziz et al., 2017; Zuriaga et al., 2017), and browning/beiging of adipose tissue protected against visceral adipose tissue inflammation (Wu et al., 2017; Gonzalez-Hurtado et al., 2018), the negative association between *NRG4* and white adipogenic/inflammatory genes reinforced *NRG4* as a marker of beige adipocytes. In fact, these correlations were only observed

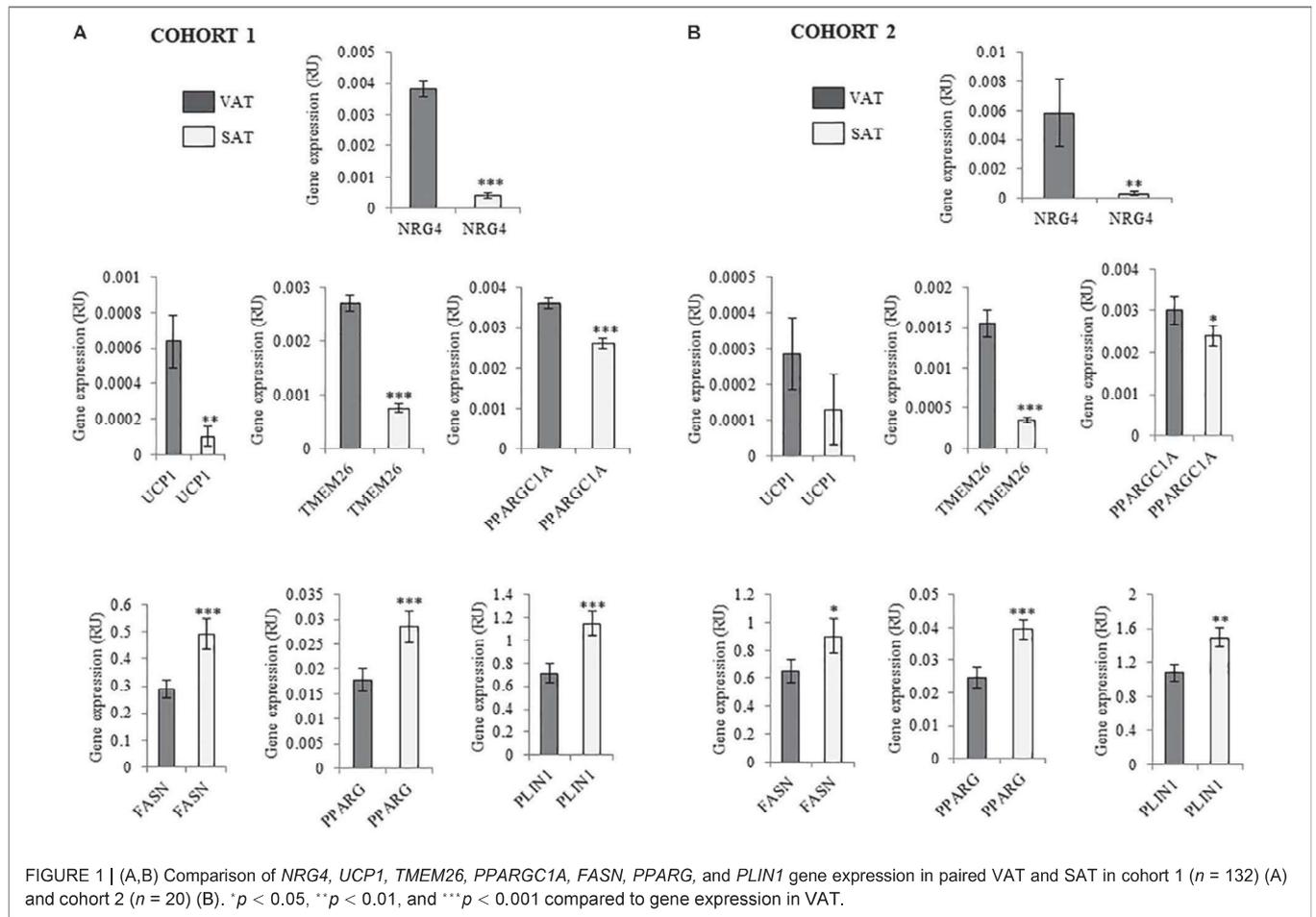


FIGURE 1 | (A,B) Comparison of *NRG4*, *UCP1*, *TMEM26*, *PPARGC1A*, *FASN*, *PPARG*, and *PLIN1* gene expression in paired VAT and SAT in cohort 1 ( $n = 132$ ) (A) and cohort 2 ( $n = 20$ ) (B). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  compared to gene expression in VAT.

TABLE 3 | Correlation between *NRG4* gene expression and anthropometric and clinical characteristics and selected gene expression in SAT ( $n = 176$ ) and VAT ( $n = 155$ ) from cohort 1.

	VAT		SAT	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Age (years)	-0.02	0.7	0.11	0.2
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.28	<0.0001	0.06	0.5
Fasting glucose (mg/dl)	0.17	0.03	0.01	0.8
HOMA <sub>IR</sub> ( $n = 56$ )	0.17	0.3	-0.32	0.02
Total cholesterol (mg/dl)	-0.10	0.2	0.11	0.2
HDL cholesterol (mg/dl)	-0.01	0.9	0.15	0.1
LDL cholesterol (mg/dl)	-0.09	0.3	0.08	0.4
Fasting triglycerides (mg/dl)	0.05	0.5	-0.09	0.3
<i>FASN</i> (RU)	-0.37	<0.0001	-0.05	0.6
<i>PPARG</i> (RU)	-0.39	<0.0001	0.05	0.6
<i>SLC2A4</i> (RU)	-0.33	0.002	0.12	0.2
<i>PLIN1</i> (RU)	-0.15	0.1	-0.10	0.4
<i>PPARGC1A</i> (RU)	0.06	0.5	0.18	0.05
<i>UCP1</i> (RU)	0.30	0.005	0.30	0.001
<i>UCP3</i> (RU)	0.29	0.005	0.13	0.1
<i>TMEM26</i> (RU)	0.77	<0.0001	0.56	<0.0001
<i>IL6</i> (RU)	-0.45	<0.0001	0.06	0.5
<i>IL8</i> (RU)	-0.36	0.001	-0.05	0.6

Bold values mean that *p*-value reached statistical significance.

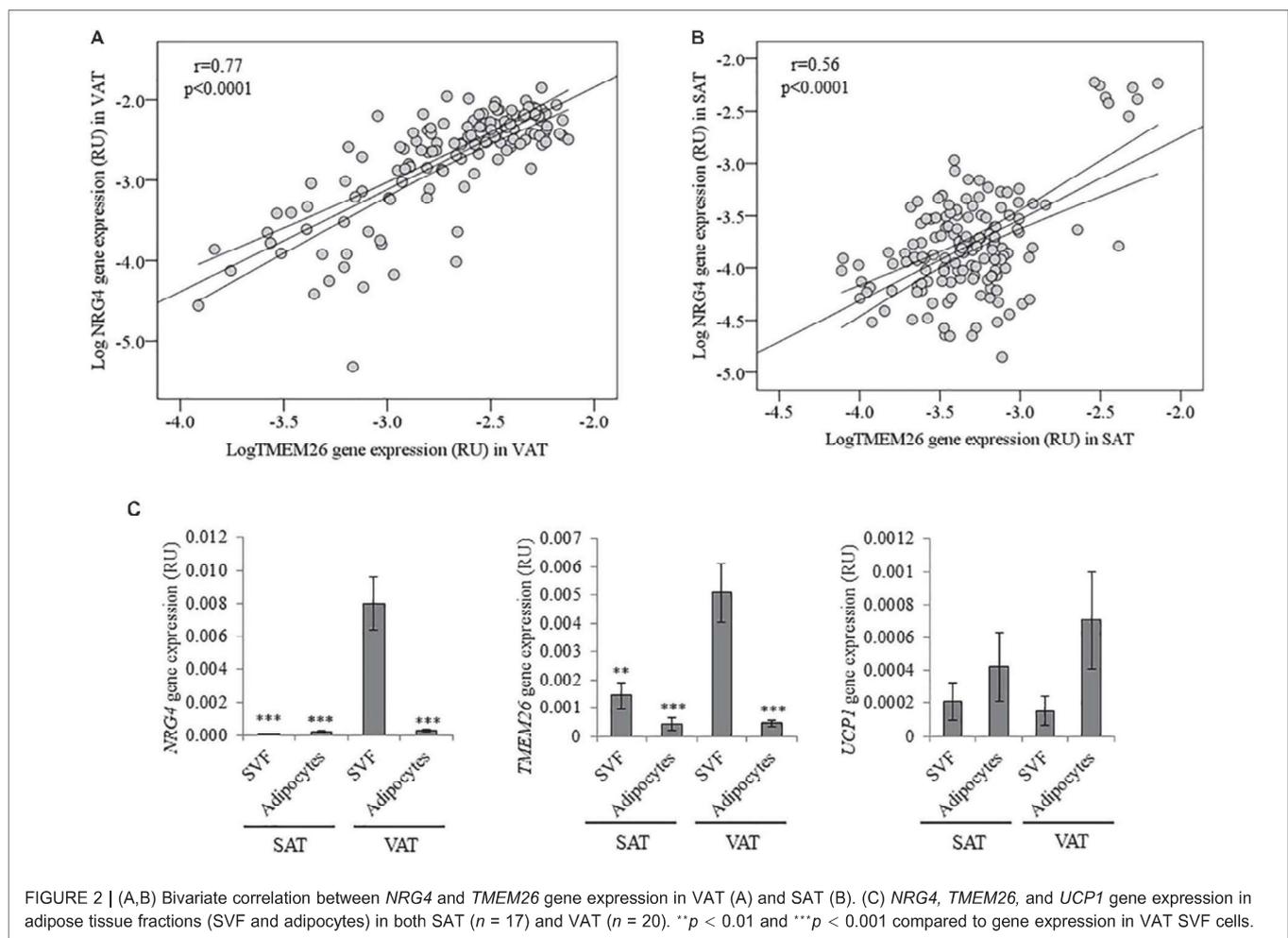


FIGURE 2 | (A,B) Bivariate correlation between *NRG4* and *TMEM26* gene expression in VAT (A) and SAT (B). (C) *NRG4*, *TMEM26*, and *UCP1* gene expression in adipose tissue fractions (SVF and adipocytes) in both SAT ( $n = 17$ ) and VAT ( $n = 20$ ). \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared to gene expression in VAT SVF cells.

TABLE 4 | Anthropometric and clinical characteristics according to glucose tolerance in cohort 2.

	NGT	IGT	T2D	$p$
	11	10	13	
Age (years)	41.6 ± 4.1	50 ± 8.5*	51.5 ± 7.5*	0.004
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	46.3 ± 8.7	47.8 ± 3.2	44.7 ± 8.1	0.6
Fasting glucose (mg/dl) <sup>a</sup>	90 (83–98)	102.5 (96–107)	121 (100.5–132)*	0.003
M [mg/(kg.min)] <sup>a</sup>	4.35 (2.21–6.28)	3.41 (1.92–5.21)	2.79 (1.68–4.31)	0.6
Total-cholesterol (mg/dl) <sup>a</sup>	182 (163–221)	207 (184.5–252)	179 (162–209)	0.07
HDL-cholesterol (mg/dl) <sup>a</sup>	49 (40–58)	45 (34.5–55.5)	46 (40.5–49.5)	0.5
LDL-cholesterol (mg/dl) <sup>a</sup>	105 (95–129)	147 (110.7–176.2)	108 (84.5–133)	0.03
Fasting triglycerides (mg/dl) <sup>a</sup>	99 (68–134)	141.5 (66.7–190.7)	139 (87.5–183)	0.4
VAT <i>NRG4</i> (RU) × 10 <sup>-3a</sup>	4.04 (1.11–6.08)	2.97 (0.141–5.92)	3.37 (2.14–6.17)	0.4
SAT <i>NRG4</i> (RU) × 10 <sup>-3a</sup>	0.172 (0.072–0.287)	0.099 (0.081–0.129)	0.131 (0.039–0.182)	0.4

VAT, visceral adipose tissue; SAT, subcutaneous adipose tissue; NGT, normal glucose tolerance; IGT, impaired glucose tolerance; T2D, type 2 diabetes; M, insulin sensitivity obtained from hyperinsulinemic-euglycemic clamp; RU, relative gene expression units.

<sup>a</sup>Median and interquartile range.

\* $p < 0.05$  compared to NGT participants after performing Bonferroni post hoc test. Bold values mean that  $p$ -value reached statistical significance.

in the samples with the highest correlation between *NRG4* and *TMEM26* ( $r = 0.77$ ,  $p < 0.0001$ ). However, the correlations between VAT *NRG4* and *UCP1*, *UCP3*, lipogenic/adipogenic -

and inflammatory-related gene expression were not replicated in morbidly obese participants (cohort 2). Further studies in human adipose tissue should be required to validate these correlations.

TABLE 5 | Correlation between *NRG4* gene expression and anthropometric and clinical characteristics and selected gene expression in SAT ( $n = 25$ ) and VAT ( $n = 34$ ) from cohort 2.

	VAT		SAT	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Age (years)	-0.07	0.7	-0.17	0.4
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.06	0.7	-0.08	0.7
Fasting glucose (mg/dl)	0.13	0.4	-0.21	0.3
M [mg/(kg.min)]	-0.03	0.9	0.43	0.04
Total cholesterol (mg/dl)	-0.23	0.2	-0.22	0.3
HDL cholesterol (mg/dl)	0.07	0.7	0.11	0.5
LDL cholesterol (mg/dl)	-0.07	0.7	-0.27	0.2
Fasting triglycerides (mg/dl)	-0.14	0.4	-0.14	0.5
<i>FASN</i> (RU)	0.05	0.8	0.13	0.6
<i>PPARG</i> (RU)	-0.09	0.6	0.17	0.4
<i>SLC2A4</i> (RU)	-0.09	0.6	0.49	0.01
<i>PLIN1</i> (RU)	0.04	0.8	-0.15	0.5
<i>PPARGC1A</i> (RU)	0.37	0.1	0.04	0.8
<i>UCP1</i> (RU)	0.29	0.1	0.43	0.04
<i>UCP3</i> (RU)	0.13	0.6	0.03	0.8
<i>TMEM26</i> (RU)	0.56	0.002	0.51	0.01
<i>IL6</i> (RU)	0.03	0.9	-0.10	0.6

**Bold values mean that *p*-value reached statistical significance.**

Furthermore, in both cohort 1 and 2, similar to beige adipocytes-related genes (*TMEM26*), *NRG4* gene expression was significantly more expressed in VAT, whereas, as expected adipogenic-related genes were more expressed in SAT (Sauma et al., 2007; Moreno-Navarrete et al., 2016; Zuriaga et al., 2017). Contrary to mice, increased pattern of browning gene expression in human VAT compared to SAT has been reported (Zuriaga et al., 2017). Interestingly, *NRG4* and *TMEM26* gene expression was enriched in SVFs from VAT compared to SVFs from SAT or adipocytes from VAT or SAT. This finding points to a specific population of beige precursor cells in VAT, characterized by increased *NRG4* and *TMEM26* gene expression, and could explain the increased expression of beige/browning-related genes observed in this fat depot (current data and Zuriaga et al., 2017). Reinforcing this idea, previous studies demonstrated that *TMEM26* gene expression was also increased in SVF and decreased in the late stages of beige adipocyte differentiation, and indicated its abundance in the precursors of beige adipocytes (Lee et al., 2015; Garcia et al., 2016).

Altogether these findings indicated *NRG4* as an additional marker of beige adipocytes in human adipose tissue, and suggested a possible role of this factor in the development of beige adipocytes in human fat depots. Supporting this hypothesis, Rosell et al. (2014) suggested that *NRG4* might promote the growth of neurites in adipose tissue, increasing sympathetic innervation and in consequence, enhancing browning of WAT. Regarding the possible role of *NRG4* on thermogenic activity, Wang et al. (2014) demonstrated in *Nrg4* deficient mice that *Nrg4* did not directly participate in BAT thermogenesis, but Ma et al. (2016) showed that *Nrg4* overexpression enhanced BAT activity with an increase of  $\sim 1^\circ\text{C}$  body temperature, and BAT and iWAT thermogenic gene expression. These studies supported a possible role of *NRG4* in beiging of human adipose tissue, but

contradictory data in relation to its thermogenic activity. Further functional studies in human adipose tissue should be required to confirm the possible role of *NRG4* in this process.

Another interesting finding of current study was the positive association between SAT *NRG4* gene expression and insulin sensitivity. In a previous study, SAT and VAT *NRG4* was significantly decreased in patients with impaired glucose tolerance (IGT) and T2D (Wang et al., 2014), but this study did not evaluate insulin sensitivity. Even though, no significant differences were found in relation to IGT or T2D, probably due to the relatively low number of adipose tissue samples compared to the previous study ( $n = 642$ ) (Wang et al., 2014). The current study showed a positive association between SAT *NRG4* and insulin sensitivity in both cohort 1 and cohort 2, evaluated by two different methods (HOMA<sub>IR</sub> in cohort 1 and hyperinsulinemic-euglycemic clamp in cohort 2). In agreement with these findings, mice studies demonstrated that liver and adipose tissue *Nrg4* overexpression improved insulin sensitivity and glucose tolerance and prevented HFD-induced hyperinsulinemia (Ma et al., 2016). In fact, two recent studies (López-Soldado et al., 2016; Zhang P. et al., 2018) demonstrated that recombinant neuregulin administration improved glucose tolerance in both control and diabetic rats by enhancing hepatic glucose utilization (López-Soldado et al., 2016) and insulin sensitivity in high fat-fed mice (Zhang P. et al., 2018).

On the other hand, contrary to previous study that demonstrated that SAT *NRG4* was negatively correlated with body fat mass (Wang et al., 2014), in the current study no significant association was found between SAT *NRG4* and BMI. In cohort 1, VAT *NRG4* gene expression was increased in obese compared to non-obese participants, and positively correlated with BMI, but in cohort 2, VAT *NRG4* gene expression was not correlated with BMI. Of note, similar *NRG4* gene expression

values were observed comparing obese participants from cohort 1 vs. those from cohort 2. Strikingly, the positive effects of diet-induced weight loss reducing body fat mass werenot associated with expression of brown/beige-related genes (Barquissau et al., 2018). However, additional studies will be necessary to clarify the relationship between human adipose tissue *NRG4* and obesity.

A significant limitation of current study was the absence of VAT or SAT *NRG4* protein analysis by scarce availability of adipose tissue lysates for protein in the same tissue samples used for RNA analysis. Similar to this, *NRG4* protein analysis wasn't evaluated in recent relevant studies that demonstrated the importance of *NRG4* in adipose tissue (Wang et al., 2014; Chen et al., 2017; Guo et al., 2017; Nugroho et al., 2018; Pellegrinelli et al., 2018). Thus, additional studies should be performed to investigate if *NRG4* protein follows the same pattern of mRNA expression in human adipose tissue. Interestingly and consistent with current findings, increased *NRG4* mRNA and protein release in human beige adipogenesis of mural-like mesenchymal stem cell was more recently reported (Su et al., 2018), indicating that *NRG4* gene expression were correlated with *NRG4* protein levels and supporting *NRG4* participation in beige adipocyte differentiation. However, it is important to note that expression of *NRG4* and brown/beige adipose tissue markers (*UCP1*, *UCP3*, and *TMEM26*) were extremely low, suggesting that browning of white adipose tissue in humans may have less relevance than in mice.

In conclusion, all these observations suggest *NRG4* gene expression as a novel marker of beige adipocytes in human adipose tissue.

## REFERENCES

- Aziz, S. A., Wakeling, L. A., Miwa, S., Alberdi, G., Hesketh, J. E., and Ford, D. (2017). Metabolic programming of a beige adipocyte phenotype by genistein. *Mol. Nutr. Food. Res.* 61:1600574. doi: 10.1002/mnfr.2016 00574
- Barquissau, V., Léger, B., Beuzelin, D., Martins, F., Amri, E. Z., Pisani, D. F., et al. (2018). Caloric restriction and diet-induced weight loss do not induce browning of human subcutaneous white adipose tissue in women and men with obesity. *Cell. Rep.* 22, 1079–1089. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.102
- Bartelt, A., and Heeren, J. (2014). Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 24–36. doi: 10.1038/nrendo.2013.204
- Cantó, C., Pich, S., Paz, J. C., Sanches, R., Martínez, V., Orpinelli, M., et al. (2007). Neuregulins increase mitochondrial oxidative capacity and insulin sensitivity in skeletal muscle cells. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 56, 2185–2193. doi: 10.2337/db06-1726
- Cantó, C., Suárez, E., Lizcano, J. M., Griñó, E., Shepherd, P. R., Fryer, L. G., et al. (2004). Neuregulin signaling on glucose transport in muscle cells. *J. Biol. Chem.* 279, 12260–12268. doi: 10.1074/jbc.M308554200
- Chen, Z., Wang, G. X., Ma, S. L., Jung, D. Y., Ha, H., Altamimi, T., et al. (2017). *Nrg4* promotes fuel oxidation and a healthy adipokine profile to ameliorate diet-induced metabolic disorders. *Mol. Metab.* 6, 863–872. doi: 10.1016/j.molmet.2017.03.016
- Ennequin, G., Boisseau, N., Caillaud, K., Chavanelle, V., Etienne, M., Li, X., et al. (2015). Neuregulin 1 improves glucose tolerance in db/db mice. *PLoS One* 10:e0130568. doi: 10.1371/journal.pone.0130568
- Finlin, B. S., Zhu, B., Confides, A. L., Westgate, P. M., Harfmann, B. D., Dupont-Versteegden, E. E., et al. (2017). Mast cells promote seasonal white adipose beiging in humans. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 66, 1237–1246. doi: 10.2337/db16-1057

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

JF-R and JM-N participated in study design and analysis of data and wrote and edited the manuscript. FC, CM, MS, FO, JL, and FD-S participated in acquisition of data. JA, MC, AG, and WR participated in interpretation of data. FC, CM, MS, FO, JL, FD-S, JA, MC, AG, and WR revised the manuscript critically for important intellectual content. All authors participated in final approval of the version to be published.

## FUNDING

This work was partially supported by research grants PI16/01173 from the Instituto de Salud Carlos III from Spain, FEDER funds and by Fundació Marató de TV3 (201626-30). CIBEROBN Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición is an initiative from the Instituto de Salud Carlos III and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) from Spain.

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the technical assistance of Emili Loshuertos (IdIBGi) and Oscar Rovira (IdIBGi). We also want to particularly acknowledge the patients, the *FATBANK* platform promoted by the *CIBEROBN* and the *IDIBGI* Biobank (Biobanc *IDIBGI*, B.0000872), integrated in the Spanish National Biobanks Network, for their collaboration and coordination.

- Garcia, R. A., Roemmich, J. N., and Claycombe, K. J. (2016). Evaluation of markers of beige adipocytes in white adipose tissue of the mouse. *Nutr. Metab.* 13:24. doi: 10.1186/s12986-016-0081-2
- Gonzalez-Hurtado, E., Lee, J., Choi, J., and Wolfgang, M. J. (2018). Fatty acid oxidation is required for active and quiescent brown adipose tissue maintenance and thermogenic programming. *Mol. Metab.* 7, 45–56. doi: 10.1016/j.molmet.2017.11.004
- Guo, L., Zhang, P., Chen, Z., Xia, H., Li, S., Zhang, Y., et al. (2017). Hepatic neuregulin 4 signaling defines an endocrine checkpoint for steatosis-to-NASH progression. *J. Clin. Invest.* 127, 4449–4461. doi: 10.1172/JCI 96324
- Haskins, J. W., Zhang, S., Means, R. E., Kelleher, J. K., Cline, G. W., Canfrán-Duque, A., et al. (2015). Neuregulin-activated ERBB4 induces the SREBP-2 cholesterol biosynthetic pathway and increases low-density lipoprotein uptake. *Sci. Signal.* 8:ra111. doi: 10.1126/scisignal.aac5124
- Hepler, C., Shao, M., Xia, J. Y., Ghaben, A. L., Pearson, M. J., Vishvanath, L., et al. (2017). Directing visceral white adipocyte precursors to a thermogenic adipocyte fate improves insulin sensitivity in obese mice. *eLife* 6:e27669. doi: 10.7554/eLife.27669
- Huang, L., Pan, D., Chen, Q., Zhu, L. J., Ou, J., Wabitsch, M., et al. (2017). Transcription factor Hlx controls a systematic switch from white to brown fat through Prdm16-mediated co-activation. *Nat. Commun.* 8:68. doi: 10.1038/s41467-017-00098-2
- Lee, M. W., Odegaard, J. I., Mukundan, L., Qiu, Y., Molofsky, A. B., Nussbaum, J. C., et al. (2015). Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell* 160, 74–87. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.011
- López-Soldado, I., Niisuke, K., Veiga, C., Adrover, A., Manzano, A., Martínez-Redondo, V., et al. (2016). Neuregulin improves response to glucose tolerance test in control and diabetic rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 310, E440–E451. doi: 10.1152/ajpendo.00226.2015

- Ma, Y., Gao, M., and Liu, D. (2016). Preventing high fat diet-induced obesity and improving insulin sensitivity through neuregulin 4 gene transfer. *Sci. Rep.* 6:26242. doi: 10.1038/srep26242
- Moreno-Navarrete, J. M., Escoté, X., Ortega, F., Serino, M., Campbell, M., Michalski, M. C., et al. (2013). A role for adipocyte-derived lipopolysaccharide-binding protein in inflammation- and obesity-associated adipose tissue dysfunction. *Diabetologia* 56, 2524–2537. doi: 10.1007/s00125-013-3015-9
- Moreno-Navarrete, J. M., Jove, M., Ortega, F., Xifra, G., Ricart, W., Obis, È, et al. (2016). Metabolomics uncovers the role of adipose tissue PDKK in adipogenesis and systemic insulin sensitivity. *Diabetologia* 59, 822–832. doi: 10.1007/s00125-016-3863-1
- Nugroho, D. B., Ikeda, K., Barinda, A. J., Wardhana, D. A., Yagi, K., Miyata, K., et al. (2018). Neuregulin-4 is an angiogenic factor that is critically involved in the maintenance of adipose tissue vasculature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 503, 378–384. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.06.043
- Pellegrinelli, V., Peirce, V. J., Howard, L., Virtue, S., Türei, D., Senzacqua, M., et al. (2018). Adipocyte-secreted BMP8b mediates adrenergic-induced remodeling of the neuro-vascular network in adipose tissue. *Nat. Commun.* 9:4974. doi: 10.1038/s41467-018-07453-x
- Rabhi, N., Hannou, S. A., Gromada, X., Salas, E., Yao, X., Oger, F., et al. (2018). Cdkn2a deficiency promotes adipose tissue browning. *Mol. Metab.* 8, 65–76. doi: 10.1016/j.molmet.2017.11.012
- Rosell, M., Kafourou, M., Frontini, A., Okolo, A., Chan, Y. W., Nikolopoulou, E., et al. (2014). Brown and white adipose tissues: intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306, E945–E964. doi: 10.1152/ajpendo.00473.2013
- Sauma, L., Franck, N., Paulsson, J. F., Westermark, G. T., Kjølhede, P., Strålfors, P., et al. (2007). Peroxisome proliferator activated receptor gamma activity is low in mature primary human visceral adipocytes. *Diabetologia* 50, 195–201. doi: 10.1007/s00125-006-0515-x
- Su, S., Guntur, A. R., Nguyen, D. C., Fakory, S. S., Doucette, C. C., Leech, C., et al. (2018). A renewable source of human beige adipocytes for development of therapies to treat metabolic syndrome. *Cell Rep.* 25, 3215.e9–3228.e9. doi: 10.1016/j.celrep.2018.11.037
- Suárez, E., Bach, D., Cadefau, J., Palacin, M., Zorzano, A., and Gumá, A. (2001). A novel role of neuregulin in skeletal muscle. Neuregulin stimulates glucose uptake, glucose transporter translocation, and transporter expression in muscle cells. *J. Biol. Chem.* 276, 18257–18264. doi: 10.1074/jbc.M008100200
- Torriani, M., Srinivasa, S., Fitch, K. V., Thomou, T., Wong, K., Petrow, E., et al. (2016). Dysfunctional subcutaneous fat with reduced Dicer and brown adipose tissue gene expression in HIV-infected patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 1225–1234. doi: 10.1210/jc.2015-3993
- Wang, G. X., Zhao, X. Y., Meng, Z. X., Kern, M., Dietrich, A., Chen, Z., et al. (2014). The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis. *Nat. Med.* 20, 1436–1443. doi: 10.1038/nm.3713
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., et al. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150, 366–376. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.016
- Wu, W., Shi, F., Liu, D., Ceddia, R. P., Gaffin, R., Wei, W., et al. (2017). Enhancing natriuretic peptide signaling in adipose tissue, but not in muscle, protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Sci. Signal.* 10:489. doi: 10.1126/scisignal.aam6870
- Zeng, F., Wang, Y., Kloepfer, L. A., Wang, S., and Harris, R. C. (2018). ErbB4 deletion predisposes to development of metabolic syndrome in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 315, E583–E593. doi: 10.1152/ajpendo.00166.2018
- Zhang, P., Kuang, H., He, Y., Idiga, S. O., Li, S., Chen, Z., et al. (2018). NRG1-Fc improves metabolic health via dual hepatic and central action. *JCI Insight* 3:98522. doi: 10.1172/jci.insight.98522
- Zhang, S., Cao, H., Li, Y., Jing, Y., Liu, S., Ye, C., et al. (2018). Metabolic benefits of inhibition of p38 $\alpha$  in white adipose tissue in obesity. *PLoS Biol.* 16:e2004225. doi: 10.1371/journal.pbio.2004225
- Zuriaga, M. A., Fuster, J. J., Gokce, N., and Walsh, K. (2017). Humans and mice display opposing patterns of “Browning” gene expression in visceral and subcutaneous white adipose tissue depots. *Front. Cardiovasc. Med.* 4:27. doi: 10.3389/fcvm.2017.00027

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Comas, Martínez, Sabater, Ortega, Latorre, Díaz-Sáez, Aragonés, Camps, Gumà, Ricart, Fernández-Real and Moreno-Navarrete. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.





## Serum neuregulin 4 is negatively correlated with insulin sensitivity in humans and impairs mitochondrial respiration in HepG2 cells

*Cristina Martínez, Jèssica Latorre, Francisco Ortega, María Arñoriaga-Rodríguez, Aina Lluch, Núria Oliveras-Cañellas, Francisco Díaz-Sáez, Julian Aragonés, Marta Camps, Anna Gumà, Wifredo Ricart<sup>1</sup>, José Manuel Fernández-Real, José María Moreno-Navarrete*

**FACTOR IMPACTO:** 4755 (Q1, Frontiers in Physiology)

En este estudio se planteó el siguiente objetivo:

- Investigar la posible relación entre el NRG4 circulante y los trastornos metabólicos asociados a la obesidad en sujetos no diabéticos con una amplia gama de adiposidad





## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Rushita Bagchi,  
University of Arkansas for Medical  
Sciences, United States

## REVIEWED BY

Milton Prabu,  
Annamalai University, India  
Gulali Aktas,  
Abant İzzet Baysal University, Turkey

## \*CORRESPONDENCE

José Manuel Fernández-Real,

jmfreal@idibgi.org  
José María Moreno-Navarrete,

jmoreno@idibgi.org

<sup>†</sup>These authors have contributed equally  
to this work

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to Integrative  
Physiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Physiology

RECEIVED 23 May 2022

ACCEPTED 30 August 2022

PUBLISHED 15 September 2022

## CITATION

Martínez C, Latorre J, Ortega F,  
Arnoriaga-Rodríguez M, Lluch A,  
Oliveras-Cañellas N, Díaz-Sáez F,  
Aragonés J, Camps M, Gumà A,  
Ricart W, Fernández-Real JM and  
Moreno-Navarrete JM (2022), Serum  
neuregulin 4 is negatively correlated  
with insulin sensitivity in humans and  
impairs mitochondrial respiration  
in HepG2 cells.

Front. Physiol. 13:950791.

doi: 10.3389/fphys.2022.950791

## COPYRIGHT

© 2022 Martínez, Latorre, Ortega,  
Arnoriaga-Rodríguez, Lluch, Oliveras-  
Cañellas, Díaz-Sáez, Aragonés, Camps,  
Gumà, Ricart, Fernández-Real and  
Moreno-Navarrete. This is an open-  
access article distributed under the  
terms of the [Creative Commons  
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,  
distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the  
original author(s) and the copyright  
owner(s) are credited and that the  
original publication in this journal is  
cited, in accordance with accepted  
academic practice. No use, distribution  
or reproduction is permitted which does  
not comply with these terms.

# Serum neuregulin 4 is negatively correlated with insulin sensitivity in humans and impairs mitochondrial respiration in HepG2 cells

Cristina Martínez<sup>1,2†</sup>, Jèssica Latorre<sup>1,2†</sup>, Francisco Ortega<sup>1,2</sup>,  
María Arnoriaga-Rodríguez<sup>1,2</sup>, Aina Lluch<sup>1,2</sup>,

Núria Oliveras-Cañellas<sup>1,2</sup>, Francisco Díaz-Sáez<sup>3,4</sup>,

Julian Aragonés<sup>5,6</sup>, Marta Camps<sup>3,4,7</sup>, Anna Gumà<sup>3,4,7</sup>,

Wifredo Ricart<sup>1,2</sup>, José Manuel Fernández-Real<sup>1,2,8\*</sup> and  
José María Moreno-Navarrete<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Institut d'Investigació Biomèdica de Girona, Girona, Spain, <sup>2</sup>CIBEROBN (CB06/03/010), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, <sup>3</sup>Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain, <sup>4</sup>Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain, <sup>5</sup>Research Unit, Hospital of Santa Cristina, Research Institute Princesa, Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain, <sup>6</sup>CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, Carlos III Health Institute, Madrid, Spain, <sup>7</sup>CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, <sup>8</sup>Department of Medicine, University of Girona, Girona, Spain

Neuregulin 4 (NRG4) has been described to improve metabolic disturbances linked to obesity status in rodent models. The findings in humans are controversial. We aimed to investigate circulating NRG4 in association with insulin action in humans and the possible mechanisms involved. Insulin sensitivity (euglycemic hyperinsulinemic clamp) and serum NRG4 concentration (ELISA) were analysed in subjects with a wide range of adiposity ( $n = 89$ ). *In vitro* experiments with human HepG2 cell line were also performed. Serum NRG4 was negatively correlated with insulin sensitivity ( $r = -0.25$ ,  $p = 0.02$ ) and positively with the inflammatory marker high-sensitivity C reactive protein (hsCRP). In fact, multivariate linear regression analyses showed that insulin sensitivity contributed to BMI-, age-, sex-, and hsCRP-adjusted 7.2% of the variance in serum NRG4 ( $p = 0.01$ ). No significant associations were found with adiposity measures (BMI, waist circumference or fat mass), plasma lipids (HDL-, LDL-cholesterol, or fasting triglycerides) or markers of liver injury. Cultured hepatocyte HepG2 treated with human recombinant NRG4 had an impact on hepatocyte metabolism, leading to decreased gluconeogenic- and mitochondrial biogenesis-related gene expression, and reduced mitochondrial respiration, without effects on expression of lipid metabolism-related genes. Similar but more pronounced effects were found after neuregulin 1 administration. In conclusion, sustained higher serum levels of neuregulin-4, observed in insulin resistant patients may have deleterious effects on metabolic and mitochondrial function in hepatocytes. However, findings from *in vitro* experiments should be confirmed in human primary hepatocytes.

## KEYWORDS

neuregulin 4, obesity, insulin resistance, mitochondrial respiration, HepG2 cells

## Introduction

Neuregulins are members of the large epidermal growth factors (EGF) family of proteins, encoded by four different genes (NRG1-4) that encode multiple isoforms characterized by the presence of an EGF-like domain that mediates their biological activity through binding to the receptors tyrosine kinase ErbB3 and ErbB4 (Meyer et al., 1997; Gumà et al., 2020). The role of neuregulins in energy balance, glucose and lipid metabolism, and their implication in metabolic syndrome, have been investigated in recent years. ErbB receptors have been demonstrated to be expressed in skeletal myocytes, with NRG1 being key to skeletal muscle development, myogenesis, and regulation of muscle metabolism by stimulating glucose utilization (Suárez et al., 2001; Cantó et al., 2007; Caillaud et al., 2016; Ennequin et al., 2017; Heim et al., 2020), and in the proliferation of cardiomyocytes during heart regeneration (Honkoop et al., 2019). Recombinant neuregulin administration in Zucker diabetic fatty rats enhanced glucose tolerance through the activation of the ErbB3/PI3K/PKB signalling pathway in liver, but not in muscle (López-Soldado et al., 2016). In addition, a recent study demonstrated that NRG4 is required for insulin-induced glucose uptake in mouse 3T3-L1 cells (Díaz-Sáez et al., 2021). NRG4 or ErbB4-induced downregulation led to insulin resistance and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice (Wang et al., 2014; Zenget al., 2018; Wang et al., 2019a; Zhu et al., 2020), supporting the importance of NRG4-ErbB4 signalling in the prevention of obesity-associated metabolic disturbances.

In humans, the association between NRG4 and obesity-associated insulin resistance and liver steatosis is less clear and controversial. Some studies demonstrated an inverse association between circulating NRG4 concentration and characteristics of the metabolic syndrome or the presence of non-alcoholic fatty liver disease (Dai et al., 2015; Wang et al., 2019b). Other investigations reported increased levels of NRG4 in patients with type 2 diabetes, altered glucose tolerance or obesity (Kang et al., 2016; Chen et al., 2017a; Kurek Eken et al., 2018). Chen et al. (2017a) analysed serum NRG4 in 310 subjects (83 with normal glucose tolerance, 129 with prediabetes and 96 with type 2 diabetes). Circulating NRG4 was significantly increased in the prediabetic and diabetic groups. Kurek Eken et al. (2018) also described increased serum NRG4 levels in women with gestational diabetes mellitus in association with increased BMI, glucose at 2-h of an oral glucose tolerance test and HOMA-IR. Kang et al. (2016) also found increased serum levels of NRG4 in participants with overweight (mean BMI  $27 \pm 4.02$  kg/m<sup>2</sup>) and type 2 diabetes compared to participants

without obesity (mean BMI  $24.1 \pm 2.65$  kg/m<sup>2</sup>). Consistently, a recent meta-analysis, in which seven studies were included, concluded that circulating NRG4 was associated with alterations in glucose metabolism and obesity (Wang et al., 2019c).

No study has evaluated, to our knowledge, serum NRG4 in association with gold standard measures of insulin action (euglycemic hyperinsulinemic clamp) or its possible mechanisms in human cells. In the present study, we aimed to investigate the potential relationship between circulating NRG4 and obesity-associated metabolic disturbances in non-diabetic subjects with a wide range of adiposity. We also evaluated the metabolic impact of neuregulins and the effects of NRG1 and NRG4 on palmitate-treated hepatocytes of the human HepG2 cell line.

## Methods

### Participants recruitment

From January 2016 to October 2017, a cross-sectional case-control study was undertaken in the Endocrinology Department of Josep Trueta University Hospital. We included 89 consecutive subjects, 55 with obesity (BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) participants, and 34 without obesity (BMI  $< 30$  kg/m<sup>2</sup>) similar in age (age range of 28–66 years) and sex distribution. Exclusion criteria were type 2 diabetes, clinically significant hepatic, neurological, or other major systemic disease, including malignancy, infection in the previous month, an elevated serum creatinine concentration, acute major cardiovascular event in the previous 6 months, acute illnesses and current evidence of high grade chronic inflammatory or infective diseases, serious chronic illness,  $> 20$  g ethanol intake/day, or use of medications that might interfere with insulin action. Liver and thyroid dysfunction were specifically excluded by biochemical work-up. Samples and data from patients included in this study were provided by the FATBANK platform promoted by the CIBEROBN and coordinated by the IDIBGI Biobank (Biobanc IDIBGI, B.0000872), integrated in the Spanish National Biobanks Network and they were processed following standard operating procedures with the appropriate approval of the Ethics, External Scientific and FATBANK Internal Scientific Committees. To ensure blinding in outcome analyses, all samples were codified.

The institutional review board—Ethics Committee and the Committee for Clinical Research (CEIC) of Dr. Josep Trueta University Hospital (Girona, Spain) approved the study protocol and informed written consent was obtained from all participants.

## Anthropometric measurements and analytical methods

BMI was calculated as the weight in kilograms divided by height in meters squared. The waists of participants were measured with a soft tape midway between the lowest rib and the iliac crest, and hip circumference was measured at the widest part of the gluteal region. Body composition was assessed using a dual energy X-ray absorptiometry (DEXA, GE Lunar, Madison, Wisconsin). Serum glucose concentrations were measured in duplicate by the glucose oxidase method using a Beckman glucose analyzer II (Beckman Instruments, Brea, California). Glycated haemoglobin (HbA1c) was measured by the high-performance liquid chromatography method (autoanalyser Jokoh HS-10, Bio-Rad, Muenchen, Germany). HDL-cholesterol was quantified following precipitation with polyethylene glycol at room temperature. The Friedewald formula was used to calculate the concentration of LDL-cholesterol. Total serum triglycerides were measured through the reaction of glycerol-phosphate-oxidase and peroxidase on a Hitachi 917 instrument (Roche, Mannheim, Germany). High-sensitivity (hs) C-reactive protein (ultrasensitive assay; 110 Beckman, Fullerton, CA), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (ASP) and gamma glutamyl transferase (GGT) were determined by a routine laboratory test. Serum neuregulin 4 (NRG4) concentrations were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Aviscera Biosciences, Santa Clara, CA). This assay has been shown to be highly sensitive to human NRG4 with a sensitivity of 0.25 ng/ml. Intra- and inter-assay variations were both less than 10%.

## Hyperinsulinemic-euglycemic clamp

Insulin action was determined using the hyperinsulinemic-euglycemic clamp. After an overnight fast, two catheters were inserted into an antecubital vein, one for each arm, used to administer constant infusions of glucose and insulin and to obtain arterialized venous blood samples. A 2-h hyperinsulinemic-euglycemic clamp was initiated by a two-step primed infusion of insulin (80 mU/m<sup>2</sup>/min for 5 min, 60 mU/m<sup>2</sup>/min for 5 min) immediately followed by a continuous infusion of insulin at a rate of 40 mU/m<sup>2</sup>/min (regular insulin [Actrapid; Novo Nordisk, Plainsboro, NJ]). Glucose infusion began at minute four at an initial perfusion rate of 2 mg/kg/min being then adjusted to maintain plasma glucose concentration at 88.3–99.1 mg/dl. Blood samples were collected every 5 min for determination of plasma glucose and insulin. Insulin sensitivity was assessed as the mean glucose infusion rate during the last 40 min. In the stationary equilibrium, the amount of glucose administered (M) equals

the glucose taken by the body tissues and is a measure of overall insulin sensitivity.

## *In vitro* experiments

Human hepatoma HepG2 cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 100 units ml<sup>-1</sup> penicillin and streptomycin, 1% glutamine and 1% sodium pyruvate, at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Palmitic acid (PA) was prepared as follows: 27.84 mg of PA (Sigma, San Luis, MO) were dissolved in 1 ml sterile water to make a 100 mM stock solution. Bovine serum albumin (BSA, 5%) was prepared in serum-free DMEM. 100 mM PA stock solution and 5% BSA were mixed for at least 1 h at 40°C to obtain a 5 mM solution. Cells were treated with PA 500 μM in combination with each of the neuregulin, human recombinant NRG4 (Cat no RKQ8WWG1, ReproKine Ltd., Rehobot, Israel) and NRG1 (Cat no 396-HB, R&D Systems, Inc., MN, United States) at 50 ng/ml during 48 h. The functionality of the dose and incubation period of these proteins was based on the validation performed in a previous study (Díaz-Sáez et al., 2021). BSA supplemented medium was used as control when necessary. All experimental conditions were performed in four biological replicates in two independent experiments. After treatment, cells were washed with phosphate buffered saline and collected with Qiazol for RNA purification.

## Gene expression analysis

RNA purification, gene expression procedures and analyses were performed, as previously described (Ortega et al., 2015). Briefly, RNA purification was performed using RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, Izasa SA, Barcelona, Spain) and the integrity was checked by Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Gene expression was assessed by real time PCR using a LightCycler<sup>®</sup> 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics SL, Barcelona, Spain), using TaqMan<sup>®</sup> and SYBR green technology suitable for relative genetic expression quantification. The RT-PCR reaction was performed in a final volume of 12 μl. The cycle program consisted of an initial denaturing of 10 min at 95°C then 40 cycles of 15 s denaturing phase at 95°C and 1 min annealing and extension phase at 60°C. A threshold cycle (Ct value) was obtained for each amplification curve and then a ΔCt was first calculated by subtracting the Ct value for human cyclophilin A (*PPIA*) RNA from the Ct value for each sample. Fold changes compared with the endogenous control were then determined by calculating 2<sup>-ΔCt</sup>, so that gene expression results are expressed as expression ratio relative to *PPIA* gene expression according to the manufacturer's guidelines. TaqMan<sup>®</sup> primer/probe

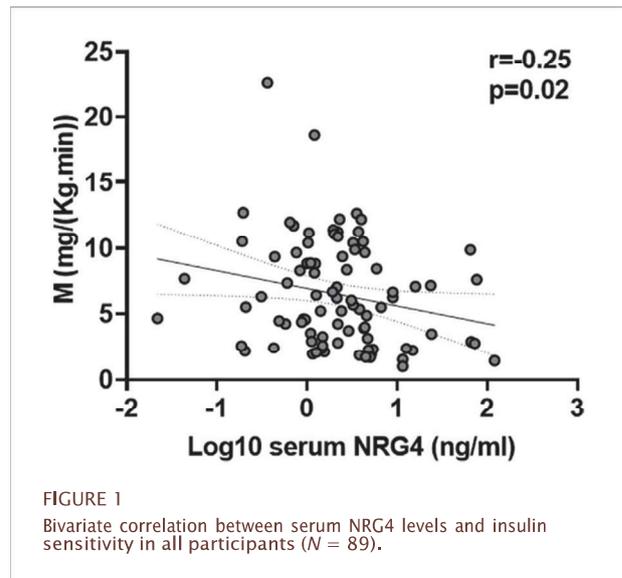
sets (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) used were as follows: Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (4333763, *PPIA* as endogenous control), phosphoenol pyruvate carboxykinase 1 (*PEPCK* or *PCK1*, Hs0159918\_m1), glucose-6-phosphatase (*G6PC*, Hs00609178\_m1), glucose transporter 2 or solute carrier family two member 2 (*GLUT2* or *SLC2A2*, Hs01096908\_m1), CD36 molecule (*CD36*, Hs00169627\_m1), acyl-CoA synthetase long chain family member 1 (*ACSL1*, Hs00960561\_m1), stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 (*SCD1*, Hs01682761\_m1), PPAR $\gamma$  coactivator one alpha (*PPARGC1A*, Hs00173304\_m1), nuclear respiratory factor 1 (*NRF1*, Hs00192316\_m1), glucose transporter 4 or solute carrier family two member 4 (*GLUT4* or *SLC2A4*, Hs00168966\_m1) and fatty acid synthase (*FASN*, Hs01005622\_m1).

## Mitochondrial respiration

Mitochondrial respiratory function was assessed in HepG2 treated with PA in combination with either NRG1 or NRG4 by means of a Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, Agilent Technologies) using SeahorseXFp Cell MitoStress Test Kit according to manufacturer's instructions. This assay determines basal respiration, ATP production, H<sup>+</sup> (proton) leak, and spare respiratory capacity. Basal respiration shows energy demand of the cell under baseline conditions. ATP production shows ATP synthesized by the mitochondria. Proton leak is the remaining basal respiration not coupled to ATP production and can be a sign of mitochondrial damage. Maximal respiration shows the maximum rate of respiration that the cell can achieve. Spare respiratory capacity indicates the capability of the cell to respond to an energy demand and can be an indicator of cell fitness or flexibility. Cells were cultured for 48 h, followed by 60 min of culture with XF base medium supplemented with 1 mM pyruvate, 2 mM glutamine, and 10 mM glucose in a CO<sub>2</sub> free incubator. Oxygen consumption rate (OCR) was then normalized to the total protein content, determined by Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE).

## Statistical analyses

Statistical analyses were performed using SPSS 12.0 software. Unless otherwise stated, descriptive results of continuous variables are expressed as mean and SD for Gaussian variables or median and interquartile range. Normality analysis was conducted using the Kolmogorov-Smirnov test. Unpaired *t*-test was used to compare serum NRG4 concentration according to obesity. The correlation between variables was analyzed using simple correlation



analyses (Pearson's and Spearman's test) and multiple regression analysis. *In vitro* experiments were analysed using non-parametric Mann-Whitney test. Levels of statistical significance were set at  $p < 0.05$ .

## Results

### Serum NRG4 associations with metabolic traits and insulin resistance

Serum NRG4 was negatively correlated with insulin sensitivity (M) (Figure 1) and positively with the inflammatory marker hsCRP (Table 1). Multivariate linear regression analyses showed that insulin sensitivity contributed to 7.2% of the variance in serum NRG4 after controlling for BMI, age, sex and hsCRP ( $p = 0.01$ ) (Table 2).

No significant associations were observed between serum NRG4 levels and adiposity measures (BMI, waist circumference or fat mass), plasma lipids (HDL, LDL-cholesterol, and fasting triglycerides), or markers of liver injury (AST, ALT, GGT) (Table 1).

### Human recombinant NRG4 and NRG1 reduce expression of gluconeogenic- and mitochondrial biogenesis-related genes in palmitate-treated HepG2 cells

Recombinant NRG1 administration was performed to test if the putative effects of NRG4 on HepG2 were specific or similar to other neuregulins. Both human recombinant

TABLE 1 Anthropometric and clinical characteristics according to obesity and correlations between serum NRG4 and these parameters.

	Non obese	Obese	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i> *
N (men/women)	9/25	16/39			
Age (years)	49.0 ± 10.3	44.4 ± 10.6	0.04	-0.10	0.32
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	24.6 ± 2.7	44.2 ± 7.3	<0.0001	0.15	0.13
Waist circumference (cm)	88.7 ± 9.4	126.9 ± 14.3	<0.0001	0.11	0.30
BI fat mass (%)	25.2 ± 6.0	44.0 ± 5.0	<0.0001	0.14	0.17
Cholesterol (mg/dl)	209.2 ± 48.4	195.5 ± 44.0	0.17	0.01	0.87
HDL (mg/dl)	69.6 ± 22.0	50.2 ± 12.8	<0.0001	-0.13	0.19
LDL (mg/dl)	126.4 ± 39.6	122.4 ± 35.6	0.62	0.06	0.52
Triglycerides (mg/dl) <sup>a</sup>	93.8 (60.7–107)	116.1 (69–142)	0.05	0.16	0.11
ASP (U/L)	22.0 ± 6.0	20.2 ± 7.1	0.24	0.13	0.20
ALT (U/L)	21.3 ± 9.1	25.3 ± 14.7	0.15	0.09	0.38
GGT (U/L) <sup>a</sup>	32.2 (11.5–32.5)	28.7 (18–32)	0.62	0.19	0.06
Glucose (mg/dl)	95.6 ± 12.3	95.6 ± 11.6	0.98	0.09	0.37
Glycated haemoglobin (%)	5.4 ± 0.2	5.5 ± 0.3	0.19	0.16	0.11
M [mg/(kg min)]	9.8 ± 3.8	4.4 ± 2.5	<0.0001	-0.25	0.02
hsCRP (mg/dl) <sup>a</sup>	1.4 (0.51–1.74)	8.2 (2.6–10.5)	<0.0001	0.21	0.04
NRG4 (ng/ml) <sup>a</sup>	2.33 (0.79–3.6)	3.4 (0.95–4.5)	0.13	—	—

<sup>a</sup>Median and interquartile range. Bold values mean that *p*-value reached statistical significance. *p*\* indicated the *p*-value of correlations.

TABLE 2 Multiple linear regression analysis to predict the impact of insulin sensitivity on serum NRG4 after controlling for BMI, age, sex, and hsCRP.

	NRG4 (ng/ml)		
	$\beta$	<i>t</i>	<i>p</i>
Age (years)	-0.070	-0.63	0.5
Gender	0.013	0.11	0.9
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.044	0.26	0.8
hsCRP (mg/dl)	0.066	0.54	0.6
M [mg/(kg min)]	-0.289	-2.65	0.01
Adjusted <i>R</i> <sup>2</sup>	0.072 (7.2%)		
ANOVA <i>P</i>	0.01		

Bold values mean that *p*-value reached statistical significance.

NRG4 or NRG1 administration resulted in decreased gluconeogenic- and mitochondrial biogenesis-related gene expression, being more pronounced these effects after NRG1 administration in palmitate-treated HepG2 cells (Figures 2, 3).

After vehicle (BSA), no significant effects of human recombinant NRG4 on gluconeogenic (*PEPCK*, *G6PC*, *GLUT2*, *GLUT4*)-, lipid metabolism (*CD36*, *ACSL1*, *FASN*, *SCD1*)- and mitochondrial biogenesis (*PPARGC1A*, *NRF1*)- related gene expression were found (Figure 2). Human recombinant NRG1 led to decreased *G6PC*, *GLUT2* and *PPARGC1A* mRNA levels (Figure 3).

## Human recombinant NRG4 and NRG1 attenuate mitochondrial respiration in palmitate-treated HepG2 cells

After 24 h-palmitate administration, NRG4 administration led to reduced basal and maximal respiration, without significant effects on oxygen consumption for ATP production and proton leak and on spare respiratory capacity (Figure 2). NRG1 administration led to reduced basal and maximal respiration, proton leak and spare respiratory capacity (Figure 3).

## Discussion

In the current study we found that serum NRG4 was positively associated with insulin resistance and hsCRP (a marker of chronic low-level inflammation), but not with dyslipidemia or markers of liver injury in subjects without type 2 diabetes. Importantly, the relationship of NRG4 with insulin sensitivity remained significant after controlling for age, BMI, sex and hsCRP. In line with the current study, increased levels of serum NRG4 in insulin resistance-associated diseases, such as type 2 diabetes (Kang et al., 2016; Chen et al., 2017a; Kurek Eken et al., 2018; Wang et al., 2019c; Kocak et al., 2019) and polycystic ovarysyndrome (Kurek Eken et al., 2019; Cao and Hu, 2021) have been reported. In contrast, a recent study described low levels of NRG4 in patients with type 2 diabetes in association to microalbuminuria (Kocak et al., 2020),

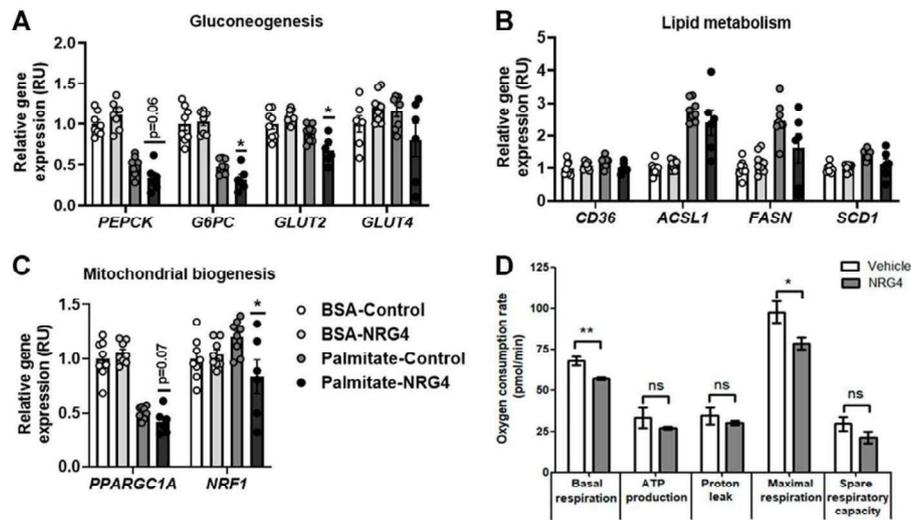


FIGURE 2

(A–C) The impact of human recombinant NRG4 on gluconeogenesis-, lipid metabolism- and mitochondrial biogenesis-related gene expression in BSA- and palmitate-treated HepG2 cells. (D) The impact of human recombinant NRG4 on mitochondrial respiration in palmitate-treated HepG2 cells. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared to control or vehicle.

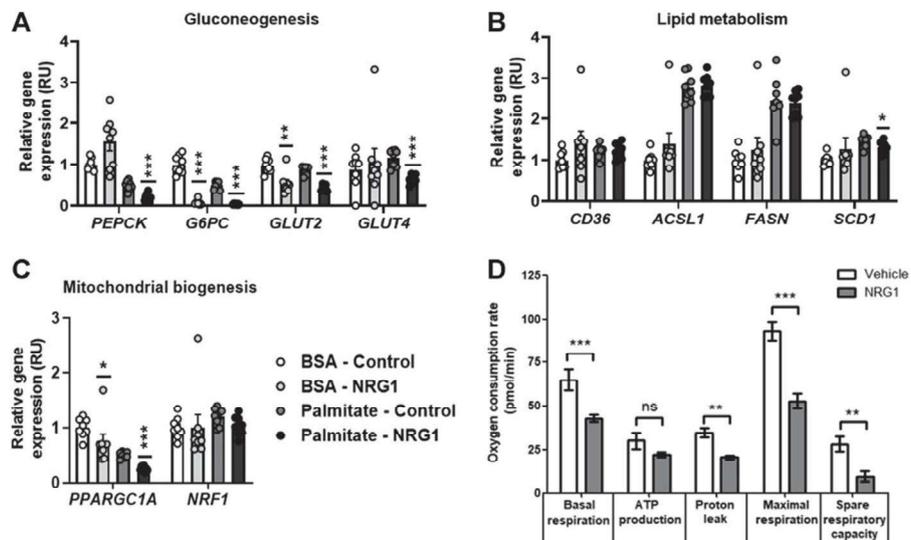


FIGURE 3

(A–C) The impact of human recombinant NRG1 on gluconeogenesis-, lipid metabolism-, and mitochondrial biogenesis-related gene expression in BSA- and palmitate-treated HepG2 cells. (D) The impact of human recombinant NRG1 on mitochondrial respiration in palmitate-treated HepG2 cells. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared to control or vehicle.

suggesting NRG4 as a putative marker of microvascular dysfunction. Increased levels of NRG4 in situations of altered glucose tolerance or early diabetes (Kang et al., 2016; Chen et al., 2017a; Kurek Eken et al., 2018; Wang et al., 2019c; Kocak et al., 2019), but decreased in those

patients with advanced diabetes (as reflects increased microalbuminuria) (Kocak et al., 2020), suggest that NRG4 levels might depend on the evolution and stage of development of diabetes. Taking into account the importance of NRG4 in insulin-induced glucose uptake

(Díaz-Sáez et al., 2021), a possible compensatory role of NRG4 in the maintenance of insulin action and glucose metabolism in situations of early diabetes is possible. However, additional interventional studies should be performed to clarify the relevance of increased serum NRG4 in early diabetes.

Controversial findings from previous studies (Dai et al., 2015; Kang et al., 2016; Chen et al., 2017a; Kurek Eken et al., 2018) together with current observations suggest that NRG4 does not exert in humans the beneficial effects previously demonstrated in mice (Wang et al., 2014; Chen et al., 2017b). To further evaluate the possible mechanisms involved, *in vitro* experiments in the HepG2 cell line were performed. These experiments revealed that, after 24 h-palmitate administration, human recombinant NRG4 did not alter lipid metabolism-related gene expression. In contrast to previous findings in mice (Wang et al., 2014; Chen et al., 2017b; Wang et al., 2019a), NRG4 impacted negatively on hepatocyte catabolism, attenuating the expression of gluconeogenesis- and mitochondrial biogenesis-related genes and slightly decreasing mitochondrial respiration. Of note, these effects were even more pronounced after human recombinant NRG1 administration, indicating that both NRG4 and NRG1 impacts negatively on gluconeogenesis and mitochondrial respiration in human hepatocytes exposed to palmitate. In line with these findings, previous studies in mice demonstrated that recombinant NRG1 administration attenuated hepatic gluconeogenesis (Arai et al., 2017; Zhanget al., 2018). The negative effects of NRG1 and NRG4 on mitochondrial biogenesis and respiration and the absence of impact on expression of lipid metabolism-related genes suggest that neuregulins did not prevent lipid accumulation in human hepatocytes as observed in mice (Wang et al., 2014; Chen et al., 2017b; Wang et al., 2019a; Zhu et al., 2020; Yang et al., 2021). The lack of protein-based data is a limitation of these experiments. While gene expression analysis at mRNA level is a suitable surrogate to characterize the effect of exogenous factors on gluconeogenesis, lipogenesis and other metabolic pathways in HepG2 cells (Patel et al., 2016; Hasei et al., 2021; Wang et al., 2022), these data should be validated at protein level in additional experiments. Even though, HepG2 cells due to their proliferative capacity are very useful for exploratory *in vitro* experiments (Patel et al., 2016; Hasei et al., 2021; Wang et al., 2022), is important to note that compared to primary hepatocytes, these cells display altered expression and activation of EGFR and enhanced glycolytic pathway. To overcome these experimental limitations and confirm current findings, further experiments in human primary hepatocytes should be required.

The beneficial impact of NRG4 on metabolism observed in mice might be explained by the direct effects of NRG4 on adipose tissue, increasing sympathetic innervations, and the enhancement of BAT activity and browning of WAT (Rosell et al., 2014; Comas et al., 2019), but not on liver metabolism. In fact, while in mice the activation of BAT and the promotion of

WAT browning ameliorate insulin sensitivity, liver steatosis and glucose tolerance in obesogenic conditions (Wang et al., 2015; Kimura et al., 2021), the impact of WAT browning on obesity or insulin resistance in humans is less relevant (Barquissau et al., 2018; Comas et al., 2019).

To sum up, NRG4 is negatively associated with insulin sensitivity in humans and contributes to reduce mitochondrial respiration in HepG2 hepatocytes.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

## Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Ethics Committee and the Committee for Clinical Research (CEIC) of Dr. Josep Trueta University Hospital. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## Author contributions

CM and JL participated in this study conducting experiments, acquiring and analyzing data. FO, MA-R, AL, and NO-C participated in this study acquiring and analyzing data; FD-S, JA, MC, AG, and WR contributed to the discussion and reviewed the manuscript; JF-R and JM-N contributed to research study design, conducting experiments, acquiring and analyzing data, and writing the manuscript.

## Funding

This work was partially supported by research grants PI16/01173, PI19/01712 and PI21/01361 from the Instituto de Salud Carlos III from Spain, Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) funds, and by Fundació Marató de TV3 (201626-30). CIBEROBN Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición is an initiative from the Instituto de Salud CarlosIII from Spain.

## Acknowledgments

We want to particularly acknowledge the patients, the FATBANK platform promoted by the CIBEROBN and the IDIBGI Biobank (Biobanc IDIBGI, B.0000872), integrated in

the Spanish National Biobanks Network, for their collaboration and coordination.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## References

- Arai, T., Ono, Y., Arimura, Y., Sayama, K., Suzuki, T., Shinjo, S., et al. (2017). Type I neuregulin1 $\alpha$  is a novel local mediator to suppress hepatic gluconeogenesis in mice. *Sci. Rep.* 7, 42959. doi:10.1038/srep42959
- Barquissau, V., Léger, B., Beuzelin, D., Martins, F., Amri, E.-Z., Pisani, D. F., et al. (2018). Caloric restriction and diet-induced weight loss do not induce browning of human subcutaneous white adipose tissue in women and men with obesity. *Cell Rep.* 22, 1079–1089. doi:10.1016/j.celrep.2017.12.102
- Caillaud, K., Boisseau, N., Ennequin, G., Chavanelle, V., Etienne, M., Li, X., et al. (2016). Neuregulin 1 improves glucose tolerance in adult and old rats. *Diabetes Metab.* 42, 96–104. doi:10.1016/j.diabet.2015.08.003
- Cantó, C., Pich, S., Paz, J. C., Sanches, R., Martínez, V., Orpinell, M., et al. (2007). Neuregulins increase mitochondrial oxidative capacity and insulin sensitivity in skeletal muscle cells. *Diabetes* 56, 2185–2193. doi:10.2337/db06-1726
- Cao, S., and Hu, Y. (2021). Effects of serum irisin, neuregulin 4, and weight management on obese adolescent girls with polycystic ovary syndrome. *Biosci. Rep.* 41, BSR20211658. doi:10.1042/BSR20211658
- Chen, L. L., Peng, M. M., Zhang, J. Y., Hu, X., Min, J., Huang, Q. L., et al. (2017). Elevated circulating Neuregulin4 level in patients with diabetes. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 33, e2870. doi:10.1002/dmrr.2870
- Chen, Z., Wang, G. X., Ma, S. L., Jung, D. Y., Ha, H., Altamimi, T., et al. (2017). Nrg4 promotes fuel oxidation and a healthy adipocyte profile to ameliorate diet-induced metabolic disorders. *Mol. Metab.* 6, 863–872. doi:10.1016/j.molmet.2017.03.016
- Comas, F., Martínez, C., Sabater, M., Ortega, F., Latorre, J., Díaz-Sáez, F., et al. (2019). Neuregulin 4 is a novel marker of beige adipocyte precursor cells in human adipose tissue. *Front. Physiol.* 10, 39. doi:10.3389/fphys.2019.00039
- Dai, Y. N., Zhu, J. Z., Fang, Z. Y., Zhao, D. J., Wan, X. Y., Zhu, H. T., et al. (2015). A case-control study: Association between serum neuregulin 4 level and non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 64, 1667–1673. doi:10.1016/j.metabol.2015.08.013
- Díaz-Sáez, F., Blanco-Sinfreu, C., Archilla-Ortega, A., Sebastian, D., Romero, M., Hernández-Alvarez, M. I., et al. (2021). Neuregulin 4 downregulation induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes through inflammation and autophagic degradation of GLUT4 vesicles. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 12960. doi:10.3390/ijms222312960
- Ennequin, G., Capel, F., Caillaud, K., Chavanelle, V., Etienne, M., Teixeira, A., et al. (2017). Neuregulin 1 improves complex 2-mediated mitochondrial respiration in skeletal muscle of healthy and diabetic mice. *Sci. Rep.* 7, 1742. doi:10.1038/s41598-017-02029-z
- Gumà, A., Díaz-Sáez, F., Camps, M., and Zorzano, A. (2020). Neuregulin, an effector on mitochondria metabolism that preserves insulin sensitivity. *Front. Physiol.* 11, 696. doi:10.3389/fphys.2020.00696
- Hasei, S., Yamamotoya, T., Nakatsu, Y., Ohata, Y., Itoga, S., Nonaka, Y., et al. (2021). Carnosic acid and carnosol activate AMPK, suppress expressions of gluconeogenic and lipogenic genes, and inhibit proliferation of HepG2 cells. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 4040. doi:10.3390/ijms22084040
- Heim, P., Morandi, C., Brouwer, G. R., Xu, L., Montessuit, C., and Brink, M. (2020). Neuregulin-1 triggers GLUT4 translocation and enhances glucose uptake independently of insulin receptor substrate and ErbB3 in neonatal rat cardiomyocytes. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* 1867, 118562. doi:10.1016/j.bbamcr.2019.118562
- Honkoop, H., de Bakker, D. E., Aharonov, A., Kruse, F., Shakked, A., Nguyen, P. D., et al. (2019). Single-cell analysis uncovers that metabolic reprogramming by ErbB2 signaling is essential for cardiomyocyte proliferation in the regenerating heart. *Elife* 8, e50163. doi:10.7554/eLife.50163
- Kang, Y. E., Kim, J. M., Choung, S., Joung, K. H., Lee, J. H., Kim, H. J., et al. (2016). Comparison of serum Neuregulin 4 (Nrg4) levels in adults with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus and controls without diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 117, 1–3. doi:10.1016/j.diabres.2016.04.007
- Kimura, H., Nagoshi, T., Oi, Y., Yoshii, A., Tanaka, Y., Takahashi, H., et al. (2021). Treatment with atrial natriuretic peptide induces adipose tissue browning and exerts thermogenic actions *in vivo*. *Sci. Rep.* 11 (1), 17466. doi:10.1038/s41598-021-96970-9
- Kocak, M. Z., Aktas, G., Atak, B. M., Duman, T. T., Yis, O. M., Erkus, E., et al. (2020). Is Neuregulin-4 a predictive marker of microvascular complications in type 2 diabetes mellitus? *Eur. J. Clin. Invest.* 50, e13206. doi:10.1111/eci.13206
- Kocak, M. Z., Aktas, G., Erkus, E., Yis, O. M., Duman, T. T., Atak, B. M., et al. (2019). Neuregulin-4 is associated with plasma glucose and increased risk of type 2 diabetes mellitus. *Swiss Med. Wkly.* 149, w20139. doi:10.4414/sm.w.2019.20139
- Kurek Eken, M., Sahin Ersoy, G., Yayla Abide, C., Sanverdi, İ., Devranoglu, B., Kutlu, T., et al. (2019). Association between circulating neuregulin 4 levels and metabolic, atherogenic, and AMH profile of polycystic ovary syndrome. *J. Obstet. Gynaecol.* 39, 975–980. doi:10.1080/01443615.2019.1581754
- Kurek Eken, M., Yayla Abide, C., Sahin Ersoy, G., Altun Ensari, T., Pekin, O., and Cevik, O. (2018). Clinical significance of neuregulin 4 (NRG4) in gestational diabetes mellitus. *Gynecol. Endocrinol.* 34, 605–608. doi:10.1080/09513590.2017.1420772
- López-Soldado, I., Niisuke, K., Veiga, C., Adrover, A., Manzano, A., Martínez-Redondo, V., et al. (2016). Neuregulin improves response to glucose tolerance test in control and diabetic rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 310, E440–E451. doi:10.1152/ajpendo.00226.2015
- Meyer, D., Yamaal, T., Garratt, A., Riethmacher-Sonnenberg, E., Kane, D., Theill, L. E., et al. (1997). Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development* 124, 3575–3586. doi:10.1242/dev.124.18.3575
- Ortega, F. J., Mercader, J. M., Moreno-Navarrete, J. M., Nonell, L., Puigdecán, E., Rodríguez-Hermosa, J. I., et al. (2015). Surgery-induced weight loss is associated with the downregulation of genes targeted by MicroRNAs in adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, E1467–E1476. doi:10.1210/jc.2015-2357
- Patel, T. P., Rawal, K., Soni, S., and Gupta, S. (2016). Swertiamarin ameliorates oleic acid induced lipid accumulation and oxidative stress by attenuating gluconeogenesis and lipogenesis in hepatic steatosis. *Biomed. Pharmacother.* 83, 785–791. doi:10.1016/j.biopha.2016.07.028
- Rosell, M., Kaforou, M., Frontini, A., Okolo, A., Chan, Y. W., Nikolopoulou, E., et al. (2014). Brown and white adipose tissues: Intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306, E945–E964. doi:10.1152/ajpendo.00473.2013
- Suárez, E., Bach, D., Cadefau, J., Palacín, M., Zorzano, A., Gumà, A., et al. (2001). A novel role of neuregulin in skeletal muscle: Neuregulin stimulates glucose uptake, glucose transporter translocation, and transporter expression in muscle cells. *J. Biol. Chem.* 276, 18257–18264. doi:10.1074/jbc.M008100200
- Wang, G. X., Zhao, X. Y., Meng, Z. X., Kern, M., Dietrich, A., Chen, Z., et al. (2014). The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis. *Nat. Med.* 20, 1436–1443. doi:10.1038/nm.3713
- Wang, R., Yang, F., Qing, L., Huang, R., Liu, Q., and Li, X. (2019). Decreased serum neuregulin 4 levels associated with non-alcoholic fatty liver disease in children with obesity. *Clin. Obes.* 9, e12289. doi:10.1111/cob.12289
- Wang, S., Jung, S., and Ko, K. S. (2022). Effects of amino acids supplementation on lipid and glucose metabolism in HepG2 cells. *Nutrients* 14, 3050. doi:10.3390/nu14153050

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Wang, T.-Y., Liu, C., Wang, A., and Sun, Q. (2015). Intermittent cold exposure improves glucose homeostasis associated with brown and white adipose tissues in mice. *Life Sci.* 139, 153–159. doi:10.1016/j.lfs.2015.07.030

Wang, W., Zhang, Y., Yang, C., Wang, Y., Shen, J., Shi, M., et al. (2019). Feature Article: Transplantation of neuregulin 4-overexpressing adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates insulin resistance by attenuating hepatic steatosis. *Exp. Biol. Med.* 244, 565–578. doi:10.1177/1535370219839643

Wang, Y., Huang, S., and Yu, P. (2019). Association between circulating neuregulin4 levels and diabetes mellitus: A meta-analysis of observational studies. *PLoS One* 14, e0225705. doi:10.1371/journal.pone.0225705

Yang, F., Zhou, N., Zhu, X., Min, C., Zhou, W., and Li, X. (2021). n-3 PUFAs protect against adiposity and fatty liver by promoting browning in postnatally

overfed male rats: a role for NRG4. *J. Nutr. Biochem.* 93, 108628. doi:10.1016/j.jnutbio.2021.108628

Zeng, F., Wang, Y., Kloepfer, L. A., Wang, S., and Harris, R. C. (2018). ErbB4 deletion predisposes to development of metabolic syndrome in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 315, E583–E593. doi:10.1152/ajpendo.00166.2018

Zhang, P., Kuang, H., He, Y., Idiga, S. O., Li, S., Chen, Z., et al. (2018). NRG1-Fc improves metabolic health via dual hepatic and central action. *JCI insight* 3, 98522. doi:10.1172/jci.insight.98522

Zhu, B., Mei, W., Jiao, T., Yang, S., Xu, X., Yu, H., et al. (2020). Neuregulin 4 alleviates hepatic steatosis via activating AMPK/mTOR-mediated autophagy in aged mice fed a high fat diet. *Eur. J. Pharmacol.* 884, 173350. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173350



# THE RELEVANCE OF EGFR, ErbB RECEPTORS AND NEUREGUINS IN HUMAN ADIPOCYTES AND ADIPOSE TISSUE IN OBESITY

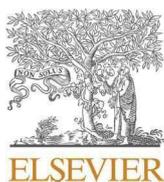
*Latorre, Cristina Martínez , Francisco Ortega, Núria Oliveras-Cañellas, Francisco Díaz-Sáez, Julian Aragonés, Marta Camps, Anna Gumà, Wifredo Ricart, José Manuel Fernández-Real, José María Moreno-Navarrete*

FACTOR IMPACTE: 7419 (Q1, Biomedicine & Pharmacotherapy)

En este estudio se planteó el siguiente objetivo:

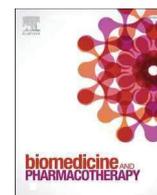
- Investigar la expresión de receptores ErbB y neuregulinas en tejido adiposo subcutáneo y visceral humano en relación con la obesidad y la resistencia a la insulina





Contents lists available at ScienceDirect

## Biomedicine &amp; Pharmacotherapy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bioph](http://www.elsevier.com/locate/bioph)

# The relevance of EGFR, ErbB receptors and neuregulins in human adipocytes and adipose tissue in obesity

Jèssica Latorre<sup>a,b,1</sup>, Cristina Martínez<sup>a,b,1</sup>, Francisco Ortega<sup>a,b</sup>, Núria Oliveras-Cañellas<sup>a,b</sup>, Francisco Díaz-Sáez<sup>c,d,e</sup>, Julian Aragonés<sup>f,g</sup>, Marta Camps<sup>c,d,e</sup>, Anna Gumà<sup>c,d,e</sup>, Wifredo Ricart<sup>a,b</sup>, José Manuel Fernández-Real<sup>a,b,h,\*</sup>, José María Moreno-Navarrete<sup>a,b,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Institut d'Investigació Biomèdica de Girona, Girona, Spain

<sup>b</sup> CIBEROBN (CB06/03/010), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain

<sup>e</sup> CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>f</sup> Research Unit, Hospital of Santa Cristina, Research Institute Princesa, Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain

<sup>g</sup> CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, Carlos III Health Institute, Madrid, Spain

<sup>h</sup> Department of Medicine, University of Girona, Girona, Spain

## ARTICLE INFO

## Keywords:

EGFR  
Neuregulins  
Adipose tissue  
Adipogenesis  
Obesity

## ABSTRACT

**Objective:** To investigate the potential role of EGFR, ErbBs receptors and neuregulins in human adipose tissue physiology in obesity.

**Methods:** Gene expression analysis in human subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissue in three independent cohorts [two cross-sectional (N = 150, N = 87) and one longitudinal (n = 25)], and *in vitro* gene knockdown and overexpression experiments were performed.

**Results:** While both SAT and VAT *ERBB2* and *ERBB4* mRNA increased in obesity, SAT *EGFR* mRNA was negatively correlated with insulin resistance, but did not change in obesity. Of note, both SAT and VAT *EGFR* mRNA were significantly associated with adipogenesis and increased during human adipocyte differentiation. *In vitro* experiments revealed that *EGFR*, but not *ERBB2* and *ERBB4*, gene knockdown in preadipocytes and in fully differentiated human adipocytes resulted in decreased expression of adipogenic-related genes. *ERBB2* gene knockdown also reduced gene expression of fatty acid synthase in fully differentiated adipocytes. In addition, neuregulin 2 (*NRG2*) mRNA was associated with expression of adipogenic genes in human adipose tissue and adipocytes, and its overexpression increased expression of *EGFR* and relevant adipogenic genes.

**Conclusions:** This study demonstrates the association between adipose tissue *ERBB2* and obesity, confirms the relevance of EGFR on human adipogenesis, and suggests a possible adipogenic role of *NRG2*.

## 1. Introduction

Obesity is a worldwide epidemic associated to increased risk of type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and several types of cancer, and it is the result of a positive balance that causes an excessive expansion and dysfunction of white adipose tissue [1]. Obesity-associated adipose tissue dysfunction is characterized by reduced capacity to store excess of

carbohydrates and lipids and generate new adipocytes and increased markers of cellular senescence and inflammation, and in consequence, is a relevant contributor to the progression of insulin resistance and other obesity-associated metabolic disturbances, such as hyperglycemia and dyslipidemia [2-4].

Searching new relevant factors in human adipose tissue physiology, a recent study reported that epidermal growth factor receptor (EGFR)

\* Correspondence to: Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition (UDEN), Biomedical Research Institute of Girona "Dr Josep Trueta", Hospital of Girona "Dr Josep Trueta", Carretera de França s/n, 17007 Girona, Spain.

\*\* Correspondence to: Section of Nutrition, Eumetabolism and Health, Biomedical Research Institute of Girona "Dr Josep Trueta", C/ Dr.Castany s/n, 17190 Salt, Spain.

E-mail addresses: [jmfreal@idibgi.org](mailto:jmfreal@idibgi.org) (J.M. Fernández-Real), [jmoreno@idibgi.org](mailto:jmoreno@idibgi.org) (J.M. Moreno-Navarrete).

<sup>1</sup> These authors have contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2022.113972>

Available online 9 November 2022

0753-3322/O 2022 The Authors. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



expression in subcutaneous adipose tissue was decreased in obese participants with insulin resistance, and positively correlated with expression of some adipogenic genes [5]. In contrast, erbB2 receptor tyrosine kinase 2 (ErbB2) expression was not associated to obesity, insulin resistance and adipogenesis. The cohort size (only 32 women) is the main weakness of this study [5]. However, previous *in vitro* studies reported contradictory data in relation to the possible role of these receptors in adipogenesis [6-10].

Whereas some studies reported that EGFR and ErbB2 mRNA and protein levels decreased during 3T3-L1 adipogenesis [6] and the erbB2 blockage using tyrphostins stimulated 3T3-L1 adipocyte differentiation under adipogenic conditions [7], other studies in the same cells found increased levels of these receptors in adipocyte and during adipogenesis, pointing to a possible role in adipogenesis [8,9]. In human adipose-derived stem cells (ASC), EGFR and ErbB2 expression and activity were significantly attenuated when adipocyte differentiation was induced, and ErbB2 inhibition increased intracellular lipid accumulation, but the joint inhibition of both EGFR and ErbB2 partially prevented these effects [10].

Neuregulins, which include four members NRG1, NRG2, NRG3 and NRG4, are ligands for receptor tyrosine kinases of the ErbB family [11]. In mice, positive effects on NRG4-ErbB signaling in adipose tissue through the preservation of its vasculature [12,13] and the induction of thermogenesis [14,15] were reported. In humans, NRG4 gene expression in both subcutaneous and visceral adipose tissue was positively correlated with markers of adipose tissue browning, but negatively with adipogenesis [16], and decreased in subjects with obesity [17]. *In vitro* experiments also demonstrated that Nrg4 administration in 3T3-L1 adipocytes induced expression of browning-related genes and glucose uptake, without any effects on adipogenesis [18]. To the best of our knowledge other neuregulins (such as neuregulin 1, 2 and 3) and their correlations with ERBBs receptors at the expression level have not been examined in adipose tissue.

To clarify the potential role of EGFR and ErbB2 on human adipogenesis and on human adipose tissue physiology and to study the potential role of other ErbBs receptors and neuregulins in this tissue, here we aimed to investigate expression of ErbB receptors and neuregulins in human subcutaneous and visceral adipose tissue according to obesity and insulin resistance in two cross-sectional cohorts and, longitudinally, after 2- years bariatric surgery-induced weight loss. In addition, the impact of siRNA-induced gene knockdown on EGFR and ErbB2 in human preadipocyte and adipocyte, as well as the effects caused by neuregulin 2 (NRG2) overexpression were also tested.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Subjects' recruitment for adipose tissue samples

#### 2.1.1. Cross-sectional studies

In cohort 1 and cohort 2, visceral (VAT) and subcutaneous (SAT) adipose tissues from 150 and 87 participants with normal body weight and different degrees of obesity, with body mass index (BMI) within 20 and 68 kg/m<sup>2</sup>, were analyzed. All participants were recruited at the Endocrinology Service of the Hospital of Girona 'Dr Josep Trueta'. All subjects were of Caucasian origin and reported that their body weight had been stable for at least 3 months before the study. Subjects were studied in the post-absorptive state. BMI was calculated as weight (in kg) divided by height (in m) squared. They had no systemic disease other than obesity and all were free of any infections in the previous month before the study. Liver diseases (specifically tumoral disease and HCV infection) and thyroid dysfunction were specifically excluded by biochemical work-up.

#### 2.2. Interventional studies

In cohort 3, twenty-five Caucasian obese (BMI = 43.7 ± 4.6 kg/m<sup>2</sup>,

age = 47 ± 9 years [mean ± SD]) subjects, who underwent bariatric surgery through Roux-en-Y gastric bypass in Hospital of Girona 'Dr Josep Trueta' were part of a previous study [19]. Inclusion criteria were age between 30 and 60 years, BMI > 35 kg/m<sup>2</sup> and ability to understand the study protocol. Exclusion criteria were use of medications able to interfere with insulin action and history of a chronic systemic disease. Adipose tissue samples from the SAT depot were obtained during bariatric surgery. Postoperative samples of SAT were obtained by subcutaneous biopsy at the mesogastric level after 2 years from surgery. Fasting blood samples were obtained at the same day of the biopsy.

All these studies were carried out in accordance with the recommendations of the ethical committee of the Hospital of Girona 'Dr Josep Trueta'. The protocol was approved by the ethical committee of the Hospital of Girona 'Dr Josep Trueta'. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki, after the purpose of the study was explained to them. Samples and data from patients included in this study were partially provided by the FATBAN7 platform promoted by the CIBEROBN and coordinated by the IDIBGI Biobank (Biobank IDIBGI, B.0000872), integrated in the Spanish National Biobanks Network and they were processed following standard operating procedures with the appropriate approval of the Ethics, External Scientific and FATBANK Internal Scientific Committees.

### 2.3. Adipose tissue collection and handling

Adipose tissue samples were obtained from SAT and VAT depots during elective surgical procedures (cholecystectomy, surgery of abdominal hernia and gastric bypass surgery). Both SAT and VAT samples were collected from the abdomen, following standard procedures. Samples of adipose tissue were immediately transported to the laboratory (5-10 min). The handling of tissue was carried out under strictly aseptic conditions. Adipose tissue samples were washed in phosphate-buffered saline (PBS), cut off with forceps and scalpel into small pieces (100 mg), and immediately flash-frozen in liquid nitrogen before stored at -80°C. The isolation of adipocyte and stromal vascular fraction cells (SVF) was performed from 16 SAT and 20 VAT non-frozen adipose tissue samples. These samples were washed three to four times with PBS and suspended in an equal volume of PBS supplemented with 1% penicillin-streptomycin and 0.1% collagenase type I prewarmed to 37 °C. The tissue was placed in a shaking water bath at 37 °C with continuous agitation for 60 min and centrifuged for 5 min at 400 g at room temperature. The supernatant, containing mature adipocytes, was recollected. The pellet was identified as the SVF. Isolated mature adipocytes and SVF stored at -80°C for gene expression analysis.

### 2.4. Analytical methods

Serum glucose concentrations were measured in duplicate by the glucose oxidase method using a Beckman glucose analyser II (Beckman Instruments, Brea, California). Glycosylated haemoglobin (HbA1c) was measured by the high-performance liquid chromatography method (BioRad, Muenchen, Germany, and autoanalyser Jokoh HS-10, respectively). Intra- and inter-assay coefficients of variation were less than 4% for all these tests. Serum insulin was measured in duplicate by RIA (Medgenix Diagnostics, Fleunes, Belgium). The intra-assay coefficient of variation was 5.2% at a concentration of 10 mU/l and 3.4% at 130 mU/l. The interassay coefficients of variation were 6.9% and 4.5% at 14 and 89 mU/l, respectively. HOMA-IR was calculated using the following formula: [Insulin (mU/l) x Glucose mmol/l]/22.5. Roche Hitachi Cobas c711 instrument (Roche, Barcelona, Spain) was used to do HDL cholesterol and total serum triglycerides determinations. HDL cholesterol was quantified by a homogeneous enzymatic colorimetric assay through the cholesterol esterase / cholesterol oxidase / peroxidase reaction (Cobas HDLC3). Serum fasting triglycerides were measured by an enzymatic, colorimetric method with glycerol phosphate oxidase and peroxidase (Cobas TRIGL). LDL cholesterol was calculated using the

Friedewald formula.

### 2.5. Experiments in mouse primary immortalised preadipocytes

Primary preadipocytes were isolated from WT, *ErbB2* and *ErbB4* Flox c57BL/6 mice. These animals were maintained by the animal facility from the Faculty of Biology of the Barcelona University. Before the extraction, mice were under anaesthetic treatment with isoflurane. After that, the animals were sacrificed and the inguinal adipose tissue from 4 to 8 weeks-old mice was extracted. The tissue was then placed in a plate with PBS and 1% (v/v) antibiotic-antimycotic. Then, in a type IIA cell culture cabin, the tissue was rinsed 3 times with PBS. Afterwards, mechanical lysis was performed using sterile scissors. When the mixture was homogeneous, enzymatic digestion was carried out with the digestion solution. The enzymatic digestion was performed at 120 rpm in a shaker (I26 Shaker, New BrunswickTM) at 37 °C for 15 min. After that, the digested mix was filtered with a 40 µm cell strainer. Collagenase activity was inhibited by adding fresh primary preadipocyte growth media. Finally, the cell suspension was centrifuged at 1600 rpm for 10 min and the supernatant was discarded. The pellet containing preadipocytes was then resuspended in primary preadipocyte growth media and the cells were seeded in 6-well plates. Specifically, the cells obtained from 3 mice were seeded per 6-well plate. Primary preadipocytes were kept at 37 °C and 7% CO<sub>2</sub> with primary preadipocyte growth media. The media was replaced every 2 days. Cells were rinsed with PBS during the first media change to clean cellular debris. Afterwards, primary preadipocytes were immortalised. Primary preadipocytes were immortalised by retroviral transfection with the MLV retrovirus. The viral genome contains the gene sequence of the thermosensitive large T antigen from the SV40 virus. In addition, the retroviral genome also incorporates the puromycin resistance gene to facilitate immortalised cell selection. The expression of the large T antigen in preadipocytes is double conditional to avoid interference with the adipogenic differentiation. First, the puromycin resistance and the expression of the large T antigen are under the promoter of the IFN $\gamma$ . Thus, the IFN $\gamma$  is supplemented in the growth media of immortalised preadipocytes, allowing the expression of the large T antigen during the proliferative state. In addition, the large T antigen contains a mutation that makes it thermosensitive at 37 °C. Therefore, the large T antigen is only stable at temperatures below 37 °C and thus, primary immortalised preadipocytes are kept at 33 °C during the proliferation stage. To induce adipogenesis, the IFN $\gamma$  is removed and the temperature is increased to 37 °C, which allow the cells to enter to a non-proliferative state. *ErbB2* Flox (iFlox *ErbB2*) and *ErbB4* Flox (iFlox *ErbB4*) primary immortalised preadipocytes were transduced with Scr-GFP and Cre-GFP adenoviral particles to remove the *ErbB2* and *ErbB4* gene respectively. To this end, primary immortalised preadipocytes were transduced with 300 µl of serum-free growth media containing the adenoviral particles supplemented with 0.2% (w/v) BSA and 1% antibiotic-antimycotic. The MOI used to delete the gene expression of *ErbB2* and *ErbB4* was optimised in this study as it can be seen in Figures 45, 46. It was determined to use 250 MOI to delete the expression of these genes and preserve the adipogenic capabilities of the preadipocytes. The transduction had a length of 3 h and it was done at 37 °C. Afterwards, the transduction media was replaced with primary immortalised preadipocyte growth media for 72 h. Primary immortalised preadipocytes were differentiated to adipocytes by changing the growth media with primary immortalised adipocyte differentiation media [FBS (10%), insulin (1 µg/ml), IBMX (0.5 mM), Dexamethasone (0.25 µM), Rosiglitazone (2.5 µM)] for 72 h. After that, the first differentiation media was changed for primary immortalised adipocyte media 2 [FBS (10%), insulin (1 µg/ml)] for 24 h. Finally, the second differentiation media was substituted with primary immortalised adipocyte media 3 [FBS (10%), insulin (0.5 µg/ml)] for 72 h.

### 2.6. Differentiation of human preadipocytes

Isolated human subcutaneous (sc) and visceral (v) preadipocytes (Zen-Bio Inc., Research Triangle Park, NC) were plated on T-75 cell culture flasks and cultured at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in DMEM/nutrient mix F-12 medium (1:1, vol/vol) supplemented with 10 U/ml penicillin/streptomycin, 10% fetal bovine serum (FBS), 1% HEPES, and 1% glutamine (all from GIBCO, Invitrogen S.A, Barcelona, Spain). One week later, the expanded human sc and v preadipocytes were cultured (~40,000 cells/cm<sup>2</sup>) in 12-well plates with preadipocytes medium (Zen-Bio) composed of DMEM/nutrient mix F-12 medium (1:1, vol/vol), HEPES, FBS, penicillin, and streptomycin in a humidified 37 °C incubator with 5% CO<sub>2</sub>. Twenty-four hours after plating, cells were checked for complete confluence (d 0), and differentiation was induced using differentiation medium (Zen-Bio) composed of preadipocytes medium, human insulin, dexamethasone, isobutylmethylxanthine, and PPAR $\gamma$  agonists (rosiglitazone). After 7 day (d7), differentiation medium was replaced with fresh adipocyte medium (Zen-Bio) composed of DMEM/nutrient mix F-12 medium (1:1, vol/vol), HEPES, FBS, biotin, pantothenate, human insulin, dexamethasone, penicillin, streptomycin, and amphotericin. Negative control (nondifferentiated cell) was performed with preadipocyte medium during all differentiation process. Fourteen days after the initiation of differentiation, cells appeared rounded with large lipid droplets apparent in the cytoplasm. Cells were then considered mature adipocytes, harvested, and stored at -80 °C for RNA/protein purification. For time course experiment, Cells were harvested and stored at -80 °C for RNA/protein purification at day 0, 5, 7, 9, 12 and 14. At the end of each experiment, cells were harvested, and pellets and supernatants were stored at -80 °C. All *in vitro* experiments were performed in three or four independent replicates.

### 2.7. Forward siRNA transfections in primary human preadipocytes and adipocytes

Primary human subcutaneous preadipocytes (Zen-Bio Inc., Research Triangle Park, NC) were forward transfected with siRNAs either during the differentiation process (at day 0 and day 4) or at the end of differentiation (at day 11). Briefly, the esiRNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) against ERBB2 and EGFR and Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies, Darmstadt, Germany) were diluted separately with Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Life Technologies, Darmstadt, Germany) and mixed by pipetting afterwards. The esiRNA-RNAiMAX complexes were left to incubate for 20 min at room temperature and subsequently added on the top of the adherent cells drop-wise. The final concentration of Lipofectamine RNAiMAX and esiRNAs were 1.6 µl/cm<sup>2</sup> and 70 nM, respectively, in 12-well cell culture plates, and the final amount of medium per well was 1 ml. Transfection conditions included silencing of either ERBB2 or EGFR. Adipocytes were harvested at day 7 and at day 14 of differentiation, meaning 72 h after transfection without changing cell culture medium. Transfection efficiency was assessed by real-time PCR and western-blot. The MISSION<sup>®</sup> esiRNAs (Sigma-Aldrich) used were human ERBB2 (EHU078751) and human EGFR (EHU076761). The MISSION<sup>®</sup> siRNA Universal Negative Control #1 (Sigma-Aldrich, SIC001) was used as control in all experiments.

### 2.8. Overexpression of NRG2 gene experiment

ORF expression done for NRG2 (217EX-W0006-M90-GS) and negative empty control vector for pReceiver-M90 (217EX-NEG-M90) were obtained from Genecopoeia ((Tebu-bio, Spain). Human subcutaneous preadipocytes were transfected with either NRG2 overexpression plasmid or control plasmid, using Fugene<sup>®</sup> Transfection Reagent (Promega, WI, USA) at ratio 1:3 following manufacturer's instructions. Plasmid transfection was performed in different stages of adipocyte differentiation: 0-14 days, 0-7 days, 7-14 days. Culture medium replacement after transfection was not necessary. Overexpression

efficiency of NRG2 was checked by qPCR. Lipid droplet (LDs) area was quantified with Fiji software [20]. The area occupied by lipid droplets was selected and quantified using threshold plugin, after sharpening pixel intensity of lipid droplets. Values obtained were expressed as the lipid droplet count with respect to total image.

HEK293T cell line were treated using ORF expression done for NRG2 or negative control using the same protocol as in adipocytes, and efficiency of transfection was checked both by qPCR and ELISA after 48 h of transfection. Intracellular NRG2 was measured using the Human Neuregulin-2 (NRG2) ELISA kit (Cat n°: CSB-EL016078HU, CUSABIO, Houston, TX, USA).

## 2.9. RNA expression

RNA purification, primer/probe sets, gene expression procedures and analyses were performed, as previously described [19]. Briefly, RNA purification was performed using RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, Izasa SA, Barcelona, Spain) and the integrity was checked by Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Gene expression was assessed by real time PCR using a LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics SL, Barcelona, Spain), using TaqMan® and STBRgreen technology suitable for relative genetic expression quantification. The RT-PCR reaction was performed in a final volume of 12  $\mu$ l. The cycle program consisted of an initial denaturing of 10 min at 95 °C then 40 cycles of 15 s denaturing phase at 95 °C and 1 min annealing and extension phase at 60 °C. A threshold cycle (Ct value) was obtained for each amplification curve and then a  $\Delta$ Ct was first calculated by subtracting the Ct value for human cyclophilin A (*PPIA*) RNA from the Ct value for each sample. Fold changes compared with the endogenous control were then determined by calculating  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , so that gene expression results are expressed as expression ratio relative to *PPIA* gene expression according to the manufacturer's guidelines. TaqMan® primer/probe sets (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) used were as follows: Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (4333763, *PPIA* as endogenous control), epidermal growth factor receptor (*EGFR*, Hs01076090\_m1), erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 (*ERBB2*, Hs01001580\_m1), erb-b2 receptor tyrosine kinase 3 (*ERBB3*, Hs00176538\_m1), erb-b2 receptor tyrosine kinase 4 (*ERBB4*, Hs00955525\_m1), neuregulin 1 (*NRG1*, Hs01101538\_m1), neuregulin 2 (*NRG2*, Hs00993399\_m1), neuregulin 3 (*NRG3*, Hs01377907\_m1), neuregulin 4 (*NRG4*, Hs00945534\_m1), adiponectin (*ADIPOQ*, Hs00605917\_m1), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARG*, Hs00234592\_m1), fatty acid synthase (*FASN*, Hs00188012\_m1), acetyl-CoA carboxylase alpha (*ACACA*, Hs00167385\_m1), solute carrier family 2 member 4 (*SLC2A4*, Hs00168966\_m1), diacylglycerol O-acyltransferase 1 (*DGAT1*, Hs00201385\_m1) Leptin (*LEP*, Hs00174877\_m1), interleukin 6 (interferon, beta 2) (*IL6*, Hs00985639\_m1), tumor necrosis factor (*TNF*, Hs00174128\_m1), interleukin 8 (*IL8*, Hs00174103\_m1), fatty acid binding protein 4, adipocyte (*FABP4*, Hs01086177\_m1). Perilipin 1 (*PLIN1*) and cell death inducing DFFA like effector c (*CIDEA* or *FSP27*) were analysed by STBRgreen technology using the following primer sets: *PLIN1* (forward: 5'-aagttgaagcttgaggagcagg-3' and reverse: 5'-gctcgcatgggaacgctga-3') and *CIDEA/FSP27* (forward: 5'-gaggtccaacgcagtcagctg-3' and reverse: 5'-gtacgcactgacacatgctgag-3').

## 2.10. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using SPSS 12.0 software. The relation between variables was analyzed by simple correlation (Spearman's test) and multiple regression analyses in a stepwise manner. One factor ANOVA with post-hoc Bonferroni test, paired t-test and unpaired t-test were used to compare expression of ERBB-related genes in human cohorts according to obesity and after bariatric surgery-induced weight loss. Nonparametric test (Mann Whitney test) was used to analyze *in vitro* experiments. Levels of statistical significance were set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Increased SAT and VAT *ERBB2* and *ERBB4* gene expression in obesity

Both SAT and VAT *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3* and *ERBB4* gene expression were analyzed in two independent cohorts.

In cohort 1, SAT *ERBB2* mRNA levels were increased in obese participants, whereas no significant changes were found for the other genes (*EGFR*, *ERBB3* and *ERBB4*) (Table 1). SAT *ERBB2* mRNA was positively correlated with BMI, fat mass, fasting glucose, but negatively with age and HDL-cholesterol (Table 1). In multiple linear regression analysis, the associations between SAT *ERBB2* and fat mass, fasting glucose and HDL-cholesterol were lost after controlling for age and BMI. SAT *ERBB3* mRNA was negatively correlated to BMI and fat mass (Table 1). In VAT, increased *EGFR*, *ERBB2* and *ERBB4* mRNA levels were found in association to obesity (Table 1). Of note, both VAT *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3* and *ERBB4* mRNA were positively correlated with adiposity measures (BMI and fat mass) and hyperglycemia (fasting glucose) (Table 1). Again, that these associations were lost after adjusting for age and BMI.

Most of these findings were replicated in an independent cohort (cohort 2). In this cohort, both SAT and VAT *ERBB2* and VAT *ERBB4* mRNA were also increased in obese participants (Table 2). In SAT, *ERBB2* mRNA was positively correlated with BMI and fasting glucose and *ERBB4* mRNA with HDL-cholesterol (Table 2). In contrast, SAT *ERBB3* mRNA was negatively correlated with BMI, fasting glucose, HbA1c and fasting triglycerides, and *EGFR* with HbA1c (Table 2). In VAT, both *ERBB2* and *ERBB4* mRNA were positively correlated with BMI, fasting glucose and HbA1c (Table 2). In addition, VAT *ERBB4* mRNA was also positively correlated with fasting triglycerides and negatively with HDL-cholesterol (Table 2). Similar to in cohort 1, all these associations also were lost after controlling for age and BMI.

### 3.2. SAT *EGFR* gene expression was negatively correlated to insulin resistance and HbA1c

In a subgroup of participants from each cohort, insulin resistance was calculated by HOMA-IR in cohort 1 ( $n = 35$ , Table 1) and cohort 2 ( $n = 52$ , Table 2). In both cohort 1 and cohort 2, SAT *EGFR* mRNA was negatively correlated with HOMA-IR (Table 1 and Table 2). In line with these data, *EGFR* mRNA was negatively correlated with HbA1c (Table 2).

These data indicated that *ERBB2* and *ERBB4* mRNA were increased in obesity, without any associations with insulin resistance, hyperglycemia or dyslipemia. In addition and similar to previous study [5], SAT *EGFR* mRNA, which did not change according to obesity, was negatively correlated with insulin resistance.

Considering the impact of obesity and insulin resistance in adipose tissue physiology, next, we explored the possible role of ERBB family-related genes in both SAT and VAT, analysing gene expression markers of adipose tissue function (adipogenesis-, lipogenesis-, glucose uptake- and lipid droplet development-related genes) and dysfunction (leptin and inflammation).

### 3.3. Adipose tissue *EGFR* gene expression was associated to adipogenesis independently of obesity

Of note, both SAT and VAT *EGFR* mRNA were positively correlated with expression of some adipogenic genes (including *ADIPOQ*, *SLC2A4*, *FSP27*, *PLIN* and *PPARG*) in cohort 1 and cohort 2 (Fig. 1). After multivariate regression analysis, most of these associations were maintained after adjusting for age and BMI.

In cohort 1, VAT *EGFR* contributed to age- and BMI-adjusted *ADIPOQ* ( $\beta = 0.34$ ,  $t = 2.3$ ,  $p = 0.03$ ), *FSP27* ( $\beta = 0.29$ ,  $t = 3.1$ ,  $p = 0.003$ ), but not *LEP* ( $\beta = 0.08$ ,  $t = 0.6$ ,  $p = 0.5$ ) mRNA variance. SAT *EGFR* contributed to age- and BMI-adjusted *ADIPOQ* ( $\beta = 0.35$ ,  $t = 3.6$ ,

**Table 1**

Anthropometric, clinical parameters and ERBB receptors according to obesity in cohort 1. Bivariate correlations (Spearman correlations) among ERBB receptors and metabolic parameters in all participants in cohort 1.

	Non-obese	Obese	p	
N	44	106		
Age (years)	47.4 ± 10.9	44.7 ± 10.1	0.1	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.3 ± 3.3	45.3 ± 7.4	< 0.0001	
Fat mass (%)	32.9 ± 6.5	57.1 ± 10.4	< 0.0001	
Waist circumference (cm)	86.6 ± 10.6	124.9 ± 18.5	< 0.0001	
Fasting glucose (mg/dl)	90.4 ± 17.6	108.5 ± 41.3	0.006	
HOMA-IR	1.6 (1.3-5.5)	3.4 (1.5-5.4)	0.5	
(n = 35)	(n = 4)	(n = 31)		
HDL-cholesterol (mg/dl)	60.7 ± 22.5	56.8 ± 35.2	0.5	
Fasting triglycerides (mg/dl)	92.5 ± 42.1	127.7 ± 89.1	0.02	
SAT <i>EGFR</i> mRNA (RU)	0.054 ± 0.02	0.053 ± 0.01	0.9	
SAT <i>ERBB2</i> mRNA (RU)	0.014 ± 0.006	0.020 ± 0.007	< 0.0001	
SAT <i>ERBB3</i> mRNA (RU)	0.00045 ± 0.0003	0.00051 ± 0.0004	0.6	
SAT <i>ERBB4</i> mRNA (RU)	0.0046 ± 0.002	0.0048 ± 0.003	0.8	
SAT <i>NRG1</i> mRNA (RU)	0.00014 ± 0.0001	0.00024 ± 0.0002	0.02	
SAT <i>NRG2</i> mRNA (RU)	0.0064 ± 0.002	0.0062 ± 0.002	0.8	
VAT <i>EGFR</i> mRNA (RU)	0.042 ± 0.02	0.049 ± 0.01	0.02	
VAT <i>ERBB2</i> mRNA (RU)	0.017 ± 0.008	0.028 ± 0.01	< 0.0001	
VAT <i>ERBB3</i> mRNA (RU)	0.0019 ± 0.002	0.0022 ± 0.001	0.4	
VAT <i>ERBB4</i> mRNA (RU)	0.0035 ± 0.002	0.0065 ± 0.003	< 0.0001	
VAT <i>NRG1</i> mRNA (RU)	0.00046 ± 0.0005	0.00051 ± 0.0005	0.7	
VAT <i>NRG2</i> mRNA (RU)	0.0041 ± 0.002	0.0053 ± 0.004	0.06	
	<i>EGFR</i> (RU)	<i>ERBB2</i> (RU)	<i>ERBB3</i> (RU)	<i>ERBB4</i> (RU)
<b>SAT</b>	<b>r</b>	<b>p</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
Age (years)	-0.15	0.07	-0.26	0.001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	-0.02	0.8	0.35	< 0.0001
Fat mass (%)	-0.02	0.8	0.31	< 0.0001
Fasting glucose (mg/dl)	-0.07	0.4	0.21	0.01
HOMA-IR	-0.37	0.03	0.32	0.06
HDL-cholesterol (mg/dl)	-0.06	0.5	-0.17	0.04
Fasting triglycerides (mg/dl)	-0.15	0.07	0.12	0.1
	<i>EGFR</i> (RU)	<i>ERBB2</i> (RU)	<i>ERBB3</i> (RU)	<i>ERBB4</i> (RU)
<b>VAT</b>	<b>r</b>	<b>p</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
Age (years)	0.15	0.06	-0.04	0.6
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.12	0.1	0.43	< 0.0001
Fat mass (%)	0.23	0.005	0.49	< 0.0001
Fasting glucose (mg/dl)	0.18	0.03	0.25	0.003
HOMA-IR	0.12	0.5	0.19	0.3
HDL-cholesterol (mg/dl)	-0.06	0.5	-0.12	0.1
Fasting triglycerides (mg/dl)	0.09	0.3	0.11	0.2

p < 0.0001), *FSP27* (β = 0.21, t = 2.1, p = 0.03) and *SLC2A4* (β = 0.24, t = 2.1, p = 0.04) mRNA variance.

In cohort 2, VAT *EGFR* contributed to age- and BMI-adjusted *ADIPOQ* (β = 0.58, t = 6.7, p < 0.0001), *SLC2A4* (β = 0.39, t = 3.3, p = 0.002), *FSP27* (β = 0.54, t = 4.4, p < 0.0001) and *PLIN* (β = 0.59, t = 4.7, p < 0.0001) mRNA variance. SAT *EGFR* contributed to age- and BMI-adjusted *ADIPOQ* (β = 0.45, t = 4.3, p < 0.0001), but not *PPARG* (β = 0.12, t = 0.8, p = 0.4) mRNA variance.

### 3.4. The association between expression of adipose tissue-related genes and *ERBB2*, *ERBB3* and *ERBB4* mRNA levels mostly depend on obesity

#### 3.4.1. *ERBB2* mRNA

In cohort 1, both SAT and VAT *ERBB2* mRNA were negatively correlated with some adipogenic gene expression, such as *SLC2A4*, *FASN*, *ACACA* and positively with *TNF* and *LEP* genes. Strikingly, *ERBB2* mRNA also were negatively correlated with proinflammatory cytokines (*IL6* and *IL8*) (Fig. 1A-B). Otherwise, after multivariate regression analysis, only the negative association between *ERBB2* mRNA and expression of lipogenesis-related genes were maintained in both SAT [*FASN* (β = -0.18, t = -1.9, p = 0.04) and *ACACA* (β = -0.30, t = -2.9, p = 0.004)] and VAT [*FASN* (β = -0.22, t = -2.8, p = 0.005), *ACACA* (β = -0.23, t = -2.5, p = 0.01)] after adjusting by age and BMI.

However, in cohort 2, the negative correlations between adipose tissue *ERBB2* mRNA and expression of lipogenesis-related genes were lost after adjusting by age and BMI.

#### 3.4.2. *ERBB3* mRNA

In cohort 1, SAT *ERBB3* was negatively correlated with *FSP27* and *LEP* mRNA, and VAT *ERBB3* negatively with *PPARG*, *SLC2A4*, *FASN*, *FSP27*, *IL6* and *IL8* mRNA levels (Fig. 1A-B). SAT *ERBB3* mRNA contributed to age- and BMI-adjusted *FSP27* (β = -0.28, t = -2.9, p = 0.004) and *LEP* (β = -0.29, t = -3.2, p = 0.002) mRNA variance. VAT *ERBB3* mRNA contributed to age- and BMI-adjusted *SLC2A4* (β = -0.21, t = -2.1, p = 0.04), *FASN* (β = -0.14, t = -2.1, p = 0.04), *PPARG* (β = -0.27, t = -1.9, p = 0.05), but not *FSP27* (β = 0.05, t = 0.5, p = 0.5), *IL6* (β = -0.13, t = -1.3, p = 0.2) and *IL8* (β = -0.17, t = -1.5, p = 0.1) mRNA variance.

In cohort 2, SAT *ERBB3* was positively correlated with *FASN* and *SLC2A4* mRNA, and VAT *ERBB3* positively with *PLIN*, but negatively with *ADIPOQ* (Fig. 1C-D). SAT *ERBB3* mRNA did not contribute to age- and BMI-adjusted *FASN* (β = -0.03, t = -0.33, p = 0.7) and *SLC2A4* (β = 0.01, t = 0.05, p = 0.9) mRNA variance. VAT *ERBB3* mRNA did not contribute to age- and BMI-adjusted *ADIPOQ* (β = -0.17, t = -1.6, p = 0.1) and *PLIN1* (β = 0.04, t = 0.25, p = 0.8) mRNA variance.

#### 3.4.3. *ERBB4* mRNA

In cohort 1, no significant associations between SAT *ERBB4* and adipogenic/inflammatory mRNAs were observed, whereas VAT *ERBB4* was negatively correlated with *SLC2A4*, *FASN*, *FSP27*, *IL6* and *IL8*, but positively with *TNF* mRNA (Fig. 1A-B). VAT *ERBB4* mRNA contributed to age- and BMI-adjusted *FASN* (β = -0.19, t = -2.5, p = 0.01), *IL8* (β = -0.40, t = -3.3, p = 0.002), *IL6* (β = -0.22, t = -1.9, p = 0.05), but not *SLC2A4* (β = 0.08, t = 0.61, p = 0.5), *FSP27* (β = -0.05,

**Table 2**

Anthropometric, clinical parameters and ERBB receptors according to obesity in cohort 2. Bivariate correlations (Spearman correlations) among ERBB receptors and metabolic parameters in all participants in cohort 2.

	Non-obese		Obese		p
N	28		59		
Age (years)	48.2 ± 7.9		47.5 ± 8.7		0.7
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.9 ± 3.3		44.4 ± 6.5		< 0.0001
Fasting glucose (mg/dl)	88.8 ± 7.7		105.8 ± 35.4		0.01
HOMA-IR (n = 52)	-		3.7 (1.9-5.1)		-
HbA1c (%)	5.4 ± 0.2		5.9 ± 1.1		0.04
HDL-cholesterol (mg/dl)	57.2 ± 18.6		47.6 ± 11.6		0.004
Fasting triglycerides (mg/dl)	99.3 ± 55.9		124.5 ± 53.3		0.04
SAT <i>EGFR</i> mRNA (RU)	0.055 ± 0.019		0.057 ± 0.019		0.5
SAT <i>ERBB2</i> mRNA (RU)	0.013 ± 0.004		0.022 ± 0.011		< 0.0001
SAT <i>ERBB3</i> mRNA (RU)	0.00054 ± 0.0003		0.00029 ± 0.0003		0.07
SAT <i>ERBB4</i> mRNA (RU)	0.0052 ± 0.003		0.0066 ± 0.004		0.07
SAT <i>NRG1</i> mRNA (RU)	0.00012 ± 0.0001		0.00025 ± 0.0002		0.2
SAT <i>NRG2</i> mRNA (RU)	0.0059 ± 0.002		0.0062 ± 0.002		0.7
VAT <i>EGFR</i> mRNA (RU)	0.042 ± 0.018		0.047 ± 0.017		0.3
VAT <i>ERBB2</i> mRNA (RU)	0.015 ± 0.006		0.028 ± 0.022		0.004
VAT <i>ERBB3</i> mRNA (RU)	0.0021 ± 0.002		0.0017 ± 0.001		0.5
VAT <i>ERBB4</i> mRNA (RU)	0.0027 ± 0.001		0.0069 ± 0.003		< 0.0001
VAT <i>NRG1</i> mRNA (RU)	0.00023 ± 0.0002		0.00042 ± 0.0004		0.06
VAT <i>NRG2</i> mRNA (RU)	0.0039 ± 0.002		0.0058 ± 0.002		0.001

SAT	<i>EGFR</i> (RU)		<i>ERBB2</i> (RU)		<i>ERBB3</i> (RU)		<i>ERBB4</i> (RU)	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Age (years)	-0.08	0.5	-0.12	0.3	-0.19	0.08	-0.04	0.7
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.07	0.5	0.55	< 0.0001	-0.54	< 0.0001	0.19	0.08
Fasting glucose (mg/dl)	-0.12	0.3	0.23	0.04	-0.39	< 0.0001	0.06	0.6
HOMA-IR	-0.31	0.02	-0.12	0.4	-0.39	0.004	0.01	0.9
HbA1c (%)	-0.26	0.03	0.17	0.1	-0.41	< 0.0001	0.08	0.5
HDL-cholesterol (mg/dl)	0.13	0.2	-0.22	0.05	0.17	0.1	0.25	0.03
Fasting triglycerides (mg/dl)	-0.09	0.4	0.33	0.003	-0.28	0.01	0.01	0.9

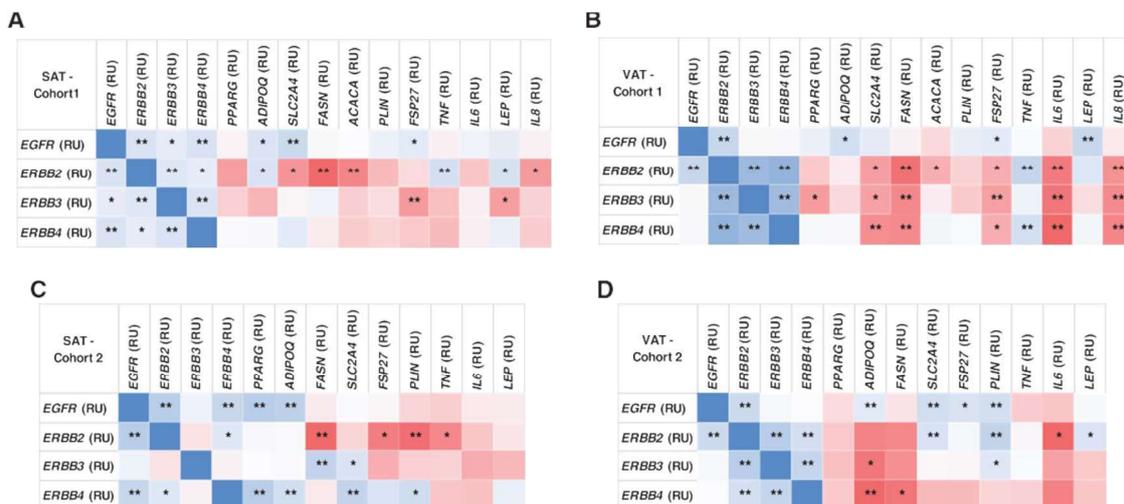
  

VAT	<i>EGFR</i> (RU)		<i>ERBB2</i> (RU)		<i>ERBB3</i> (RU)		<i>ERBB4</i> (RU)	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Age (years)	0.08	0.4	-0.04	0.7	-0.07	0.5	-0.16	0.1
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	-0.01	0.9	0.33	0.002	0.10	0.3	0.53	< 0.0001
Fasting glucose (mg/dl)	0.11	0.3	0.33	0.002	0.17	0.1	0.28	0.01
HOMA-IR	-0.14	0.3	-0.06	0.7	-0.03	0.8	-0.13	0.3
HbA1c (%)	0.15	0.2	0.23	0.04	0.14	0.2	0.21	0.05
HDL-cholesterol (mg/dl)	0.05	0.6	-0.07	0.5	0.01	0.9	-0.22	0.04
Fasting triglycerides (mg/dl)	-0.07	0.5	0.11	0.3	0.09	0.4	0.27	0.01

t = -0.57, p = 0.5) and *TNF* ( $\beta = -0.08$ , t = -0.8, p = 0.4) mRNA variance.

In cohort 2, SAT *ERBB4* was positively correlated with *PPARG*, *ADIPOQ*, *SLC24A4* and *PLIN1* mRNA, whereas VAT *ERBB4* negatively with *ADIPOQ* and *FASN* (Fig. 1C-D). SAT *ERBB4* mRNA contributed to age- and BMI-adjusted *PPARG* ( $\beta = 0.30$ , t = 2.2, p = 0.03), *ADIPOQ*

( $\beta = 0.39$ , t = 3.7, p < 0.0001), *SLC24A4* ( $\beta = 0.34$ , t = 2.6, p = 0.01), but not *PLIN1* ( $\beta = 0.24$ , t = 1.6, p = 0.1) mRNA variance. Otherwise, the associations between VAT *ERBB4* and *FASN* ( $\beta = -0.08$ , t = -0.8, p = 0.4) or *ADIPOQ* ( $\beta = -0.09$ , t = -0.8, p = 0.4) mRNA were lost after controlling for age and BMI.



**fig. 1.** Bivariate correlations (Spearman correlations) among expression of ERBB receptors-related genes and adipogenic and proinflammatory mRNA levels in SAT and VAT from cohort 1 (A-B) and cohort 2 (C-D). The intensity of blue colour indicates the degree of positive correlations, and the intensity of red colour the same for negative correlations. \*p < 0.05 and \*\*p < 0.01.

### 3.5. Impact of bariatric-surgery induced weight loss on ERBB receptors

Confirming the association between AT ERBB2 and ERBB4 and obesity, SAT ERBB2 and ERBB4 mRNA levels were significantly decreased after 2 years-bariatric surgery-induced weight loss in correlation with the percent change in BMI, whereas no significant changes were found in SAT EGFR and ERBB3 mRNA levels (Fig. 2A-B).

The most consistent findings from these cross-sectional and longitudinal cohorts were that EGFR and ERBB2 were the most abundant ERBB receptors in human adipose tissue, being ERBB2 (and ERBB4) associated to obesity and EGFR associated to expression of adipogenesis-related genes.

### 3.6. ERBB receptors in adipose tissue cells

Of note in both SAT and VAT, EGFR mRNA were increased in adipocytes compared to SVF (Fig. 3A), In SAT, no significant differences in SVF or adipocyte ERBB2 and ERBB3 mRNA were found (Fig. 3B-C). In VAT, ERBB2 and ERBB3 mRNA were increased in SVF (Fig. 3B-C). SAT, but not VAT, ERBB4 mRNA were increased in adipocytes (Fig. 3D). In addition, both EGFR, ERBB2 and ERBB4 increased during human subcutaneous and visceral adipocyte differentiation, whereas ERBB3 tended to decrease (Fig. 3E-H).

### 3.7. Functional experiments in mouse primary preadipocytes

Taking into account the association between ERBB2 and ERBB4 gene expression and obesity, and to further investigate the relevance of these receptors in the generation of new adipocytes, experiments in mouse primary preadipocytes with *Erb2* and *Erb4* gene depletion were performed. These experiments revealed that *Erb2* gene depletion, but not *Erb4*, blunted adipocyte differentiation, inhibiting the intracellular lipid accumulation and expression of adipogenic genes (Figure S1A-C).

Considering that ERBB4 was expressed at low levels in human adipose tissue, the contradictory associations between ERBB4 mRNA and expression of adipogenesis-related genes in each cohort, and that *Erb4* depletion in mouse primary preadipocytes did not impact on these genes (Figure S1C), functional gene knockdown (KD) *in vitro* experiments in human cells were only focused in EGFR and ERBB2 genes.

### 3.8. Impact of EGFR and ERBB2 gene 7D on early stage of human adipocyte differentiation

EGFR gene KD during early stage of adipocyte differentiation in human subcutaneous preadipocytes resulted in decreased adipogenic (*ADIPOQ*, *FABP4*, *DGAT1* and *FASN*) gene expression (Fig. 4A). Otherwise, ERBB2 gene KD only decreased *DGAT1* mRNA levels (Fig. 4A).

### 3.9. Impact of EGFR and ERBB2 gene 7D on fully differentiated human adipocytes

In fully differentiated human subcutaneous adipocytes, EGFR gene KD also led to decreased *ADIPOQ*, *FABP4*, *FASN* and *DGAT1* mRNA levels (Fig. 4B), and ERBB2 gene KD decreased *FASN* mRNA, *DGAT1* and *FABP4* (Fig. 4B).

These experiments supported the relevance of EGFR in human adipogenesis and suggest that even though ERBB2 did not seem relevant during human adipocyte differentiation, this receptor might be required for adipocyte physiology.

### 3.10. NRG2 might mediate EGFR-associated adipogenic effects

Next, in the search for putative EGFR ligands that may enhance human adipose tissue adipogenesis, neuregulins were investigated. However, a previous study reported a negative association between VAT neuregulin 4 (*NRG4*) mRNA levels and expression of adipogenic genes in VAT, without any correlations in SAT [16]. Thus, in the present study other neuregulins (*NRG1*, *NRG2* and *NRG3*) were analysed. In both SAT and VAT, very low *NRG1* mRNA levels were detected. Similar to *NRG4*, VAT *NRG1* mRNA was negatively correlated with adipogenic gene expression, including *ADIPOQ*, *FASN* and *SLC2A4* (Figure S2A), but no significant correlations between *NRG1* and adipogenic genes were found in SAT. Of interest, *NRG2* was significantly increased compared to *NRG1* and *NRG4* mRNA levels (Fig. 5A-B) and positively correlated with adipogenesis-related gene expression (Fig. 5C-J). In line with these associations, during human subcutaneous and visceral adipocyte differentiation, *NRG2* mRNA was significantly increased at day 5, remaining induced until the end of the process (Figure S2B), whereas *NRG1* mRNA was significantly attenuated (Figure S2C). *NRG3* mRNA were not

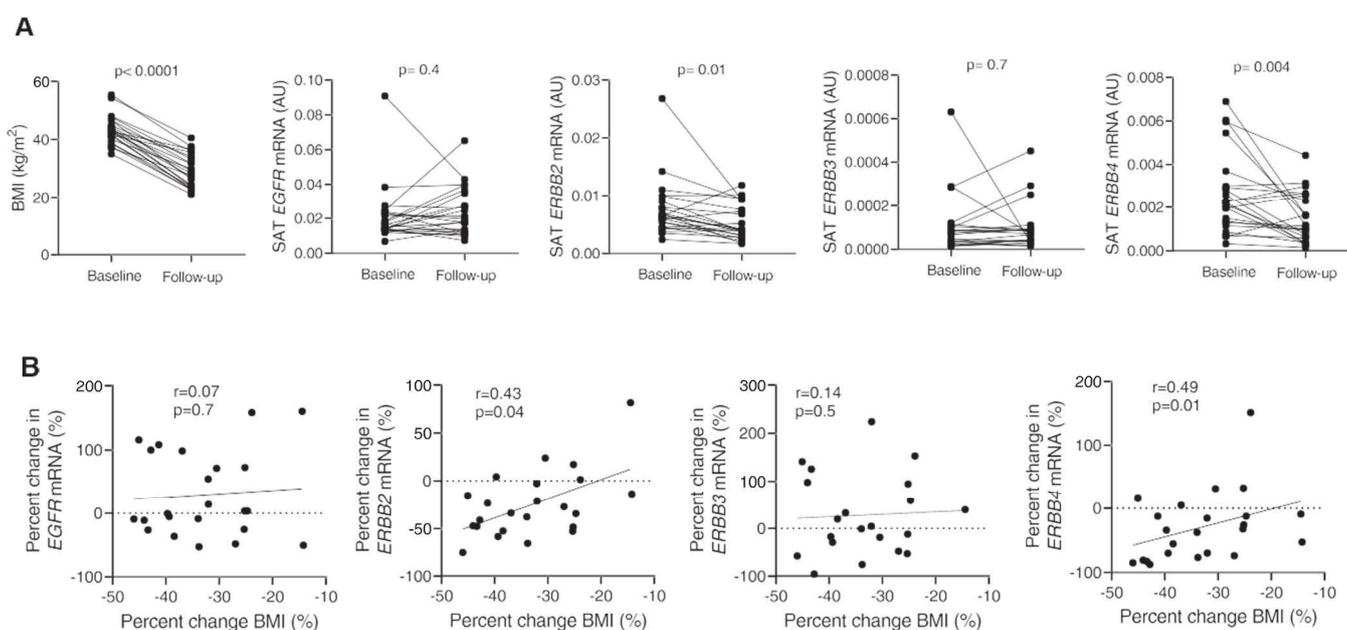
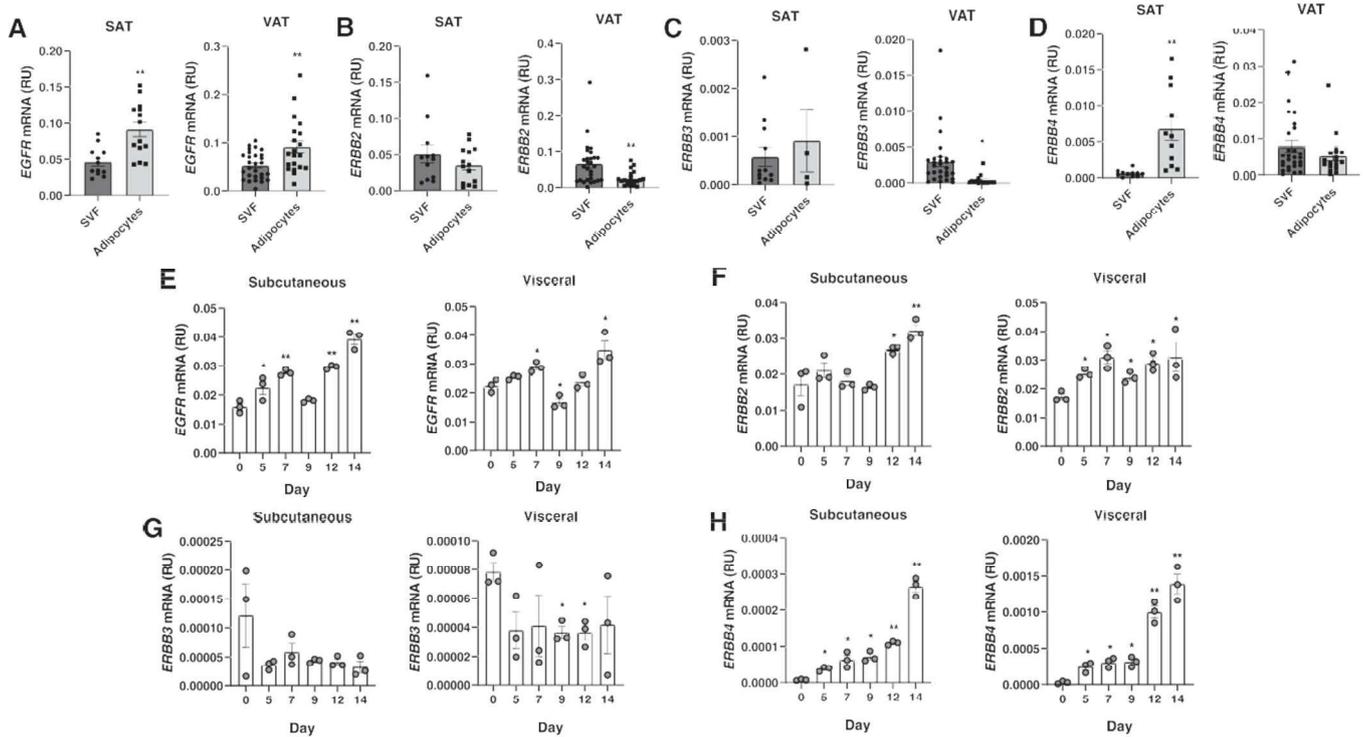
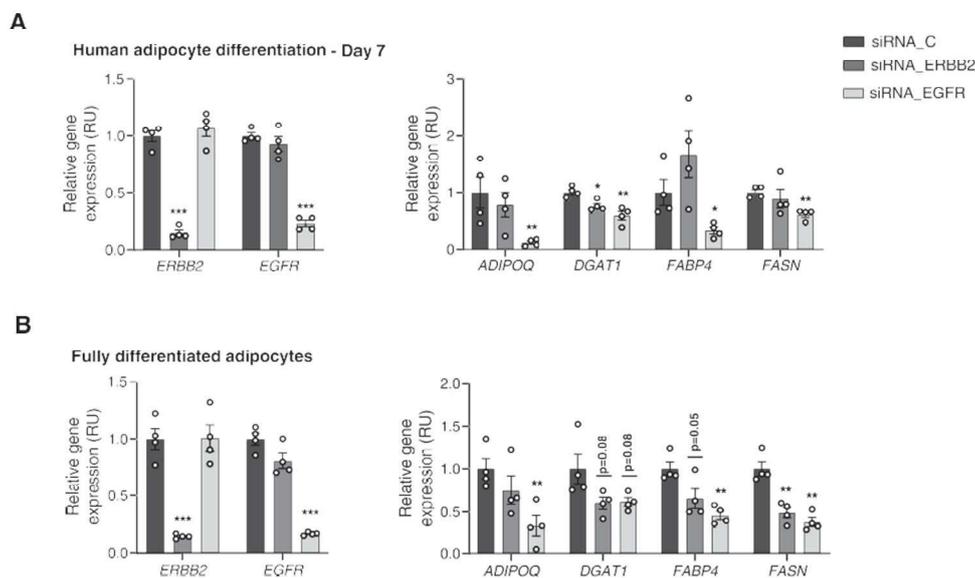


Fig. 2. A) Longitudinal changes in BMI and SAT EGFR, ERBB2, ERBB3 and ERBB4 mRNA levels after 2 year-bariatric surgery-induced weight loss intervention. B) Bivariate correlations (Spearman correlations) among the percent change in EGFR, ERBB2, ERBB3 and ERBB4 mRNA levels and BMI after weight loss intervention.



**fig. 3.** A-D) SAT and VAT *EGFR* (A), *ERBB2* (B), *ERBB3* (C) and *ERBB4* (D) mRNA levels in adipose tissue cell fractions. \*p < 0.05 and \*\*p < 0.01 compared to SVF. E-H) *EGFR* (E), *ERBB2* (F), *ERBB3* (G) and *ERBB4* (H) mRNA levels during adipocyte differentiation in subcutaneous and visceral preadipocytes. \*p < 0.05 and \*\*p < 0.01 compared to day 0.



**fig. 4.** A-B) Impact of *EGFR* and *ERBB2* gene knockdown on expression of adipogenic (*ADIPOQ*, *DGAT1*, *FABP4*, *FASN*) genes in humans subcutaneous preadipocytes during adipocyte differentiation (A) and in fully differentiated subcutaneous adipocytes (B). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001 compared to siRNA\_C. Black bars indicate siRNA\_C, dark grey bars siRNA\_ERBB2 and light grey bars siRNA\_EGFR.

detected in human adipose tissue, preadipocytes or fully differentiated adipocytes. These data suggest that *NRG2* might play a possible role in human adipocyte differentiation.

### 3.11. The impact of *NRG2* gene overexpression on human adipocyte differentiation

To study the possible role of *NRG2* induction in adipocyte

differentiation, the impact of *NRG2* gene overexpression was evaluated at different stages of human adipocyte differentiation, including early stage (from day 0-7), late stage (from day 7-14) and during all the process (day 0-14). *NRG2* gene overexpression at day 0 slightly decreased expression of some adipogenic genes at day 7 (including *PPARG* and *FASN* genes; Figure S3A-B) and day 14 (including *ADIPOQ*, *SLC2A4*, *PPARG*, *DGAT1* and *FASN* genes; Figure S3C-D), without resulting in significant differences in lipid droplet counts (Figure S3E

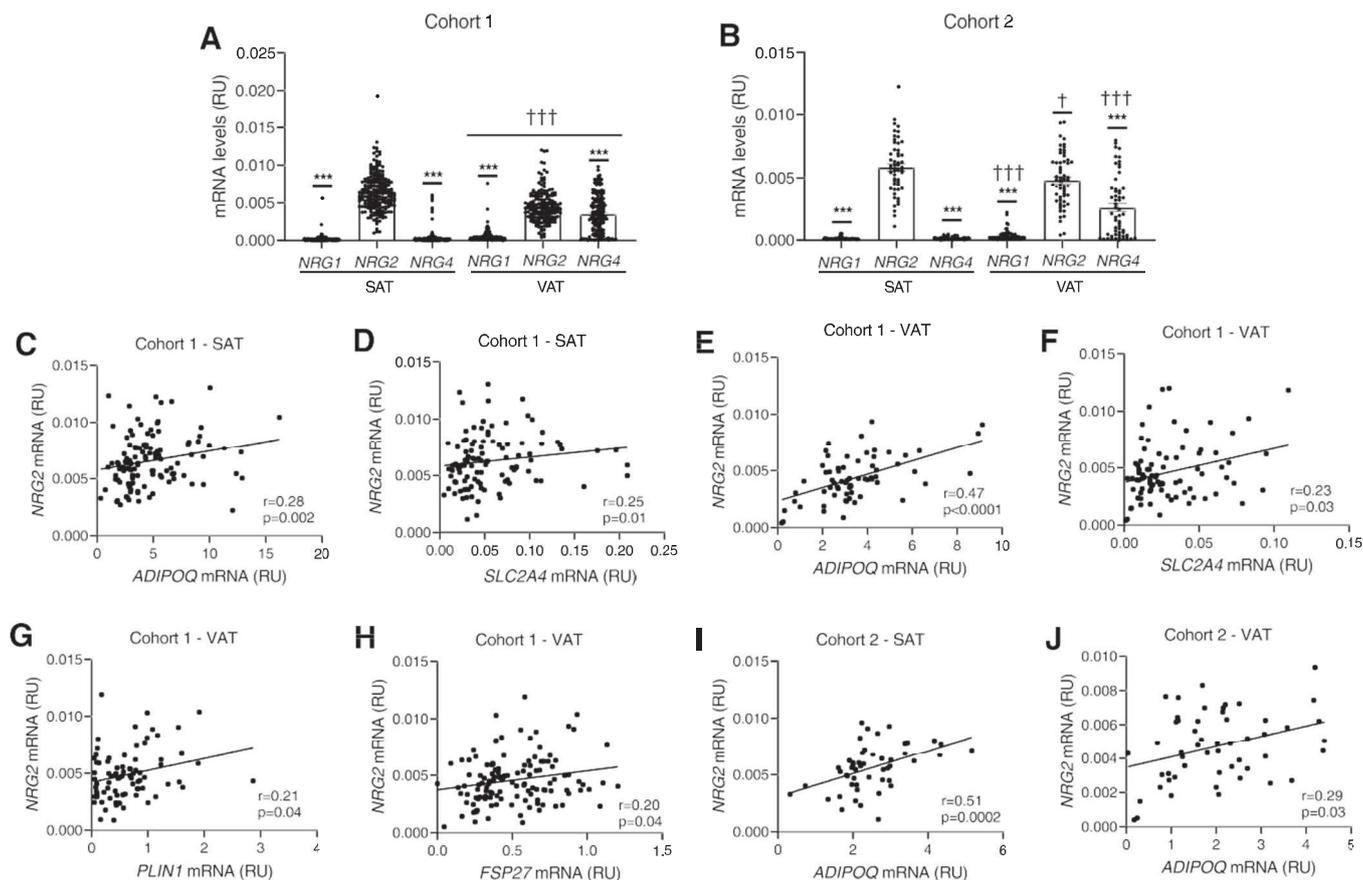


fig. 5. A-B) SAT and VAT *NRG1*, *NRG2* and *NRG4* mRNA levels in cohort 1 (A) and cohort 2 (B). \*\*\**p* < 0.001 compared to *NRG2* mRNA levels; † < 0.05 and ††† < 0.001 compared to SAT. C-5) Bivariate correlations (Spearman correlations) among SAT and VAT adipogenic and *NRG2* mRNA levels in cohort 1 and 2.

and Figure S4). However, the induction of *NRG2* gene overexpression at day 7 resulted in increased markers of adipocyte differentiation, including expression of relevant adipogenic genes (*CEBPA* and *FABP4*), and increased number of lipid droplets (Fig. 6A-C and Figure S5) at the end of adipocyte differentiation process. However, while transfected cells displayed a very high increase in *NRG2* mRNA levels, the improvement in adipogenesis was rather more restrained, leading us to question whether *NRG2* mRNA was properly translated to protein.

In HEK293 cell line, we confirmed the very significant increase in *NRG2* mRNA levels in transfected cells, whereas only slightly increased intracellular *NRG2* protein, indicating that the increased *NRG2* mRNA levels were not proportional to intracellular *NRG2* protein levels (Figure S6).

#### 4. Discussion

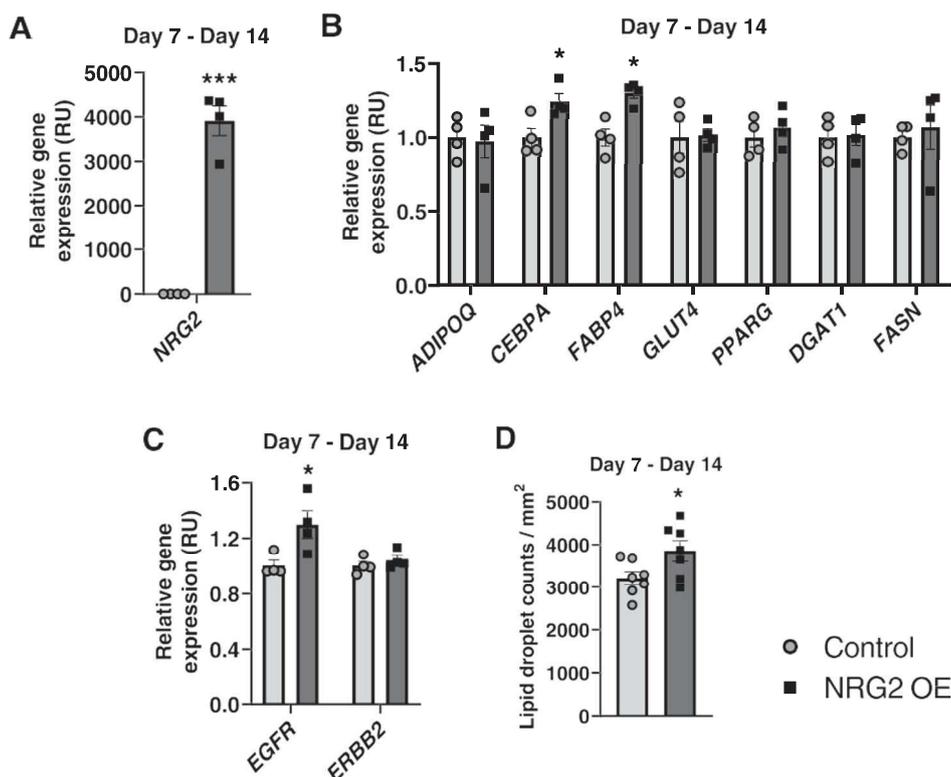
Current study provides several evidences supporting an important role for EGFR in human adipogenesis:

- i) In two independent cohorts, human adipose tissue *EGFR* gene expression was significantly correlated with expression of adipogenic genes in both SAT and VAT.
- ii) In adipose tissue cell fraction, *EGFR* gene expression was significantly increased in adipocytes compared to SVF.
- iii) In human subcutaneous and visceral preadipocytes, *EGFR* gene expression increased during first stage of adipocyte differentiation, achieving maximal levels at the end of the process.
- iv) In human subcutaneous preadipocytes, *EGFR* gene knockdown resulted in decreased expression of adipogenic (*ADIPOQ*, *DGAT1*, *FABP4* and *FASN*) genes during adipocyte differentiation.

- v) In fully differentiated human subcutaneous adipocytes, *EGFR* gene knockdown also resulted in decreased expression of adipogenic genes.

In line with these findings, a previous study in 32 women with different degrees of obesity and insulin resistance reported that subcutaneous adipose tissue *EGFR* protein levels were positively correlated with expression of some adipogenic genes, and that pharmacological inhibition of *EGFR* reduced expression of adipogenic genes in human preadipocytes after adipocyte differentiation induction [5]. Similar to this study [5], SAT *EGFR* gene expression was negatively correlate with insulin resistance (*HOMA<sub>IR</sub>*). Taking into account the importance of adipose tissue function on insulin sensitivity [2-4], current data led us to suggest that adipose tissue *EGFR* might a useful therapeutic target to improve insulin resistance through the enhancing of adipose tissue adipogenesis. It is important to note that impaired adipogenesis led to decreased adiponectin production (an adipokine with insulin-sensitizing effects [21]), reduced cellular capacity to store excess energy by decreasing the rates of fatty acid uptake and esterification [22], and enhanced adipose tissue inflammation [23]. All these changes consequently promote an insulin resistance phenotype [24].

Another important finding of current study was the association between *ERBB2* mRNA and obesity. This association has been shown in two independent cross-sectional cohorts and longitudinally after bariatric surgery-induced weight loss. Consistent with these findings, previous studies reported increased serum *HER2* levels, which were the soluble form of *ERBB2* protein, in human obesity and insulin resistance [25,26]. Since serum *HER2* levels reflects tumor *ERBB2* overexpression in oncology patients [27], current data led us to postulate that the association between serum *HER2* and obesity might come from increased



**fig. 6.** A-D) Impact of day 7-induced *NRG2* gene overexpression on *NRG2* (A), adipogenic (*ADIPOQ*, *CEBPA*, *FABP4*, *SLC2A4*, *PPARG*, *DGAT1*, *FASN*) (B), *EGFR* and *ERBB2* (C) gene expression, and on lipid droplet counts (D) at day 14. \**p* < 0.05 and \*\*\**p* < 0.001 compared to control.

*ERBB2* expression in adipose tissue. Adipose tissue *ERBB2* was also positively correlated with fasting glucose, and negatively with lipogenic genes, but most of these correlations were lost after adjusting by age and BMI. In fact, *ERBB2* gene knockdown did not impact on adipogenic genes (except for *DGAT1*) during human adipocyte differentiation, but in fully differentiated adipocytes it led to decreased mRNA levels of the major lipogenic enzyme fatty acid synthase (*FASN*). These data indicate that *ERBB2* might support *de novo* lipogenesis in differentiated adipocytes, but it was not required for an optimal differentiation of adipocytes, as previously reported [5]. Strengthening these findings, previous studies demonstrated the bidirectional relationship between *ERBB2* and lipogenesis in cancer cells [28], showing that the pharmacological or genetic inhibition of this receptor reduced *FASN* expression, and that the specific inhibition of *FASN* attenuated *ERBB2* signaling [28-31]. However, it is important to note that the total depletion of *ErbB2* gene in mouse primary preadipocytes blunted adipocyte differentiation, indicating that at least a minimal level of *ErbB2* might be required to sustain adipose tissue adipogenesis and expansion.

Otherwise, even though *ERBB3* and *ERBB4* gene expression were associated with expression of some adipogenic and inflammatory genes, the loss of most of these associations after adjusting for age and BMI, the disparity between cohorts and the very low mRNA levels detected suggest that these receptors are of little relevance in adipose tissue physiology. In fact, *ErbB4* depletion in mouse primary preadipocytes did not impact on adipogenic gene expression (current study). In line with this, previous studies also reported very low *ERBB3* and *ERBB4* mRNA levels in 3T3-L1 cells [6] and human adipose tissue [5]. The different associations observed in VAT from cohort 1 between expression of *ERBB4* and *IL6/IL8* (negative) and between *ERBB4* and *TNF* (positive) might be explained by their covariance with other metabolic factors. Interestingly, while the association between VAT *ERBB4* and *TNF* gene expression was no longer significant after adjusting by age and BMI, the negative correlation between VAT *ERBB4* and *IL6/IL8* expression remained statistically significant. Supporting these associations, *ErbB4*

deletion in mice resulted in increased adipose tissue inflammation [18], while the expression of *NRG4*, a specific ligand for *ERBB4*, was negatively correlated with *IL6* and *IL8* gene expression in VAT [16], and *Nrg4* gene knockdown in 3T3-L1 adipocytes also enhanced the expression of proinflammatory cytokines [32].

In addition, exploring neuregulins as some putative endogenous EGFR ligands in adipose tissue that promote adipogenic pathway, we found that *NRG2* might be an optimal candidate. Compared to other detected neuregulins in adipose tissue (*NRG1* and *NRG4*), increased *NRG2* mRNA levels were found. SAT and VAT *NRG2* mRNA levels were positively correlated with adipogenic genes and increased during adipocyte differentiation, whereas *NRG1* (current study) and *NRG4* [16] negatively correlated with adipogenesis. To the best of our knowledge this is the first study reporting *NRG2* expression in adipose tissue and its association with adipogenesis. The overexpression of *NRG2* gene in the late stage of adipocyte differentiation (but not in preadipocytes) slightly increased expression of some adipogenesis-related genes, *CEBPA* and *FABP4*, and the number of intracellular lipid droplets, supporting a possible role of *NRG2* on the maintenance of adipogenesis, but not in the induction of adipocyte differentiation.

Taken together, this study demonstrates the importance of EGFR and *ERBB2* in human adipose tissue physiology, showing the association between adipose tissue *ERBB2* and obesity, confirming the adipogenic role of EGFR and suggesting neuregulin 2 as a possible endogenous EGFR ligand with a hypothetical role in human adipogenesis.

### Concluding

This work was partially supported by research grants PI16/01173 and PI19/01712 from the Instituto de Salud Carlos III from Spain, FEDER funds and by Fundació Marató de TV3 (201626-30). CIBEROBN Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición is an initiative from the Instituto de Salud Carlos III and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) from Spain.

## Author contributions statement

JMF-R and JMM-N participated in study design and analysis of data and wrote and edited the manuscript. JL, CM, FO, AL, NO-C and FD-S participated in acquisition of data. JA, MC, AG, and WR participated in interpretation of data. JL, CM, FO, AL, NO-C, FD-S, JA, MC, AG, and WR revised the manuscript critically for important intellectual content.

All authors participated in final approval of the version to be published.

## Conflict of interest statement

The authors declared no conflict of interest.

## Acknowledgments

We acknowledge the technical assistance of Oscar Rovira (IDIBGI). We also want to particularly acknowledge the patients, the *FATBAN7* platform promoted by the *CIBEROBN* and the *IDIBGI* Biobank (Biobanc *IDIBGI*, B.0000872), integrated in the Spanish National Biobanks Network, for their collaboration and coordination.

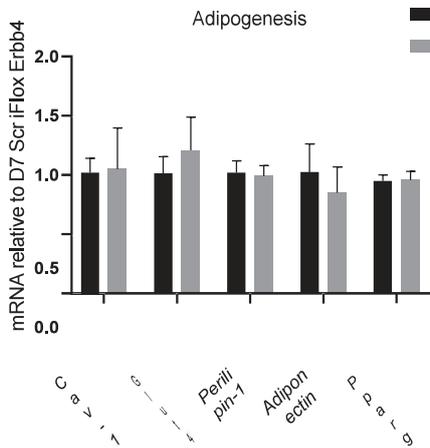
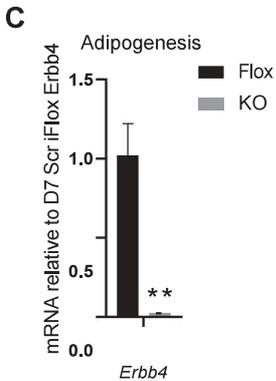
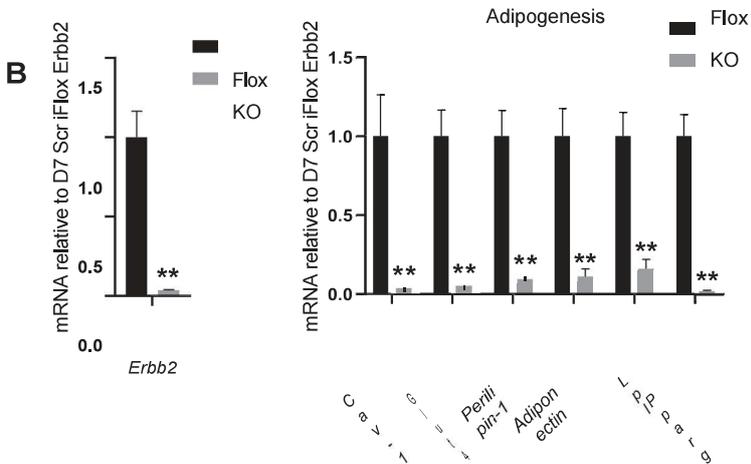
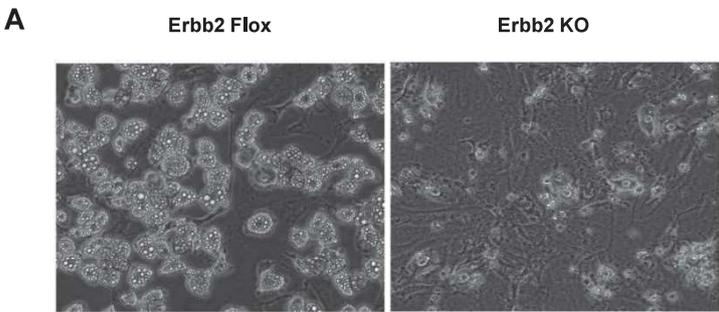
## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.biopha.2022.113972](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113972).

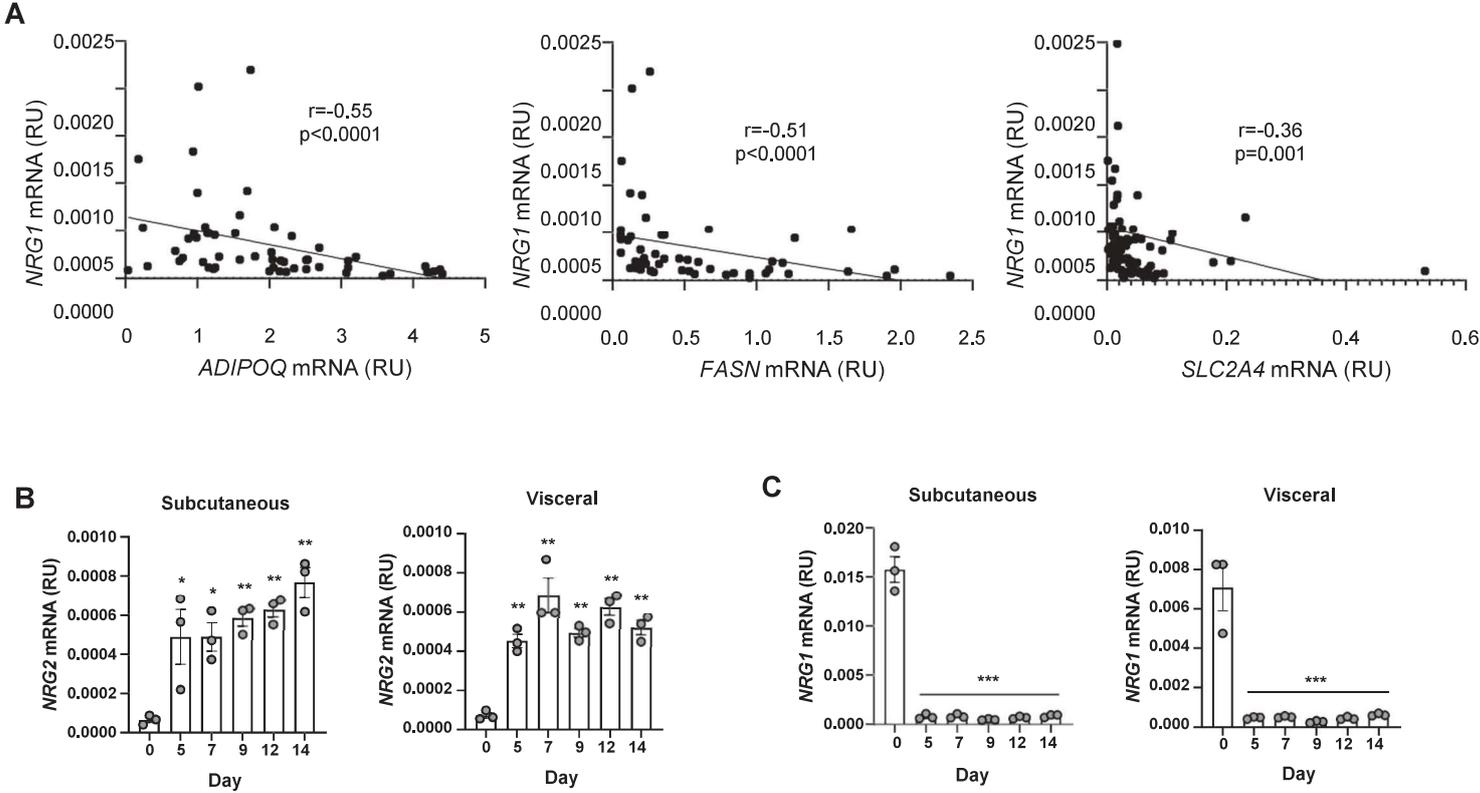
## References

- M. Blüher, Obesity: global epidemiology and pathogenesis, *Nat. Rev. Endocrinol.* (2019), <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>.
- S. Carobbio, V. Pellegrinelli, A. Vidal-Puig, Adipose tissue function and expandability as determinants of lipotoxicity and the metabolic syndrome, *Adv. Exp. Med. Biol.* (2017) 161–196, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_7).
- M. Blüher, Adipose tissue dysfunction in obesity, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* (2009), <https://doi.org/10.1055/s-0029-1192044>.
- S.S. Choe, J.T. Huh, I.J. Hwang, J.I. Kim, J.B. Kim, Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders, *Front. Endocrinol.* (2016), <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00030>.
- C. Rogers, F. Moukdar, M.A. McGee, B. Davis, B.M. Buehrer, K.W. Daniel, S. Collins, H. Barakat, J. Robidoux, EGF receptor (ERBB1) abundance in adipose tissue is reduced in insulin-resistant and type 2 diabetic women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2012), <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1033>.
- E. Pagano, J.C. Calvo, ErbB2 and EGFR are downmodulated during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, *J. Cell. Biochem.* (2003), <https://doi.org/10.1002/jcb.10647>.
- E. Pagano, O. Coso, J.C. Calvo, Down-modulation of erbB2 activity is necessary but not enough in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, *J. Cell. Biochem.* (2008), <https://doi.org/10.1002/jcb.21621>.
- M. Harrington, S. Pond-Tor, C.M. Boney, Role of epidermal growth factor and ErbB2 receptors in 3T3-L1 adipogenesis, *Obesity* (2007), <https://doi.org/10.1038/oby.2007.562>.
- A. Vazquez-Martin, F.J. Ortega-Delgado, J.M. Fernandez-Real, J.A. Menendez, The tyrosine kinase receptor HER2 (erbB-2): From oncogenesis to adipogenesis, *J. Cell. Biochem.* (2008), <https://doi.org/10.1002/jcb.21917>.
- V. Cervelli, M.G. Sciole, P. Gentile, E. Doldo, E. Bonanno, L.G. Spagnoli, A. Orlandi, Platelet-rich plasma greatly potentiates insulin-induced adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells through a serine/threonine kinase Akt-dependent mechanism and promotes clinical fat graft maintenance, *Stem Cells Transl. Med.* (2012), <https://doi.org/10.5966/sctm.2011-0052>.
- D.L. Falls, Neuregulins: Functions, forms, and signaling strategies, *Exp. Cell Res.* (2003), [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(02\)00102-7](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(02)00102-7).
- D.B. Nugroho, K. Ikeda, K. Kajimoto, K. Ichi Hirata, N. Emoto, Activation of neuregulin-4 in adipocytes improves metabolic health by enhancing adipose tissue angiogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.197>.
- D.B. Nugroho, K. Ikeda, A.J. Barinda, D.A. Wardhana, K. Tagi, K. Miyata, T. Oike, K. Ichi Hirata, N. Emoto, Neuregulin-4 is an angiogenic factor that is critically involved in the maintenance of adipose tissue vasculature, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.043>.
- V. Pellegrinelli, V.J. Peirce, L. Howard, S. Virtue, D. Túrei, M. Senzacqua, A. Frontini, J.W. Dalley, A.R. Horton, G. Bidault, I. Severi, A. Whittle, K. Rahmouni, J. Saez-Rodriguez, S. Cinti, A.M. Davies, A. Vidal-Puig, Adipocyte-secreted BMP8b mediates adrenergic-induced remodeling of the neuro-vascular network in adipose tissue, *Nat. Commun.* (2018), <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07453-x>.
- M. Rosell, M. Kaforou, A. Frontini, A. Okolo, T.W. Chan, E. Nikolopoulou, S. Millership, M.E. Fenech, D. MacIntyre, J.O. Turner, J.D. Moore, E. Blackburn, W. J. Gullick, S. Cinti, G. Montana, M.G. Parker, M. Christian, Brown and white adipose tissues: intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* (2014), <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00473.2013>.
- F. Comas, C. Martínez, M. Sabater, F. Ortega, J. Latorre, F. Díaz-Sáez, J. Aragonés, M. Camps, A. Gumà, W. Ricart, J.M. Fernández-Real, J.M. Moreno-Navarrete, Neuregulin 4 is a novel marker of beige adipocyte precursor cells in human adipose tissue, *Front. Physiol.* (2019), <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00039>.
- G.X. Wang, X.T. Zhao, Z.X. Meng, M. Kern, A. Dietrich, Z. Chen, Z. Cozacov, D. Zhou, A.L. Okunade, X. Su, S. Li, M. Blüher, J.D. Lin, The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis, *Nat. Med.* (2014), <https://doi.org/10.1038/nm.3713>.
- F. Zeng, T. Wang, L.A. Kloepper, S. Wang, R.C. Harris, ErbB4 deletion predisposes to development of metabolic syndrome in mice, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* (2018), <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00166.2018>.
- F.J. Ortega, J.M. Mercader, J.M. Moreno-Navarrete, L. Nonell, E. Puigdecamet, J. I. Rodríguez-Hermosa, O. Rovira, G. Xifra, E. Guerra, M. Moreno, D. Mayas, N. Moreno-Castellanos, J.A. Fernández-Formoso, W. Ricart, F.J. Tinahones, D. Torrens, M.M. Malagón, J.M. Fernández-Real, Surgery-induced weight loss is associated with the downregulation of genes targeted by MicroRNAs in adipose tissue, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100 (2015) E1467–E1476, <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2357>.
- J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.T. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat. Methods* (2012), <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- J. Ryu, J.T. Hadley, Z. Li, F. Dong, H. Xu, X. Xin, T. Zhang, C. Chen, S. Li, X. Guo, J. L. Zhao, R.J. Leach, M.A. Abdul-Ghani, R.A. DeFronzo, A. Kamat, F. Liu, L.Q. Dong, Adiponectin alleviates diet-induced inflammation in the liver by suppressing MCP-1 expression and macrophage infiltration, *Diabetes* 70 (2021) 1303–1316, <https://doi.org/10.2337/db20-1073>.
- U. Smith, B.B. Kahn, Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids, *J. Intern. Med.* 280 (2016) 465–475, <https://doi.org/10.1111/joim.12540>.
- K.K.-L. Wu, S.W.-M. Cheung, K.K.-T. Cheng, NLRP3 inflammasome activation in adipose tissues and its implications on metabolic diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020), <https://doi.org/10.3390/ijms21114184>.
- B. Gustafson, S. Hedjazifaz, S. Gogg, A. Hammarstedt, U. Smith, Insulin resistance and impaired adipogenesis, *Trends Endocrinol. Metab.* 26 (2015) 193–200, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.01.006>.
- M. Tanabe, N. Kaneko, T. Takeuchi, *Schistosoma mansoni*: Suppression of carbamoyl phosphate synthetase (ammonia) and ornithine carbamoyltransferase activities in the liver of infected mice, *Exp. Parasitol.* (1989), [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(89\)90128-8](https://doi.org/10.1016/0014-4894(89)90128-8).
- J.M. Fernández-Real, J.A. Menendez, G. Frühbeck, J.M. Moreno-Navarrete, A. Vazquez-Martín, W. Ricart, Serum HER-2 concentration is associated with insulin resistance and decreases after weight loss, *Nutr. Metab.* (2010), <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-14>.
- C. Tsé, A.S. Gauchez, W. Jacot, P.J. Lamy, HER2 shedding and serum HER2 extracellular domain: Biology and clinical utility in breast cancer, *Cancer Treat. Rev.* (2012), <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.03.008>.
- J.A. Menendez, L. Vellon, I. Mehmi, B.P. Oza, S. Ropero, R. Colomer, R. Lupu, Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2004), <https://doi.org/10.1073/pnas.0403390101>.
- M.S. Weng, C.T. Ho, T.S. Ho, J.K. Lin, Theanaphthoquinone inhibits fatty acid synthase expression in EGF-stimulated human breast cancer cells via the regulation of EGFR/ErbB-2 signaling, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2007), <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.10.021>.
- X.H. Long, K. Zhao, G.M. Zhang, T. Zhou, R.P. Zhou, Z.L. Liu, Z.H. Zhang, Interaction between fatty acid synthase and human epidermal growth receptor 2 (HER2) in osteosarcoma cells, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* (2014).
- J.A. Menendez, Fine-tuning the lipogenic/lipolytic balance to optimize the metabolic requirements of cancer cell growth: Molecular mechanisms and therapeutic perspectives, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* (2010), <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.09.005>.
- F. Díaz-Sáez, C. Blanco-Sinfreu, A. Archilla-Ortega, D. Sebastian, M. Romero, M. I. Hernández-Alvarez, S. Mora, X. Testar, W. Ricart, J.M. Fernández-Real, J. M. Moreno-Navarrete, J. Aragonés, M. Camps, A. Zorzano, A. Gumà, Neuregulin 4 Downregulation Induces Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes through Inflammation and Autophagic Degradation of GLUT4 Vesicles, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021), <https://doi.org/10.3390/ijms222312960>.

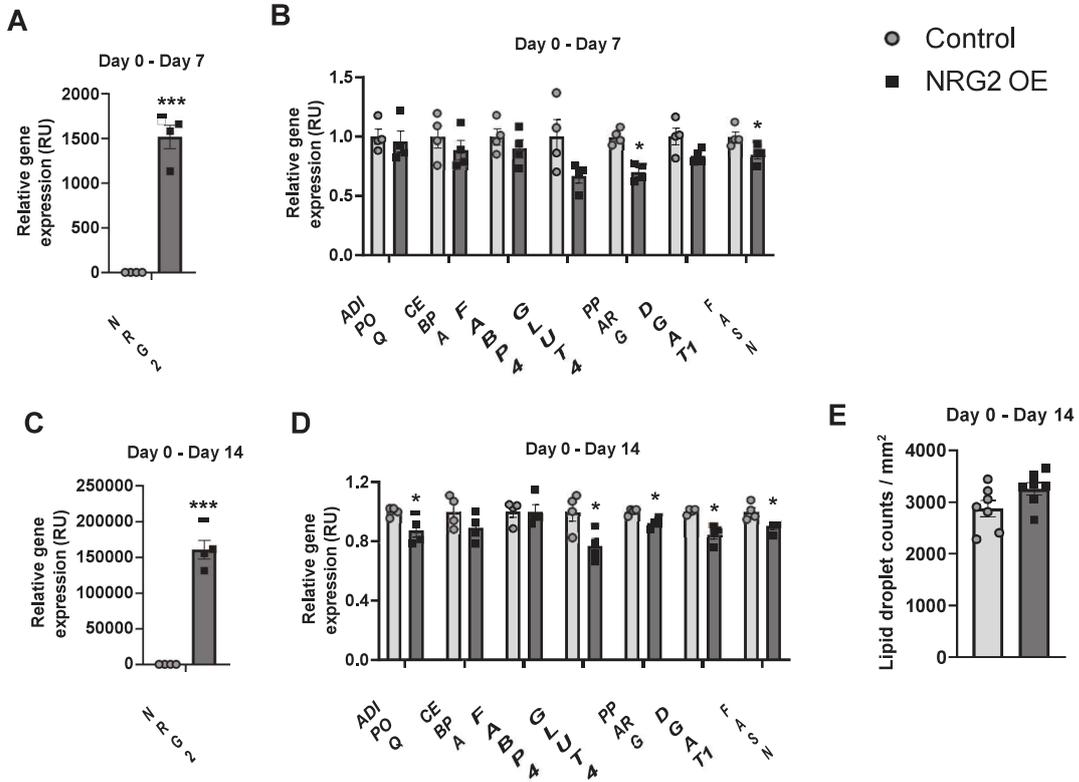
Suppl Figure 1



**Suppl Figure 2**



### Suppl Figure 3

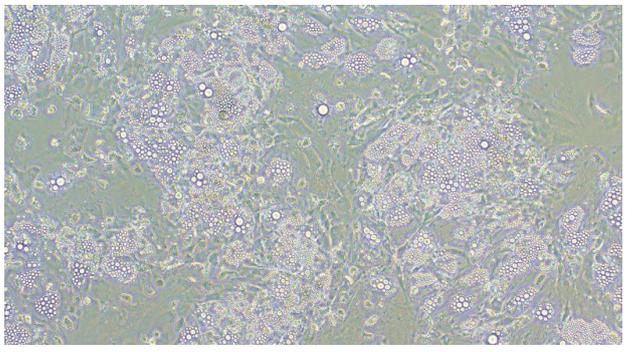
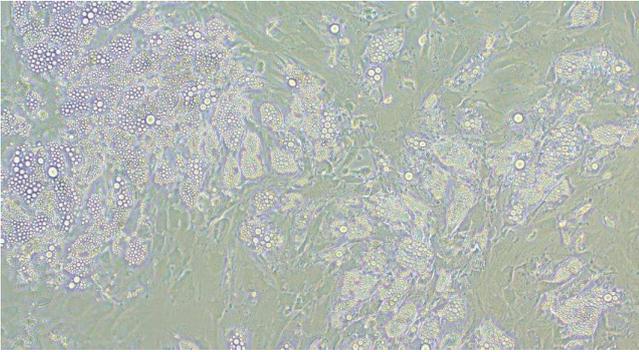
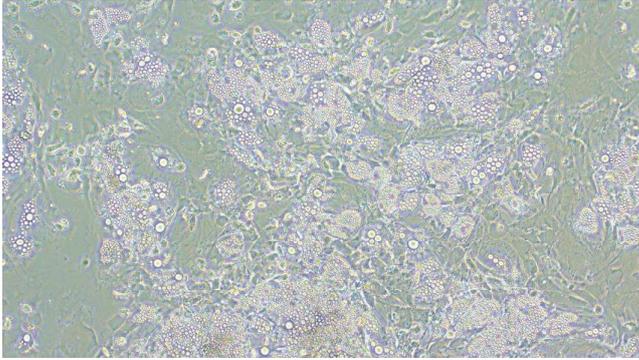
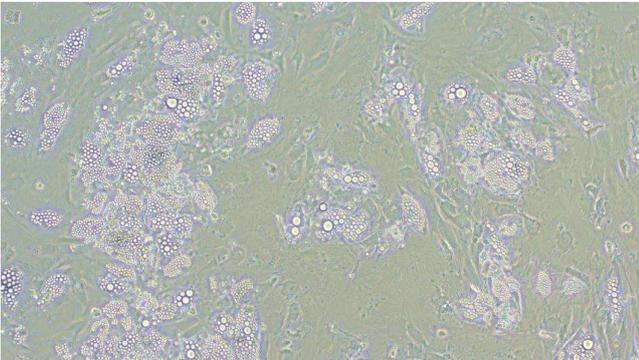


Suppl Figure 4

Day 0 – Day 14

CONTROL

NRG2 OE

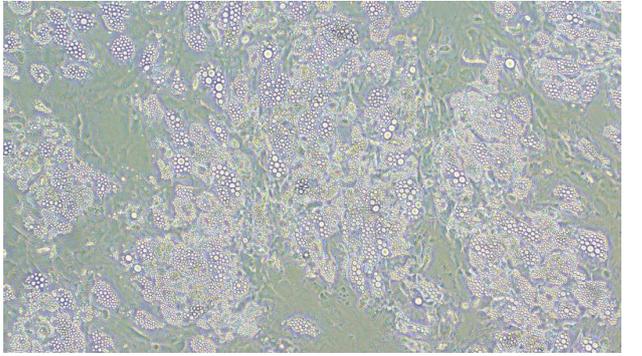
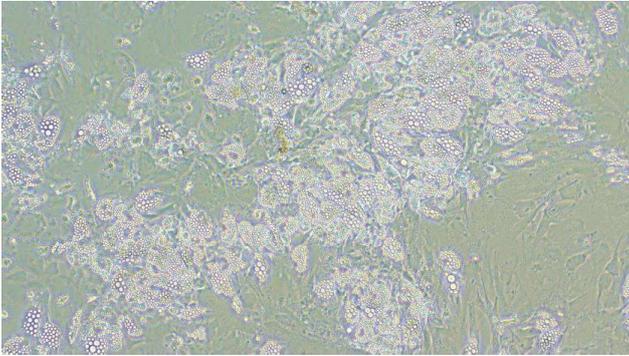
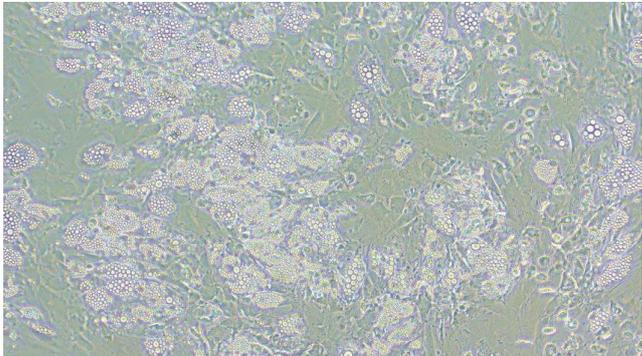
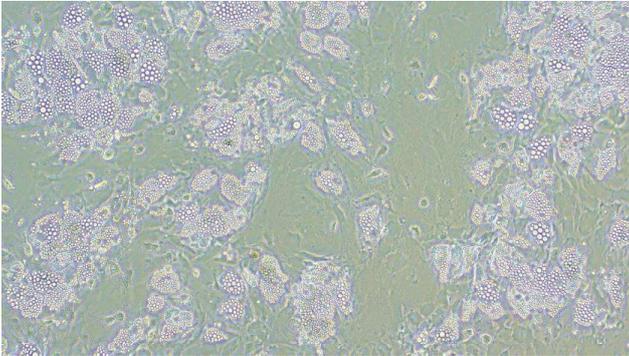


Suppl Figure 5

Day 7 – Day 14

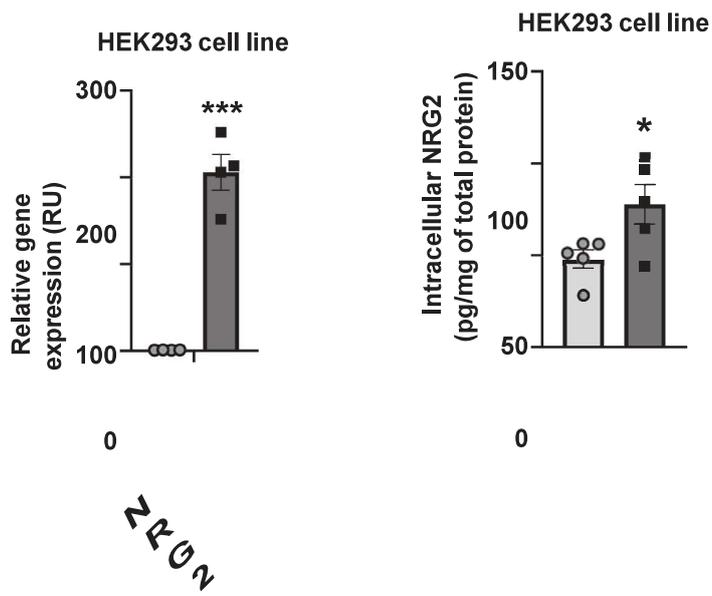
CONTROL

NRG2 OE



Suppl Figure 6

- Control
- NRG2 OE





## **DISCUSSION GENERAL**





Han sido muchos los estudios realizados con la gran familia de neuregulinas desde su descubrimiento en 1990. Varios estudios han señalado a las neurregulinas como una importante familia de ligandos que regulan diversos aspectos del metabolismo de la glucosa, lípidos y el balance energético. En las células del músculo esquelético, la administración de neurregulina recombinante estimuló la captación de glucosa en las células musculares<sup>136</sup> en un mecanismo alternativo independiente de la insulina, activando las vías PI3K, PDK1 y PKCzeta<sup>139</sup> y promovió la glucosa y oxidación de palmitato, potenciando la capacidad oxidativa mitocondrial<sup>137</sup>. En el hígado, la neuregulina 1 (Nrg1) y la neuregulina 4 (Nrg4) redujeron la gluconeogénesis y la lipogénesis y aumentaron la oxidación de ácidos grasos, mejorando la sensibilidad sistémica a la insulina y la tolerancia a la glucosa <sup>132,145,146,147,172</sup>. De hecho, la vía de señalización Nrg4/ErbB4 protege a los hepatocitos de la muerte celular inducida por estrés, evitando la progresión de esteatosis a esteatohepatitis<sup>170</sup>. En células de cáncer de mama humano, la unión de NRG1 a ERBB4 activa SREBP-2 y condujo a una mayor expresión de genes relacionados con la biosíntesis de colesterol y la captación de LDL<sup>173</sup>. Un estudio reciente demostró que la eliminación de ErbB4 aceleró el desarrollo de obesidad, dislipidemia, esteatosis hepática, hiperglucemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina después de 24 semanas con una dieta baja en grasas<sup>162</sup>. Nrg4, un ligando específico para ErbB4 involucrado en el crecimiento de neuritas, la administración en adipocitos 3T3-L1 inhibió la lipogénesis e indujo el pardeamiento y la captación de glucosa, pero no ejerció ningún efecto sobre la adipogénesis y la lipólisis<sup>162</sup>. De hecho, Nrg4 ha sido propuesto como un marcador de la actividad del tejido adiposo marrón (BAT) en ratones, siendo altamente expresado en la actividad BAT inducida por frío y el pardeamiento del tejido adiposo blanco (WAT)<sup>132,152</sup>

Los experimentos in vitro mostraron que NRG4 derivado de adipocitos marrones podría promover el crecimiento de neuritas en el tejido adiposo, aumentando la inervación simpática, mejorando la actividad de BAT y el oscurecimiento de WAT<sup>152</sup>. Sin embargo, Wang et al. (2014)<sup>132</sup> informaron que a pesar de la abundante expresión de Nrg4 en BAT, parece prescindible para la respuesta de hipotermia inducida por frío, siendo UCP1 y DIO2 inducidos en un grado similar por la exposición al frío en ratones WT y NRG4KO. Estos hallazgos indicaron que Nrg4 no participó directamente en la termogénesis de BAT.

La obesidad inducida por la dieta condujo a una disminución significativa de la expresión del gen Nrg4 en WAT pero no en BAT<sup>132,146,172</sup> en ratones. Un estudio reciente también mostró que la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) inducida por la dieta resultó en una reducción significativa de Nrg4 tanto en BAT como en WAT<sup>170</sup>

Estos estudios sugirieron que el Nrg4 derivado del tejido adiposo podría ejercer efectos positivos sobre los trastornos metabólicos asociados a la obesidad <sup>132,146,170,172</sup>, mejorando la tolerancia a la glucosa, sensibilidad a la insulina y atenuando la inflamación del tejido adiposo y del hígado<sup>132,146,198,170,172</sup>

En humanos, sólo un estudio ha investigado los niveles de ARNm de NRG4 en el tejido adiposo en asociación con la masa de grasa corporal, el contenido de lípidos en el hígado y la tolerancia a la glucosa<sup>132</sup>, pero ningún estudio previo ha investigado la relación entre NRG4 y los marcadores del oscurecimiento del tejido adiposo humano. La modulación de la actividad del tejido adiposo marrón y el oscurecimiento del tejido adiposo blanco se ha propuesto como una estrategia terapéutica prometedora en el tratamiento de los trastornos metabólicos asociados a la obesidad<sup>107,174,175,176</sup> con la intención de mejorar la sensibilidad a la insulina<sup>176,177</sup> y la esteatosis hepática <sup>178</sup> entre otros.

Ante todos estos resultados obtenidos in vitro y la escasa información obtenida hasta el momento en muestras humanas, nos hemos propuesto estudiar el rol de neuregulinas en la fisiología del tejido adiposo humano asociado con la obesidad aportando conocimiento sobre:

1. La relación potencial entre el tejido adiposo humano NRG4 y marcadores browning
2. Rol de NRG4 en tejido adiposo de pacientes con diferentes grados de obesidad y la sensibilidad a la insulina y su Valor clínico como biomarcadores de diagnóstico / pronóstico en enfermedades metabólicas
4. Efectos biológicos de NRG1 y NRG4 en hepatocitos humanos
5. Expresión y señalización de las diferentes neuregulinas 1, 2 y 3 y sus correlaciones con la expresión de los receptores ErbB en tejido adiposo subcutáneo y visceral humano con diferentes grados de obesidad y resistencia a la insulina.
6. Impacto de la eliminación de genes inducida por siRNA en EGFR y ErbB2 en preadipocitos y adipocitos humanos, así como los efectos causados por la sobreexpresión de neuregulina 2 (NRG2).

Nuestro primer objetivo ha sido evaluar el impacto de la expresión de NRG4 en tejido adiposo humano con diferentes grados de obesidad y de sensibilidad a la insulina y estudiar la relación potencial con otros marcadores de adipocitos marrones/beige implicados en la actividad del TAM y pardeamiento del TAB.

Para ello, hemos estudiado el ARNm de NRG4 y marcadores de browning en adipocitos de grasa visceral (VAT) y en grasa subcutánea (SAT) humana, así como la asociación de NRG4 con la actividad insulínica en tejido adiposo de pacientes con diferentes grados de obesidad y sensibilidad a la insulina recogidas en 2 estudios transversales previos durante procedimientos quirúrgicos electivos (colecistectomía, cirugía de hernia abdominal y cirugía de bypass gástrico).

En la cohorte 1, se incluyeron 331 participantes con peso corporal normal y diferentes grados de obesidad, con índice de masa corporal (IMC) dentro de 20 y 68 kg/m<sup>2</sup>. Se obtuvo 155 muestras de tejido adiposo visceral (VAT) y 176 muestras de tejido adiposo subcutáneo (SAT)

En la cohorte 2 se incluyeron 59 pacientes obesos (IMC > 35 kg/m<sup>2</sup>) con diferentes grados de acción de la insulina [medida con pinza hiperinsulinémica-euglucémica<sup>179</sup>. Se obtuvo 34 muestras de tejido adiposo visceral (VAT) y 25 muestras de tejido adiposo subcutáneo (SAT)

Los resultados obtenidos muestran una relación significativa entre la expresión génica de NRG4 y TMEM26 (descrito como marcador específico de browning<sup>107,180,181</sup>) en tejido adiposo humano. Curiosamente, esta asociación se encontró tanto en el VAT como en el SAT y se validó en una segunda cohorte independiente. También encontramos asociaciones positivas entre NRG4 y marcadores de actividad termogénica (característica de los adipocitos tanto marrones como beige) como la expresión de los genes UCP1 y UCP3. Además, la expresión del gen VAT NRG4 se correlacionó negativamente con la expresión de genes relacionados con lipogénicos/adipogénicos (FASN y PPARG) e inflamatorios (IL6 e IL8), incluso después de controlar el IMC.

Dado que los adipocitos beige tienen menor capacidad lipogénica en comparación con los adipocitos blancos<sup>182,183</sup>, y el browning del tejido adiposo está protegido contra la inflamación del tejido adiposo visceral<sup>184,185</sup>, la asociación negativa entre NRG4 y genes adipogénicos/inflamatorios reforzó a NRG4 como marcador de adipocitos beige. De hecho, estas correlaciones solo se observaron en las muestras con mayor correlación entre NRG4 y TMEM26 ( $r = 0,77$ ,  $p < 0,0001$ ).

Sin embargo, las correlaciones entre VAT NRG4 y UCP1, UCP3, lipogénico/adipogénico y la expresión génica relacionada con la inflamación no se replicó en los participantes con obesidad mórbida (cohorte 2). Se requieren más estudios en tejido adiposo humano para validar estas correlaciones.

Tanto en la cohorte 1 como en la 2, de manera similar a los genes relacionados con los adipocitos beige (TMEM26), la expresión del gen NRG4 se expresó significativamente más en VAT, mientras que, como se esperaba, los genes relacionados con adipocitos se expresaron más en SAT<sup>183,186,187</sup>. A diferencia de los ratones, se ha observado un aumento del patrón de expresión del gen de pardeamiento en VAT humano en comparación con SAT<sup>183</sup>. Curiosamente, la expresión génica de NRG4 y TMEM26 se enriqueció en SVF de VAT en comparación con SVF de SAT o adipocitos de VAT o SAT. Este hallazgo apunta a una población específica de células precursoras de color beige en VAT, caracterizadas por una mayor expresión de los genes NRG4 y TMEM26, y podría explicar el aumento de la expresión de genes relacionados con el color beige/pardeamiento observados en este depósito de grasa datos actuales y Zuriaga et al., 2017<sup>183</sup>. Reforzando esta idea, estudios previos demostraron que la expresión del gen TMEM26 también aumentó en SVF y disminuyó en las últimas etapas de la diferenciación de los adipocitos beige, e indicaron su abundancia en los precursores de los adipocitos beige<sup>188,189</sup>.

En conjunto, estos hallazgos indicaron que NRG4 es un marcador adicional de adipocitos beige en tejido adiposo humano y sugirien un posible papel de este factor en el desarrollo de adipocitos beige en depósitos de grasa humana. Apoyando esta hipótesis, Rosell et al. (2014) sugirieron que NRG4 podría promover el crecimiento de neuritas en el tejido adiposo, aumentando la inervación simpática y, en consecuencia, mejorando el pardeamiento de WAT. Con respecto al posible papel de NRG4 en la actividad termogénica, Wang et al. (2014) demostraron en ratones deficientes en *Nrg4*, que ésta no participaba directamente en la termogénesis de BAT, pero Ma et al. (2016) demostraron que la sobreexpresión de *Nrg4* mejoró la actividad de BAT con un aumento de 1°C en la temperatura corporal, y la expresión del gen termogénico BAT y WAT.

Estos estudios apoyaron la idea de un posible papel de NRG4 en el pardeamiento del tejido adiposo humano, pero con datos contradictorios en relación a su actividad termogénica. Se requieren más estudios funcionales en tejido adiposo humano para confirmar el posible papel de NRG4 en este proceso.

Otro hallazgo interesante del estudio actual fue la asociación positiva entre la expresión del gen SAT NRG4 y la sensibilidad a la insulina tanto en la cohorte 1 como en la cohorte 2, evaluada por dos métodos diferentes (HOMAIR en la cohorte 1 CLAMP en la cohorte 2). En un estudio anterior en humanos, SAT y VAT NRG4 se redujeron significativamente en pacientes con intolerancia a la glucosa (IGT) y T2D<sup>132</sup>, pero este estudio no evaluó la sensibilidad a la insulina.

Aún así, no se encontraron diferencias significativas en relación con IGT o T2D, probablemente debido al número relativamente bajo de muestras de tejido adiposo en comparación con el estudio anterior (n = 642)<sup>132</sup>

De acuerdo con estos hallazgos, los estudios en ratones demostraron que la sobreexpresión de Nrg4 en el hígado y el tejido adiposo mejoró la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa y previno la hiperinsulinemia inducida por HFD<sup>172</sup>. Cabe destacar dos estudios recientes<sup>147,159</sup> en que se demostró que la administración de neurregulina recombinante mejoró la tolerancia a la glucosa en ratas de control y diabéticas al mejorar la utilización de glucosa hepática<sup>159</sup> y sensibilidad a la insulina en ratones alimentados con alto contenido de grasas<sup>147</sup>.

Por otro lado, contrariamente a estudios previos que demostraron que SAT NRG4 se correlacionó negativamente con la masa grasa corporal<sup>132</sup>, en el presente estudio no se encontró una asociación significativa entre SAT NRG4 y el IMC. En la cohorte 1, la expresión del gen VAT NRG4 aumentó en los participantes obesos en comparación con los no obesos, y se correlacionó positivamente con el IMC, pero en la cohorte 2, la expresión del gen VAT NRG4 no se correlacionó con el IMC.

Es de destacar que se observaron valores similares en la expresión del gen NRG4 comparando participantes obesos de la cohorte 1 frente a los de la cohorte 2. Sorprendentemente, los efectos positivos de la reducción de la masa grasa corporal inducida por la dieta no se asociaron con la expresión de genes relacionados con el marrón/beige<sup>190</sup>. Sin embargo, serán necesarios estudios adicionales para aclarar la relación entre el tejido adiposo humano NRG4 y la obesidad.

Una limitación significativa del estudio actual fue la ausencia de análisis de proteínas VAT o SAT NRG4 debido a la escasa disponibilidad de lisados de tejido adiposo para proteínas en las mismas muestras de tejido utilizadas para el análisis de ARN. De manera similar, el análisis de la proteína NRG4 no se evaluó en estudios relevantes recientes que demostraron la importancia de NRG4 en el tejido adiposo<sup>132,146,170,171,191</sup>

Por lo tanto, se deben realizar estudios adicionales para investigar si la proteína NRG4 sigue el mismo patrón de expresión de ARNm en el tejido adiposo humano. Curiosamente y de acuerdo con los hallazgos actuales, se ha reportado más recientemente un aumento de la liberación de proteína y ARNm de NRG4 en la adipogénesis beige humana de células madre mesenquimales<sup>192</sup>, lo que indica que la expresión del gen NRG4 se correlacionó con los niveles de proteína NRG4 y apoya la participación de NRG4 en la diferenciación de adipocitos beige.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que la expresión de NRG4 y marcadores de tejido adiposo marrón/beige (UCP1, UCP3 y TMEM26) fue extremadamente baja, lo que sugiere que el oscurecimiento del tejido adiposo blanco en humanos puede tener menos relevancia que en ratones.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que muestra una relación significativa entre la expresión de NRG4 y TMEM26 en tejido adiposo humano y como conclusión final podemos afirmar que todas estas observaciones sugieren la expresión del gen NRG4 como un nuevo marcador de browning en el tejido adiposo humano.

Tras estos resultados, el siguiente objetivo fue investigar la relación entre la NRG4 circulante y las alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad en sujetos no diabéticos con una amplia gamma de adiposidad.

Los resultados obtenidos indicaron que la NRG4 sérica se asoció positivamente con la resistencia a la insulina y la PCRhs (un marcador de inflamación crónica de bajo nivel), pero no con lípidos plasmáticos (HDL, LDL-colesterol y triglicéridos en ayunas) o marcadores de daño hepático (AST, ALT, GGT) en sujetos sin diabetes tipo 2. El análisis de regresión lineal multivariante mostró que la sensibilidad a la insulina contribuyó al IMC, la edad, el sexo y la PCR ajustada en un 7,2 % de la varianza en el NRG4 sérico, por lo que la relación de NRG4 con la resistencia a la insulina siguió siendo significativa después de controlarla por estos factores. En línea con estos resultados, se ha encontrado niveles séricos de NRG4 aumentados en enfermedades asociadas a la resistencia a la insulina, como la diabetes tipo 2<sup>146,164,167,168,193</sup> y el síndrome de ovario poliquístico<sup>194,195</sup>. Contrariamente, esta asociación resultó negativa en trastornos metabólicos asociados con la obesidad, como la enfermedad del hígado graso no alcohólico<sup>160,165,198</sup> y en un estudio reciente se ha descrito también niveles bajos de NRG4 en pacientes con diabetes tipo 2 en asociación con microalbuminuria<sup>197</sup>, sugiriendo que NRG4 puede ser un marcador de disfunción microvascular en pacientes con diabetes mellitus. Se ha descrito niveles elevados de NRG4 en situaciones de tolerancia a la glucosa alterada o diabetes temprana<sup>135,142,143,197,198</sup>, pero niveles de NRG4 disminuidos en aquellos pacientes con diabetes avanzada (como refleja el aumento de la microalbuminuria), lo que nos llevó a especular que los niveles de NRG4 podría depender de la evolución y etapa de desarrollo de la diabetes. Teniendo en cuenta la importancia de NRG4 en la captación de glucosa inducida por insulina<sup>160</sup>, podría sugerirse un posible papel compensatorio de NRG4 en el mantenimiento de la acción de la insulina y el metabolismo de la glucosa en situaciones

de diabetes temprana. Sin embargo, se deben realizar estudios de intervención adicionales para aclarar la relevancia del aumento de NRG4 en suero en la diabetes temprana.

Los hallazgos controvertidos de estudios previos<sup>165,167,168,169</sup> junto con las observaciones actuales sugieren que NRG4 no ejerce en humanos los efectos beneficiosos demostrados previamente en ratones<sup>132,146</sup>.

Para evaluar más a fondo los posibles mecanismos involucrados, se realizaron experimentos in vitro en la línea celular HepG2 tratada con palmitato para estudiar el impacto/efecto de tratamiento con NRG1 y NRG4. Estos experimentos revelaron que, después de 24 horas de administración de palmitato, el NRG4 humano recombinante no alteró la expresión génica relacionada con el metabolismo de los lípidos

En contraste con hallazgos previos en ratones<sup>132,146,161</sup>, NRG4 impactó negativamente en el catabolismo de los hepatocitos, atenuando la expresión de genes relacionados con la gluconeogénesis y la biogénesis mitocondrial y disminuyendo ligeramente la respiración mitocondrial.

Es de destacar que estos efectos fueron aún más pronunciados después de la administración de NRG1 recombinante humano, lo que indica que tanto NRG4 como NRG1 tienen un impacto negativo en la gluconeogénesis y la respiración mitocondrial en hepatocitos humanos expuestos a palmitato.

En base a estos resultados, sugerimos que los niveles plasmáticos más altos sostenidos de NRG4, observados en pacientes resistentes a la insulina, pueden tener efectos nocivos sobre la función metabólica y mitocondrial en los hepatocitos. Se ha discutido sobre la utilización de los tratamientos con NRG4/NRG1, péptidos con poca vida media y sobre la determinación de las dosis utilizadas de NRG4. Para la funcionalidad de la dosis y el periodo de incubación de los tratamientos, nos hemos basado en la validación de estudios previos. Otro aspecto discutido ha sido sobre la experimentación con NRG1. Hemos querido realizar este tratamiento para estudiar si el efecto de NRG4 en células HepG2 era específico o similar a otras neuregulinas

De acuerdo con estos hallazgos, estudios previos en ratones demostraron que la administración de NRG1 recombinante atenuó la gluconeogénesis hepática<sup>147,200</sup>. Los efectos negativos de NRG1 y NRG4 sobre la biogénesis mitocondrial y la respiración y la ausencia de impacto sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo de los lípidos sugieren que las NRG no impidieron la acumulación de lípidos en los hepatocitos humanos como se observó en ratones<sup>132,146,161,163,201</sup>

Sin embargo, es importante tener en cuenta que, en comparación con los hepatocitos primarios, las células HepG2 mostraron una expresión y activación alteradas de EGFR (receptores de NRG) y una vía glucolítica mejorada. Para superar estas limitaciones experimentales, se debería replicar este experimento en en hepatocitos primarios humanos.

El impacto beneficioso de NRG4 en el metabolismo observado en ratones podría explicarse por sus efectos directos de NRG4 en el tejido adiposo, el aumento de la inervación simpática y la mejora de la actividad de BAT y el oscurecimiento de WAT <sup>152,202</sup> pero no en el metabolismo hepático.

De hecho, mientras que en ratones la activación de BAT y el pardeamiento de WAT mejoran la sensibilidad a la insulina, la esteatosis hepática y la tolerancia a la glucosa en condiciones de obesidad <sup>203,204</sup>, el impacto del pardeamiento WAT sobre la obesidad o la resistencia a la insulina en humanos es menos relevante <sup>190,202</sup>

Concluimos tras estos estudios que NRG4 se asocia negativamente con la sensibilidad a la insulina en humanos posiblemente a través del deterioro de la función mitocondrial, al menos en hepatocitos hepG2

Estos hallazgos son contrarios a estudios previos donde se destaca los múltiples beneficios metabólicos de NRG4 en humanos y modelos de ratones con obesidad, diabetes y NAFDL.

Una de las oportunidades de este trabajo ha sido investigar por primera vez, el papel de NRG4 circulante en asociación con la acción de la insulina en humanos y explorar los posibles mecanismos. Una de las debilidades del estudio ha sido la utilización de este tipo celular de hepatocitos (HepG2). Está bien documentado que existe sobreexpresión del receptor ErbB2 en células de carcinoma hepatocelular y existen varios estudios donde se demuestra que esta línea celular es mucho más glicolítica que en hepatocitos normales. Las células HepG2 están restringidas a la ruta OXPHOS mitocondrial, lo que sugiere nuevamente que no es un buen modelo para estudios funcionales/de respiración mitocondrial. Para superar esta limitación, estudios adicionales de validación tendrían que ser realizados en cultivo de hepatocitos primarios de origen humano.

Dado que las neuregulinas, que incluyen 4 miembros (NRG1-NRG4), son ligandos de la familia de receptores tirosinquinasa (ErbB), y en la búsqueda de nuevos factores relevantes en la fisiología del tejido adiposo humano, nos planteamos investigar la expresión de los receptores ErbB y las neuregulinas en células subcutáneas y viscerales de tejido adiposo humano según obesidad y resistencia a la insulina en dos cohortes transversales y uno longitudinal, después de 2 años de pérdida de peso inducida por cirugía bariátrica.

Además, también se probó el impacto de la eliminación de genes inducida por siRNA en EGFR y ErbB2 en preadipocitos y adipocitos humanos, así como los efectos causados por la sobreexpresión de neuregulina 2 (NRG2). Por lo que sabemos hasta ahora, no se ha examinado el papel de NRG2 y sus correlaciones con los receptores ERBB a nivel de expresión en tejido adiposo humano.

Para ello, se recogieron muestras de tejido adiposo visceral y subcutáneo en 3 cohortes de pacientes con diferentes grados de obesidad (dos transversales (N=150, N=87) y uno longitudinal (n = 25)) y se realizaron experimentos de eliminación y sobreexpresión de genes in vitro.

Los resultados obtenidos proporcionan varias evidencias que respaldan un papel importante para EGFR en la adipogénesis humana:

1. La expresión de EGFR en SAT está correlacionada negativamente con resistencia a la insulina y Hb1Ac
2. La expresión de EGFR en tejido adiposo está asociado a la adipogénesis independientemente de la obesidad. En dos cohortes independientes, la expresión del gen EGFR en tejido adiposo humano se correlacionó significativamente con la expresión de genes adipogénicos tanto en SAT como en VAT.
3. En la fracción de células de tejido adiposo, la expresión del gen EGFR aumentó significativamente en los adipocitos en comparación con SVF.
4. En preadipocitos subcutáneos y viscerales humanos, la expresión del gen EGFR aumentó durante la primera etapa de diferenciación de los adipocitos, alcanzando niveles máximos al final del proceso.
5. En los preadipocitos subcutáneos humanos, la eliminación del gen EGFR resultó en una disminución de la expresión de los genes adipogénicos (ADIPOQ, DGAT1, FABP4 y FASN) durante la diferenciación de los adipocitos.
6. En adipocitos subcutáneos humanos completamente diferenciados, la eliminación del gen EGFR, también resultó en una disminución de la expresión de genes adipogénicos

De acuerdo con estos hallazgos, un estudio previo en 32 mujeres con diferentes grados de obesidad y resistencia a la insulina informó que los niveles de proteína EGFR en tejido adiposo subcutáneo se correlacionaron positivamente con la expresión de algunos genes adipogénicos y que la inhibición farmacológica de EGFR redujo la expresión de genes adipogénicos en preadipocitos humanos después de la inducción de la diferenciación de adipocitos <sup>205</sup>.

Similar a nuestro estudio, la expresión del gen SAT EGFR se correlacionó negativamente con la resistencia a la insulina (HOMAIR)<sup>205</sup>. Teniendo en cuenta la importancia de la función del tejido adiposo en la sensibilidad a la insulina<sup>206,207,208</sup> los datos actuales nos llevaron a sugerir que la activación de EGFR del tejido adiposo podría ser un objetivo terapéutico útil para mejorar la resistencia a la insulina mediante la mejora de la adipogénesis del tejido adiposo. Es importante destacar que una disfunción en adipogenesis conlleva un descenso en la producción de adiponectina (adipoquina con efecto sensibilizante a la insulina<sup>209</sup> disminuye la capacidad para almacenar el exceso de energía al disminuir la captación y esterificación de ácidos grasos<sup>210</sup> y produce inflamación del tejido adiposo<sup>211</sup>. Todos estos cambios promueven el fenotipo de resistencia a insulina<sup>212</sup>

Otro hallazgo importante del estudio actual fue la asociación entre el ARNm de ERBB2 y la obesidad. Esta asociación se ha demostrado en dos cohortes transversales independientes y longitudinales después de la pérdida de peso inducida por cirugía bariátrica. De acuerdo con estos hallazgos, estudios previos informaron un aumento de los niveles séricos de HER2<sup>213,214</sup>. Dado que los niveles séricos de HER2 reflejan la sobreexpresión de ERBB2 tumoral en pacientes oncológicos<sup>215</sup>, los datos actuales nos llevaron a postular que la asociación entre el HER2 sérico y la obesidad podría provenir de una mayor expresión de ERBB2 en el tejido adiposo.

El ERBB2 del tejido adiposo también se correlacionó positivamente con la glucosa en ayunas y negativamente con los genes lipogénicos, pero la mayoría de estas correlaciones se perdieron después de ajustar por edad e IMC. De hecho, la eliminación del gen ERBB2 no tuvo impacto en los genes adipogénicos (excepto DGAT1) durante la diferenciación de los adipocitos humanos, pero en los adipocitos completamente diferenciados condujo a una disminución de los niveles de ARNm de la principal enzima lipogénica, la ácido graso sintasa (FASN). Estos datos indican que ERBB2 podría respaldar la lipogénesis de novo en adipocitos diferenciados, pero no fue necesario para una diferenciación óptima de adipocitos, como se informó anteriormente <sup>205</sup>.

Reforzando estos hallazgos, estudios previos demostraron la relación bidireccional entre ERBB2 y la lipogénesis en células cancerosas<sup>216</sup> mostrando que la inhibición farmacológica o genética de éste receptor redujo la expresión de FASN y que la inhibición específica de FASN reduce la señalización de ERBB2<sup>216,217,218,219</sup>. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el silenciamiento total del gen *ErbB2* en los preadipocitos primarios de ratón frenó la diferenciación de los adipocitos, lo que indica que al menos un nivel mínimo de *ErbB2* podría ser necesario para sostener la adipogénesis y expansión del tejido adiposo.

Por lo demás, aunque la expresión de los genes ERBB3 y ERBB4 se asoció con la expresión de algunos genes adipogénicos e inflamatorios, la pérdida de la mayoría de estas asociaciones después de ajustar por edad e IMC, la disparidad entre cohortes y los niveles muy bajos de ARNm detectados sugieren que estos receptores son de poca relevancia en la fisiología del tejido adiposo.

De hecho, observamos en nuestro estudio que el silenciamiento de *ErbB4* en preadipocitos primarios de ratón no tuvo impacto en la expresión de genes adipogénicos. De acuerdo con esto, estudios previos también informaron niveles muy bajos de ARNm de ERBB3 y ERBB4 en células 3T3-L1<sup>221</sup> y en tejido adiposo humano<sup>205</sup>.

Las diferentes asociaciones observadas en VAT de la cohorte 1 entre la expresión de ERBB4 e IL6/IL8 (negativa) y entre ERBB4 y TNF (positiva) podrían explicarse por su covarianza con otros factores metabólicos. Curiosamente, aunque la asociación entre VAT ERBB4 y la expresión génica de TNF ya no fue significativa después de ajustar por edad e IMC, la correlación negativa entre VAT ERBB4 y la expresión de IL6/IL8 siguió siendo estadísticamente significativa. Apoyando estas asociaciones, la eliminación de *ErbB4* en ratones resultó en un aumento de la inflamación del tejido adiposo<sup>222</sup> mientras que la expresión de NRG4, un ligando específico para ERBB4, se correlacionó negativamente con la expresión de los genes IL6 e IL8 en VAT<sup>223</sup> y la caída del gen *Nrg4* en Los adipocitos 3T3-L1 también mejoraron la expresión de citocinas proinflamatorias<sup>220</sup>.

Además, al explorar las neurregulinas como algunos ligandos EGFR endógenos en el tejido adiposo que promueven la vía adipogénica, encontramos que NRG2 podría ser un candidato óptimo. En comparación con otras neurregulinas detectadas en tejido adiposo (NRG1 y NRG4), se encontraron niveles elevados de ARNm de NRG2.

Los niveles de ARNm de SAT y VAT NRG2 se correlacionaron positivamente con los genes adipogénicos y aumentaron durante la diferenciación de los adipocitos, mientras que NRG1 (estudio actual) y NRG4<sup>223</sup> se correlacionaron negativamente con la adipogénesis. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que informa la expresión de NRG2 en tejido adiposo y su asociación con la adipogénesis. La sobreexpresión del gen NRG2 en la etapa tardía de la diferenciación de los adipocitos (pero no en los preadipocitos) aumentó ligeramente la expresión de algunos genes relacionados con la adipogénesis, CEBPA y FABP4, y el número de gotas de lípidos intracelulares, lo que respalda un posible papel de NRG2 en el mantenimiento de adipogénesis, pero no en la inducción de la diferenciación de adipocitos.

Tomados en conjunto, este estudio demuestra la importancia de EGFR y ERBB2 en la fisiología del tejido adiposo humano, mostrando la asociación entre el tejido adiposo ERBB2 y la obesidad, confirmando el papel adipogénico de EGFR y sugiriendo la neuregulina 2 como un posible ligando EGFR endógeno con un papel hipotético en la adipogénesis humana.

Los hallazgos de estos estudios nos permiten proponer, por primera vez en humanos, funciones relevantes de las diferentes neuregulinas en la fisiología del tejido adiposo asociado en el contexto de la obesidad. Por ejemplo, hemos descrito que la NRG4 podría estar involucrada en el desarrollo de adipocitos beige en depósitos de grasa humana, proponiéndola como marcador browning en tejido adiposo humano, y que la activación de EGFR mediante el ligando NRG2, podría participar en la adipogénesis y mejorar la disfunción del tejido adiposo asociada a la obesidad.

A nivel circulante, hemos confirmado por primera vez en humanos, que NRG4 está asociada negativamente a la sensibilidad a la insulina, probablemente por un deterioro en la función mitocondrial. Esta explicación vendría respaldada por las observaciones obtenidas de experimentos realizados in vitro con células HepG2, en que observamos los efectos negativos de NRG1 y NRG4 sobre la biogénesis mitocondrial y la respiración.





# CONCLUSIONES



1. La expresión del gen NRG4 podría ser un nuevo marcador de browning en el tejido adiposo humano.
2. Los niveles de NRG4 en suero se correlacionan negativamente con la sensibilidad a la insulina en humanos y la administración de NRG4 reduce la respiración mitocondrial en los hepatocitos HepG2 humanos.
3. La inducción de EGFR y neuregulina 2 en el tejido adiposo humano podría mejorar la disfunción del tejido adiposo asociada a la obesidad, mientras que la inhibición de ErbB2 podría ejercer efectos antiobesogénicos.



## **BIBLIOGRAFIA**



- [1] Collaborators GBDO, Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, et al. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. *N Engl J Med* 2017;377:13-27. doi:10.1056/NEJMoa1614362.
- [2] Hetherington MM, Blundell-Birtill P, Caton SJ, Cecil JE, Evans CE, Rolls BJ, et al. Understanding the science of portion control and the art of downsizing. *Proc Nutr Soc* 2018;77:347-55. doi:10.1017/S0029665118000435.
- [3] Venetsanou F, Kambas A, Gourgoulis V, Yannakoulia M. Physical activity in pre-school children: trends over time and associations with body mass index and screen time. *Ann Hum Biol* 2019;46:393-9. doi:10.1080/03014460.2019. 1659414.
- [4] Nightingale CM, Rudnicka AR, Donin AS, Sattar N, Cook DG, Whincup PH, et al. Screen time is associated with adiposity and insulin resistance in children. *Arch Dis Child* 2017;102:612-16. doi:10.1136/archdischild-2016-312016.
- [5] Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol* 2019.
- [6] Carobbio S, Pellegrinelli V, Vidal-Puig A. Adipose tissue function and expandability as determinants of lipotoxicity and the metabolic syndrome. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 960., 2017, pp 161-196.
- [7] Blüher M. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2009
- [8] Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2016
- [9] Eknoyan, G (2008) Adolphe Quetelet (1796-1874) -the average man and indices of obesity. *Nephrol Dial Transplant*. 23(1): 47-51
- [10] Billington C.J, Epstein L.H, Goodwin N.J, Hill J.O, Pi-Sunyer F.X, Rolls B.J, Stern J, Wadden T.A, Weinsier R.L, Wilson G.T, Wing R.R, Yanovski S.Z, Hubbard V.S, Hoofnagle J.H, Everhart J, Harrison B (2000) Overweight, obesity, and health risk. *Arch Intern Med*. 160(10): 898-904.
- [11] Picot J, Jones J, Colquitt J.L, Gospodarevskaya E, Loveman E, Baxter L, Clegg A.J (2002) The clinical effectiveness and cost-effectiveness of surgery for people with morbid obesity: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 6(12): 1-153.
- [12] Fernandez Otero, Y. (2011). Lipoatrofia marrón, obesidad y daño vascular: mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina en células cardiovasculares.
- [13] Pineda, C. A. (2008). Síndrome metabólico : definición, historia, criterios. *Colombia médica*, 39(1), 97-104.
- [14] Bjorntorp P (1997) Body fat distribution, insulin resistance, and metabolic diseases *Nutrition*. 13(9): 795-803

- [15] Olufadi R and Byrne C.D (2008) Clinical and laboratory diagnosis of the metabolic syndrome. *J Clin Pathol.* 61(6): 697-706.
- [16] Steven E. Shoelson, Jongsoon Lee, and Allison B. Goldfine. *J Clin Invest.* 2006 Jul 3; 116(7): 1793-1801. doi: 10.1172/JCI29069)
- [17] Yki-Järvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014. doi:10.1016/S2213-8587(14)70032-4
- [18] Koehler EM, Schouten JNL, Hansen BE, et al. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in the elderly: Results from the Rotterdam study. *J Hepatol.* 2012;57(6):1305-1311. doi:10.1016/j.jhep.2012.07.028)
- [19] Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013. doi:10.1038/nrgastro.2013.41)
- [20] Marcela, Reyes, J. (2012). Características biológicas del tejido adiposo: el adipocito como célula endocrina. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(2), 136- 144. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(12\)70290-0](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70290-0)
- [21] Serrano Ríos, M., Ordovás, J. M., & Gutiérrez Fuentes, J. A. (2011). *Obesity*. Barcelona, España: Elsevier
- [22] Guyton, A. C. MD, & Hall, J. E. Ph.D. (2001). *Tratado de la fisiología médica (10ª ed.)*. Madrid, España: McGraw-Hill.
- [23] Fundación Diabetes: <https://www.fundaciondiabetes.org/general/82/conozcamosla-mejor-2>
- [24] Ruis-Ramos, M., Escolar-Pujolar, A., Mayoral-Sánchez, E., CorralSan Laureano, F., & FernándezFernández, I. (2006). La diabetes mellitus en España: mortalidad, prevalencia, incidencia, costes economicos y desigualdades. *Gaceta Sanitaria*, 20(1), 15-24. <https://doi.org/10.1157/13086022>
- [25] Serrano Ríos, M., & Cascales Angosto, M. (2015). Resistencia a la insulina, inflamación y obesidad. Recuperado de <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1579/1663>
- [26] Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principios de bioquímica (4ª ed.)*. Barcelona, España: Omega
- [27] Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., et al. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150, 366-376. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.016
- [28] Cinti, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2005 Jul; 73(1):9-15. doi: 10.1016/j.plefa.2005.04.010.)

- [29] Matthew S Rodeheffer , Kivanç Birsoy, Jeffrey M Friedman .Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo *Cell*. 2008 Oct 17;135(2):240-9. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.036. Epub 2008 Oct 2.
- [30] Kangduk Choi , Young-Bum Kim Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes *Korean J Intern Med* . 2010 Jun;25(2):119-29. doi: 10.3904/kjim.2010.25.2.119. Epub 2010 Jun 1.
- [31] Un Ju Jung , Myung-Sook Choi .Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease *Int J Mol Sci* . 2014 Apr 11;15(4):6184-223. doi: 10.3390/ijms15046184.
- [32] Kenneth Sidle Molecular basis of signaling specificity of insulin and IGF receptors: neglected corners and recent advances *Front Endocrinol (Lausanne)* . 2012 Feb 28;3:34. doi: 10.3389/fendo.2012.00034. eCollection 2012.
- [33] Varman T Samuel , Gerald I Shulman Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links *Cell* . 2012 Mar 2;148(5):852-71. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.017.
- [34] Jianping Ye Mechanisms of insulin resistance in obesity *Front Med*.2013 Mar;7(1):14-24. doi: 10.1007/s11684-013-0262-6. Epub 2013 Mar 9
- [35] M P Czech , M Tencerova, D J Pedersen, M Aouadi Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage *Diabetologia* . 2013 May;56(5):949-64. doi: 10.1007/s00125-013-2869-1. Epub 2013 Feb 27.
- [36] David B Savage , Kitt Falk Petersen, Gerald I Shulman Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance *Physiol Rev* . 2007 Apr;87(2):507-20. doi: 10.1152/physrev.00024.2006.
- [37] Varman T Samuel , Kitt Falk Petersen, Gerald I Shulman Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism *Lancet* . 2010 Jun 26;375(9733):2267-77. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60408-4
- [38] Hyokjoon Kwon , Jeffrey E Pessin Adipokines mediate inflammation and insulin resistance *Front Endocrinol (Lausanne)* . 2013 Jun 12;4:71. doi: 10.3389/fendo.2013.00071. eCollection 2013
- [39] Eduardo Fuentes , Francisco Fuentes, Gemma Vilahur, Lina Badimon, Iván Palomo Mechanisms of chronic state of inflammation as mediators that link obese adipose tissue and metabolic syndrome *Mediators Inflamm*.2013;2013:136584. doi: 10.1155/2013/136584. Epub 2013 Jun 13
- [40] John M Wentworth , Gaetano Naselli, Wendy A Brown, Lisa Doyle, Belinda Phipson, Gordon K Smyth, Martin Wabitsch, Paul E O'Brien, Leonard C Harrison Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity *Diabetes* . 2010 Jul;59(7):1648-56. doi: 10.2337/db09-0287. Epub 2010 Mar 31.

- [41] Adilson Guilherme , Joseph V Virbasius, Vishwajeet Puri, Michael P Czech Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes Nat Rev Mol Cell Biol . 2008 May;9(5):367-77. doi: 10.1038/nrm2391.
- [42] Stephen G Young , Rudolf Zechner Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis Genes Dev . 2013 Mar 1;27(5):459-84. doi: 10.1101/gad.209296.112.
- [43] Marisa Coelho , Teresa Oliveira, Ruben Fernandes Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ Arch Med Sci . 2013 Apr 20;9(2):191-200. doi: 10.5114/aoms.2013.33181. Epub 2013 Feb 10
- [44] Sanshiro Tateya , Francis Kim, Yoshikazu Tamori Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance Front Endocrinol (Lausanne) . 2013 Aug 8;4:93. doi: 10.3389/fendo.2013.00093. eCollection 2013.
- [45] Yael T Joffe , Malcolm Collins, Julia H Goedecke The relationship between dietary fatty acids and inflammatory genes on the obese phenotype and serum lipids Nutrients 2013 May 21;5(5):1672-705. doi: 10.3390/nu5051672.
- [46] Hyokjoon Kwon , Jeffrey E Pessin Adipokines mediate inflammation and insulin resistance Front Endocrinol (Lausanne).2013 Jun 12;4:71. doi: 10.3389/fendo.2013.00071. eCollection 2013.
- [47] M P Czech , M Tencerova, D J Pedersen, M Aouadi Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage Diabetologia . 2013 May;56(5): 949-64.doi: 10.1007/s00125-013-2869-1. Epub 2013 Feb 27.
- [48] Kazuto Nakamura , José J Fuster , Kenneth Walsh Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease J Cardiol . 2014 Apr;63(4):250-9. doi: 10.1016/j.jjcc.2013.11.006. Epub 2013 Dec 16.
- [49] Yu Li , Lin Ding, Waseem Hassan, Daoud Abdelkader, Jing Shang Adipokines and hepatic insulin resistance J Diabetes Res. 2013;2013:170532. doi: 10.1155/2013/170532. Epub 2013 May 16
- [50] Tobias C Walther , Robert V Farese Jr Lipid droplets and cellular lipid metabolism Annu Rev Biochem . 2012;81:687-714. doi: 10.1146/annurev-biochem-061009-102430. Epub 2012 Apr 13.
- [51] Andrew S Greenberg , Rosalind A Coleman, Fredric B Kraemer, James L McManaman, Martin S Obin, Vishwajeet Puri, Qing-Wu Yan, Hideaki Miyoshi, Douglas G Mashek The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans J Clin Invest . 2011 Jun;121(6):2102-10. doi: 10.1172/JCI46069. Epub 2011 Jun 1.
- [52] Boudewijn Klop , Jan Willem F Elte, Manuel Castro Cabezas Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets Nutrients .2013 Apr 12;5(4):1218-40. doi: 10.3390/nu5041218

- [53] Samata Tiwari , Shadab A Siddiqi Intracellular trafficking and secretion of VLDL Arterioscler Thromb Vasc Biol . 2012 May;32(5):1079-86. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.241471.
- [54] Veronika Zábó , Laura Simon-Szabó, Péter Szelényi, Eva Kereszturi, Gábor Bánhegyi, Miklós Csala Lipotoxicity in the liver World J Hepatol . 2013 Oct 27;5(10):550-7. doi: 10.4254/wjh.v5.i10.550.
- [55] X Buqué , P Aspichueta, B Ochoa Molecular basis of obesity-related hepatic steatosis Rev Esp Enferm Dig . 2008 Sep;100(9):565-78. doi: 10.4321/s1130-01082008000900007.
- [56] Barba, J. (2008). Esteatosis hepática, esteatohepatitis y marcadores de lesión hepática. Rev Mex Patol Clin, 55(4), 216-232.
- [57] Carpenter, G., K. J. Lembach, M. M. Morrison and S. Cohen (1975). "Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts." J Biol Chem 250(11): 4297-4304
- [58] Carpenter, G., L. King, Jr. and S. Cohen (1978). "Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro." Nature 276(5686): 409-410
- [59] Stanley Cohen (1965). The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). , 12(3), 394-407. doi:10.1016/0012-1606(65)90005-9
- [60] Bryan Linggi , Graham Carpenter ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology Trends Cell Biol . 2006 Dec;16(12):649-56. doi: 10.1016/j.tcb.2006.10.008. Epub 2006 Nov 7.
- [61] J Massagué, A Pandiella Membrane-anchored growth factors. Annu Rev Biochem . 1993;62:515-41. doi: 10.1146/annurev.bi.62.070193.002503
- [62] Holmes, W. E.; Sliwkowski, M. X.; Akita, R. W.; Henzel, W. J.; Lee, J.; Park, J. W.; Yansura, D.; Abadi, N.; Raab, H.; Lewis, G. D.; Shepard, H. M.; Kuang, W.-J.; Wood, W. L.; Goeddel, D. V.; Vandlen, R. L. (1992). *Identification of Heregulin, a Specific Activator of p185erbB2*. Science, 256(5060), 1205-1210. doi:10.1126/science.256.5060.1205
- [63] D Wen , S V Suggs, D Karunakaran, N Liu, R L Cupples, Y Luo, A M Janssen, N Ben-Baruch, D B Trollinger, V L Jacobsen, Structural and functional aspects of the multiplicity of Neu differentiation factors. Mol Cell Biol . 1994 Mar;14(3):1909-19. doi: 10.1128/mcb.14.3.1909-1919.1994
- [64] E.TzaharG. LevkowitzD. KarunakaranL. YiE.PelesS. LaviD.ChangN. LiuA. Yayon D.Wen ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu differentiation factor/hergulin isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, (), -. doi:10.1016/s0021-9258(17)31521-1
- [65] Carmen M Warren , Kian Kani, Ralf Landgraf The N-terminal domains of neuregulin 1 confer signal attenuation J Biol Chem . 2006 Sep 15;281(37):27306-16. doi: 10.1074/jbc.M512887200. Epub 2006 Jul 6

- [66] Yumi Kinugasa , Hiroshi Ishiguro, Yoshihito Tokita, Atsuhiko Oohira, Hiroshi Ohmoto, Shigeki Higashiyama Neuroglycan C, a novel member of the neuregulin family *Biochem Biophys Res Commun* . 2004 Sep 3;321(4):1045-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.07.066
- [67] Suzanne A Eccles The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology *Int J Dev Biol* . 2011;55(7-9):685-96. doi: 10.1387/ijdb.113396se.
- [68] J Downward, P Parker, M D Waterfield Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor *Nature* . 1984 Oct 4-10;311(5985):483-5. doi: 10.1038/311483a0
- [69] Y Yarden , M X Sliwkowski Untangling the ErbB signalling network *Nat Rev Mol Cell Biol* . 2001 Feb;2(2):127-37. doi: 10.1038/35052073.
- [70] Stuart S Hobbs , Stephanie L Coffing, Ann T D Le, Elizabeth M Cameron, Eric E Williams, Michelle Andrew, Erika N Blommel, Robert P Hammer, Han Chang, David J Riese 2nd Neuregulin isoforms exhibit distinct patterns of ErbB family receptor activation *Oncogene* . 2002 Dec 5;21(55):8442-52. doi: 10.1038/sj.onc.1205960.
- [71] Nancy E Hynes, Heidi A Lane ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* . 2005 May;5(5):341-54. doi: 10.1038/nrc1609.
- [72] D Meyer, T Yamaai, A Garratt, E Riethmacher-Sonnenberg, D Kane, L E Theill, C Birchmeier Isoform-specific expression and function of neuregulin *Development* . 1997 Sep;124(18):3575-86. doi: 10.1242/dev.124.18.3575.
- [73] S Britsch , L Li, S Kirchhoff, F Theuring, V Brinkmann, C Birchmeier, D Riethmacher The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system *Genes Dev* . 1998 Jun 15;12(12):1825-36. doi: 10.1101/gad.12.12.1825.
- [74] Douglas L Falls Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies *Exp Cell Res* . 2003 Mar 10;284(1):14-30. doi: 10.1016/s0014-4827(02)00102-7
- [75] M Breuleux Role of heregulin in human cancer *Cell Mol Life Sci* . 2007 Sep;64(18):2358-77. doi: 10.1007/s00018-007-7120-0.
- [76] Juan Carlos Montero , Ruth Rodríguez-Barrueco, Alberto Ocaña, Elena Díaz- Rodríguez, Azucena Esparís-Ogando, Atanasio Pandiella Neuregulins and cancer *Clin Cancer Res* . 2008 Jun 1;14(11):3237-41. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5133
- [77] K L Carraway 3rd , S J Burden Neuregulins and their receptors *Curr Opin Neurobiol* . 1995 Oct;5(5):606-12. doi: 10.1016/0959-4388(95)80065-4.
- [78] S Burden , Y Yarden Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis *Neuron* . 1997 Jun;18(6):847-55. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80324-4.

- [79] Hoiseon Jeong, Jinkyong Kim , Youngseok Lee , Jae Hong Seo, Sung Ran Hong , AereeKim Neuregulin-1 induces cancer stem cell characteristics in breast cancer cell lines *Oncol Rep* . 2014 Sep;32(3):1218-24. doi: 10.3892/or.2014.3330. Epub 2014 Jul 11.
- [80] Azucena Esparís-Ogando, Juan Carlos Montero, Joaquín Arribas, Alberto Ocaña, Atanasio Pandiella Targeting the EGF/HER Ligand-Receptor System in Cancer *Curr Pharm Des* . 2016;22(39):5887-5898. doi: 10.2174/1381612822666160715132233
- [81] E Peles , R Lamprecht, R Ben-Levy, E Tzahar, Y Yarden Regulated coupling of the Neu receptor to phosphatidylinositol 3'-kinase and its release by oncogenic activation *J Biol Chem* . 1992 Jun 15;267(17):12266-74.
- [82] Downward, J., Y. Yarden, E. Mayes, G. Scrace, N. Totty, P. Stockwell, A. Ullrich, J. Schlessinger and M. D. Waterfield (1984). "Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences." *Nature* 307(5951): 521-527.
- [83] Ullrich, A., L. Coussens, J. S. Hayflick, T. J. Dull, A. Gray, A. W. Tam, J. Lee, Y. Yarden, T. A. Libermann, J. Schlessinger, et al. (1984). "Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells." *Nature* 309(5967): 418-425
- [84] Coussens, L., T. L. Yang-Feng, Y. C. Liao, E. Chen, A. Gray, J. McGrath, P. H. Seeburg, T. A. Libermann, J. Schlessinger, U. Francke, et al. (1985). "Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene." *Science* 230(4730): 1132-1139.
- [85] C R King, M H Kraus, S A Aaronson Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* . 1985 Sep 6;229(4717):974-6. doi: 10.1126/science.2992089.
- [86] M H Kraus , W Issing, T Miki, N C Popescu, S A Aaronson Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 1989 Dec;86(23):9193-7. doi: 10.1073/pnas.86.23.9193.
- [87] Plowman, G. D., J. M. Culouscou, G. S. Whitney, J. M. Green, G. W. Carlton, L. Foy, M. G. Neubauer and M. Shoyab (1993). "Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(5): 1746-1750.
- [88] Schlessinger, J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." *Cell* 103(2): 211-225
- [89] Citri, A. and Y. Yarden (2006). "EGF-ERBB signalling: towards the systems level." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(7): 505-516
- [90] Tebbutt, N., M. W. Pedersen and T. G. Johns (2013). "Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy." *Nat Rev Cancer* 13(9): 663-673.

- [91] Schlessinger, J. (2004). "Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors." *Science* 306(5701): 1506-1507.
- [92] Wen, D., Peles, E., Cupples, R., Suggs, S. V., Bacus, S. S., Luo, Y., Trail, G., Hu, S., Silbiger, S. M., Levy, R. B., et al. (1992). Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* 69, 559-572
- [93] Carraway, K. III and Cantley, L. C. (1994). A new acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling. *Cell* 78, 5-8
- [94] Beerli, R. R., Graus-Porta, D., Woods-Cook, K., Chen, X., Yarden, Y. and Hynes, N. E. (1995). Neu differentiation factor activation of erbB3 and erbB4 is cell specific and displays a differential requirement for erbB2. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6496-6503).
- [95] Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Revisión Endocrinol Nutr.* 2014;61(2) :100---112
- [96] W.D. Van Marken Lichtenbelt, J.W. Vanhommerig, N.M. Smulders, J.M. Drossaerts, G.J. Kemerink, N.D. Bouvy, *et al.* Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*, 360 (2009), pp. 1500-1508. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0808718>
- [97] E.D. Rosen, B.M. Spiegelman. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16 (2000), pp. 145-171
- [98] S.R. Farmer. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*, 4 (2006), pp. 263-273
- [99] E.D. Rosen, O.A. MacDougald. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7 (2006), pp. 885-896
- [100] T. Tanaka, N. Yoshida, T. Kishimoto, S. Akira. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP $\beta$  and/or C/EBP $\delta$  gene. *EMBO J*, 16 (1997), pp. 7432-7443
- [101] Y. Zuo, L. Quiang, S.R. Farmer. Activation of C/EBP $\beta$ /enhancer-binding protein (C/EBP $\beta$ ) expression by C/EBP $\delta$  during adipogenesis requires a peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ -associated repression of HDAC1 and C/ebpa gene promoter. *J Biol Chem*, 281 (2006), pp. 7960-7967
- [102] T. Tchkonja, N. Giorgadze, T. Pirtskhalava, Y. Tchoukalova, I. Karagiannides, R.A. Forse, *et al.* Fat depot origin affects adipogenesis in primary cultured and cloned human preadipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282 (2002), pp. R1286-R1296
- [103] T. Tchkonja, Y.D. Tchoukalova, N. Giorgadze, T. Pirtskhalava, I. Karagiannides, R.A. Forse, *et al.* Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288 (2005), pp. E267-E277

- [104] B. Cannon, J. Nedergaard. Brown adipose tissue: Function and physiological significance. *Physiol Rev*, 84 (2004), pp. 277-359
- [105] J. Nedergaard, T. Bengtsson, B. Cannon. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293 (2007), pp. E444-E452
- [106] W.D. Van Marken Lichtenbelt, J.W. Vanhommerig, N.M. Smulders, J.M. Drossaerts, G.J. Kemerink, N.D. Bouvy, *et al.* Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*, 360 (2009), pp. 1500-1508
- [107] Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., *et al.* (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150, 366-376. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.016
- [108] S.P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R.L. Leibel, A.W. Ferrante. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112 (2003), pp. 1796-1808
- [109] Sliwkowski, M. X., Schaefer, G., Akita, R. W., Lofgren, J. A., Fitzpatrick, V. D., Nuijens, A., Fendly, B. M., Cerione, R. A., Vandlen, R. L. and Carraway, K. III (1994). Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J. Biol. Chem.* 269, 14661-14665
- [110] Marchionni, M. A., A. D. Goodearl, M. S. Chen, O. Bermingham-McDonogh, C. Kirk, M. Hendricks, F. Danehy, D. Misumi, J. Sudhalter, K. Kobayashi, *et al.* (1993). "Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system." *Nature* 362(6418): 312-318
- [111] Goodearl, A. D., A. G. Yee, A. W. Sandrock, Jr., G. Corfas and G. D. Fischbach (1995). "ARIA is concentrated in the synaptic basal lamina of the developing chick neuromuscular junction." *J Cell Biol* 130(6): 1423-1434.
- [112] Hayes, N. V., E. Blackburn, L. V. Smart, M. M. Boyle, G. A. Russell, T. M. Frost, B. J. Morgan, A. J. Baines and W. J. Gullick (2007). "Identification and characterization of novel spliced variants of neuregulin 4 in prostate cancer." *Clin Cancer Res* 13(11): 3147-3155
- [113] Montero, J. C., R. Rodriguez-Barrueco, A. Ocana, E. Diaz-Rodriguez, A. Esparis-Ogando and A. Pandiella (2008). "Neuregulins and cancer." *Clin Cancer Res* 14(11): 3237-3241.
- [114] Carraway, K. L., 3rd, J. L. Weber, M. J. Unger, J. Ledesma, N. Yu, M. Gassmann and C. Lai (1997). "Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases." *Nature* 387(6632): 512-516.
- [115] Hobbs, S. S., S. L. Coffing, A. T. Le, E. M. Cameron, E. E. Williams, M. Andrew, E. N. Blommel, R. P. Hammer, H. Chang and D. J. Riese, 2nd (2002). "Neuregulin isoforms exhibit distinct patterns of ErbB family receptor activation." *Oncogene* 21(55): 8442-8452.
- [116] Buonanno, A. and G. D. Fischbach (2001). "Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system." *Curr Opin Neurobiol* 11(3): 287-296.

- [117] Steinhorsdottir, V., H. Stefansson, S. Ghosh, B. Birgisdottir, S. Bjornsdottir, A. C. Fasquel, O. Olafsson, K. Stefansson and J. R. Gulcher (2004). "Multiple novel transcription initiation sites for NRG1." *Gene* 342(1): 97-105.
- [118] Meyer, D. and C. Birchmeier (1995). "Multiple essential functions of neuregulin in development." *Nature* 378(6555): 386-390.
- [119] Wolpowitz, D., T. B. Mason, P. Dietrich, M. Mendelsohn, D. A. Talmage and L. W. Role (2000). "Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses." *Neuron* 25(1): 79-91
- [120] Li, L., S. Cleary, M. A. Mandarano, W. Long, C. Birchmeier and F. E. Jones (2002). "The breast protooncogene, HRGalpha regulates epithelial proliferation and lobuloalveolar development in the mouse mammary gland." *Oncogene* 21(32): 4900-4907
- [121] Wong, R. W. (2003). "Transgenic and knock-out mice for deciphering the roles of EGFR ligands." *Cell Mol Life Sci* 60(1): 113-118
- [122] Busfield, S. J., D. A. Michnick, T. W. Chickering, T. L. Revett, J. Ma, E. A. Woolf, C. A. Comrack, B. J. Dussault, J. Woolf, A. D. Goodearl, et al. (1997). "Characterization of a neuregulin-related gene, Don1, that is highly expressed in restricted regions of the cerebellum and hippocampus." *Mol Cell Biol* 17(7): 4007-4014.
- [123] Ring, H. Z., H. Chang, A. Guilbot, A. Brice, E. LeGuern and U. Francke (1999). "The human neuregulin-2 (NRG2) gene: cloning, mapping and evaluation as a candidate for the autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease linked to 5q." *Hum Genet* 104(4): 326-332.
- [124] Crovello, C. S., C. Lai, L. C. Cantley and K. L. Carraway, 3rd (1998). "Differential signaling by the epidermal growth factor-like growth factors neuregulin-1 and neuregulin-2." *J Biol Chem* 273(41): 26954-26961.
- [125] Sweeney, C., D. Fambrough, C. Huard, A. J. Diamonti, E. S. Lander, L. C. Cantley and K. L. Carraway, 3rd (2001). "Growth factor-specific signaling pathway stimulation and gene expression mediated by ErbB receptors." *J Biol Chem* 276(25): 22685-22698
- [126] Nakano, N., S. Higashiyama, H. Ohmoto, H. Ishiguro, N. Taniguchi and Y. Wada (2004). "The Nterminal region of NTAK/neuregulin-2 isoforms has an inhibitory activity on angiogenesis." *J Biol Chem* 279(12): 11465-11470.
- [127] Zhang, D., M. X. Sliwkowski, M. Mark, G. Frantz, R. Akita, Y. Sun, K. Hillan, C. Crowley, J. Brush and P. J. Godowski (1997). "Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(18): 9562-9567
- [128] Fallin, M. D., V. K. Lasseter, P. S. Wolyniec, J. A. McGrath, G. Nestadt, D. Valle, K. Y. Liang and A. E. Pulver (2003). "Genomewide linkage scan for schizophrenia susceptibility loci among Ashkenazi Jewish families shows evidence of linkage on chromosome 10q22." *Am J Hum Genet* 73(3): 601-611.

- [129] Morar, B., M. Dragovic, F. A. Waters, D. Chandler, L. Kalaydjieva and A. Jablensky (2011). "Neuregulin 3 (NRG3) as a susceptibility gene in a schizophrenia subtype with florid delusions and relatively spared cognition." *Mol Psychiatry* 16(8): 860-866.
- [130] Howard, B. A. (2008). "The role of NRG3 in mammary development." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13(2): 195-203.
- [131] Harari, D., E. Tzahar, J. Romano, M. Shelly, J. H. Pierce, G. C. Andrews and Y. Yarden (1999). "Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase." *Oncogene* 18(17): 2681-2689
- [132] Wang, G. X., X. Y. Zhao, Z. X. Meng, M. Kern, A. Dietrich, Z. Chen, Z. Cozacov, D. Zhou, A. L. Okunade, X. Su, et al. (2014). "The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis." *Nat Med* 20(12): 1436-1443.
- [133] Pfeifer, A. and L. S. Hoffmann (2015). "Brown, beige, and white: the new color code of fat and its pharmacological implications." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 55: 207-227.
- [134] Meyer D, Yamaal T, Garratt A, Riethmacher-Sonnenberg E, Kane D, Theill LE, Birchmeier C. Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development* 1997. doi:10.1242/dev.124.18.3575
- [135] Anna Gumà , Francisco Díaz-Sáez , Marta Camps , Antonio Zorzano Neuregulin, an Effector on Mitochondria Metabolism That Preserves Insulin Sensitivity PMID: 32655416 PMCID: PMC7324780 DOI: 10.3389/fphys.2020.00696
- [136] Suárez E, Bach D, Cadefau J, Palacín M, Zorzano A, Gumà A. A novel role of neuregulin in skeletal muscle: Neuregulin stimulates glucose uptake, glucose transporter translocation, and transporter expression in muscle cells. *J. Biol. Chem.* 2001. doi:10.1074/jbc.M008100200
- [137] Cantó C, Pich S, Paz JC, Sanches R, Martínez V, Orpinell M, Palacín M, Zorzano A, Gumà A. Neuregulins increase mitochondrial oxidative capacity and insulin sensitivity in skeletal muscle cells. *Diabetes* 2007. doi:10.2337/db06-1726
- [138] Anna Gumà , Vicente Martínez-Redondo, Iliana López-Soldado, Carles Cantó, Antonio Zorzano Emerging role of neuregulin as a modulator of muscle metabolism. PMID: 20028964 DOI: 10.1152/ajpendo.00541.2009
- [139] Cantó, C., Suárez, E., Lizcano, J. M., Griñó, E., Shepherd, P. R., Fryer, L. G., et al. (2004). Neuregulin signaling on glucose transport in muscle cells. *J. Biol. Chem.* 279, 12260-12268. doi: 10.1074/jbc.M308554200
- [140] Vaibhav Moondra , Satyam Sarma, Tracy Buxton, Radwan Safa, Gregory Cote, Thomas Storer, Nathan K Lebrasseur, Douglas B Sawyer Serum Neuregulin-1beta as a Biomarker of Cardiovascular Fitness PMID: 20634924 PMCID: PMC2903891 DOI: 10.2174/1875318300902010001

- [141] Caillaud, K., Boisseau, N., Ennequin, G., Chavanelle, V., Etienne, M., Li, X., et al. (2016). Neuregulin 1 improves glucose tolerance in adult and old rats. *Diabetes Metab.* 42, 96-104. doi:10.1016/j.diabet.2015.08.003
- [142] Ennequin, G., Capel, F., Caillaud, K., Chavanelle, V., Etienne, M., Teixeira, A., et al. (2017). Neuregulin 1 improves complex 2-mediated mitochondrial respiration in skeletal muscle of healthy and diabetic mice. *Sci. Rep.* 7, 1742. doi:10.1038/s41598-017-02029-z
- [143] Heim, P., Morandi, C., Brouwer, G. R., Xu, L., Montessuit, C., and Brink, M. (2020). Neuregulin-1 triggers GLUT4 translocation and enhances glucose uptake independently of insulin receptor substrate and ErbB3 in neonatal rat cardiomyocytes. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* 1867, 118562. doi:10.1016/j.bbamcr.2019.118562
- [144] Honkoop, H., de Bakker, D. E., Aharonov, A., Kruse, F., Shakked, A., Nguyen, P. D., et al. (2019). Single-cell analysis uncovers that metabolic reprogramming by ErbB2 signaling is essential for cardiomyocyte proliferation in the regenerating heart. *Elife* 8, e50163. doi:10.7554/eLife.50163
- [145] Ennequin, G., Boisseau, N., Caillaud, K., Chavanelle, V., Etienne, M., Li, X., et al. (2015). Neuregulin 1 improves glucose tolerance in db/db mice. *PLoS One* 10: e0130568. doi:10.1371/journal.pone.0130568
- [146] Chen, Z., Wang, G. X., Ma, S. L., Jung, D. Y., Ha, H., Altamimi, T., et al. (2017). Nrg4 promotes fuel oxidation and a healthy adipokine profile to ameliorate diet induced metabolic disorders. *Mol. Metab.* 6, 863-872. doi:10.1016/j.molmet.2017.03.016
- [147] Zhang, P., Kuang, H., He, Y., Idiga, S. O., Li, S., Chen, Z., et al. (2018). NRG1-Fc improves metabolic health via dual hepatic and central action. *JCI insight* 3, 98522. doi:10.1172/jci.insight.98522
- [148] Dan Guo , Jianfang Liu, Peizhen Zhang , Xiaoyu Yang , Deying Liu , Jiayang Lin, Xueyun Wei, Bingyan Xu , Chensihan Huang , Xuan Zhou , Fei Teng, Hong Zhu , Huijie Zhang Adiposity Measurements and Metabolic Syndrome Are Linked Through Circulating Neuregulin 4 and Adipsin Levels in Obese Adults *Front Physiol* 2021 May 4;12:667330. doi: 10.3389/fphys.2021.667330. eCollection 2021.
- [149] Iliana López-Soldado, Katrin Niisuke , Catarina Veiga , Anna Adrover, Anna Manzano, Vicente Martínez-Redondo , Marta Camps , Ramon Bartrons , Antonio Zorzano , Anna Gumà. Neuregulin improves response to glucose tolerance test in control and diabetic rats *Am J Physiol Endocrinol Metab* . 2016 Mar 15;310(6):E440-51. doi: 10.1152/ajpendo.00226.2015. Epub 2015 Dec 29. PMID: 26714846

- [150] Jonathan W Haskins , Shannon Zhang , Robert E Means, Joanne K Kelleher Gary W Cline , Alberto Canfrán-Duque , Yajaira Suárez , David F Stern Neuregulin-activated ERBB4 induces the SREBP-2 cholesterol biosynthetic pathway and increases low-density lipoprotein uptake PMID: 26535009 PMCID: PMC4666504 DOI: 10.1126/scisignal.aac5124 Sci Signal . 2015 Nov 3;8(401):ra111. doi: 10.1126/scisignal.aac512
- [151] Fenghua Zeng , Yinqiu Wang , Lance A Kloepper, Suwan Wang, Raymond C Harris, ErbB4 deletion predisposes to development of metabolic syndrome in mice PMID: 29944391 PMCID: PMC6230712 Am J Physiol Endocrinol Metab . 2018 Oct 1;315(4):E583-E593. doi: 10.1152/ajpendo.00166.2018. Epub 2018 Jun 26.
- [152] Rosell, M., Kaforou, M., Frontini, A., Okolo, A., Chan, Y. W., Nikolopoulou, E., et al. (2014). Brown and white adipose tissues: Intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306, E945-E964. doi:10.1152/ajpendo.00473.2013
- [153] Alexander Bartelt, Joerg Heeren Adipose tissue browning and metabolic health *Nat Rev Endocrinol* . 2014 Jan;10(1):24-36. doi: 10.1038/nrendo.2013.204.
- [154] Chelsea Hepler , Mengle Shao , Jonathan Y Xia , Alexandra L Ghaben, Mackenzie J Pearson , Lavanya Vishvanath, Ankit X Sharma, Thomas S Morley, William L Holland , Rana K Gupta Directing visceral white adipocyte precursors to a thermogenic adipocyte fate improves insulin sensitivity in obese mice *Elife* . 2017 Jul 19;6:e27669. doi: 10.7554/eLife.27669.
- [155] Nabil Rabhi , Sarah Anissa Hannou , Xavier Gromada , Elisabet Salas, Xi Yao, Frédéric Oger , Charlene Carney , Isabel C Lopez-Mejia , Emmanuelle Durand , Iandry Rabearivelo , Amélie Bonnefond, Emilie Caron, Lluis Fajas , Christian Dani, Philippe Froguel , Jean-Sébastien Annicotte . Cdkn2a deficiency promotes adipose tissue browning *Mol Metab* . 2018 Feb; 8:65-76. doi: 10.1016/j.molmet.2017.11.012. Epub 2017 Dec 1.
- [156] Yongjie Ma , Mingming Gao, Dexi Liu Preventing High Fat Diet-induced Obesity and Improving Insulin Sensitivity through Neuregulin 4 Gene Transfer *Sci Rep* 2016 May 17;6:26242. doi: 10.1038/srep26242.
- [157] Runlin Gao Jian Zhang, Liuquan Cheng, Xuesi Wu, Wei Dong, Xinchun Yang, Tianchang Li, Xifu Liu, Yabei Xu, Xinyan Li, Mingdong Zhou A Phase II, randomized, double-blind, multicenter, based on standard therapy, placebo-controlled study of the efficacy and safety of recombinant human neuregulin-1 in patients with chronic heart failure *J Am Coll Cardiol* . 2010 May 4;55(18):1907-14. doi: 10.1016/j.jacc.2009.12.044.
- [158] Jabbour A, Hayward CS, Keogh AM, Kotlyar E, McCrohon JA, England JF, Amor R, Liu X, Li XY, Zhou MD, Graham RM, Macdonald PS. Parenteral administration of recombinant human neuregulin-1 to patients with stable chronic heart failure produces favourable acute and chronic haemodynamic responses *Eur J Heart Fail* . 2011 Jan;13(1):83-92. doi: 10.1093/eurjhf/hfq152.

- [159] López-Soldado, I., Niisuke, K., Veiga, C., Adrover, A., Manzano, A., Martínez Redondo, V., et al. (2016). Neuregulin improves response to glucose tolerance test in control and diabetic rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 310, E440-E451. doi:10.1152/ajpendo.00226.2015
- [160] Díaz-Sáez, F., Blanco-Sinfreu, C., Archilla-Ortega, A., Sebastian, D., Romero, M., Hernández-Alvarez, M. I., et al. (2021). Neuregulin 4 downregulation induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes through inflammation and autophagic degradation of GLUT4 vesicles. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 12960. doi:10.3390/ijms222312960
- [161] Wang, W., Zhang, Y., Yang, C., Wang, Y., Shen, J., Shi, M., et al. (2019). Feature Article: Transplantation of neuregulin 4-overexpressing adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates insulin resistance by attenuating hepatic steatosis. *Exp. Biol. Med.* 244, 565-578. doi:10.1177/1535370219839643
- [162] Zeng, F., Wang, Y., Kloepfer, L. A., Wang, S., and Harris, R. C. (2018). ErbB4 deletion predisposes to development of metabolic syndrome in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 315, E583-E593. doi:10.1152/ajpendo.00166.2018
- [163] Zhu, B., Mei, W., Jiao, T., Yang, S., Xu, X., Yu, H., et al. (2020). Neuregulin 4 alleviates hepatic steatosis via activating AMPK/mTOR-mediated autophagy in aged mice fed a high fat diet. *Eur. J. Pharmacol.* 884, 173350. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173350
- [164] Wang, Y., Huang, S., and Yu, P. (2019). Association between circulating neuregulin4 levels and diabetes mellitus: A meta-analysis of observational studies. *PLoS One* 14, e0225705. doi:10.1371/journal.pone.0225705
- [165] Dai, Y. N., Zhu, J. Z., Fang, Z. Y., Zhao, D. J., Wan, X. Y., Zhu, H. T., et al. (2015). A case-control study: Association between serum neuregulin 4 level and non alcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 64, 1667-1673. doi:10.1016/j.metabol.2015.08.013
- [166] Chen, L. L., Peng, M. M., Zhang, J. Y., Hu, X., Min, J., Huang, Q. L., et al. (2017). Elevated circulating Neuregulin4 level in patients with diabetes. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 33, e2870. doi:10.1002/dmrr.2870
- [167] Kang, Y. E., Kim, J. M., Choung, S., Joung, K. H., Lee, J. H., Kim, H. J., et al. (2016). Comparison of serum Neuregulin 4 (Nrg4) levels in adults with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus and controls without diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 117, 1-3. doi:10.1016/j.diabres.2016.04.007
- [168] Kurek Eken, M., Yayla Abide, C., Sahin Ersoy, G., Altun Ensari, T., Pekin, O., and Cevik, O. (2018). Clinical significance of neuregulin 4 (NRG4) in gestational diabetes mellitus. *Gynecol. Endocrinol.* 34, 605-608. doi:10.1080/09513590.2017.1420772
- [169] Pfeifer A. NRG4: an endocrine link between brown adipose tissue and liver. *Cell Metab* 2015;21:13-14.

- [170] Guo L, Zhang P, Chen Z, et al. Hepatic neuregulin 4 signaling defines an endocrine checkpoint for steatosis-to-NASH progression. *J Clin Invest* 2017;127:4449-4461.
- [171] Pellegrinelli, V., Peirce, V. J., Howard, L., Virtue, S., Türei, D., Senzacqua, M., et al. (2018). Adipocyte-secreted BMP8b mediates adrenergic-induced remodeling of the neuro-vascular network in adipose tissue. *Nat. Commun.* 9:4974. doi: 10.1038/s41467-018-07453-x
- [172] Ma, Y., Gao, M., and Liu, D. (2016). Preventing high fat diet-induced obesity and improving insulin sensitivity through neuregulin 4 gene transfer. *Sci. Rep.* 6:26242. doi: 10.1038/srep26242
- [173] Haskins, J. W., Zhang, S., Means, R. E., Kelleher, J. K., Cline, G. W., Canfrán Duque, A., et al. (2015). Neuregulin-activated ERBB4 induces the SREBP-2 cholesterol biosynthetic pathway and increases low-density lipoprotein uptake. *Sci. Signal.* 8:ra111. doi: 10.1126/scisignal.aac5124
- [174] Bartelt, A., and Heeren, J. (2014). Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 24-36. doi: 10.1038/nrendo.2013.204
- [175] Zhang, S., Cao, H., Li, Y., Jing, Y., Liu, S., Ye, C., et al. (2018). Metabolic benefits of inhibition of p38a in white adipose tissue in obesity. *PLoS Biol.* 16:e2004225. doi: 10.1371/journal.pbio.2004225
- [176] Rabhi, N., Hannou, S. A., Gromada, X., Salas, E., Yao, X., Oger, F., et al. (2018). Cdkn2a deficiency promotes adipose tissue browning. *Mol. Metab.* 8, 65-76. doi: 10.1016/j.molmet.2017.11.012
- [177] Hepler, C., Shao, M., Xia, J. Y., Ghaben, A. L., Pearson, M. J., Vishvanath, L., et al. (2017). Directing visceral white adipocyte precursors to a thermogenic adipocyte fate improves insulin sensitivity in obese mice. *eLife* 6:e27669. doi: 10.7554/eLife.27669
- [178] Huang, L., Pan, D., Chen, Q., Zhu, L. J., Ou, J., Wabitsch, M., et al. (2017). Transcription factor Hlx controls a systematic switch from white to brown fat through Prdm16-mediated co-activation. *Nat. Commun.* 8:68. doi: 10.1038/s41467-017-00098-2
- [179] Moreno-Navarrete, J. M., Escoté, X., Ortega, F., Serino, M., Campbell, M., Michalski, M. C., et al. (2013). A role for adipocyte-derived lipopolysaccharidebinding protein in inflammation- and obesity-associated adipose tissue dysfunction. *Diabetologia* 56, 2524-2537. doi: 10.1007/s00125-013-3015-9[205]
- [180] Torriani, M., Srinivasa, S., Fitch, K. V., Thomou, T., Wong, K., Petrow, E., et al. (2016). Dysfunctional subcutaneous fat with reduced Dicer and brown adipose tissue gene expression in HIV-infected patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 1225-1234. doi: 10.1210/jc.2015-3993
- [181] Finlin, B. S., Zhu, B., Confides, A. L., Westgate, P. M., Harfmann, B. D., Dupont Versteegden, E. E., et al. (2017). Mast cells promote seasonal white adipose being in humans. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 66, 1237-1246. doi: 10.2337/db16-1057

- [182] Aziz, S. A., Wakeling, L. A., Miwa, S., Alberdi, G., Hesketh, J. E., and Ford, D. (2017). Metabolic programming of a beige adipocyte phenotype by genistein. *Mol. Nutr. Food. Res.* 61:1600574. doi: 10.1002/mnfr.2016 00574
- [183] Zuriaga, M. A., Fuster, J. J., Gokce, N., and Walsh, K. (2017). Humans and mice display opposing patterns of “Browning” gene expression in visceral and subcutaneous white adipose tissue depots. *Front. Cardiovasc. Med.* 4:27. doi: 10.3389/fcvm.2017.00027
- [184] Wu, W., Shi, F., Liu, D., Ceddia, R. P., Gaffin, R., Wei, W., et al. (2017). Enhancing natriuretic peptide signaling in adipose tissue, but not in muscle, protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Sci. Signal.* 10:489. doi: 10.1126/scisignal.aam6870
- [185] Gonzalez-Hurtado, E., Lee, J., Choi, J., and Wolfgang, M. J. (2018). Fatty acid oxidation is required for active and quiescent brown adipose tissue maintenance and thermogenic programming. *Mol. Metab.* 7, 45-56. doi: 10.1016/j.molmet. 2017.11.004
- [186] Sauma, L., Franck, N., Paulsson, J. F., Westermark, G. T., Kjølhede, P., Strålfors, P., et al. (2007). Peroxisome proliferator activated receptor gamma activity is low in mature primary human visceral adipocytes. *Diabetologia* 50, 195-201. doi: 10.1007/s00125-006-0515-x
- [187] Moreno-Navarrete, J. M., Jove, M., Ortega, F., Xifra, G., Ricart, W., Obis, È, et al. (2016). Metabolomics uncovers the role of adipose tissue PDXK in adipogenesis and systemic insulin sensitivity. *Diabetologia* 59, 822-832. doi: 10.1007/s00125- 016-3863-1
- [188] Lee, M. W., Odegaard, J. I., Mukundan, L., Qiu, Y., Molofsky, A. B., Nussbaum, J. C., et al. (2015). Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell* 160, 74-87. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.011
- [189] Garcia, R. A., Roemmich, J. N., and Claycombe, K. J. (2016). Evaluation of markers of beige adipocytes in white adipose tissue of the mouse. *Nutr. Metab.* 13:24. doi: 10.1186/s12986-016-0081-2
- [190] Barquissau, V., Léger, B., Beuzelin, D., Martins, F., Amri, E. Z., Pisani, D. F., et al. (2018). Caloric restriction and diet-induced weight loss do not induce browning of human subcutaneous white adipose tissue in women and men with obesity. *Cell. Rep.* 22, 1079-1089. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.102
- [191] Nugroho, D. B., Ikeda, K., Barinda, A. J., Wardhana, D. A., Yagi, K., Miyata, K., et al. (2018). Neuregulin-4 is an angiogenic factor that is critically involved in the maintenance of adipose tissue vasculature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 503, 378-384. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.06.043
- [192] Su, S., Guntur, A. R., Nguyen, D. C., Fakory, S. S., Doucette, C. C., Leech, C., et al. (2018). A renewable source of human beige adipocytes for development of therapies to treat metabolic syndrome. *Cell Rep.* 25, 3215.e9-3228.e9. doi: 10.1016/j.celrep.2018.11.037

- [193] Kocak, M. Z., Aktas, G., Erkus, E., Yis, O. M., Duman, T. T., Atak, B. M., et al. (2019). Neuregulin-4 is associated with plasma glucose and increased risk of type 2 diabetes mellitus. *Swiss Med. Wkly.* 149, w20139. doi:10.4414/smw.2019.20139
- [194] Kurek Eken, M., Sahin Ersoy, G., Yayla Abide, C., Sanverdi, İ., Devranoglu, B., Kutlu, T., et al. (2019). Association between circulating neuregulin 4 levels and metabolic, atherogenic, and AMH profile of polycystic ovary syndrome. *J. Obstet. Gynaecol.* 39, 975-980. doi:10.1080/01443615.2019.1581754
- [195] Cao, S., and Hu, Y. (2021). Effects of serum irisin, neuregulin 4, and weight management on obese adolescent girls with polycystic ovary syndrome. *Biosci. Rep.* 41, BSR20211658. doi:10.1042/BSR20211658
- [196] Kocak, M. Z., Aktas, G., Atak, B. M., Duman, T. T., Yis, O. M., Erkus, E., et al. (2020). Is Neuregulin-4 a predictive marker of microvascular complications in type 2 diabetes mellitus? *Eur. J. Clin. Invest.* 50, e13206. doi:10.1111/eci.13206
- [197] Mehmet Zahid Kocak , Gulali Aktas , Burcin M Atak , Tuba T Duman , Ozgur Mehmet Yis, Edip Erkus, Haluk Savli. Is Neuregulin-4 a predictive marker of microvascular complications in type 2 diabetes mellitus? *Eur J Clin Invest* . 2020 Mar;50(3): e13206. doi: 10.1111/eci.13206. Epub 2020 Feb 15.
- [198] Helda Tutunchi ,Majid Mobasseri, Naser Aghamohammadzadeh , Jalil Hooshyar, Fatemeh Naeini, Farzad Najafipour .Serum neuregulin 4 (NRG-4) level and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A case-control study. *Int J Clin Pract* . 2021 Oct;75(10):e14555. doi: 10.1111/ijcp.14555. Epub 2021 Jun 29.
- [199] Hasei, S., Yamamotoya, T., Nakatsu, Y., Ohata, Y., Itoga, S., Nonaka, Y., et al. (2021). Carnosic acid and carnosol activate AMPK, suppress expressions of gluconeogenic and lipogenic genes, and inhibit proliferation of HepG2 cells. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 4040. doi:10.3390/ijms22084040
- [200] Arai, T., Ono, Y., Arimura, Y., Sayama, K., Suzuki, T., Shinjo, S., et al. (2017). Type i neuregulin1a is a novel local mediator to suppress hepatic gluconeogenesis in mice. *Sci. Rep.* 7, 42959. doi:10.1038/srep42959
- [201] Yang, F., Zhou, N., Zhu, X., Min, C., Zhou, W., and Li, X. (2021). n-3 PUFAs protect against adiposity and fatty liver by promoting browning in postnatally overfed male rats: a role for NRG4. *J. Nutr. Biochem.* 93, 108628. doi:10.1016/j.jnutbio.2021.108628
- [202] Comas, F., Martínez, C., Sabater, M., Ortega, F., Latorre, J., Díaz-Sáez, F., et al. 2019). Neuregulin 4 is a novel marker of beige adipocyte precursor cells in human adipose tissue. *Front. Physiol.* 10, 39. doi:10.3389/fphys.2019.00039
- [203] Wang, T-Y., Liu, C., Wang, A., and Sun, Q. (2015). Intermittent cold exposure improves glucose homeostasis associated with brown and white adipose tissues in mice. *Life Sci.* 139, 153-159. doi:10.1016/j.lfs.2015.07.030

- [204] Kimura, H., Nagoshi, T., Oi, Y., Yoshii, A., Tanaka, Y., Takahashi, H., et al. (2021). Treatment with atrial natriuretic peptide induces adipose tissue browning and exerts thermogenic actions in vivo. *Sci. Rep.* 11 (1), 17466. doi:10.1038/s41598-021-96970-9
- [205] C. Rogers, F. Moukdar, M.A. McGee, B. Davis, B.M. Buehrer, K.W. Daniel, S. Collins, H. Barakat, J. Robidoux EGF receptor (ERBB1) abundance in adipose tissue is reduced in insulin-resistant and type 2 diabetic women *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2012), 10.1210/jc.2011-1033
- [206] S. Carobbio, V. Pellegrinelli, A. Vidal-Puig Adipose tissue function and expandability as determinants of lipotoxicity and the metabolic syndrome *Adv. Exp. Med. Biol.* (2017), pp. 161-196, 10.1007/978-3-319-48382-5\_7 View Record in Scopus Google Scholar
- [207] M. Blüher Adipose tissue dysfunction in obesity *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* (2009), 10.1055/s-0029-1192044 Google Scholar
- [208] S.S. Choe, J.Y. Huh, I.J. Hwang, J.I. Kim, J.B. Kim Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders *Front. Endocrinol.* (2016), 10.3389/fendo.2016.00030
- [209] J. Ryu, J.T. Hadley, Z. Li, F. Dong, H. Xu, X. Xin, Y. Zhang, C. Chen, S. Li, X. Guo, J. L. Zhao, R.J. Leach, M.A. Abdul-Ghani, R.A. DeFronzo, A. Kamat, F. Liu, L.Q. Dong, Adiponectin alleviates diet-induced inflammation in the liver by suppressing MCP- 1 expression and macrophage infiltration, *Diabetes* 70 (2021) 1303-1316, <https://doi.org/10.2337/db20-1073>.
- [210] U. Smith, B.B. Kahn, Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids, *J. Intern. Med.* 280 (2016) 465-475, <https://doi.org/10.1111/joim.12540>.
- [211] K.K.-L. Wu, S.W.-M. Cheung, K.K.-Y. Cheng, NLRP3 inflammasome activation in adipose tissues and its implications on metabolic diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020), <https://doi.org/10.3390/ijms21114184>.
- [212] B. Gustafson, S. Hedjazifar, S. Gogg, A. Hammarstedt, U. Smith, Insulin resistance and impaired adipogenesis, *Trends Endocrinol. Metab.* 26 (2015) 193-200, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.01.006>.
- [213] M. Tanabe, N. Kaneko, T. Takeuchi, *Schistosoma mansoni*: Suppression of carbamoyl phosphate synthetase (ammonia) and ornithine carbamoyltransferase activities in the liver of infected mice, *Exp. Parasitol.* (1989), [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(89\)90128-8](https://doi.org/10.1016/0014-4894(89)90128-8).
- [214] J.M. Fernandez-Real, J.A. Menendez, G. Frühbeck, J.M. Moreno-Navarrete, A. Vazquez-Martín, W. Ricart, Serum HER-2 concentration is associated with insulin resistance and decreases after weight loss, *Nutr. Metab.* (2010), <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-14>.
- [215] C. Tse, A.S. Gauchez, W. Jacot, P.J. Lamy, HER2 shedding and serum HER2 extracellular domain: Biology and clinical utility in breast cancer, *Cancer Treat. Rev.* (2012), <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.03>

- [216] J.A. Menendez, L. Vellon, I. Mehmi, B.P. Oza, S. Ropero, R. Colomer, R. Lupu, Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (2004), <https://doi.org/10.1073/pnas.0403390101>.
- [217] M.S. Weng, C.T. Ho, Y.S. Ho, J.K. Lin, Theanaphthoquinone inhibits fatty acid synthase expression in EGF-stimulated human breast cancer cells via the regulation of EGFR/ErbB-2 signaling, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2007), <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.10.021>.
- [218] X.H. Long, K. Zhao, G.M. Zhang, Y. Zhou, R.P. Zhou, Z.L. Liu, Z.H. Zhang, Interaction between fatty acid synthase and human epidermal growth receptor 2 (HER2) in osteosarcoma cells, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* (2014).
- [219] J.A. Menendez, Fine-tuning the lipogenic/lipolytic balance to optimize the metabolic requirements of cancer cell growth: Molecular mechanisms and therapeutic perspectives, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* (2010), <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.09.00>
- [220] F. Díaz-Saez, C. Blanco-Sinfreu, A. Archilla-Ortega, D. Sebastian, M. Romero, M. I. Hernandez-Alvarez, S. Mora, X. Testar, W. Ricart, J.M. Fernandez-Real, J.M. Moreno-Navarrete, J. Aragonés, M. Camps, A. Zorzano, A. Guma, Neuregulin 4 Downregulation Induces Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes through Inflammation and Autophagic Degradation of GLUT4 Vesicles, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021), <https://doi.org/10.3390/ijms22231296>
- [221] E. Pagano, J.C. Calvo, ErbB2 and EGFR are downmodulated during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, *J. Cell. Biochem.* (2003), <https://doi.org/10.1002/jcb.1064>
- [222] F. Zeng, Y. Wang, L.A. Kloepfer, S. Wang, R.C. Harris, ErbB4 deletion predisposes to development of metabolic syndrome in mice, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* (2018), <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00166.2>
- [223] F. Comas, C. Martínez, M. Sabater, F. Ortega, J. Latorre, F. Díaz-Saez, J. Aragonés, M. Camps, A. Guma, W. Ricart, J.M. Fernandez-Real, J.M. Moreno-Navarrete, Neuregulin 4 is a novel marker of beige adipocyte precursor cells in human adipose tissue, *Front. Physiol.* (2019), <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00>
- [224] Sharma, A. M. & Padwal, R. Obesity is a sign - overeating is a symptom: an aetiological framework for the assessment and management of obesity. *Obes. Rev.* 11, 362-370 (2010)
- [225] Adachi H, Kurachi H, Homma H, Adachi K, Imai T, Morishige K, Matsuzawa Y, Miyake A 1994 Epidermal growth factor promotes adipogenesis of 3T3-L1 cell in vitro. *Endocrinology* 135:1824 - 1830
- [226] Harrington M, Pond-Tor S, Boney CM 2007 Role of epidermal growth factor and ErbB2 receptors in 3T3-L1 adipogenesis. *Obesity (Silver Spring)* 15:563-571
- [227] Eleonora Pagano, Omar Coso, Juan Carlos Calvo Down-modulation of erbB2 activity is necessary but not enough in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Biochem.* 2008 May 1;104(1):274-85. doi: 10.1002/jcb.21621.

- [228] Molly Harrington, Sunthorn Pond-Tor, Charlotte M Boney Role of epidermal growth factor and ErbB2 receptors in 3T3-L1 adipogenesis Obesity (Silver Spring) . 2007 Mar;15(3):563-71. doi: 10.1038/oby.2007.562.
- [229] A. Vazquez-Martin, F.J. Ortega-Delgado, J.M. Fernandez-Real, J.A. Menendez The tyrosinekinase receptor HER2 (erbB-2): From oncogenesis to adipogenesis, J. Cell. Biochem. (2008). <https://doi.org/10.1002/jcb.21917>.
- [230] Fisiopatología de la obesidad: Perspectiva actual Pathophysiology of obesity: Current view. Rev Chil Nutr Vol. 44, N° 3, 2017. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182017000300226>
- [231] Dominios funcionales de las neuregulinas y su uso como diana terapéutica. Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer. CSIC-Universidad de Salamanca
- [232] Expression of the epidermal growth factor receptor in ovarian cáncer. Maité Pérez Cutiño, Alain Alonso Remedios, Elizabeth González Ortega *versión impresa* ISSN 0138-600X *versión On-line* ISSN 1561-3062. Rev Cubana Obstet ginecol vol.44 no.2 Ciudad de la Habana abr.-jun. 2018

