



**Fundació**  
La Marató de TV3

22è SIMPOSIUM  
Diabetis i Obesitat



## **REGULACIÓ DE L'ACTIVITAT MITOCONDRIAL COM A ESTRATÈGIA TERAPÈUTICA PER A L'OBESITAT I LA DIABETIS DE TIPUS 2**

**Wifred Ricart Engel**

*Hospital Dr. Josep Trueta - IDIBGi Institut d'Investigació Biomèdica de Girona*

**Julián Aragonés López**

*Instituto de Investigación Sanitaria – Hospital Universitario de La Princesa Madrid*

**Marta Camps Camprubí**

*Facultat de Biologia - Universitat de Barcelona*

## 1. Resum

Hi ha un interès emergent per entendre la disfunció mitocondrial de l'adipòcit blanc en les alteracions metabòliques derivades de l'obesitat causades per l'engrandiment dels adipòcits però també per una secreció patològica d'adipocines. Aquest projecte pretén donar a conèixer els mecanismes implicats en aquesta disfunció mitocondrial per dissenyar estratègies a fi de restaurar l'activitat mitocondrial i combatre l'expansió patològica del teixit adipós blanc (WAT). El subministrament insuficient d'oxigen als adipòcits blancs durant l'expansió del WAT activa la disfunció mitocondrial dependent dels factors induïbles per la hipòxia (HIF), però els mecanismes subjacents dependents d'HIF continuen sent esquius. Les nostres dades indiquen que les condicions d'hipòxia que indueixen l'activació d'HIF1 $\alpha$  poden contrarestar la senyalització de la neuroregulina (NRG) mitjançant l'expressió d'un inhibidor, ERFFi1, del coreceptor, ErbB1, de l'NRG per retroalimentació negativa. A més, els nivells reduïts d'una nova adipocina identificada recentment, NRG4, juntament amb les propietats promitocondrials de la via NRG/ErbB en altres entorns, ens van portar a proposar un paper protector de la neuroregulina en la biologia del WAT, compromesa en la prevenció de la patologia induïda per HIF1 $\alpha$  davant l'expansió del WAT. En canvi, les nostres dades no han demostrat una major expressió d'ERFFi1 en teixit adipós blanc en condicions d'obesitat. Sorprenentment hem descobert que el factor de resposta HIF2 (però no HIF1) promou l'expressió d'NRG4, fet que ens permet definir un nou eix terapèutic HIF2-NRG4 que podria ser potenciat farmacològicament. Utilitzant un enfocament experimental combinat de mostres humanes, nous models transgènics de ratolí i anàlisi molecular de mitocondris, primer proposem analitzar l'expressió de les NRG derivades del WAT i dels seus receptors ErbB/HER així com la regulació de la senyalització de les NRG que es pugués veure afectada en individus obesos i diabètics. En segon lloc, proposem identificar les NRG que puguin potenciar l'activitat mitocondrial de l'adipòcit blanc, l'organització dels complexos mitocondrials i l'oxidació dels substrats a fi de contrarestar la disfunció mitocondrial del WAT *in vivo*. És important destacar que aquests enfocaments són operatius per a aquest projecte i van més enllà del que s'utilitza normalment en altres estudis de la biologia del WAT perquè els enfocaments actuals per a la inactivació de gens de manera restringida als adipòcits no poden discriminar entre el teixit adipós blanc i el marró. Col·lectivament, aquest projecte proporciona una nova comprensió de la disfunció mitocondrial en WAT

mitjançant la repressió de la senyalització NRG i obre noves vies terapèutiques per restaurar al WAT un metabolisme mitocondrial saludable en pacients obesos.

## 2. Resultats

La neuroregulina 4 (NRG4) és una adipocina amb múltiples efectes protectors tant locals sobre els adipòcits com distals sobre hepatòcits, els efectes de la qual són antagonistes amb la inducció de resistència a la insulina segons dades bibliogràfiques preliminars i les obtingudes en aquest projecte, que es resumeixen en les aportacions següents.

### 1. Troballes en humans

*1.1. Neuroregulina 4 és un nou marcador de cèl·lules precursors d'adipòcits beix en teixit adipós humà.*

En ratolins, l'expressió de neuroregulina 4 (NRG4) ha estat associada a l'activitat del teixit adipós marró i a l'embruniment dels adipòcits blancs. Aquí, hem trobat en humans que tant en el teixit adipós subcutani (TAS) com en el d'origen visceral (TAV) l'expressió d'NRG4 estava positivament correlacionada amb marcadors d'adipòcit marró o beix (UCP1, UCP3 i TMEM26). A més, l'expressió d'NRG4 en TAS s'associava amb l'acció de la insulina, mentre que en TAV l'expressió d'NRG4 es correlacionava negativament amb l'expressió de gens lipogènics i inflamatoris. En resum, aquestes troballes suggereixen l'expressió d'NRG4 com un nou marcador d'adipòcits beix en teixit adipós humà.

*1.2. Els nivells d'NRG4 en sèrum no s'associen a l'obesitat ni als trastorns metabòlics associats a l'obesitat, inclosa la resistència a la insulina, en subjectes no diabètics.*

En humans, l'associació entre els nivells circulants d'NRG4 i la resistència a la insulina o l'esteatosi hepàtica associada a l'obesitat és poc clara a causa d'algunes contradiccions en estudis anteriors. En l'estudi actual, vam examinar la possible vinculació entre NRG4 circulant i els trastorns metabòlics associats a l'obesitat en subjectes no diabètics i en dos cohorts independents. No es van trobar associacions significatives entre NRG4 en sèrum i obesitat, resistència a la insulina o esteatosi hepàtica en cap de les dues cohorts.

### 1.3. El receptor del factor de creixement epidèrmic en el teixit adipós impacta en l'adipogènesi humana.

Per aclarir el possible rol del receptor d'EGF (EGFR) i HER2 (*human ErbB receptor 2*) en l'adipogènesi i el teixit adipós humà, i per estudiar el possible rol d'altres receptors HER i neuroregulines en aquest teixit, en aquest projecte es va investigar l'expressió de receptors HER i neuroregulines en TAS i TAV en relació amb l'obesitat i la resistència a la insulina. Les principals troballes d'aquest estudi són:

- Els nivells d'ARNm d'HER2 i HER4 estaven incrementats en obesitat, sense associacions amb resistència a la insulina, hiperglucèmia o dislipèmia. D'altra banda, els nivells d'ARNm d'EGFR en TAS, que no canvien en obesitat, es correlacionaven negativament amb la resistència a la insulina.
- Una observació important va ser que els nivells d'ARNm d'EGFR en TAS i TAV estaven positivament correlacionats amb l'expressió d'alguns gens adipogènics, entre els quals *ADIPOQ*, *SLC2A4*, *FSP27*, *PLIN* i *PPARG*.
- En línia amb aquestes observacions, els experiments *in vitro* van indicar que el silenciament d'EGFR afectava negativament l'adipogènesi durant la primera fase de diferenciació adipocitària en preadipòcits i en adipòcits humans d'origen subcutani.
- Una altra troballa important d'aquest estudi va ser l'associació entre neuroregulina 2 (NRG2) i l'adipogènesi en el teixit adipós humà.

## 2. Paper de la neuroregulina 4 (NRG4) en la biologia de l'adipòcit i possibles efectes sistèmics

2.1. *L'NRG4 s'expressa en adipòcits, no en la fracció estromàtica del teixit adipós, i en cultius d'adipòcits primaris i línia estable 3T3-L1. El silenciament de l'expressió de l'NRG4 o dels seus receptors ErbB altera la biologia de l'adipòcit i la sensibilitat a la insulina.*

Les dades aportades a l'inici del projecte van permetre observar que els adipòcits (procedents de l'aïllament de la fracció adiposa del teixit adipós visceral i subcutani de ratolí, així com en cultius primaris d'aquests adipòcits i en cultius estables d'adipòcits 3T3-L1) expressen NRG4 i el seu receptor específic ErbB4, així com els coreceptors

ErbB1 i ErbB2. D'això es deduïa que hi devia haver efectes locals de l'adipocina NRG4 sobre el propi teixit adipós. Vam obtenir models de silenciament d'NRG4, d'ErbB4 i d'ErbB2 en cultius d'adipòcits primaris i transformats 3T3-L1. El silenciament de l'NRG4 i del seu receptor ErbB4 mostrava caràcters similars, però el silenciament d'ErbB2 provocava la disrupció de tot el procés adipogènic. Ens vam centrar en la caracterització del model de silenciament d'NRG4 en adipòcits 3T3-L1. La pèrdua d'NRG4 provocava una resistència total a la insulina amb relació a la capacitat d'induir el transport de glucosa.

*2.2. El silenciament en l'expressió d'NRG4 provoca la inducció de caràcters proinflamatoris que condueixen a la repressió de l'expressió del receptor de la insulina.* Davant la falta d'NRG4, es redueix l'expressió del receptor de la insulina. Vam observar que en aquests adipòcits s'indueix la via NFkB que condueix a una sobreexpressió, tardana en l'adipogènesi, de citocines proinflamatòries com TNFa, IL1b i IL6. Agents antiinflamatoris com la dexametasona o el salicilat van permetre revertir l'expressió de citocines proinflamatòries i recuperar l'expressió del receptor de la insulina.

*2.3. El caràcter antiinflamatori de l'NRG4 es manifesta també sobre els macròfags.* Els macròfags (M0), tant primaris (de medul·la òssia de ratolí) com transformats (RAW), induïts a una diferenciació M1 de caràcter proinflamatori, es van sotmetre a medis condicionats procedents de cultius d'adipòcits control 3T3-L1, rics en NRG4. Es va observar tant un efecte de reversió del caràcter proinflamatori com de prevenció quan els macròfags van rebre el tractament durant el procés de diferenciació. Atès que els macròfags tissulars són els principals productors de citocines proinflamatòries en el teixit adipós sota condicions d'obesitat i diabetis, aquest resultat apunta a un efecte protector local de l'NRG4 contra la inflamació. En aquest sentit, cal apuntar que els macròfags expressen nivells elevats del receptor ErbB4.

*2.4. El silenciament en l'expressió d'NRG4 promou la degradació autofàgica de les vesícules riques en el transportador de glucosa sensible a la insulina, GLUT4.* Els adipòcits amb pèrdua de l'expressió d'NRG4 mostren una caiguda dramàtica en el contingut proteic (però no d'mRNA) del transportador GLUT4 sensible a la insulina, així com d'altres marcadors de les vesícules endosomàtiques riques en GLUT4, com IRAP i syntaxina-6. Mitjançant l'ús del disruptor funcional dels lisosomes, bafilomicina A1, que permet la retenció del procés autofàgic, es va poder establir que els adipòcits silenciats

per a l'NRG4 presentaven un flux autofàgic més alt i que després de la seva aturada podien recuperar-se els nivells del transportador GLUT4.

### *2.5. El silenciament d'NRG4 promou estrès oxidatiu i una alteració en la morfologia i el funcionament mitocondrial en adipòcits 3T3-L1.*

Les causes de la inducció dels caràcters inflamatoris, així com de l'autofàgia, bé es podrien trobar en una alteració dels mitocondris. En aquest sentit, hem descrit que els adipòcits silenciats per a l'expressió de l'NRG4 tenen una elevada producció de superòxids (ROS) i una bona part són produïts pels mitocondris. Es va observar una lleugera pèrdua en el contingut total mitocondrial i que els mitocondris subjacents mostraven caràcters morfològics associats a l'estrès mitocondrial, petits i arrodonits amb pèrdua de la capacitat de formar estructures filamentoses. A més, mostraven un increment en el potencial de membrana i una pèrdua en la proteïna desacobladora UCP1, fet que podria contribuir a la generació de superòxids. Així mateix, s'observava un increment en la lipòlisi dels TAG, propi de la situació inflamatòria, i la pèrdua de l'acció de la insulina sobre l'oxidació de la glucosa i la lipogènesi. L'estudi d'intermediaris metabòlics del cicle de Krebs, com el citrat, el malat, el succinat i el fumarat, suggeria un alentiment d'aquesta via metabòlica, alhora que s'observava una producció elevada d'aminoàcids de cadena ramificada, els quals s'han associat a situacions de resistència a la insulina. Tot plegat concorda amb l'existència d'estrès metabòlic mitocondrial.

### *2.6. Els adipòcits silenciats per a l'expressió d'NRG4 mostren increments en l'expressió d'Hif1a i la pèrdua del factor de creixement endotelial vascular (VEGF).*

Durant la realització del projecte es van publicar estudis en què s'indicava que l'NRG4 era una adipocina amb efectes angiogènics. Els nostres estudis van indicar que en situació d'induir estrès cel·lular amb DMOG, que reproduïx els efectes generats per la hipòxia, s'incrementa l'expressió d'NRG4 en adipòcits control, cosa que apunta a un paper protector de l'NRG4. En aquest sentit, hem constatat que els adipòcits silenciats per a NRG4 augmenten els nivells d'HIF1a i perden la capacitat d'expressar el factor angiogènic VEGF.

### *2.7. Efectes sistèmics de l'NRG4: el bloqueig de l'expressió d'ErbB4 en el múscul esquelètic.*

Els estudis en ratolins ErbB4 *knock-out* condicionals de múscul esquelètic, un teixit que encara no havia estat abordat a la bibliografia, ens va permetre estudiar la possible existència d'una comunicació distal entre el teixit adipós i el múscul esquelètic, el principal teixit captador de glucosa en condicions absortives. Si bé sembla que existeixen efectes compensatoris quant a les respostes de tolerància a la glucosa i a la insulina, sí que vam poder determinar que el múscul esquelètic, tal com passava amb els adipòcits, mostra un increment en citocines proinflamatòries, així com en FGF21, una miocina que s'indueix per estrès mitocondrial. En aquestes condicions, el fetge mostra una pèrdua de la capacitat de produir NRG4, que sembla compensada per la producció en el teixit adipós, ja que ni el fetge ni WAT mostren una inducció d'inflamació. Els estudis que es detallen en l'informe científic de la darrera anualitat permeten apuntar a l'existència d'eixos de comunicació tissulars mediat per l'NRG4 i el seu receptor ErbB4 entre el múscul i el fetge, i aquest últim actua com a mediador en la comunicació entre WAT i el múscul. Futurs estudis haurien d'aprofundir en aquests eixos de comunicació tissulars i l'impacte en la resistència a la insulina.

### **3. Paper de la hipòxia en la regulació de components del sistema NRG-ErbB1**

En els darrers anys s'ha demostrat que els factors de la hipòxia HIF1 o HIF2 són reguladors centrals del metabolisme autònom de la cèl·lula. La senyalització produïda per neuroregulines i els seus receptors ErbBs són també elements reguladors d'escenaris fisiopatològics com l'obesitat o la resistència a la insulina. No obstant això, encara no es coneix el paper dels factors HIF en la senyalització produïda per neuroregulines i els seus receptors ErbBs. Les nostres dades, però, han revelat el següent.

#### *3.1. La hipòxia induïx l'expressió d'ERRFi1 en models cel·lulars d'adipòcits in vitro però no en el teixit adipós blanc en condicions d'obesitat.*

Les nostres dades han revelat que ERRFi1, un inhibidor de la senyalització d'ErbBs, s'indueix en cèl·lules 3T3-L1 (línia cel·lular de preadipòcit) exposades a hipòxia. No obstant això, aquesta regulació positiva d'ERRFi1 no es manifesta en teixit adipós de ratolins alimentats amb una dieta enriquida amb greixos, ja que els nostres estudis previs han demostrat que és un escenari que desencadena l'activació d'HIF1 $\alpha$ . Aquestes dades poden suggerir que l'activació d'HIF1 $\alpha$  *in vivo* es podria donar de manera menys marcada que en cèl·lules 3T3-L1 exposades a hipòxia. Alternativament,

és possible que aquesta via HIF1 $\alpha$ -ERRFi1 no sigui operativa *in vivo* durant l'expansió del teixit adipós blanc.

*3.2. El factor de resposta a hipòxia HIF2a induïx NRG4 en fetge i teixit adipós blanc.* Amb l'ús de models animals de guany i pèrdua de funció dels factors HIF (emprant el sistema Ubc-CreERT2), identifiquem en primer lloc que l'expressió d'NRG4 s'indueix d'una manera molt notable en resposta a la isoforma HIF2 en el fetge. Aquestes dades ens van portar a canviar la nostra atenció d'ERRFi1 cap a NRG4. En aquesta línia, dades prèvies d'altres grups han demostrat que l'activació parcial d'HIF2a en el teixit hepàtic facilita la sensibilitat a la insulina a més de contrarestar la disfunció metabòlica. Per tant, actualment estem considerant que NRG4 podria produir aquest efecte beneficiós de l'activació d'HIF2a sobre el metabolisme hepàtic. A més, hem descobert recentment que, de manera similar al teixit hepàtic, la potenciació de la isoforma HIF2 induïx notablement NRG4 en el teixit adipós blanc. Per tant, els efectes beneficiosos en l'obesitat duts a terme per NRG4 podrien ser induïts per l'activació farmacològica d'HIF2a (vegeu també més avall).

*3.3. El promotor proximal d'NRG4 presenta llocs d'unió consens per a la unió d'HIF2a.* Les dades presentades en la secció 3.2 ens van portar a analitzar la presència de possibles llocs d'unió d'ADN per HIF en el promotor d'NRG4 de ratolí i humà. En aquest sentit, vam localitzar tres motius RCGTG en el promotor proximal d'NRG4 tant humà com de ratolí en posició 5' de l'exó 1 d'NRG4. És important destacar que aquests tres possibles llocs d'unió d'HIF només són en regions caracteritzades per modificacions en la histona 3 com H3K4Me1, H3K5Me3 o H3K27Ac, que es troben comunament en regions d'ADN de transcripció activa.

### **3. Rellevància i possibles implicacions futures**

#### **Implicacions clíniques i futures línies d'investigació**

La resistència a la insulina implica una inflamació crònica de menor abast en el teixit adipós. L'estudi actual ens porta a concloure el següent:

1. L'adipocina neuroregulina 4 és un factor endocrí amb efectes antiinflamatoris sobre els adipòcits basat en els models generats per a aquest projecte de pèrdua de funció.



2. El tractament amb neuroregulina 4 pot revertir els caràcters inflamatoris dels adipòcits.
3. La neuroregulina 4 atenua el desenvolupament d'un perfil inflamatori en macròfags estimulats amb factors proinflamatoris.
4. La neuroregulina 4 preserva la sensibilitat a la insulina exercint un control sobre la inflamació i el flux autofàgic, cosa que assegura els nivells d'expressió del receptor d'insulina i del transportador de glucosa GLUT4 sensible a la insulina en els adipòcits.
5. La manca de neuroregulina 4 condueix a la disfunció dels mitocondris i a la producció de superòxids en adipòcits.
6. Els estudis *in vivo* indiquen que la manca d'acció de neuroregulina 4 en el múscul esquelètic induïx inflamació muscular i disfunció mitocondrial basada en l'expressió d'FGF21.
7. Hi ha un diàleg entre múscul i fetge amb relació al manteniment de l'expressió de neuroregulina 4 hepàtica.
8. Pel que fa a la regulació d'NRG4 per la isoforma HIF2a, s'ha de considerar que (i) l'activació farmacològica de la via de l'HIF mitjançant inhibidors dels sensors d'oxigen PHD combat els signes de la síndrome metabòlica en ratolins i (ii) s'ha demostrat que NRG4 presenta múltiples beneficis metabòlics. Per tant, aquestes dades suggereixen que l'activació farmacològica del sistema HIF2, mitjançant inhibidors de PHD, pot representar una nova aproximació terapèutica per induir els efectes metabòlics beneficiosos mediat per NRG4.
9. En el teixit adipós humà, l'expressió de neuroregulina 4 és un nou marcador de cèl·lules termogèniques. Aquesta troballa indica que la inducció d'NRG4 en teixit adipós humà podria intensificar la despesa energètica i, en conseqüència, reduir l'excessiva acumulació de greix en pacients amb obesitat.
10. L'estudi actual també confirma la importància d'EGFR en l'adipogènesi del teixit adipós i demostra l'associació d'HER2 i HER4 amb obesitat. Aquestes troballes

suggereixen una nova via terapèutica dirigida a intensificar EGFR i silenciar els receptors HER2 i HER4 en teixit adipós per millorar els trastorns metabòlics associats a l'obesitat.

En general, els receptors de neuroregulina 4, ErbB4/HER4, són essencials per mantenir la sensibilitat a la insulina en els adipòcits, prevenir la inflamació i també tenen un paper endocrí dirigit al múscul esquelètic i al fetge amb conseqüències sistèmiques que haurien d'abordar-se de manera més profunda en el futur. Amb això en ment, la neuroregulina 4 emergeix com una eina terapèutica potencial per prevenir la inflamació i la resistència a la insulina. En aquest sentit, la cerca d'agonistes farmacològics específics per al receptor de neuroregulina 4, HER4, podria ser una alternativa nova per tractar pacients diabètics tipus 2 relacionats amb l'obesitat.

#### 4. Bibliografia científica generada

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

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

Front Physiol. 2019 Jan 31;10:39. doi: 10.3389/fphys.2019.00039. eCollection 2019.

Gumà, A., Díaz-Sáez, F., Camps, M., Zorzano, A.

*Neuregulin, an effector on mitochondria metabolism that preserves insulin sensitivity.*

Frontiers in Physiology, 11, art. 696, 2020. REVIEW.

doi: 10.3389/fphys.2020.00696.

Díaz-Sáez F, Blanco C, Archilla A, Testar X, Hernández-Alvarez MI, Mora S, Sebastian D, Romero M, Ricart W, Fernández-Real JM, Moreno-Navarrete JM, Aragonés J, Zorzano A, Camps M, Gumà A.

*Neuregulin 4 downregulation induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes through inflammation and autophagic degradation of GLUT4 vesicles.*

Enviat a Diabetologia, International peer-review Journal, IF 7,1.

Latorre J, Martínez C, Ortega F, Lluch A, Oliveras-Cañellas N, Díaz-Sáez F, Aragonés J, Camps M, Gumà A, Ricart W, José Manuel Fernández-Real JM, Moreno-Navarrete JM.  
*Adipose tissue epidermal growth factor receptor impacts on human adipogenesis.*  
En procés.

Martínez C, Latorre J, Ortega F, Lluch A, Oliveras-Cañellas N, Aragonés J, Camps M, Gumà A, Ricart W, José Manuel Fernández-Real JM, Moreno-Navarrete JM.  
*Serum NRG4 is not associated to obesity and its associated metabolic disturbances.*  
En procés.