



Universidad  
de La Laguna

# CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO ANIMAL DE OBESIDAD EN PRESENCIA DE HAPLOINSUFICIENCIA DEL RECEPTOR ADRENÉRGICO $\alpha_{2B}$

**CARLOS VALIDO REYES**

Departamento de Medicina Interna,  
Dermatología y Psiquiatría

Junio 2020

TUTOR: Dr J. Federico Díaz González  
CO-TUTOR: Dr Javier R. Castro Hernández



**Trabajo Fin de Grado**  
**Conformidad para la presentación de la memoria y defensa**

Los Dres. José Federico Díaz González y Javier Rafael Castro Hernández, tutores del trabajo realizado por el alumno **Carlos Valido Reyes** con el título **Caracterización de un modelo animal de obesidad en presencia de haploinsuficiencia del receptor adrenérgico  $\alpha 2B$** , damos nuestra aprobación para la presentación de la memoria y a su defensa como Trabajo Fin de Grado.

En La Laguna, a 15 de mayo de 2020

Fdo: Dr. José Federico Díaz González

Fdo: Dr. Javier Rafael Castro Hernández



Facultad de Medicina , Campus de Ofra, s/n. 38071-La Laguna. Tel: 922319296 Fax: 922219411

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.

*La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>*

Identificador del documento: 2478494

Código de verificación: jEyVhye1

Firmado por: José Federico Díaz González  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 15/05/2020 14:06:18

Javier Rafael Castro Hernández  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

15/05/2020 14:07:14

# Dedicatoria

A mi familia, por apoyarme durante tanto tiempo a alcanzar mi sueño. A mis padres, por su esfuerzo, este trabajo está dedicado a ellos. También a mi hermana, por aguantar mis continuas explicaciones sobre la fisiología del sistema cardiovascular.

A mi tutor J. Federico Díaz González y co-tutor Javier Rafael Castro Hernández, por permitir que este trabajo salga adelante. Por su apoyo y excelentes consejos, no sólo en relación a este trabajo, sino a este último año de carrera y al futuro.

A Sergio, colega en su año de Máster. Por su ayuda con los protocolos del laboratorio.

A mis profesores, por depositar en todos nosotros sus expectativas de un futuro mejor.

A mis amigos, por tantos momentos que no hemos podido pasar juntos. Han demostrado que siempre están ahí, valoran mi esfuerzo y me ayudan a crecer personalmente.

Y finalmente, me lo dedico a mí mismo. Ver este trabajo terminado, después de tanto esfuerzo, simboliza la culminación de 6 años de estudio (que quizás comenzaron algunos años antes).

# Resumen

La obesidad es una enfermedad crónica que se define como un excesivo acúmulo de grasa que se evalúa mediante la relación entre peso y talla por el índice de masa corporal. La obesidad se relaciona con la diabetes, la dislipemia, el hígado graso, el infarto de miocardio, la artrosis o el cáncer, entre otras patologías.

El tejido adiposo es un órgano muy complejo, con funciones endocrinas que causan efectos sistémicos importantes, incluyendo la regulación del sistema inmune. Uno de los grandes implicados en la regulación de este sistema son los macrófagos, células pertenecientes al sistema inmune innato. Estudios previos del laboratorio han demostrado la capacidad de los agonistas adrenérgicos  $\alpha_2$  de modular la capacidad de los neutrófilos de migrar a los focos inflamatorios y de regular la polaridad (fenotipo) de los macrófagos tisulares, un hallazgo que refuerza la relevancia de la interconexión entre sistema nervioso y el sistema inmunitario.

Mediante este trabajo, se pretende dilucidar el papel que juegan los receptores  $\alpha_{2B}$  adrenérgicos en la regulación de la ganancia de peso, la homeostasis de la glucosa y la inflamación. Para ello se ha comparado el estado ponderal de ratones heterocigotos para el receptor  $\alpha_{2B}$  adrenérgico con respecto a un grupo control.

*Palabras clave: receptor  $\alpha_{2B}$ , obesidad, macrófagos, composición corporal*

# *Abstract*

Obesity is a chronic disease that is defined as an excessive accumulation of fat that is evaluated by the relationship between weight and height by the body mass index (BMI). Obesity is related to diabetes, dyslipidemia and fatty liver, myocardial infarction, arthrosis or cancer, among other pathologies.

Adipose tissue is an extraordinarily complex organ, with endocrine functions that cause important systemic effects including the regulation of the immune system. One of the major players in the regulation of this system are macrophages, cells belonging to the innate immune system. Previous laboratory studies have demonstrated the capacity of adrenergic agonists  $\alpha_2$  to modulate the ability of neutrophils to migrate into the inflammatory foci and to regulate the polarity (phenotype) of tissue macrophages, a finding that reinforces the relevance of the interconnection between the nervous system and the immune system.

This work aims to elucidate the role played by adrenergic receptors  $\alpha_{2B}$  in the regulation of inflammation and weight gain. For this purpose, the weight status of heterozygous mice for *Adra2b* has been compared with a control group.

*Keywords:  $\alpha_{2B}$  receptor, obesity, macrophages, body composition*

# Índice general

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>5</b>
1.1	La obesidad . . . . .	5
1.1.1	Síndrome metabólico . . . . .	7
1.2	La lipoinflamación . . . . .	8
1.2.1	Autofagia . . . . .	10
1.3	Receptores adrenérgicos . . . . .	11
1.3.1	Efectos sobre la homeostasis . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Hipótesis y objetivos</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Material y métodos</b>	<b>15</b>
3.1	Animales . . . . .	15
3.2	Medición de la composición corporal . . . . .	15
3.3	Control de la ingesta energética . . . . .	16
3.4	Homeostasis de la glucosa . . . . .	16
3.5	Estudio de infiltración de macrófagos en grasa <sup>(2)</sup> . . . . .	16
3.6	Análisis estadístico . . . . .	17
<b>4</b>	<b>Resultados</b>	<b>18</b>
4.1	Valoración del fenotipo de obesidad . . . . .	18
<b>5</b>	<b>Discusión</b>	<b>24</b>
<b>6</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>28</b>
<b>7</b>	<b>¿Qué he aprendido durante este TFG?</b>	<b>29</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>30</b>
	<b>Anexo</b>	<b>39</b>

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. La obesidad

La obesidad es una patología crónica caracterizada por el acúmulo excesivo de tejido adiposo en el organismo de naturaleza multifactorial. La cuantificación del contenido graso corporal se puede realizar por diferentes técnicas como la Dual-energy X-ray absorciometry (DEXA), Tomografía computarizada (TC), Resonancia Nuclear Magnética (RNM) o impedanciometría, entre otras técnicas [1]. Sin embargo, estimaciones como el índice de masa corporal (IMC) (relación entre el peso y la altura en  $\text{kg}/\text{m}^2$  circunferencia abdominal tienen gran utilidad en la práctica diaria y proveen de información relevante sobre el nivel del estado ponderal del individuo. En esencia, es comúnmente aceptado que un IMC superior a 25 se considera sobrepeso, y obesidad cuando supera 30, según los valores de referencia para la edad y el sexo [2]. También se puede definir por sus consecuencias sobre la salud. La obesidad se ha asociado directa e indirectamente a diabetes, dislipemia, infarto de miocardio, hígado graso no alcohólico, síndrome de hipoventilación-obesidad, la patología degenerativa articular y el cáncer, entre otros, con un impacto variable en función de la población afecta [2].

La intensa actividad investigadora de los últimos 70 años ha permitido ahondar en los conocimientos fisiopatológicos que intervienen en el desarrollo de la obesidad. A ello se debe el reconocimiento de la obesidad como una enfermedad crónica y no simplemente un resultado de la falta de autocontrol en la ingestión de alimentos. De esta manera, la obesidad, como otras enfermedades crónicas, es el resultado de la interacción entre una dotación genética que predispone a la ganancia de peso y los factores ambientales [3].

A nivel global, la proporción de adultos con un IMC mayor de 25 (sobrepeso y obesidad) ha aumentado entre 1980 y 2013 del 28,8% al 36,9% en hombres, y del 29,8% al 38% en las mujeres. Esta tendencia se ha observado tanto en países en vías de desarrollo como en los

plenamente industrializados [4]. Sin embargo, desde el año 2006 el incremento de la población adulta obesa se ha estabilizado. En Estados Unidos, un estudio del año 2017 ha encontrado una prevalencia de individuos obesos mayor entre adultos con edades comprendidas entre 40-59 años (42,8 %) frente al grupo de edad de los 20-39 años (35,7 %) [5].

Según la Encuesta Nacional de Salud del año 2017, un 37,1 % de los adultos españoles tenían sobrepeso y un 17,4 % obesidad. Estadísticamente, la edad sería un factor determinante tanto en el sobrepeso como la obesidad. Por otro lado, entre los niveles educativos más bajos se dan las mayores proporciones de obesidad. En Canarias, un 37,2 % de los mayores de edad tenían sobrepeso y un 19,26 % obesidad. Cabe destacar que la proporción de mujeres obesas en Canarias supera en 4,66 puntos porcentuales la media española (21,40 frente a 16,74 %) [6].

Además de las consecuencias directas sobre la salud, la obesidad tiene implicaciones socio-económicas muy importantes. En España, por ejemplo, se ha determinado una mayor probabilidad de las personas con obesidad de grado II ( $IMC > 35 \text{ kg/m}^2$ ) de requerir cuidados en el hogar, más visitas al médico de familia, así como asistencia al servicio de emergencias y hospitalizaciones respecto a los adultos con normopeso [7].

El sobrepeso y la obesidad en España han crecido enormemente desde que existen registros. En el año 2016, los gastos médicos directos generados por la obesidad se estimaron en torno al 2 % del gasto sanitario español. Se espera que para el año 2030, si la tendencia continúa, crezca el número de casos de obesidad en un 16 %, así como un incremento del gasto sanitario directo en un 58 % (3.000.000.000 euros/año) [8].

Por otro lado, estudios genéticos han permitido describir alteraciones monogénicas que por sí mismas son responsables de obesidad, así como variables poligénicas que afectan, a la edad de aparición y la severidad de la obesidad [9]. Sin embargo, por ahora, solo una pequeña parte de la variabilidad de peso entre la población es explicada en base genética. Muchos elementos ambientales parecen tener especial relevancia, entre estos se encuentra la calidad en la alimentación, el trabajo, el ocio y determinantes socio-económicos y culturales. Sin embargo, abordar cada uno de ellos sobrepasa la capacidad resolutoria de la consulta médica.

### 1.1.1. Síndrome metabólico

La obesidad, en muchas ocasiones, no aparece de manera aislada, sino que suele verse acompañada de otros signos y síntomas. En 1988 se describe por primera vez la asociación de obesidad central, hipertensión, resistencia insulínica y aterogénesis-dislipemia, denominado síndrome metabólico (también denominado síndrome X o síndrome de Reaven). Los criterios que definen al síndrome metabólico han sufrido múltiples cambios desde su primera aparición. Partiendo de los criterios diagnósticos de la OMS en 1998, pasando por las modificaciones llevadas a cabo por la *American Association of Clinical Endocrinologists*, hasta llegar a la definición consenso del año 2009 [10].

La prevalencia global del síndrome metabólico depende, por un lado, de los factores geográficos y sociodemográficos, y por otro, de los criterios diagnósticos utilizados. En Estados Unidos, la encuesta nacional de salud y nutrición estima que un 35% de los adultos, y un 50% de los mayores de 60 presentan síndrome metabólico, según criterios del "*National Cholesterol Education Program*". Por otra parte, utilizando los criterios de la "*International Diabetes Federation*", en Europa se ha estimado una prevalencia del 41% de los hombres y un 38% de las mujeres [10].

## 1.2. La lipoinflamación

Una situación de balance energético positivo permite un acúmulo del excedente en el tejido adiposo subcutáneo, desencadenando un fenómeno de hiperplasia. Una vez sobrepasada la capacidad de almacenamiento, el tejido adiposo visceral se capacita para un mayor acúmulo de grasa, pero en este caso, los adipocitos aumentan de tamaño, es decir, sufren hipertrofia. Este crecimiento se ha asociado a cambios estructurales y funcionales del tejido adiposo [11]. Es más, se ha observado que, en animales, y también en humanos, la hipertrofia de adipocitos induce hipoxia tisular. Los tejidos, ante una situación amenazante, como la hipoxia, responden mediante la secreción de adipocitoquinas pro-inflamatorias como la Interleukina (IL)-6, inhibidor del activador del plasminógeno (PAI)-1, Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o la leptina [12]. Aunque, en condiciones normales el adipocito es mayoritario en el tejido adiposo, otras células como los macrófagos infiltrantes juegan un papel clave en este proceso descrito de lipoinflamación.

Los macrófagos tisulares juegan un papel muy específico dentro de las funciones metabólicas del propio tejido. Por ejemplo, los osteoclastos son un tipo de macrófago multinucleado que se encuentra en el hueso y es responsable de la reabsorción ósea, y al igual que estos, se ha hipotetizado que los macrófagos del tejido adiposo responden a cambios del microambiente, se diferencian y adaptan sus funciones [13].

El número de macrófagos que infiltran el tejido adiposo se incrementa en estados de obesidad. En ratones obesos, los macrófagos constituyen hasta el 45-60% del contenido celular del tejido adiposo, mientras que en ratones delgados solo llegan al 10-15% [14]. En estados de balance energético positivo, los macrófagos sufren cambios en su estado de polarización. Esto último hace referencia al modo en que estas células han sido activadas; además, cabe destacar que se trata de una situación dinámica, que responde a múltiples señales como pueden ser microorganismos, el daño tisular o alteraciones homeostáticas. Se han establecido dos fenotipos de macrófagos en función de su estado de polarización, aquellos con características anti-inflamatorias o M2, que son la forma predominante en situación de balance energético negativo, y una forma M1 pro-inflamatoria [15] que es la predominante con balance energético positivo [16].

Desde hace un tiempo se ha llegado a la conclusión de que la obesidad, al igual que otras enfermedades crónicas, se desarrolla en un contexto de inflamación crónica de bajo grado [17]. Esta inflamación se produce localmente en el tejido adiposo, el cual genera una gran variedad de moléculas bioactivas, entre las que destacan por su efecto inmunomodulador la leptina y la adiponectina. La adiponectina tiene efecto anti-inflamatorio e insulinosensibilizante. De forma opuesta, la leptina es una hormona con función anorexígena a nivel hipotalámico, que en estados de obesidad se acompaña de una resistencia central a su acción, lo que desencadena una “hiperleptinemia” compensadora por mecanismos de regulación tipo *feedback* negativo. Esto último tiene efectos directos sobre la activación de células inmunitarias, entre las que se encuentran los macrófagos [18].

Con relación a la perpetuación del estado inflamatorio crónico, se ha propuesto recientemente que los macrófagos localizados en el tejido adiposo presentan un efecto adipogénico. Es decir, reducen la lipólisis o fragmentación de los depósitos adiposos, favoreciendo de esta manera el acúmulo de grasa. Esto se consigue mediante el aumento de la expresión de genes encargados de la degradación de las catecolaminas, por la vía del inflammasoma [19].

Las células del sistema inmunitario innato, entre las que se encuentran los macrófagos, presentan una serie de receptores de transmembrana denominados PRRs (pattern recognition receptors), que detectan tanto moléculas asociadas a patógenos (PAMPs) como a daño tisular (DAMPs) [20]. La activación de muchos de estos PRRs desencadena cascadas de señalización inflamatorias (NF- $\kappa$ B, interferones, etc.) [20]. Sin embargo, existe otra serie de receptores citoplasmáticos que desencadenan una respuesta defensiva diferente: la formación de complejos proteicos denominados inflamomas, que activan unas proteasas denominadas caspasas 1 y 11 cuya función es la producción de interleuquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y IL-8, así como la inducción de apoptosis [21].

### 1.2.1. Autofagia

Recientemente, se ha establecido que la autofagia puede jugar un papel importante en el control de la respuesta inmunitaria. En función de las cascadas de señalización activadas, objetivos y genes implicados diferenciamos entre macroautofagia, microautofagia, y autofagia mediada por chaperonas. Este trabajo se centrará en la macroautofagia (en adelante “autofagia”) [22].

La autofagia, entre sus múltiples funciones, reduce la respuesta proinflamatoria desencadenada por los macrófagos [23]. La inflamación tisular viene determinada en gran parte por la ratio entre fenotipos macrofágicos M1/M2 [23]. La deficiencia de autofagia promueve la diferenciación a M1 e inhibición del fenotipo M2. Se entiende, por tanto, que mediante activación de autofagia en macrófagos, se favorece la diferenciación M2 [24]. La autofagia tiene lugar en condiciones fisiológicas celulares con objeto de eliminar proteínas y organelas dañadas, sin embargo, este proceso puede encontrarse alterado en muchas enfermedades [25]. Por tanto, se hace indispensable conocer sus mecanismos regulación y control. La inducción de la autofagia se produce mediante la inhibición de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), una proteína-quinasa muy conservada y que se ha establecido como punto central regulador del crecimiento celular [26].

Así, situaciones de estrés o deprivación nutricional desencadenan la inhibición de mTOR. En este sentido, se ha descrito que la activación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos interactúa en el metabolismo lipídico mediante mecanismos que involucran la autofagia [27]. De manera que la modulación de mTOR está perfectamente descrita en su interacción con receptores acoplados a proteínas G.

Un estudio previo de nuestro laboratorio, desarrollado como TFM por José Daniel Morales Fernández con el título: “*Modulación de la autofagia mediada por receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos en macrófagos*”[28], ha encontrado que los macrófagos en condiciones basales expresan receptores  $\alpha_{2B}$  pero no  $\alpha_{2A}$ , lo que puede dar claves para entender cómo mutaciones en estos genes tendrán efectos metabólicos.

### 1.3. Receptores adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos, también denominados adrenoceptores, tienen una distribución ubicua y son los responsables de mediar los efectos biológicos de las catecolaminas, principalmente adrenalina y noradrenalina. Los receptores adrenérgicos pertenecen a una gran familia. Hasta la fecha, se han identificado tres tipos farmacológicos, cada uno de ellos con 3 subtipos:  $\alpha_1$  ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ),  $\alpha_2$  ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ) y  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ ) [29]. Todos ellos comparten una base estructural, que es la monocadena polipeptídica con 7 dominios transmembrana, un dominio N-terminal extracelular y otro C-terminal, siendo este último el que interactúa a nivel intracelular, mediante su acoplamiento a proteínas G, desencadenando cascadas de señalización intracelular.

La estructura primaria de los receptores adrenérgicos ha sido estudiada en base a las secuencias de nucleótidos de los 9 subtipos. Por su importancia en este trabajo, los receptores  $\alpha_2$  ( $\alpha_2R$ ) tienen regiones C-terminales más cortas que los  $\beta$ , y a su vez, mucho más cortas que los  $\alpha_1$ . Esto concuerda con que la inhibición (por  $\alpha_2R$ ) de la adenilato ciclasa (AC) requiera segmentos C-terminales más cortos que los necesarios para su activación (por  $\beta R$ ). Por otro lado, los receptores  $\alpha_1$ , presentan regiones C-terminales más largas, estando involucrados en sistemas en los que se activa la fosfolipasa C [30]. Ver Ilustración 1.1

La acción lipolítica de las catecolaminas, por tanto, corre a cargo de los receptores  $\beta$ . Una vez activada la AC, se produce un aumento de los niveles de AMPc, que a su vez activa a la lipasa, enzima que hidroliza los triacilglicéridos liberando glicerol y ácidos grasos libres [31]. Todo esto, en concordancia con los hallazgos recientes ya comentados en la sección 1.2.1.

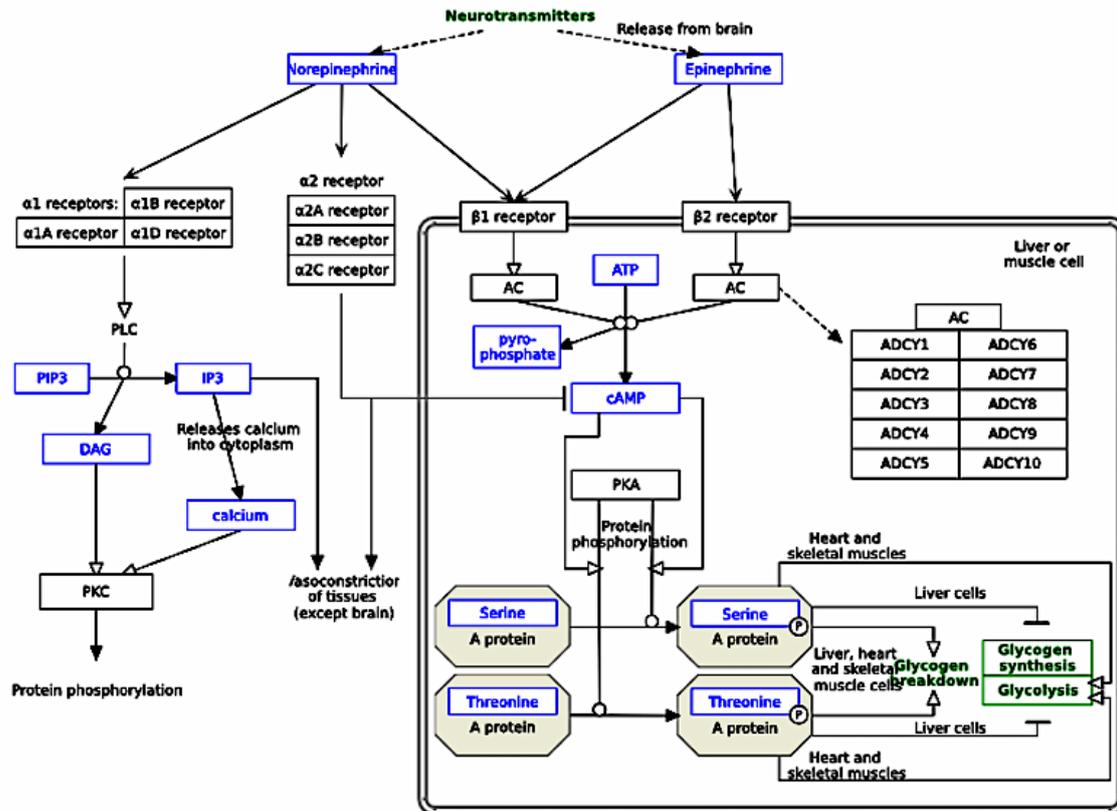


Ilustración 1.1: Vía de señalización intracelular de los distintos tipos de receptores adrenérgicos estimulados por adrenalina y noradrenalina. Tomado de Wikipathways [32]

### 1.3.1. Efectos sobre la homeostasis

Los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos han sido propuestos en primera instancia como inhibidores presinápticos de la liberación de neurotransmisores. La delección de los distintos subtipos de  $\alpha_2$ -adrenoceptores, siendo los primeros experimentos realizados a mediados de los años 90 [33] ha permitido estudiar las funciones selectivas de cada uno de ellos.

Lejos de lo que en principio pueda parecer, las funciones de estos receptores no son del todo redundantes. En el tejido cardíaco, por ejemplo, los receptores  $\alpha_{2A}$  y  $\alpha_{2C}$  operan a diferentes frecuencias de estimulación del nervio simpático [34]. En cuanto a sus efectos hemodinámicos, se ha observado que la delección genética de los adrenoceptores  $\alpha_{2A}$  lleva tanto al incremento de la presión arterial y frecuencia cardíaca, como a una predisposición al remodelado cardíaco e hipertrofia [35]. En la misma línea, la activación de los receptores  $\alpha_{2B}$  lleva a una respuesta hipertensiva secundaria, que contrarresta los efectos antihipertensivos de agonistas  $\alpha_2$  centrales

como la  $\alpha$ -metildopa o la clonidina [36].

La noradrenalina y adrenalina actúan a nivel de receptores  $\alpha_{2A}$  postinápticos, inhibiendo la secreción de insulina por las células  $\beta$  pancreáticas, así como la lipólisis en los adipocitos [37]. Por otro lado, los  $\alpha_{2A}$  constituye el principal inhibidor presináptico de la liberación de catecolaminas. En humanos, un polimorfismo del gen ADRA2A (rs553668), que codifica los receptores  $\alpha_{2A}$ , favorece la sobreexpresión de estos receptores, y asocia una presentación más temprana de diabetes tipo 2 y obesidad en varones [38]. De manera similar, durante el tratamiento con glucocorticoides, se induce la sobreexpresión de receptores  $\alpha_{2A}$  sobre las células  $\beta$  pancreáticas [39].

Desde el punto de vista metabólico, se ha observado que ratones con sobreexpresión del adrenoceptor  $\alpha_{2A}$  presentan niveles basales de glucosa e insulina normales, pero la tolerancia a la glucosa se muestra alterada. En estos casos, la aplicación del agonista  $\alpha_{2A}$  brimonidina tiene un pronunciado efecto hiperglucemiante e hipoinsulinizante [37]. Por el contrario, ratones KO (*knockout*) para el gen ADRA2A muestran niveles más elevados de insulina y datos de una mejor tolerancia a la glucosa [40]. Por tanto, es razonable observar que antagonistas de receptores  $\alpha_{2A}$  pueden aumentar los niveles de secreción de insulina. Todo esto demuestra que los adrenoceptores  $\alpha_{2A}$  juegan un papel crítico en la limitación de situaciones de hiperinsulinemia e hipoglucemia, como puede darse durante el tratamiento con sulfonilureas [41]. En definitiva, muchos de estos fármacos parecen disminuir los niveles de glucemia así como mejorar la tolerancia a la glucosa, tanto en experimentación animal como en humanos [42].

Existe una extensa bibliografía sobre las funciones del receptor  $\alpha_{2B}$  en el SNC [43], sin embargo, no han sido tan estudiadas sobre los tejidos periféricos. Este subtipo de receptor adrenérgico, es codificado por el gen ADRA2B, cuya región codificante carece de intrones [44]. Una variante polimórfica del adrenoceptor  $\alpha_{2B}$ , se ha relacionado con una disminución de su actividad proteína-quinasa acoplada a proteínas G y una reducción del metabolismo basal en humanos obesos, con un notable incremento del peso entre los sujetos no diabéticos [45].

# Capítulo 2

## Hipótesis y objetivos

La mayoría de los estudios centrados en el análisis funcional de los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos se han desarrollado sin ahondar en las funciones reguladoras sobre metabolismo energético llevadas a cabo por cada subtipo de receptor. La hipótesis del presente trabajo se centra en que la lipoinflamación perpetuada por macrófagos de fenotipo M1 (Ver Sección 1.2), puede favorecer el desarrollo de obesidad en los modelos animales, así como alteraciones descritas en el síndrome metabólico. Por tanto, sería esperable que una disrupción de la señalización de los receptores  $\alpha_{2B}$  favorezca la obesidad en ratones, por un aumento de la ratio M1/M2 el tejido adiposo.

A continuación, se exponen los objetivos del presente trabajo:

1. Caracterización del fenotipo de obesidad en ratones haploinsuficientes  $Adra2b^{+/-}$  mediante la determinación del peso, composición grasa corporal, homeostasis de la glucosa y cuantificación de la ingesta.
2. Determinar el papel de la haploinsuficiencia  $Adra2b^{+/-}$  en la proliferación, migración y supervivencia de los macrófagos infiltrados en tejido adiposo. **Aclaración:** *este segundo objetivo no se ha podido realizar debido a la irrupción de la pandemia por el virus SARS-CoV-2, causante de la enfermedad COVID-19, declarada en diciembre de 2019 y que ha establecido el confinamiento general en nuestro país desde el día 14 de marzo de 2020.*

# Capítulo 3

## Material y métodos

### 3.1. Animales

Los experimentos se han llevado a cabo con ratones macho transgénicos heterocigotos para el receptor adrenérgico  $\alpha_{2B}$  (Adra2b<sup>+/-</sup>), generados mediante la inserción de un codón de parada antes de la secuencia codificante para el quinto dominio transmembrana de ADRA2B. Los ratones fueron obtenidos de los laboratorios Charles River, que suministraron ratones Adra2b<sup>+/-</sup> con un fondo genético mixto entre C57BL/6J y 129S.

Todos los ratones han permanecido en el Estabulario de la Universidad de La Laguna manteniendo una temperatura controlada, con ciclos de luz-oscuridad de 12h, manteniendo el mismo número de animales por jaula y alimentación *ad libitum* con dieta estándar (Research Diets Inc). Todos los experimentos se han llevado a cabo con la aprobación del Comité Ético de la Universidad de la Laguna, siguiendo las guías ARRIVE y la European Communities Council Directive del 22 de septiembre 2010 (2010/63EU) en relación al cuidado y uso de los animales con fines de experimentación científica.

### 3.2. Medición de la composición corporal

La primera fase del estudio ha consistido en realizar una curva de monitorización del peso y la composición corporal durante 65 semanas en ratones macho salvajes (Wt) y ratones Adra2b<sup>+/-</sup>. Para ello, han sido pesados cada dos semanas, realizando mediciones de su composición corporal utilizando un densitómetro (Lunar PIXImus<sup>TM</sup>) a los 3 y 12 meses de edad. Para llevar a cabo el procedimiento, los animales han sido sedados con Ketamina+Xilacina

(a dosis de 80-120 mg/Kg + 5-16 mg/Kg, respectivamente) para conseguir la inmovilización del animal durante el procedimiento. Se ha tenido en cuenta que el anestésico puede cambiar el ritmo de alimentación en los días siguientes al mismo.

### **3.3. Control de la ingesta energética**

El control de la ingesta energética se ha realizado mediante el pesado del alimento cada dos días durante un mes. Este procedimiento se ha llevado a cabo a los 12 meses de edad. Los datos se expresan en gramos por animal y por día.

### **3.4. Homeostasis de la glucosa**

Tras someter a los animales al ayuno nocturno se ha procedido a la inyección intraperitoneal (i.p.) de glucosa (2 g/Kg) o insulina (0.75 U/Kg), respectivamente. Se ha ajustado la cantidad de glucosa e insulina administradas por masa magra, ya que se ha visto que la utilización del peso corporal total puede inducir un empeoramiento de la tolerancia a la glucosa en los modelos obesos [46]. Se ha utilizado un glucómetro y tiras reactivas (Roche™).

Los niveles de glucemia se han obtenido a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración i.p. de glucosa o insulina, respectivamente. La tolerancia a la glucosa e insulina se ha calculado como el área bajo la curva. Este procedimiento se ha llevado a cabo a los 12 meses de edad. Las pruebas de tolerancia metabólica son muy agotadoras para los ratones. Por ello se ha dejado una semana de separación entre ambas pruebas para ayudar su recuperación y reposición de las pérdidas de sangre [47].

### **3.5. Estudio de infiltración de macrófagos en grasa<sup>(2)</sup>**

Para estudiar si el tejido graso de ratones heterocigotos para  $\alpha_{2B}$  contienen un aumento de la infiltración de macrófagos, se sacrifican ratones de 3 meses con isoflurano al 5% y se

realiza una perfusión cardíaca para eliminar la sangre de los tejidos. Los depósitos adiposos perigonadal e inguinal se aíslan y pesan. En este caso, el peso se utiliza para normalizar los datos de citometría de flujo.

El tejido adiposo se lava para eliminar cualquier contaminante y se disecciona en trozos pequeños con tijeras estériles. Los depósitos de grasa se transfieren a un tubo de fondo redondo de 10 ml con 7 ml de tampón de digestión frío y se mantienen en hielo. Se añade colagenasa a la solución de digestión para alcanzar una concentración de 1 mg/ml y la reacción se incuba a 37°C durante 20-45 min con agitación vigorosa. Después de la digestión, se agrega EDTA a una concentración final de 10 mM y se incuba a 37°C durante 5-10 minutos adicionales. Las células de la capa inferior se colocan en un filtro de malla de nylon con un diámetro de poro de 100  $\mu$ m y se lavan dos veces suavemente añadiendo 10 ml de tampón FACS (PBS 1X + 5% de suero fetal bovino). Con cuidado, la suspensión celular se centrifuga a 500xg durante 10 minutos a 4°C, para separar los adipocitos y las células vasculares del estroma (SVC).

Después de la centrifugación, los adipocitos forman una capa blanca en la parte superior, mientras que los SVC forman un precipitado rojo/blanco en la parte inferior del tubo. Los adipocitos se aspiran y desechan, mientras que el sedimento se resuspende en 0,5 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos (RBC) y se incuba a temperatura ambiente con agitación ocasional. El RBC se neutraliza con 5 ml de solución FACS y se centrifuga a 500xg durante 10 minutos a 4°C. El pellet resuspendido se marca con un anticuerpo para CD68 y CD86 (Santa Cruz Biotechnology<sup>TM</sup>), marcadores de macrófago. Las células marcadas finalmente son lavadas y resuspendidas en PBS para su análisis por Citometría de flujo en un Accuri C6 (BD Biosciences). Los datos son analizados y normalizados por el peso de la grasa (macrófagos/gramo de grasa).

### **3.6. Análisis estadístico**

Los resultados son representados como la media  $\pm$  la desviación estándar (SD) de la media. Para la comparación de los dos grupos se ha utilizado la Prueba t de Student (Graphpad Prism, version 6, USA) considerando estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ .

# Capítulo 4

## Resultados

### 4.1. Valoración del fenotipo de obesidad

**Los ratones haploinsuficientes para el gen ADRA2B tienen una mayor ganancia de peso en el tiempo, independientemente de la composición de la dieta**

El peso de los ratones al inicio del estudio ha sido de  $19.9 \pm 2.4$  gramos para los ratones salvajes (Wt) y de  $23.3 \pm 2.2$  gramos para los ratones  $Adra2b^{+/-}$ . Ambos grupos han sido alimentados con una dieta estándar ad libitum. Se han encontrado diferencias significativas entre los dos grupos, apreciables a partir de la edad de 3 meses, alcanzando una media de peso de  $37.89 \pm 1.13$  gramos para el grupo de ratones  $Adra2b^{+/-}$ , frente a sus homólogos salvajes con un peso medio de  $28,7 \pm 0.8$  gramos ( $p < 0.001$ ). Estas diferencias se han mantenido a los 12 meses, con un peso medio de los ratones mutados de  $43.4 \pm 2.2$  gramos, frente a los  $35.4 \pm 1.6$  gramos del grupo control ( $p < 0.01$ ). Ver Ilustración 4.2a

Con objeto de esclarecer si el fondo genético podría influir en los resultados, se han realizado retrocruces al fondo genético 129S [48]. Datos preliminares, correspondientes al tercer retrocruce, muestran que a los 6 meses de edad los ratones haploinsuficientes  $Adra2b^{+/-}$  presentan diferencias en el peso con respecto a sus homólogos salvajes, tal y como se puede apreciar con un peso de  $34 \pm 0.5$  gramos para los ratones Wt frente a  $40.3 \pm 1.3$  gramos para los  $Adra2b^{+/-}$  ( $p < 0.0001$ ). Los datos obtenidos hasta el momento, establecen que el peso de estos ratones homocigotos  $Adra2b^{-/-}$  a la edad de 6 meses ( $35 \pm 3$  gramos) no difiere de los ratones salvajes 129S Wt ( $34 \pm 0.5$  gramos), con un valor de  $p > 0.05$ . Sin embargo, se requiere una “n” mayor para alcanzar resultados concluyentes. Ver Ilustración 4.2b

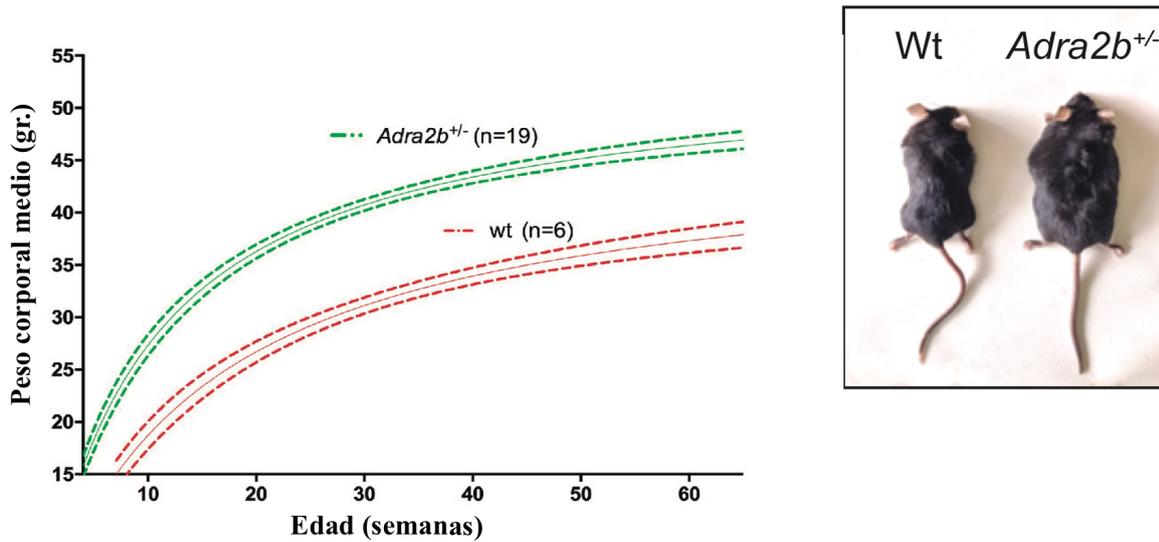
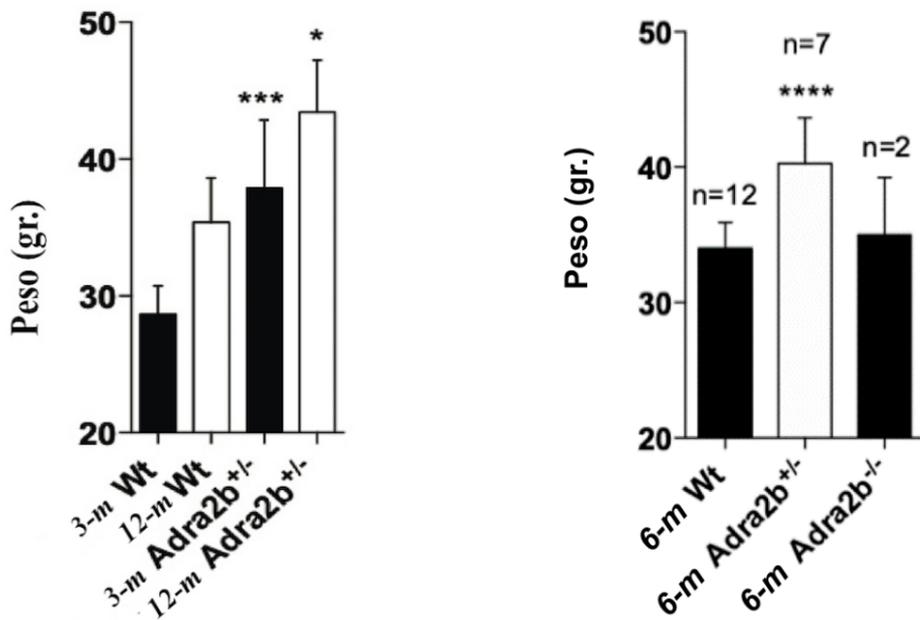


Ilustración 4.1: Ganancia ponderal. Comparación entre el grupo *Adra2b* y Wt. A la izquierda, la curva de crecimiento de ratones con genotipo *Adra2b*<sup>+/-</sup> y genotipo Wt. A la derecha, imagen representativa de los mismos a la edad de 3 meses



(a) Grupos *Adra2b*<sup>+/-</sup> y Wt con fondo genético C57BL/6J a los 3 y 12 meses.

(b) Grupos *Adra2b*<sup>+/-</sup>, *Adra2b*<sup>-/-</sup> y Wt con fondo genético 129S a los 6 meses.

Ilustración 4.2: Gráficas comparativas de peso. Fondos genéticos C57BL/6J y 129S

## La haploinsuficiencia para $Adra2b^{+/-}$ está asociada a un aumento de la grasa corporal

La ganancia de peso corporal en los ratones transgénicos para el receptor  $\alpha_{2B}$  adrenérgico se asocia con un aumento en el porcentaje de grasa. El estudio realizado mediante densitometría ha mostrado que los ratones haploinsuficientes para el receptor  $\alpha_{2B}$  adrenérgico tienen un 12% más de tejido graso que sus homólogos salvajes a los 3 meses de edad. Como puede observarse en la Ilustración 4.3, los ratones  $Adra2b^{+/-}$ , con un porcentaje de grasa corporal del  $30 \pm 0.5\%$  frente al  $18.1 \pm 0.6\%$  correspondiente a los ratones Wt, presentan una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ). A los 12 meses, estas diferencias se han mantenido, con un 10% más de porcentaje graso para los para  $Adra2b^{+/-}$ , con un resultado de  $41.1 \pm 0.8\%$  frente al  $30.8 \pm 1.7\%$  de los ratones Wt ( $p < 0.01$ ).

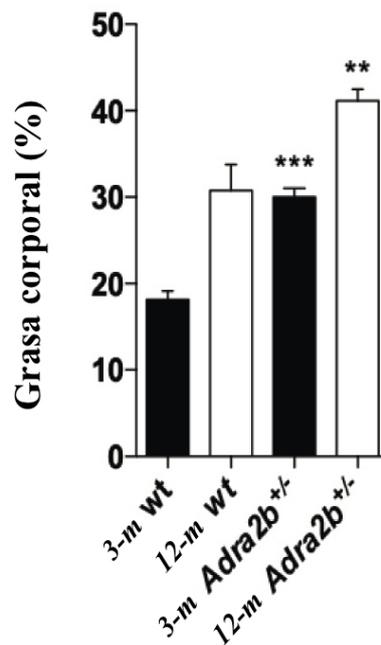


Ilustración 4.3: Porcentaje de grasa corporal. Comparación entre ratones  $Adra2b^{+/-}$  y Wt a los 3 y 12 meses de edad.

## La haploinsuficiencia para $Adra2b^{+/-}$ induce un aumento en la ingesta energética

Es ampliamente aceptado que la obesidad puede ser resultado de un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético, con un incremento energético positivo. Para dilucidar la causa de la obesidad asociada al genotipo  $Adra2b^{+/-}$ , y de esta manera caracterizar el fenotipo, se ha realizado un control diario de la ingesta energética (ver Ilustración 4.4). El grupo de ratones salvajes ha tenido una ingesta de  $2.372 \pm 0.05$  (gramos/animal/día), frente a los  $2.95 \pm 0.1$  (gramos/animal/día) de los ratones  $Adra2b^{+/-}$ . Esto sugiere que la haploinsuficiencia para el receptor  $\alpha_{2B}$  adrenérgico favorece un incremento de la ingesta energética del 124 % con respecto a sus homólogos salvajes ( $p < 0.001$ ), lo que podría explicar, al menos en parte, sus diferencias en la ganancia de peso.

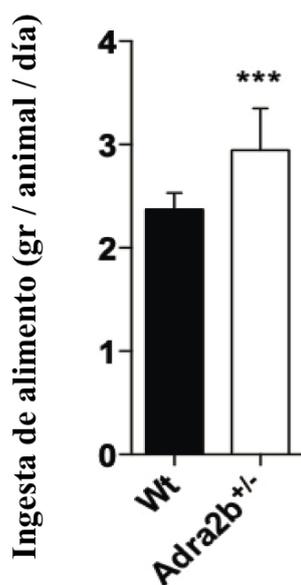


Ilustración 4.4: Ingesta expresada en gramos/animal/día. Comparación entre el grupo  $Adra2b^{+/-}$  y el control (Wt)

## Existe resistencia a la acción de la insulina en el grupo $Adra2b^{+/-}$ con respecto a los ratones del grupo control

Los resultados obtenidos mediante el Test de Tolerancia a la Glucosa (*Glucose Tolerance Test*) muestran un claro efecto meseta en la curva correspondiente a los ratones  $Adra2b^{+/-}$  con respecto al grupo control, lo que implica un área bajo la curva significativamente mayor (valores para  $Adra2b^{+/-}$  de 22.577 frente a 21.609 de los ratones Wt;  $p < 0.05$ ), por lo que la capacidad de manejo de la glucemia está alterada (Ver Ilustración 4.5a). En concordancia, se observa como los resultados del Test de Tolerancia Insulínica (Insulin Tolerance Test) sugieren una resistencia a la acción de la insulina en el grupo transgénico, debido a que presentan un valor del área bajo la curva significativamente mayor que en grupo control. ( $Adra2b^{+/-}$  11241 frente a Wt 6311;  $p < 0.01$ ). Ver Ilustración 4.5b.

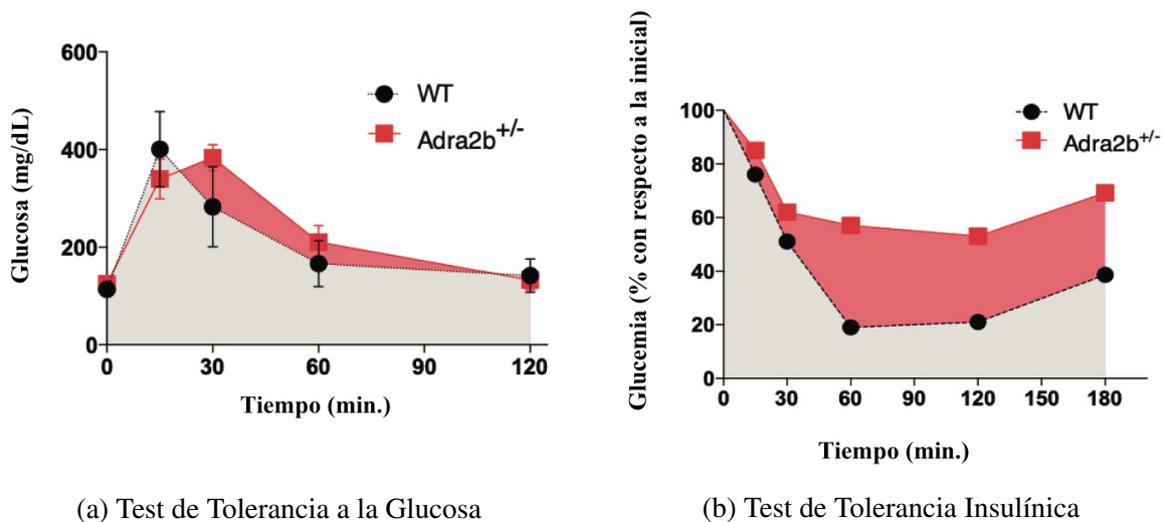


Ilustración 4.5: Tests de tolerancia metabólica. Comparación entre el grupo  $Adra2b^{+/-}$  (■) y WT (●) en ratones de 12 meses de edad

Estos datos indican que la haploinsuficiencia para  $Adra2b^{+/-}$  se asocia a una resistencia a la acción de la insulina. Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas en los niveles de glucemia basal (datos no mostrados). Una limitación del estudio es que los tests para evaluar la homeostasis de la glucosa se han realizado en ratones que ya presentaban sobrepeso. Se precisa de nuevos estudios en ratones más jóvenes, no obesos, para aclarar directamente el papel que tiene la haploinsuficiencia  $\alpha_{2B}$  en la homeostasis de la glucosa.

*NOTA.* Los valores de p de significación estadística \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.001$  del test de Wilcoxon (alternativa no paramétrica de la Prueba t de Student).

# Capítulo 5

## Discusión

El presente trabajo pretende caracterizar los efectos de la haploinsuficiencia *Adra2b*<sup>+/-</sup> en el manejo del peso. Para ello se ha realizado un seguimiento del peso y la composición corporal durante 65 semanas y monitorización de la ingesta energética, encontrando que la haploinsuficiencia del receptor  $\alpha_{2B}$  conduce a una condición de hiperfagia que podría explicar la obesidad. Finalmente, se ha realizado un estudio de la tolerancia a la glucosa e insulina, encontrando que estos ratones presentan resistencia a la acción de esta hormona.

Los ratones presentan un fondo genético mixto C57BL/6J y 129S. Debido a que las variaciones de este fondo pueden ocasionar notables diferencias en el balance energético [49], se han llevado a cabo retrocruces de los ratones *Adra2b*<sup>+/-</sup> con ratones de genotipo C57BL/6J o 129S. Hasta el momento de realizar los experimentos, se han producido seis retrocruzamientos con C57BL/6J y tres con 129S, de los 8-10 que se han establecido estadísticamente para alcanzar un fondo genético homogéneo en > 99 %, por lo que se supone de antemano una limitación de este estudio [48].

Se ha elegido el fondo genético C57BL/6J para realizar los primeros retrocruzamientos puesto que han sido ampliamente utilizados en modelos de obesidad con una dieta alta en grasa [50] y a lo largo de los años se ha convertido en el mejor modelo experimental de obesidad inducida por la dieta [51]. Estudios han encontrado que los C57BL/6J son más pesados y más obesos que los 129S a la edad de 6.8-12.6 meses, con diferencias más significativas entre machos de la misma cepa [52].

Este trabajo se ha desarrollado en ratones heterocigotos, principalmente porque se ha descrito que la delección completa de los receptores  $\alpha_{2B}$ , es decir, la homocigosis para este gen (*Adra2b*<sup>+/-</sup>) presenta una letalidad elevada [53]. Durante las primeras horas tras el nacimiento, los ratones desarrollan insuficiencia respiratoria y cianosis, que se ha correlacionado con anormalidades morfológicas pulmonares y de los septos interalveolares. Se ha observado

mediante el cruce de heterocigotos, que estos no siguen una ratio mendeliana, obteniéndose aproximadamente 3 ratones *Adra2b*<sup>-/-</sup> de cada 98 en el día P25. Sin embargo, la distribución de los genotipos no se desvía significativamente durante estadios embrionarios entre E10.5 y E18.5 [53].

Un dato destacable es que esta ratio no mendeliana se ha cumplido durante los retrocruces hacia el fondo genético C57BL/6J. Sin embargo, el retrocruce hacia 129S ha permitido conseguir una ratio de homocigotos bastante superior a la que previamente había sido descrita para C57BL/6J (3 de cada 98), obteniéndose 2 ratones homocigotos viables de 20 nacidos. Esto resalta la importancia de la interacción génica y los fenómenos de compensación que favorecen la supervivencia de los ratones, aunque más experimentos serán necesarios para confirmar este hallazgo.

Este estudio ha puesto de manifiesto que la búsqueda de las bases moleculares y fisiológicas, tanto de la diabetes como de la obesidad, constituyen una tarea difícil de llevar a cabo, debido en gran parte al origen multifactorial de estas enfermedades. En este caso, variaciones alélicas de genes puntuales (*ADRA2B*) pueden explicar un porcentaje muy pequeño de las diferencias observadas en los fenotipos de obesidad. Sin embargo, es complejo encontrar un único modelo que pueda prestarnos una explicación fisiopatológica, completa y única [51].

Otra limitación que destacar es el hecho de que no se ha llevado a cabo el estudio experimental utilizando modelos de ambos sexos, con objeto de identificar diferencias debidas a esta variable. Algo que sí han demostrado estudios previos, donde se ha observado que los ratones hembra C57BL/6J son menos susceptibles a desarrollar obesidad inducida por la dieta, y además lo hacen de una manera menos acentuada en el tiempo. Por ejemplo, un estudio con una gran muestra de ratones C57BL/6J, ha observado que las hembras (n=255) aumentan un 71 % su peso, frente a un incremento del 93 % en los machos (n=269), después de 35 semanas alimentados con una dieta alta en grasa [54].

Este trabajo ha encontrado que la haploinsuficiencia para el gen *ADRA2B* induce diferencias significativas en relación con el peso corporal de los ratones, que son independientes de la composición de la dieta, a las edades de 3 y 12 meses. Además, estos datos se han asociado con unas diferencias igualmente significativas en cuanto a la composición corporal, obtenida

mediante densitometría. Algunos polimorfismos en genes de receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos se han ligado a obesidad en diferentes poblaciones. Específicamente, un polimorfismo que lleva a la delección de 3 glutaminas en un elemento repetitivo de 12 glutaminas en el gen que codifica para ADRA2B se ha encontrado en obesos fineses [55]. El metabolismo basal de estos individuos se ha visto disminuido, lo que los autores han sugerido como factor de riesgo para desarrollar obesidad [55]. Otro estudio de seguimiento a 10 años en una población finaesa con peso normal encontró relación entre este mismo polimorfismo y una mayor ganancia de peso [56]. El mismo polimorfismo ha sido estudiado en una población china y ha sido asociado con hipertensión y riesgo incrementado de sufrir sobrepeso y obesidad [57, 58].

Los datos del presente trabajo, indican que los ratones *Adra2b<sup>+/-</sup>* muestran un incremento de la ingesta, expresado en gramos de dieta estándar. Futuros experimentos podrán aportar una nueva visión para investigar las causas de un mayor riesgo de obesidad asociado al polimorfismo en ADRA2B, que conduce a un incremento del riesgo de obesidad en humanos.

Los receptores adrenérgicos no solo se expresan a nivel periférico, sino que tienen funciones a nivel central. Aunque fuera del objetivo de este estudio, la inflamación crónica de bajo grado también tiene efectos a nivel hipotalámico, lo que puede afectar al control de estímulo de la saciedad [59]. La activación inflamatoria e infiltración de la microglía en el hipotálamo mediobasal puede reducir el metabolismo basal e incrementar la ingesta calórica y, finalmente la ganancia de peso. Investigadores han encontrado que la depleción de microglía con un inhibidor del receptor del factor estimulante de colonias 1 (CSF1R) previene la infiltración de células mieloides derivadas de la médula ósea, la hiperfagia y la ganancia de peso [59, 60].

En definitiva, un aumento de la ingesta calórica podría ser una de las razones por las que los ratones *Adra2b<sup>+/-</sup>* desarrollan obesidad. Sin embargo, serán necesarios futuros experimentos para correlacionar estos datos con la tasa metabólica basal. A pesar de esto, se ha conseguido evaluar alguna de las alteraciones descritas en el síndrome metabólico, como es la homeostasis de la glucosa, mediante tests de tolerancia metabólica. Los datos obtenidos muestran una clara predisposición a la resistencia insulínica entre los ratones *Adra2b<sup>+/-</sup>*.

Esto puede explicarse por la situación de lipoinflamación, que establece un desequilibrio con preponderancia de los macrófagos polarizados a M1, por la liberación de citoquinas proinflamatorias con efectos sistémicos, por acciones de hormonas como la leptina, que inducen resistencia a en el microambiente adiposo, potenciando a su vez la resistencia a la acción de la insulina a niveles sistémicos. En este sentido, debido a que los test metabólicos se han realizado en ratones que ya eran obesos, futuros estudios serán necesarios en ratones jóvenes para esclarecer si la resistencia insulínica es inducida por la haploinsuficiencia del gen ADRA2B o, por el contrario, se corresponde a un efecto derivado de la propia situación de sobrepeso.

# Capítulo 6

## Conclusiones

1. La haploinsuficiencia para *Adra2b* induce obesidad independientemente de la composición de la dieta, caracterizada por un aumento del peso y de su porcentaje de grasa corporal, en dos fondos genéticos diferentes.
2. El modelo de obesidad en ratones *Adra2b*<sup>+/-</sup> se asocia a un aumento de la ingesta calórica.
3. Los ratones heterocigotos para *Adra2b* presentan resistencia a la insulina en la edad adulta.

# Capítulo 7

## ¿Qué he aprendido durante este TFG?

La ciencia es paciencia, tesón, pasión y dedicación. He iniciado este proyecto junto a grandes compañeros, y desde un principio he gozado de una buena acogida, que me ha permitido desarrollar habilidades de trabajo en equipo. Gracias a este trabajo he descubierto que el avance científico precisa dar pasos en firme, asumiendo que la Medicina debe compaginar solidez e incertidumbre. Podría decirse que esa tenue luz que ilumina el sendero es la investigación.

Desde un punto de vista académico, he asumido que la búsqueda bibliográfica debe ser estructurada, seguida de unos criterios definidos y una lectura comprensiva. He aprendido a valorar que un mayor conocimiento permite una discriminación más ágil de la calidad de los contenidos. Por otro lado, los procedimientos de laboratorio han sido algo nuevo. Es más, como estudiante de Medicina aprecio enormemente haber centrado mi trabajo en las Ciencias Básicas, las cuales han despejado dudas; y afortunadamente han hecho aflorar otras, lo que sin duda tomo como un logro.

He ganado experiencia realizando procedimientos como *Western blot*, genotipado de ratones, el cuidado de los mismos y su manejo durante los experimentos. He sido introducido en protocolos aplicados a cultivos celulares de una línea de macrófagos. Además, he aprendido sobre el funcionamiento de un citómetro de flujo, que desgraciadamente ha dado problemas técnicos en los últimos meses, lo que unido a la crisis de la COVID-19 ha impedido desarrollar parte de los objetivos. A pesar de los contratiempos, espero que este camino no haya hecho más que comenzar.

# Bibliografía

- [1] Thaisa Lemos y Dympna Gallagher. «Current body composition measurement techniques.» eng. En: *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 24.5 (oct. de 2017), págs. 310-314. ISSN: 1752-2978 (Electronic). DOI: [10 . 1097 / MED . 0000000000000360](https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000360).
- [2] Kiran K Panuganti y Ravi K Kshirsagar. «Obesity». eng. En: enero de 2020.
- [3] Jonathan Q Purnell. *Definitions, Classification, and Epidemiology of Obesity*. 2000.
- [4] Marie Ng y col. «Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013.» eng. En: *Lancet (London, England)* 384.9945 (agosto de 2014), págs. 766-781. ISSN: 1474-547X (Electronic). DOI: [10 . 1016/S0140-6736\(14\)60460-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60460-8).
- [5] Craig M Hales y col. «Prevalence of Obesity Among Adults and Youth: United States, 2015-2016.» eng. En: *NCHS data brief* 288 (oct. de 2017), págs. 1-8. ISSN: 1941-4927 (Electronic).
- [6] Instituto Nacional de Estadística. *Encuesta Europea de Salud en España*. Inf. téc. 2017. URL: <https://www.ine.es/jaxi/Datos.htm?path=/t15/p419/a2017/p06/10/&file=01001.px#!tabs-tabla>.
- [7] Olga Espallardo y col. «The Impact of Severe Obesity on Healthcare Resource Utilisation in Spain.» eng. En: *Obesity surgery* 27.8 (agosto de 2017), págs. 2058-2066. ISSN: 1708-0428 (Electronic). DOI: [10.1007/s11695-017-2596-7](https://doi.org/10.1007/s11695-017-2596-7).
- [8] Álvaro Hernández y col. «Excess Weight in Spain: Current Situation, Projections for 2030, and Estimated Direct Extra Cost for the Spanish Health System». En: *Revista Espanola de Cardiologia* (2019). ISSN: 15792242. DOI: [10.1016/j.recesp.2018.07.009](https://doi.org/10.1016/j.recesp.2018.07.009).
- [9] Per Lindstrom. «The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice].» eng. En: *TheScientificWorldJournal* 7 (mayo de 2007), págs. 666-685. ISSN: 1537-744X (Electronic). DOI: [10.1100/tsw.2007.117](https://doi.org/10.1100/tsw.2007.117).

- [10] Emma McCracken, Monica Monaghan y Shiva Sreenivasan. «Pathophysiology of the metabolic syndrome.» eng. En: *Clinics in dermatology* 36.1 (enero de 2018), págs. 14-20. ISSN: 1879-1131 (Electronic). DOI: [10.1016/j.clindermatol.2017.09.004](https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2017.09.004).
- [11] Olatz Izaola y col. «[Inflammation and obesity (lipoinflammation)].» spa. En: *Nutricion hospitalaria* 31.6 (jun. de 2015), págs. 2352-2358. ISSN: 1699-5198 (Electronic). DOI: [10.3305/nh.2015.31.6.8829](https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.6.8829).
- [12] Naomi Hosogai y col. «Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation». En: *Diabetes* (2007). ISSN: 00121797. DOI: [10.2337/db06-0911](https://doi.org/10.2337/db06-0911).
- [13] Xiaoyuan Xu y col. «Obesity activates a program of lysosomal-dependent lipid metabolism in adipose tissue macrophages independently of classic activation.» eng. En: *Cell metabolism* 18.6 (diciembre de 2013), págs. 816-830. ISSN: 1932-7420 (Electronic). DOI: [10.1016/j.cmet.2013.11.001](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.001).
- [14] Gokhan S Hotamisligil y Ebru Erbay. «Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases.» eng. En: *Nature reviews. Immunology* 8.12 (diciembre de 2008), págs. 923-934. ISSN: 1474-1741 (Electronic). DOI: [10.1038/nri2449](https://doi.org/10.1038/nri2449).
- [15] Carey N Lumeng, Jennifer L Bodzin y Alan R Saltiel. «Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization.» eng. En: *The Journal of clinical investigation* 117.1 (enero de 2007), págs. 175-184. ISSN: 0021-9738 (Print). DOI: [10.1172/JCI29881](https://doi.org/10.1172/JCI29881).
- [16] Carey N Lumeng y col. «Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes.» eng. En: *Diabetes* 57.12 (diciembre de 2008), págs. 3239-3246. ISSN: 1939-327X (Electronic). DOI: [10.2337/db08-0872](https://doi.org/10.2337/db08-0872).
- [17] Gokhan S Hotamisligil. «Inflammation and metabolic disorders.» eng. En: *Nature* 444.7121 (diciembre de 2006), págs. 860-867. ISSN: 1476-4687 (Electronic). DOI: [10.1038/nature05485](https://doi.org/10.1038/nature05485).
- [18] Fatima Perez de Heredia, Sonia Gomez-Martinez y Ascension Marcos. «Obesity, inflammation and the immune system.» eng. En: *The Proceedings of the Nutrition Society* 71.2 (mayo de 2012), págs. 332-338. ISSN: 1475-2719 (Electronic). DOI: [10.1017/S0029665112000092](https://doi.org/10.1017/S0029665112000092).

- [19] Christina D Camell y col. «Inflammasome-driven catecholamine catabolism in macrophages blunts lipolysis during ageing.» eng. En: *Nature* 550.7674 (oct. de 2017), págs. 119-123. ISSN: 1476-4687 (Electronic). DOI: [10.1038/nature24022](https://doi.org/10.1038/nature24022).
- [20] Osamu Takeuchi y Shizuo Akira. «Pattern recognition receptors and inflammation.» eng. En: *Cell* 140.6 (mar. de 2010), págs. 805-820. ISSN: 1097-4172 (Electronic). DOI: [10.1016/j.cell.2010.01.022](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022).
- [21] Fabio Martinon, Kimberly Burns y Jurg Tschopp. «The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta.» eng. En: *Molecular cell* 10.2 (agosto de 2002), págs. 417-426. ISSN: 1097-2765 (Print). DOI: [10.1016/s1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00599-3).
- [22] Beth Levine, Noboru Mizushima y Herbert W Virgin. «Autophagy in immunity and inflammation.» eng. En: *Nature* 469.7330 (enero de 2011), págs. 323-335. ISSN: 1476-4687 (Electronic). DOI: [10.1038/nature09782](https://doi.org/10.1038/nature09782).
- [23] Peter J Murray. «Macrophage Polarization.» eng. En: *Annual review of physiology* 79 (feb. de 2017), págs. 541-566. ISSN: 1545-1585 (Electronic). DOI: [10.1146/annurev-physiol-022516-034339](https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034339).
- [24] Kun Liu y col. «Impaired macrophage autophagy increases the immune response in obese mice by promoting proinflammatory macrophage polarization.» eng. En: *Autophagy* 11.2 (2015), págs. 271-284. ISSN: 1554-8635 (Electronic). DOI: [10.1080/15548627.2015.1009787](https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1009787).
- [25] Eric M Wauson y col. «G protein-coupled receptors and the regulation of autophagy.» eng. En: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 25.5 (mayo de 2014), págs. 274-282. ISSN: 1879-3061 (Electronic). DOI: [10.1016/j.tem.2014.03.006](https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.03.006).
- [26] Christian C Dibble y Brendan D Manning. «Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output.» eng. En: *Nature cell biology* 15.6 (jun. de 2013), págs. 555-564. ISSN: 1476-4679 (Electronic). DOI: [10.1038/ncb2763](https://doi.org/10.1038/ncb2763).
- [27] Analyn Lizaso, Kien-Thiam Tan y Ying-Hue Lee. «beta-adrenergic receptor-stimulated lipolysis requires the RAB7-mediated autolysosomal lipid degradation.» eng. En: *Autophagy* 9.8 (agosto de 2013), págs. 1228-1243. ISSN: 1554-8635 (Electronic). DOI: [10.4161/auto.24893](https://doi.org/10.4161/auto.24893).

- [28] Javier Castro Hernández José Daniel Morales Fernández, Federico Díaz González. «Modulación de la autofagia mediada por receptores  $\alpha 2$  adrenérgicos en macrófagos». Tesis doct. Universidad de la Laguna, 2018, págs. 1-35.
- [29] D B Bylund y col. «International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors.» eng. En: *Pharmacological reviews* 46.2 (jun. de 1994), págs. 121-136. ISSN: 0031-6997 (Print).
- [30] A D Strosberg. «Structure, function, and regulation of adrenergic receptors.» eng. En: *Protein science : a publication of the Protein Society* 2.8 (agosto de 1993), págs. 1198-1209. ISSN: 0961-8368 (Print). DOI: [10.1002/pro.5560020802](https://doi.org/10.1002/pro.5560020802).
- [31] Alexander Yang y Emilio P Mottillo. «Adipocyte lipolysis: from molecular mechanisms of regulation to disease and therapeutics.» eng. En: *The Biochemical journal* 477.5 (mar. de 2020), págs. 985-1008. ISSN: 1470-8728 (Electronic). DOI: [10.1042/BCJ20190468](https://doi.org/10.1042/BCJ20190468).
- [32] Chris Gillissen y col. *Major receptors targeted by epinephrine and norepinephrine (Homo sapiens)*. URL: <https://www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP4589> (visitado).
- [33] Anne E Knaus y col. «Alpha2-adrenoceptor subtypes—unexpected functions for receptors and ligands derived from gene-targeted mouse models.» eng. En: *Neurochemistry international* 51.5 (oct. de 2007), págs. 277-281. ISSN: 0197-0186 (Print). DOI: [10.1016/j.neuint.2007.06.036](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.06.036).
- [34] J Scheibner y col. «Stimulation frequency-noradrenaline release relationships examined in alpha2A-, alpha2B- and alpha2C-adrenoceptor-deficient mice.» eng. En: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 364.4 (oct. de 2001), págs. 321-328. ISSN: 0028-1298 (Print). DOI: [10.1007/s002100100432](https://doi.org/10.1007/s002100100432).
- [35] Brede Marc y col. «Feedback Inhibition of Catecholamine Release by Two Different  $\alpha 2$ -Adrenoceptor Subtypes Prevents Progression of Heart Failure». En: *Circulation* 106.19 (nov. de 2002), págs. 2491-2496. DOI: [10.1161/01.CIR.0000036600.39600.66](https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000036600.39600.66). URL: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000036600.39600.66>.

- [36] R E Link y col. «Cardiovascular regulation in mice lacking alpha2-adrenergic receptor subtypes b and c.» eng. En: *Science (New York, N.Y.)* 273.5276 (agosto de 1996), págs. 803-805. ISSN: 0036-8075 (Print). DOI: [10.1126/science.273.5276.803](https://doi.org/10.1126/science.273.5276.803).
- [37] J C Devedjian y col. «Transgenic mice overexpressing alpha2A-adrenoceptors in pancreatic beta-cells show altered regulation of glucose homeostasis.» eng. En: *Diabetologia* 43.7 (jul. de 2000), págs. 899-906. ISSN: 0012-186X (Print). DOI: [10.1007/s001250051467](https://doi.org/10.1007/s001250051467).
- [38] Anders H Rosengren y col. «Overexpression of alpha2A-adrenergic receptors contributes to type 2 diabetes.» eng. En: *Science (New York, N.Y.)* 327.5962 (enero de 2010), págs. 217-220. ISSN: 1095-9203 (Electronic). DOI: [10.1126/science.1176827](https://doi.org/10.1126/science.1176827).
- [39] D Hamamdzic y col. «Regulation of alpha 2-adrenergic receptor expression and signaling in pancreatic beta-cells.» eng. En: *The American journal of physiology* 269.1 Pt 1 (jul. de 1995), E162-71. ISSN: 0002-9513 (Print). DOI: [10.1152/ajpendo.1995.269.1.E162](https://doi.org/10.1152/ajpendo.1995.269.1.E162).
- [40] Eriika Savontaus y col. «Reduced blood glucose levels, increased insulin levels and improved glucose tolerance in alpha2A-adrenoceptor knockout mice.» eng. En: *European journal of pharmacology* 578.2-3 (enero de 2008), págs. 359-364. ISSN: 0014-2999 (Print). DOI: [10.1016/j.ejphar.2007.09.015](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.09.015).
- [41] V Fagerholm, M Scheinin y M Haaparanta. «alpha2A-adrenoceptor antagonism increases insulin secretion and synergistically augments the insulintropic effect of glibenclamide in mice.» eng. En: *British journal of pharmacology* 154.6 (jul. de 2008), págs. 1287-1296. ISSN: 0007-1188 (Print). DOI: [10.1038/bjp.2008.186](https://doi.org/10.1038/bjp.2008.186).
- [42] Veronica Fagerholm, Merja Haaparanta y Mika Scheinin. «alpha2-adrenoceptor regulation of blood glucose homeostasis.» eng. En: *Basic and clinical pharmacology and toxicology* 108.6 (jun. de 2011), págs. 365-370. ISSN: 1742-7843 (Electronic). DOI: [10.1111/j.1742-7843.2011.00699.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00699.x).
- [43] Weizhen Xie y col. «ADRA2B deletion variant and enhanced cognitive processing of emotional information: A meta-analytical review.» eng. En: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 92 (sep. de 2018), págs. 402-416. ISSN: 1873-7528 (Electronic). DOI: [10.1016/j.neubiorev.2018.05.010](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.05.010).

- [44] R L Weinshank y col. «Cloning, expression, and pharmacological characterization of a human alpha 2B-adrenergic receptor.» eng. En: *Molecular pharmacology* 38.5 (nov. de 1990), págs. 681-688. ISSN: 0026-895X (Print).
- [45] N Siitonen y col. «Association between a deletion/insertion polymorphism in the alpha2B-adrenergic receptor gene and insulin secretion and Type 2 diabetes. The Finnish Diabetes Prevention Study.» eng. En: *Diabetologia* 47.8 (agosto de 2004), págs. 1416-1424. ISSN: 0012-186X (Print). DOI: [10.1007/s00125-004-1462-z](https://doi.org/10.1007/s00125-004-1462-z).
- [46] Mikkel S Jorgensen, Kristina S Tornqvist y Henning Hvid. «Calculation of Glucose Dose for Intraperitoneal Glucose Tolerance Tests in Lean and Obese Mice.» eng. En: *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 56.1 (enero de 2017), págs. 95-97. ISSN: 1559-6109 (Print).
- [47] Csorsz Nagy y Elisa Einwallner. «Study of In Vivo Glucose Metabolism in High-fat Diet-fed Mice Using Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) and Insulin Tolerance Test (ITT).» eng. En: *Journal of visualized experiments : JoVE* 131 (enero de 2018). ISSN: 1940-087X (Electronic). DOI: [10.3791/56672](https://doi.org/10.3791/56672).
- [48] Karla E Vogel. «Backcross breeding.» eng. En: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 526 (2009), págs. 161-169. ISSN: 1064-3745 (Print). DOI: [10.1007/978-1-59745-494-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0_14).
- [49] Matthias H Tschop y col. «A guide to analysis of mouse energy metabolism.» eng. En: *Nature methods* 9.1 (diciembre de 2011), págs. 57-63. ISSN: 1548-7105 (Electronic). DOI: [10.1038/nmeth.1806](https://doi.org/10.1038/nmeth.1806).
- [50] R S Surwit y col. «Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice.» eng. En: *Diabetes* 37.9 (sep. de 1988), págs. 1163-1167. ISSN: 0012-1797 (Print). DOI: [10.2337/diab.37.9.1163](https://doi.org/10.2337/diab.37.9.1163).
- [51] Dinh-Toi Chu y col. «C57BL/6J mice as a polygenic developmental model of diet-induced obesity.» eng. En: *Physiological reports* 5.7 (abril de 2017). ISSN: 2051-817X (Electronic). DOI: [10.14814/phy2.13093](https://doi.org/10.14814/phy2.13093).
- [52] Danielle R Reed y col. «Loci on chromosomes 2, 4, 9, and 16 for body weight, body length, and adiposity identified in a genome scan of an F2 intercross between the 129P3/J and C57BL/6ByJ mouse strains.» eng. En: *Mammalian genome : official journal of the*

- International Mammalian Genome Society* 14.5 (mayo de 2003), págs. 302-313. ISSN: 0938-8990 (Print). DOI: [10.1007/s00335-002-2170-y](https://doi.org/10.1007/s00335-002-2170-y).
- [53] Miriam Haubold, Ralf Gilsbach y Lutz Hein. «Alpha2B-adrenoceptor deficiency leads to postnatal respiratory failure in mice.» eng. En: *The Journal of biological chemistry* 285.44 (oct. de 2010), págs. 34213-34219. ISSN: 1083-351X (Electronic). DOI: [10.1074/jbc.M110.129205](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.129205).
- [54] Yongbin Yang y col. «Variations in body weight, food intake and body composition after long-term high-fat diet feeding in C57BL/6J mice.» eng. En: *Obesity (Silver Spring, Md.)* 22.10 (oct. de 2014), págs. 2147-2155. ISSN: 1930-739X (Electronic). DOI: [10.1002/oby.20811](https://doi.org/10.1002/oby.20811).
- [55] P Heinonen y col. «Identification of a three-amino acid deletion in the alpha2B-adrenergic receptor that is associated with reduced basal metabolic rate in obese subjects.» eng. En: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84.7 (jul. de 1999), págs. 2429-2433. ISSN: 0021-972X (Print). DOI: [10.1210/jcem.84.7.5818](https://doi.org/10.1210/jcem.84.7.5818).
- [56] K Sivenius y col. «Effect of a three-amino acid deletion in the alpha2B-adrenergic receptor gene on long-term body weight change in Finnish non-diabetic and type 2 diabetic subjects.» eng. En: *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 25.11 (nov. de 2001), págs. 1609-1614. DOI: [10.1038/sj.ijo.0801798](https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801798).
- [57] Li-Hua Li y col. «Anthropometric and metabolic phenotypes in relation to the ADRA2B deletion/insertion polymorphism in Chinese population.» eng. En: *Journal of hypertension* 26.11 (nov. de 2008), págs. 2161-2167. ISSN: 0263-6352 (Print). DOI: [10.1097/HJH.0b013e32831103ec](https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32831103ec).
- [58] Hai-feng Zhang y col. «ADRA2B gene insertion/deletion polymorphism and artery compliance.» eng. En: *Chinese medical journal* 118.21 (nov. de 2005), págs. 1797-1802. ISSN: 0366-6999 (Print).
- [59] Alexander Jais y Jens C Bruning. «Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease.» eng. En: *The Journal of clinical investigation* 127.1 (enero de 2017), págs. 24-32. ISSN: 1558-8238 (Electronic). DOI: [10.1172/JCI88878](https://doi.org/10.1172/JCI88878).

- [60] Martin Valdearcos y col. «Microglia dictate the impact of saturated fat consumption on hypothalamic inflammation and neuronal function.» eng. En: *Cell reports* 9.6 (diciembre de 2014), págs. 2124-2138. ISSN: 2211-1247 (Electronic). DOI: [10.1016/j.celrep.2014.11.018](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.018).

# Índice de figuras

1.1	Vía de señalización intracelular de los distintos tipos de receptores adrenergicos estimulados por adrenalina y noradrenalina. Tomado de Wikipathways [32] . . .	12
4.1	Ganancia ponderal. Comparacion entre el grupo Adra2b y Wt. A la izquierda, la curva de crecimiento de ratones con genotipo Adra2b <sup>+/-</sup> y genotipo Wt. A la derecha, imagen representativa de los mismos a la edad de 3 meses . . . . .	19
4.2	Gráficas comparativas de peso. Fondos genéticos C57BL/6J y 129S . . . . .	19
4.3	Porcentaje de grasa corporal. Comparación entre ratones Adra2b <sup>+/-</sup> y Wt a los 3 y 12 meses de edad. . . . .	20
4.4	Ingesta expresada en gramos/animal/día. Comparación entre el grupo Adra2b <sup>+/-</sup> y el control (Wt) . . . . .	21
4.5	Tests de tolerancia metabólica. Comparación entre el grupo Adra2b <sup>+/-</sup> (■) y WT (●) en ratones de 12 meses de edad . . . . .	22
7.1	Esquema del proceso de retrocruzamiento genético para un alelo recesivo. Tomado de [48] . . . . .	39

# Anexo

A continuación se muestra un esquema del proceso de retrocruzamiento. El objetivo último del mismo es tomar un alelo recesivo de una cepa donante (Donor) con fondo genético no deseado, e incluirlo en otra cepa receptora (RP) con fondo genético deseado.

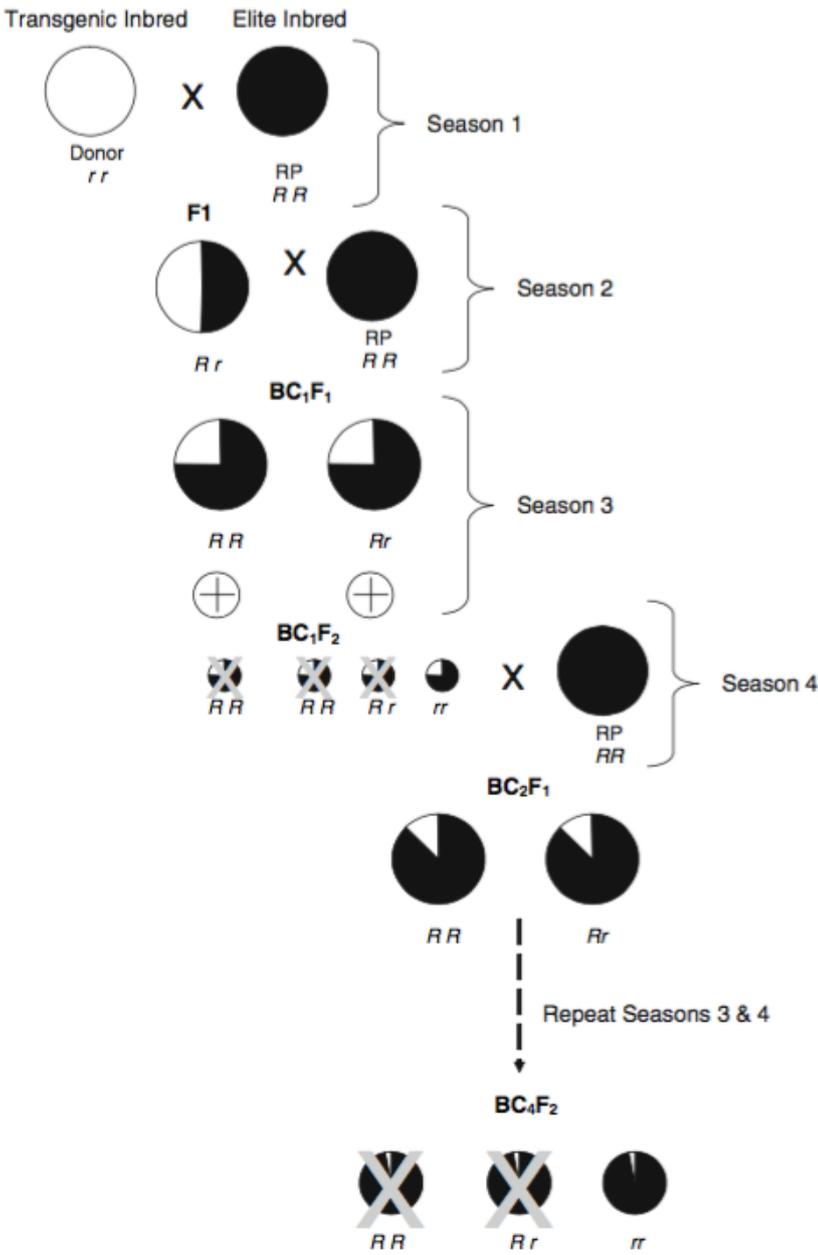


Ilustración 7.1: Esquema del proceso de retrocruzamiento genético para un alelo recesivo. Tomado de [48]