

WNT5A, SFRP5 Y CRT3: NUEVAS ADIPOCINAS RELACIONADAS CON LA OBESIDAD EN LA EDAD PEDIÁTRICA

Pilar Soriano Rodríguez

Per citar o enllaçar aquest document:
Para citar o enlazar este documento:
Use this url to cite or link to this publication:
<http://hdl.handle.net/10803/666754>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESIS DOCTORAL

WNT5A, SFRP5 Y CRT3: NUEVAS ADIPOCINAS
RELACIONADAS CON LA OBESIDAD EN LA EDAD
PEDIÁTRICA

Pilar Soriano Rodríguez

2015



TESIS DOCTORAL

WNT5A, SFRP5 Y CRT3: NUEVAS ADIPOCINAS
RELACIONADAS CON LA OBESIDAD EN LA EDAD
PEDIÁTRICA

Pilar Soriano Rodríguez

2015

Ciències experimentals i sostenibilitat

Dirigida per:

Dr. Abel López Bermejo

Dra. Anna Prats Puig

Investigador I3
Institut d'Investigació Biomèdica de Girona
Metge adjunt de Pediatria
Servei de Pediatria, Hospital de Girona
Professor Associat de Medicina
Universitat de Girona

Investigadora postdoctoral
Institut d'Investigació Biomèdica de Girona
Escola Universitària de la Salut i l'Esport (EUSES)

Memòria presentada per a optar al títol de doctora per la Universitat de Girona

Gràcies per la vostra paciència i el vostre amor,
vosaltres em doneu la força per seguir endavant.

Manel, Francesc i Alexander.

Agraïments

Aquesta tesi es fruit de l'esforç de moltes persones generoses que m'han donat el suport necessari per arribar fins al final.

No és fàcil que et donin la oportunitat d'iniciar-te en el món de la investigació quan arribes a una certa edat. El Dr. Abel López-Bermejo, va creure en mi, em va oferir la seva ajuda, els seus consells i em va obrir una nova porta que ja creia tancada. Ell em va ensenyar amb humilitat i saviesa a caminar pel món de la investigació i a perseverar quan arribava el desànim.

L'altre persona crucial en el meu inici com investigadora ha estat la Dra. Anna Prats Puig, ella ha sigut el meu àngel de la guarda. Ha estat la meva mestra pacient però alhora exigent, demostrant que la seva intel·ligència va més enllà dels seus amplis coneixements científics, malgrat la seva joventut és una persona amb lideratge, capaç de transmetre la seguretat necessària per dirigir un treball tan intens i de llarg recorregut com és una tesi doctoral.

No vull deixar de recordar a la Dra. Judit Bassols, directora de la meva tesina, els seus consells i la seva ajuda incondicional sempre han estat presents. La Gemma Carreras companya de fatigues que està acabant la seva pròpia tesi.

La Dra Inés Osiniri, quantes vegades ens em animat l'una a l'altre.

Els companys del laboratori de l'Hospital de Figueres amb la Dra. Mora al capdavant. Els pediatres de les àrees bàsiques de l'Alt Empordà. La Silvia Espuña que ha realitzat bona part de la recollida de mostres. Agrair al servei de cirurgia de l'Hospital Dr. Josep Trueta de Girona i en especial a la Dra. Montserrat Ros Miquel per a la seva col·laboració en la obtenció de les biòpsies de teixit adipós dels nens.

Per últim agrair als pares i nens que han participat desinteressadament com a voluntaris en aquest estudi.

Sense la col·laboració de tots ells no s'hauria pogut fer aquesta tesi, gràcies de tot cor.

Listado de abreviaciones

AC	Adenilato ciclasa
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
AMPK	Proteína Cinasa activada por AMP
Adiponectina de APM	Adiponectina de alto peso molecular
BAT	Grasa parda
CBP	Proteína enlazante de CREB
CRTC3/ TORC3	Coactivador de la transcripción regulado por CREB
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc
Dsv	Proteína Disheveled.
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
GGT	Gamma-glutamyl transferasa
GIM	Grosor de la íntima-media carotídea
GOT	Aspartato aminotransferasa
GPT	Alanina aminotransferasa
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HMGB1	Proteína del Grupo de Alta Movilidad Box1
HOMA-IR	Homeostatic model assesment de resistencia a la insulina
HSL	Lipasa sensible a hormonas
HSP70	Proteínas de shock térmico de 70 KDa
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL-6	Interleucina 6
ICC	Índice cintura-cadera

IMC	Índice de masa corporal
IRS-1	Receptor de la insulina 1
JNK-1	Quinasa C-Jun N-terminal 1
LSD	Lithium Dodecyl Sulfate
MARK2	Microtubule affinity-regulating kinase 2
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MG	Masa grasa
MLG	Masa libre de grasa
NIH	National Institute of Health de los EEUU
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAI1	Inhibidor del activador del plasminógeno 1
PC	Perímetro de cintura
PCRus	Proteína C reactiva ultra sensible
PGC1 α	Peroxisome proliferator- activated receptor-gamma coactivator1 alfa.
PGE2	Prostaglandina E2
PKA	Proteína quinasa A
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RBP4	Proteína transportadora de retinol tipo 4
RGS2	Regulador de la señal de la proteína G 2
SFRP5	Proteína secretada similar a frizzle número 5
SIK2	Cinasa sal inducible 2
SNP	Polimorfismos de un solo nucleótido
TAD	Tensión arterial diastólica

TAS	Tensión arterial sistólica
TG	Triglicéridos
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
WAT	Grasa blanca
WNT5A	Wingless type MMTV integration site family member 5 class A

Índice de figuras

Figura 1| Clasificación de la obesidad en adultos según el IMC

Figura 2| Mapa universal de la distribución de la obesidad según la OMS.

Figura 3| Clasificación del IMC en niños según el percentil y el valor Z

Figura 4| Estructura del tejido adiposo

Figura 5| Regulación hormonal de la lipólisis

Figura 6| Citocinas secretadas por el adipocito: Proinflamatorias y antiinflamatorias

Figura 7| Inflamación y obesidad: Esquema de los cambios estructurales del tejido adiposo y su relación con las alteraciones metabólicas.

Figura 8| Factores locales que regulan la adipogénesis

Figura 9| Genotipo ahorrador

Figura 10| Vías de señalización Wnt: A) Vía canónica. B) Vía no canónica polaridad celular planar (PCP). C) Vía no canónica Wnt- Ca^{+2} .

Figura 11| Estructura SFRP: CRD dominio rico en cisteína homólogo de las proteínas frizzled, receptor de Wnts.

Figura 12| Modelo de la inhibición de la señal Wnt5A

Figura 13| Funciones metabólicas de los diferentes CRTCs dependiendo del tejido en que se expresen.

Figura 14| Estructura CRTC

Figura 15| Activación y Translocación de CRTC

Figura 16| Feedback negativo de CRTC3 sobre la señal de AMPc.

Figura 17| CRTC3 inhibe la vía de catecolaminas

Figura 18| Western Blot CRTC3

Figura 19| Identificación de CRTC3 por la técnica de Enzimoimmunoensayo (Elisa)

Figura 20| Concentración de las proteínas SFRP5, WNT5A y CRTC3 medidas en el medio condicionado de tejido adiposo visceral y subcutáneo.

Figura 21| Odds ratio de obesidad según la concentración de SFRP5

Figura 22| Barras de error no ajustadas y ajustadas por edad, sexo e IMC, de las variables que mostraron diferencias significativas entre cuartiles de la concentración de SFRP5, Los p valores corresponden a modelos lineales generales.

Figura 23| Diagrama de dispersión entre log de WNT5A y log de SFRP5 en suero

Figura 24| Diagrama de dispersión entre log de WNT5A y log de SFRP5: A) en medio condicionado de tejido adiposo visceral; B) en medio condicionado de tejido adiposo subcutáneo.

Figura 25| Gráfico de barras de error de los cambios en el valor Z del IMC, la adiponectina de APM y el colesterol HDL respecto a la concentración de CRT3 basal en tertiles.

Figura 26| Modelo propuesto de asociación entre la proteína CRT3 con el tejido adiposo visceral y la adiponectina en función del IMC de niños sanos.

Figura 27| Modelo propuesto de asociación entre las proteínas WNT5A y SFRP5 en función del IMC de los niños y comparación con los adultos con patología.

Figura 28| Modelo propuesto de asociación entre las proteínas WNT5A, SFRP5 y CRT3 en relación a la inflamación del tejido adiposo y el fenotipo metabólico en niños delgados y obesos.

Índice de tablas

Tabla 1| Medias y rango de concentración en sangre de las proteínas WNT5A, SFRP y CRT3.

Tabla 2| Características antropométricas y metabólicas de los niños estudiados en el estudio inicial y en el seguimiento a los 3 años.

Tabla 3| Variables antropométricas y metabólicas de los sujetos estudiados según tertiles de WNT5A en suero.

Tabla 4| Coeficiente de correlación de Pearson entre WNT5A y las variables antropométricas y metabólicas.

Tabla 5| Análisis de regresión Multivariado con el HOMA-IR y GPT como variables dependientes.

Tabla 6| Cambio en las variables antropométricas y metabólicas de los sujetos estudiados en el estudio longitudinal según tertiles de WNT5A basales en suero.

Tabla 7| Variables antropométricas y metabólicas de los sujetos estudiados según los cuartiles de SFRP5.

Tabla 8| Análisis de regresión multivariante con SFRP5 en suero como variable dependiente. SFRP5.

Tabla 9| Cambios en los valores de las variables antropométricas y metabólicas en el estudio de seguimiento según los tertiles SFRP5 basal

Tabla 10| Coeficientes de correlación de Pearson entre WNT5A y variables antropométricas y metabólicas, en función de la mediana de la concentración de SFRP5.

Tabla 11| Análisis de regresión multivariante con el HOMA-IR y la GPT como variable dependiente en los niños con $SFRP5 \leq 4.81$ ng/mL.

Tabla 12| Coeficientes de correlación de Pearson entre WNT5A y el incremento a los 3 años de variables antropométricas y metabólicas, en función de la mediana de la concentración de SFRP5 basal.

Tabla 13| Variables antropométricas y metabólicas de los sujetos estudiados según los tertiles de CRT3.

Tabla 14| Coeficientes de correlación de Pearson de CRT3 y variables antropométricas y metabólicas. En todos los sujetos y estratificados en función del valor Z del IMC.

Tabla 15| Análisis de regresión lineal multivariante con el Valor Z del IMC basal como variable dependiente. Subgrupos de acuerdo al IMC-z score.

Tabla 16| Análisis de regresión lineal multivariante con CRT3 como variable dependiente en la muestra completa de niños y en los subgrupos en función del IMC.

Tabla 17| Cambios en los valores de las variables antropométricas y metabólicas en el estudio de seguimiento estratificados según los tertiles de concentración de CRT3 basales.

Tabla 18| Modelos de regresión lineal del estudio longitudinal en que las variables dependientes son el cambio en el valor Z del IMC y el cambio en la adiponectina de APM (n=115).

Índice

Listado de abreviaciones.....	ii
Índice de Figuras	vi
Índice de Tablas	viii
RESUM	1
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN	7
1.1 OBESIDAD	9
1.1 DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA	9
1.2 OBESIDAD INFANTIL.....	11
1.3 PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA OBESIDAD	13
1.3.1 RESISTENCIA A LA INSULINA Y DIABETES TIPO 2	13
1.3.2 ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR	14
1.3.3 DISLIPEMIA.....	15
1.4 TEJIDO ADIPOSO	15
1.4.1 ESTRUCTURA.....	15
1.4.2 TEJIDO ADIPOSO REGULADOR DE ENERGÍA.....	17
1.4.3 TEJIDO ADIPOSO ÓRGANO ENDOCRINO	19
1.4.3.1 LEPTINA.....	20
1.4.3.2 ADIPONECTINA.....	21
1.4.4 FISIOPATOLOGÍA DEL TEJIDO ADIPOSO	22
1.4.4.1 TEORÍA DE LA EXPANSIBILIDAD DEL TEJIDO ADIPOSO	25
1.4.4.2 TEORÍA DEL GENOTIPO AHORRADOR	27
1.5 NUEVAS PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA OBESIDAD	28
1.5.1 WNT5A.....	28
1.5.1.1 ESTRUCTURA.....	29
1.5.1.2 MECANISMOS DE ACCIÓN.....	29
1.5.1.3 REGULACIÓN.....	31
1.5.1.4 WNT5A Y TEJIDO ADIPOSO	31
1.5.2 SFRP5.....	32
1.5.2.1 ESTRUCTURA.....	33
1.5.2.2 MECANISMOS DE ACCIÓN.....	33
1.5.2.3 REGULACIÓN.....	35
1.5.2.4 SFRP5 Y TEJIDO ADIPOSO.....	36
1.5.3 CRT3	38
1.5.3.1 ESTRUCTURA.....	39
1.5.3.2 MECANISMOS DE ACCIÓN.....	39
1.5.3.3 REGULACIÓN.....	41
1.5.3.4 CRT3 Y TEJIDO ADIPOSO	43
HIPÓTESIS	45
OBJETIVOS	49
MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
4.1 DISEÑO	55
4.2 CONSIDERACIONES ÉTICAS	55
4.3 SUJETOS A ESTUDIO	55

4.4	CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN	56
4.5	VARIABLES.....	57
4.5.1.	VARIABLES CLÍNICAS.....	57
4.5.2.	VARIABLES ANALÍTICAS	58
4.5.2.1.	ELABORACIÓN DE UNA SEROTECA Y UNA PLASMOTECA.....	59
4.5.2.2.	DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS Y HORMONALES.....	59
4.5.2.3.	DETERMINACIÓN GROSOR DE LA ÍNTIMA MEDIA CAROTIDEA.....	60
4.5.3	VARIABLES ESPECÍFICAS	61
4.5.3.1	WNT5A.....	61
4.5.3.2	SFRP5	62
4.5.3.3	CRTC3.....	64
4.6	BIOPSIAS DE TEJIDO ADIPOSO	65
4.6.1	CULTIVO CELULAR	66
4.6.2	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	66
4.6.3	VIABILIDAD DE LAS BIOPSIAS DE TEJIDO ADIPOSO.....	67
4.7	ANÁLISIS WESTERN BLOT.....	67
4.8	RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS.....	68
	RESULTADOS.....	70
5.1	ESTUDIO DE SECRECIÓN PROTEICA EN BIOPSIAS DE TEJIDO ADIPOSO.....	73
5.1.1	IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEINA CRTC3	73
5.1.1.1	WESTERN BLOT DE CRTC3.....	73
5.1.1.2	ELISA DE CRTC3	74
5.1.2	MEDICIÓN DE LA SECRECIÓN DE WNT5A, SFRP5 Y CRTC3 EN TEJIDO ADIPOSO.....	75
5.1.2	MEDICIÓN DE LA SECRECIÓN DE WNT5A, SFRP5 Y CRTC3 EN SUERO	76
5.2	COHORTE DE ESTUDIO	77
5.3	WNT5A ASOCIACIÓN CON LAS VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y METABÓLICAS	79
5.3.1	ESTUDIO TRANSVERSAL	79
5.3.2	ESTUDIO LONGITUDINAL	83
5.4	SFRP5 ASOCIACIÓN CON LAS VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y METABÓLICAS	85
5.4.1	ESTUDIO TRANSVERSAL	85
5.4.2	ESTUDIO LONGITUDINAL	91
5.5	EJE WNT5A-SFRP5	93
5.5.1	EJE WNT5A-SFRP5: ASOCIACIÓN CON VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y METABÓLICAS	95
5.5.2	EJE WNT5A-SFRP5: ASOCIACIÓN CON VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y METABÓLICAS. ESTUDIO LONGITUDINAL	97
5.6	CRTC3: ASOCIACIÓN CON VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y METABÓLICAS.....	99
5.6.1	ESTUDIO TRANSVERSAL	99
5.6.2	ESTUDIO LONGITUDINAL	104
	DISCUSIÓN	109
6.1	SECRECIÓN DE LAS PROTEÍNAS WNT5A, SFRP5 Y CRTC3 POR EL TEJIDO ADIPOSO VISCERAL Y SUBCUTÁNEO	111
6.2	WNT5A, SFRP5 Y CRTC3 EN SANGRE: MARCADORES DE OBESIDAD Y RESISTENCIA A LA INSULINA	114
6.2.1	WNT5A CIRCULANTE: RELACIÓN CON OBESIDAD Y VARIABLES METABÓLICAS	114
6.2.2	SFRP5 CIRCULANTE: RELACIÓN CON OBESIDAD Y VARIABLES METABÓLICAS.....	117
6.2.3	CRTC3 CIRCULANTE: RELACIÓN CON OBESIDAD Y VARIABLES METABÓLICAS	119
6.3	EJE WNT5A-SFRP5	124

6.5 DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS.....	126
CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFÍA	133

Resum

La WNT5A és una proteïna proinflamatòria relacionada recentment amb la resistència a la insulina. Es creu que la proteïna SFRP5 podria exercir les seves propietats antiinflamatòries tot segrestant la WNT5A i evitant l'aparició de la resistència a la insulina. Recentment s'ha descrit que les dues proteïnes poden ser secretades pel teixit adipós en adults. Per altra banda, la proteïna CRT3 és expressada en el teixit adipós on juga un paper important en el metabolisme energètic. Recentment, s'ha descrit que el gen de la proteïna CRT3 està relacionat amb el desenvolupament de l'obesitat metabòlicament complicada.

Es coneix que el teixit adipós juga un paper important en la regulació de l'homeòstasi energètica de l'organisme mitjançant la secreció de determinades molècules a la sang. En aquest treball s'estudiarà la secreció de WNT5A, SFRP5 i CRT3 per part del teixit adipós i la seva relació amb l'obesitat i marcadors de risc cardiovascular en l'edat pediàtrica.

Amb aquesta finalitat, s'ha dissenyat un estudi transversal amb una mostra de nens sans de 7 anys d'edat (n = 211; 103 nens i 108 nenes), no seleccionats, provinents de la població general i reclutats en centres d'atenció primària. I també s'ha dissenyat un estudi longitudinal amb 130 nens (63 nens i 67 nenes), estudiats al cap de 3 anys de la seva inclusió inicial a l'estudi. A tots ells se'ls va realitzar un examen clínic i antropomètric. Es va obtenir una mostra de sang que es va utilitzar per realitzar una analítica general i quantificar els marcadors a estudiar, que inclouen: WNT5A, SFRP5 i CRT3. Addicionalment, es van obtenir biòpsies de teixit adipós visceral de 12 nens (10 nens i 2 nenes) sotmesos a una intervenció quirúrgica programada per causes externes

a l'estudi. Aquest teixit adipós es va utilitzar en estudis *ex vivo* per estudiar la secreció de les proteïnes WNT5A, SFRP5 i CRT3.

Els resultats obtinguts demostren que les proteïnes WNT5A, SFRP5 i CRT3 són secretades pel teixit adipós i, en major quantitat, pel teixit adipós visceral en nens prepuberals sans. A més a més, concentracions baixes de SFRP5 i elevades de WNT5A i CRT3 es relacionen amb un fenotip dismetabòlic, consistent en una relativa disminució de l'adiponectina en sang, augment de la resistència a la insulina i augment de l'índex de massa corporal.

L'estudi de l'eix WNT5A-SFRP5 ha demostrat que les dues proteïnes es relacionen positivament tant en el medi condicionat de les biòpsies de teixit adipós com en el sèrum dels nens sans. A més a més, els nostres resultats demostren que les concentracions baixes de SFRP5 en sang potencien la relació entre WNT5A i l'augment de la resistència a la insulina i de paràmetres de funció hepàtica.

Aquests resultats aporten evidències de l'important paper del teixit adipós en la secreció de les proteïnes WNT5A, SFRP5 i CRT3 i la seva relació amb marcadors coneguts de risc metabòlic -i el desenvolupament del fenotip dismetabòlic en etapes primerenques de la vida.

Resumen

La WNT5A es una proteína proinflamatoria relacionada recientemente con la resistencia a la insulina. Se cree que esta proteína podría estar regulada por la SFRP5, la cual secuestraría la WNT5A, ejerciendo así sus propiedades antiinflamatorias y evitando la aparición de la resistencia a la insulina. Recientemente se ha descrito que las dos proteínas pueden ser secretadas por el tejido adiposo de adultos. Por su parte, la proteína CRT3 es expresada en el tejido adiposo donde juega un papel importante en el metabolismo energético. Recientemente, se ha descrito que el gen de la proteína CRT3 está relacionado con el desarrollo de la obesidad metabólicamente complicada.

Se sabe que el tejido adiposo juega un papel importante en la regulación de la homeostasis energética del organismo mediante la secreción de determinadas moléculas en la sangre. En este trabajo se estudiará la secreción de WNT5A, SFRP5 y CRT3 por parte del tejido adiposo y su relación con la obesidad y marcadores de riesgo cardiovascular en la edad pediátrica.

Para tal fin, se ha diseñado un estudio transversal con una muestra de niños sanos de 7 años de edad (n = 211; 103 niños y 108 niñas), no seleccionados, provenientes de la población general, reclutados en los centros de atención primaria, y un estudio longitudinal con 130 niños (63 niños y 67 niñas), estudiados a los 3 años de su inclusión en el estudio inicial. A todos ellos se les realizó un examen clínico y antropométrico. Se obtuvo una muestra de sangre que se utilizó para realizar una analítica general y cuantificar los marcadores en estudio, que incluyen: WNT5A, SFRP5 y CRT3. Adicionalmente, se obtuvieron biopsias de tejido adiposo visceral de 12 niños (10 niños y 2 niñas) que se sometieron a una intervención quirúrgica programada por

causas externas al estudio. Este tejido adiposo se utilizó en estudios *ex vivo* para estudiar la secreción de las proteínas WNT5A, SFRP5 y CRT3.

Los resultados obtenidos demuestran que las proteínas WNT5A, SFRP5 y CRT3 son secretadas por el tejido adiposo y en mayor cantidad por el tejido adiposo visceral en niños prepuberales sanos. Además, concentraciones bajas de SFRP5 y elevadas de WNT5A y CRT3 se relacionan con un perfil metabólico disfuncional, consistente en una relativa disminución de la adiponectina en sangre, aumento de la resistencia a la insulina y aumento del índice de masa corporal.

El estudio del eje WNT5A - SFRP5 ha demostrado que las dos proteínas se relacionan positivamente tanto en el medio condicionado de las biopsias de tejido adiposo como en el suero de los niños sanos. Además, nuestros resultados demuestran que las concentraciones bajas de SFRP5 en sangre potencian la relación entre WNT5A y el aumento de la resistencia a la insulina y de parámetros de función hepática.

Estos resultados aportan evidencias del importante papel del tejido adiposo en la secreción de las proteínas WNT5A, SFRP5 y CRT3 y su relación con marcadores conocidos de riesgo metabólico y el desarrollo de alteraciones metabólicas en etapas precoces de la vida.

Summary

WNT5A is a protein with proinflammatory properties recently related to insulin resistance. It is believed that this protein might be regulated by SFRP5, which sequesters WNT5A exerting its anti-inflammatory actions and preventing the onset of insulin resistance. Recently, it has been reported that both proteins can be secreted by the adipose tissue. CRT3 is another protein expressed by the adipose tissue which plays important roles in energy metabolism. Recently, it has been reported that *CRT3* is associated with the development of obesity.

It is known that adipose tissue plays important roles in the regulation of energy homeostasis by secreting a number of molecules into the circulation. In this work, we will study the secretion of WNT5A, SFRP5 and CRT3 by the adipose tissue in relation to obesity and cardiovascular risk markers in healthy children.

To this end, the study population consisted of 211 asymptomatic Caucasian children (103 boys and 108 girls) enrolled in a longitudinal study of cardiovascular risk factors. These children were recruited among those seen within a setting of preventive medicine. A longitudinal study was also performed in 130 children included in the cross-sectional study. All subjects underwent anthropometric and clinical examination and a blood sample was used to quantify the study parameters, including WNT5A, SFRP5 and CRT3. We also obtained biopsies of visceral adipose tissue from 12 additionally children (10 boys and 2 girls) who underwent surgical procedures which were unrelated to the study. These biopsies were used *ex vivo* to study the secretion of WNT5A, SFRP5 and CRT3 by the adipose tissue.

WNT5A, SFRP5 and CRT3 were found to be secreted by the adipose tissue and to a greater extent by the visceral adipose tissue in healthy prepubertal children. In addition, lower levels of SFRP5 and higher levels of WNT5A and CRT3 in serum were related to a poorer metabolic profile showing significant associations with lower levels of high molecular weight adiponectin, higher levels of insulin resistance and a higher body mass index.

The study of the WNT5A - SFRP5 axis has shown that both proteins are positively related in both the conditioned media from the adipose tissue biopsies and in serum of healthy children. Furthermore, our results demonstrate that lower concentrations of SFRP5 in serum enhance the associations of WNT5A with insulin resistance and parameters of liver function.

These results provide evidence for the important role of the secretion of WNT5A, SFRP5 and CRCT3 by the adipose tissue and the relationship with metabolic risk markers and the development of metabolic dysfunction in childhood.

INTRODUCCIÓN

1.1 OBESIDAD

1.1 DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGIA

La obesidad es una enfermedad crónica compleja y multifactorial que se desarrolla como resultado de la interacción entre el genotipo y factores ambientales como la alimentación y el estilo de vida. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la obesidad y el sobrepeso como la acumulación anormal o excesiva de grasa que es perjudicial para la salud [1].

Actualmente, la obesidad está considerada como la gran pandemia del siglo XXI y la pregunta que se hacen médicos e investigadores es ¿Cuál es la causa que ha provocado el aumento de la obesidad especialmente en las sociedades más industrializadas? Existen diversas teorías que explican el origen de la pandemia y todas ellas coinciden en el impacto que han tenido las nuevas tecnologías en el cambio de estilo de vida hacia un modelo más sedentario, las modificaciones de la dieta y los cambios en el medioambiente [10-14]. Todos estos cambios han favorecido la aparición de un entorno obesogénico cuya característica principal es que la ingesta calórica es superior al gasto energético [15].

La obesidad es un grave problema de salud para la población general debido a su estrecha vinculación con patologías de alta mortalidad y morbilidad como son las enfermedades cardiovasculares, la hipertensión arterial, la diabetes mellitus y algunos cánceres [16]. Según la OMS la obesidad y el sobrepeso son la quinta causa de muerte en el mundo y es la principal enfermedad no declarable [1].

A partir de los años 80 el método indirecto más utilizado para clasificar el sobrepeso y la obesidad es el índice de masa corporal (IMC) o índice de Quetelet [17]. El IMC se calcula mediante una sencilla fórmula

Clasificación del IMC	
Insuficiencia ponderal	< 18.5
Intervalo normal	18.5 – 24.5
Sobrepeso	≥ 25.0
Obesidad	≥ 30
Obesidad clase I	30.0 – 34.9
Obesidad clase II	35.0 – 39.9
Obesidad clase III	≥ 40

Figura 1 | Clasificación de la obesidad en adultos según el IMC [1].

en la que el peso en kilogramos se divide por el cuadrado de la talla en metros (kg/m^2). Aunque este índice mide más la masa corporal total que la masa grasa, se correlaciona muy estrechamente con la cantidad de grasa corporal [18]. Con este índice, el sobrepeso en adultos se define como un IMC igual o superior a 25 pero inferior a 30 y la obesidad como un IMC igual o superior a 30 (Figura 1) [1].

La OMS y el Grupo Internacional de Trabajo sobre Obesidad (IOTF) recomiendan la utilización del IMC para definir la obesidad en los estudios epidemiológicos que estiman la prevalencia de la enfermedad, con el fin de que los resultados obtenidos sean comparables. No obstante, se debe tener en cuenta que no solo es importante el aumento de grasa corporal sino también su distribución. En relación a la distribución de la grasa se utilizan otros índices antropométricos como el perímetro de cintura [19] y el índice cintura-cadera (ICC) [20], ambas medidas se relacionan mejor con la obesidad de distribución central. En algunos estudios se ha relacionado positivamente el perímetro de cintura y el ICC con la resistencia a la insulina, la tensión arterial y los niveles de colesterol y triglicéridos (TG) [21, 22].

Mediante el IMC, la prevalencia de obesidad en la edad adulta en España se estimó en un 15,5% y el sobrepeso en un 39,2% según el estudio multicéntrico DORICA, realizado entre 1990 y 2000 [23]. Esta cifra se ve aumentada en el mapa internacional

de obesidad actualizado en 2008 por la OMS, en el que se sitúa a España en el grupo de países con una prevalencia de obesidad entre un 20 y un 30 % (Figura 2).

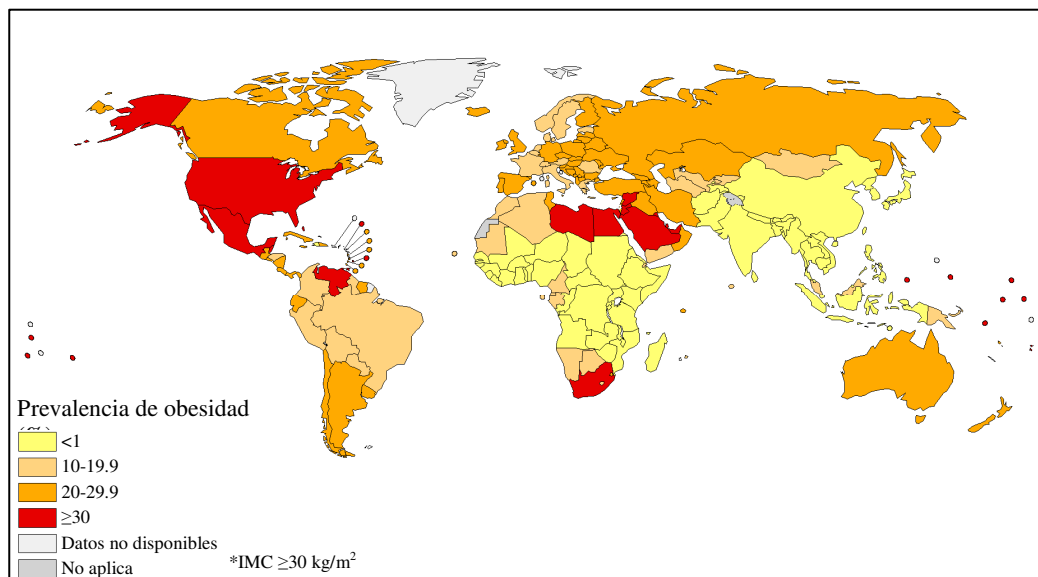


Figura 2| Mapa universal de la distribución de la prevalencia de la obesidad según la OMS en adultos mayores de 20 años y ambos sexos (2008) [1].

1.2 OBESIDAD INFANTIL

La obesidad en la infancia es más difícil de valorar que en la edad adulta debido a que los niños experimentan cambios muy marcados en su composición corporal durante la etapa de crecimiento. El valor del IMC durante la infancia y adolescencia no es constante y cambia con la edad y el sexo. En las niñas el desarrollo puberal se asocia a un incremento proporcionalmente mayor de la masa grasa (MG), mientras que en los niños hay una disminución de la MG, un aumento de la masa libre de grasa (MLG) y un aumento de la estatura más marcado [24]. Por este motivo, se ha establecido un consenso por el que el IMC se informa como valor estandarizado (valor Z) o percentiles respecto a una población de referencia en la que se calcula el valor Z del IMC en función de la edad y el sexo de cada niño.

$$\text{Cálculo de la puntuación Z} = \frac{\text{Valor antropométrico real} - \text{Mediana (Percentil 50)*}}{\text{Desviación estándar*}}$$

*mediana y desviación estándar de la población de referencia por sexo y edad

La población de referencia debe ser preferentemente de origen local para minimizar así las posibles diferencias antropométricas entre razas y etnias [25]. El punto de corte utilizado a partir del cual se considera que existe sobrepeso son valores del valor Z iguales o superiores a 1 y la obesidad se define con un valor Z igual o superior 2 (Figura 3).

Clasificación del IMC en niños		
	Percentil	Valor Z
Delgadez severa	3	Valor Z \leq -2
Delgado	15	-2 > Valor Z < -1
Normal	50	-1 \geq Valor Z < 1
Sobrepeso	85	1 \geq Valor Z < 2
Obesidad	97	Valor Z \geq 2

Figura 3 | Clasificación del IMC en niños según el percentil y el valor Z [25].

Existen numerosos estudios epidemiológicos tanto nacionales como internacionales que muestran como el número de niños obesos o con sobrepeso ha ido aumentando de forma constante en las últimas dos décadas [26-28]. Concretamente, en España la prevalencia de obesidad infantil ha aumentado considerablemente, hemos pasado del 4.9% de niños obesos documentado en el

estudio PAIDOS en 1984, hasta el 16.6% en niños con edades comprendidas entre 8 y 13 años y un 12.5% en la franja de edad que va de los 14 a los 17 años de edad (cifras recogidas en el estudio EnKid realizado el año 2000). La noticia positiva es que desde el año 2000 hasta el 2012 las cifras de obesidad y sobrepeso infantil no sólo no han aumentado sino que parece que existe una tendencia a la baja [29].

Los niños con sobrepeso tienen muchas probabilidades de convertirse en adultos obesos y tienen más riesgo de sufrir diabetes y enfermedades cardiovasculares que los niños no obesos [30] aumentando así la mortalidad en el adulto a edad más temprana [1].

1.3 PATOLOGIAS ASOCIADAS A LA OBESIDAD

1.3.1 RESISTENCIA A LA INSULINA Y DIABETES TIPO 2

La resistencia a la acción de la insulina se caracteriza por el aumento de los niveles de insulina en sangre y disminución de la respuesta a la insulina por parte de los tejidos más insulino dependientes como son el hígado, el tejido muscular y el tejido adiposo [31]. Este periodo prediabético se caracteriza porque el aumento de secreción de insulina mantiene los niveles de glucemia dentro de la normalidad, pero con el tiempo, el páncreas se vuelve incapaz de compensar la situación metabólica y como consecuencia aparece la diabetes tipo 2.

Numerosos estudios en animales y humanos avalan la idea de que la relación entre obesidad y resistencia a la insulina es del tipo causa efecto [32]. La obesidad provoca cambios inflamatorios y metabólicos, alterando la expresión de ciertas proteínas con función endocrina que interfieren con la acción de la insulina y que

pueden desencadenar la aparición de diabetes [33]. La identificación de nuevos marcadores precoces de obesidad es importante para mejorar la prevención y el tratamiento de la diabetes tipo 2 en adultos, los estudios epidemiológicos se utilizan como primer paso para investigar las bases moleculares de la resistencia a la insulina.

1.3.2 ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

La obesidad es un factor de riesgo para sufrir enfermedades cardiovasculares [34]. Concretamente, el Estudio Interheart identificó la grasa de distribución central, evaluada clínicamente mediante el perímetro de la cintura, como uno de los nueve factores de riesgo modificables que explicaban hasta el 90 % del riesgo del infarto de miocardio [35].

En la actualidad numerosos trabajos apuntan que varias de las alteraciones asociadas a la obesidad como son la inflamación de bajo grado, la resistencia a la insulina, la dislipidemia, la hipertensión arterial y alteraciones de la coagulación, podrían causar disfunción endotelial y como consecuencia el desarrollo de aterogénesis [36]. Así mismo, es conocido que la obesidad durante la infancia y la adolescencia aumenta la morbilidad y la mortalidad de la enfermedad cardiovascular en la edad adulta [37].

Actualmente se conocen algunos marcadores de riesgo cardiovascular en la edad pediátrica, concretamente en un estudio epidemiológico realizado en niños se observó que el IMC y la adiposidad se asociaban positivamente con el grosor de la íntima-media carotídea (GIMc) en el adulto [38]. El GIMc se ha demostrado como un marcador subclínico no invasivo precoz de arterioesclerosis en adultos y en niños [39-41]. Otro marcador subclínico de riesgo cardiovascular es la proteína C reactiva ultrasensible

(PCRus) utilizada como marcador de inflamación de bajo grado asociada con un aumento del riesgo cardiovascular en obesos [42].

1.3.3 DISLIPEMIA

Una de las alteraciones metabólicas que suele acompañar a la aterosclerosis en la obesidad es la dislipemia. En el adulto obeso la alteración lipídica típica se caracteriza por aumento de los triglicéridos, aumento del colesterol LDL y disminución del colesterol HDL [43].

Los niños y niñas con sobrepeso y obesidad muestran el mismo patrón lipídico que los adultos, mostrando una correlación positiva del IMC con los triglicéridos y el colesterol LDL, mientras que la correlación es negativa con respecto al colesterol HDL [44].

1.4 TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo es un tipo de tejido conectivo especializado que tiene como funciones ser el mayor reservorio energético del organismo, servir de envoltorio protector de las vísceras y en los últimos tiempos está considerado como uno de los más importantes órganos endocrinos.

1.4.1 ESTRUCTURA

Los adipocitos son las células más abundantes del tejido adiposo. Son células esféricas que tienen un contenido lipídico muy elevado. En el tejido adiposo también podemos encontrar células precursoras o preadipocitos, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos [2] que conforman el estroma vascular (Figura 4). El tejido

adiposo es un tejido altamente innervado y vascularizado, lo que nos da idea de su gran actividad metabólica.

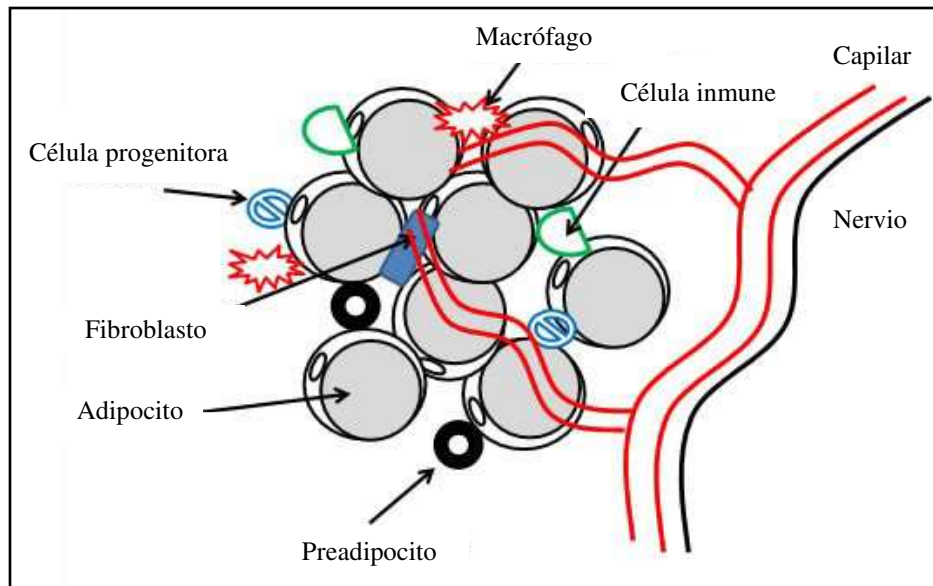


Figura 4| Esquema de la estructura del tejido adiposo [2]

En los mamíferos existen dos tipos de tejido adiposo: la grasa blanca, cuya función principal es almacenar el exceso de energía en forma de triglicéridos y la grasa parda que elimina el exceso energético produciendo calor [45]. Ya desde los años 40, se viene planteando la hipótesis de que existe algún tipo de comunicación entre el tejido adiposo y otros tejidos. Recientemente se ha descrito que el tejido adiposo blanco no solo responde a nutrientes, señales hormonales y neuronales, sino que también produce y secreta determinadas hormonas, considerándose como un órgano endocrino que puede actuar sobre otros tejidos [46]. De la misma manera, durante mucho tiempo se consideró que la grasa parda en los adultos se encontraba en muy pequeña cantidad y que no tenía relevancia metabólica, pero recientemente han aparecido trabajos que demuestran la importancia de la grasa parda en la regulación del equilibrio energético en adultos [47].

A su vez el tejido adiposo blanco puede clasificarse según su distribución corporal en grasa visceral y grasa subcutánea. Los adipocitos de la grasa visceral presentan diferencias respecto a los de la grasa subcutánea en cuanto a su capacidad lipolítica, secreción hormonal y presencia de receptores. En numerosos estudios se señala el aumento de la grasa visceral como la principal causa de la patología derivada de la obesidad [48]. El perímetro de la cintura se ha utilizado en numerosos estudios como una medida indirecta de la grasa visceral y según el National Institute of Health (NIH) de los EEUU el aumento del perímetro de la cintura se asocia positivamente con el aumento del riesgo de padecer diabetes tipo 2, dislipemia e hipertensión arterial y se considera que es un marcador independiente de riesgo cardiovascular [20].

1.4.2 TEJIDO ADIPOSO REGULADOR DE ENERGÍA

El almacenamiento de energía es un mecanismo de supervivencia para tiempos en los que los alimentos escasean [49]. El tejido adiposo es clave en la homeostasis de los recursos energéticos. La principal forma de almacenamiento de energía es a través de la síntesis de TG que se almacenan en los adipocitos. Los TG pueden ser originados a partir de la dieta o por síntesis *de novo*, proceso conocido como lipogénesis. Cuando el organismo necesita energía los TG son hidrolizados mediante la lipólisis a ácidos grasos y glicerol.

Tanto la lipogénesis como la lipólisis son procesos regulados hormonalmente. La insulina es la principal hormona antilipolítica, favorece el almacenamiento de energía mediante la activación de la lipogénesis, la síntesis y exportación de la lipoproteína lipasa al endotelio vascular y la síntesis de TG a partir de glucosa [50]. Por el contrario,

las hormonas adrenérgicas activan la lipólisis mediante la unión a receptores β -adrenérgicos y la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) (Figura 5) [51].

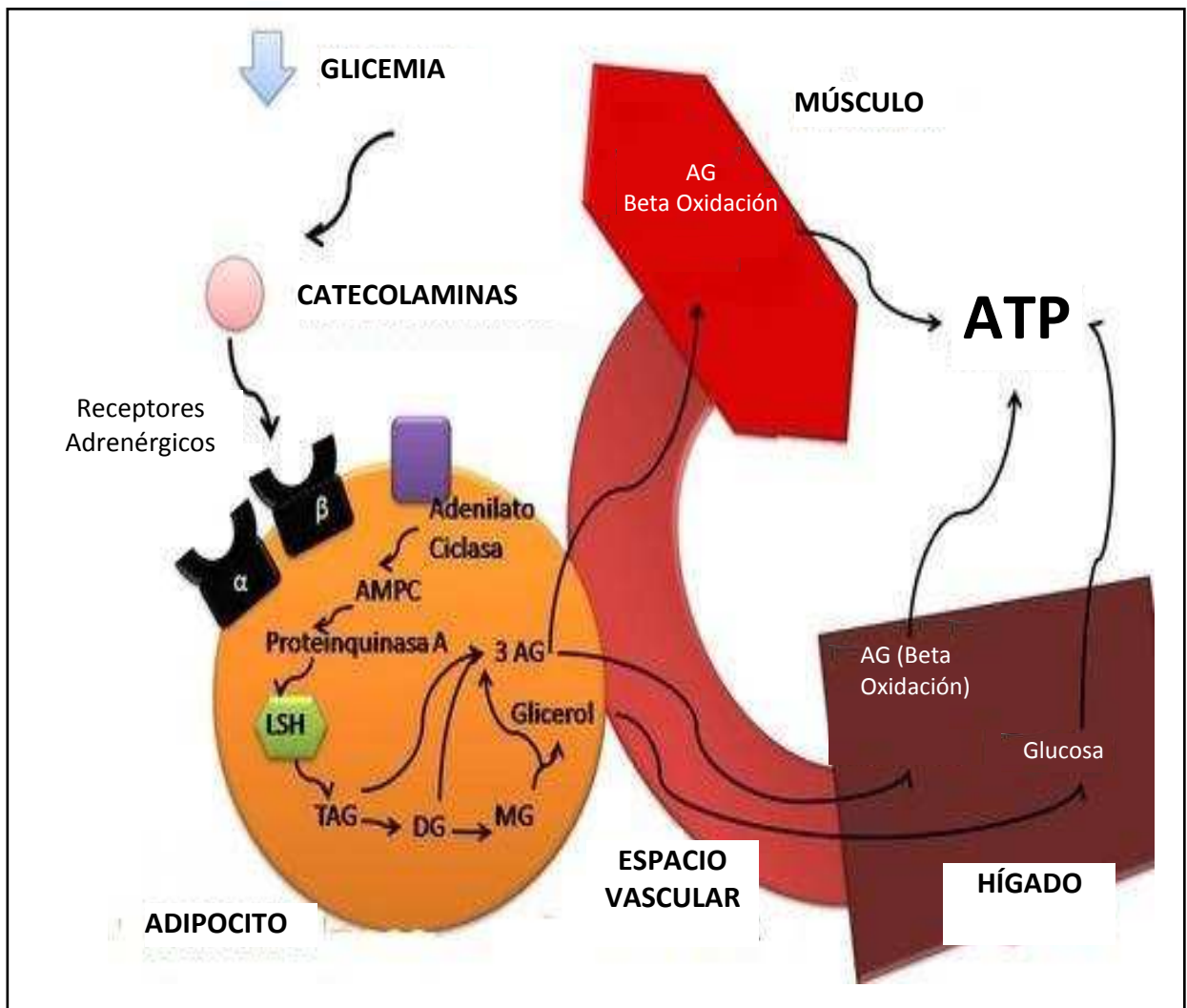


Figura 5 | Regulación hormonal de la lipólisis. Elabo

Durante el ayuno las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) estimulan la lipólisis en el adipocito. Por inervación simpática o a través de la circulación, las catecolaminas llegan a la superficie del adipocito e interactúan con los receptores β -adrenérgicos y como resultado se activa la adenilato ciclasa, esta enzima cataliza la formación de AMPC, que a su vez activa la proteína cinasa A (PKA), por último la PKA activa la lipasa sensible a hormonas (HSL) enzima responsable de la hidrólisis de los triglicéridos.

1.4.3 TEJIDO ADIPOSO ÓRGANO ENDOCRINO

El tejido adiposo secreta sustancias conocidas como adipocinas que actúan a nivel local mediante señales autocrinas y paracrinas y a nivel sistémico mediante señales endocrinas (Figura 6). Además el adipocito expresa en su superficie multitud de receptores para hormonas y neurotransmisores que permiten conectar al tejido adiposo con el resto del organismo incluido el sistema nervioso central [52]. A través de las adipocinas el tejido adiposo actúa regulando el equilibrio energético, la respuesta inflamatoria, la función vascular y la sensibilidad a la insulina.

El perfil secretor del adipocito cambia según sea la situación metabólica del tejido adiposo, lo que incluye alteraciones en el número y fenotipo, no solo de los adipocitos sino también de las células inflamatorias del estroma vascular. Concretamente, en la obesidad aumenta la secreción de las citocinas proinflamatorias que contribuyen al desarrollo de la inflamación crónica y a la disfunción metabólica que se asocian a la obesidad mientras que se encuentran disminuidas las citocinas con propiedades antiinflamatorias (Figura 6) [5].

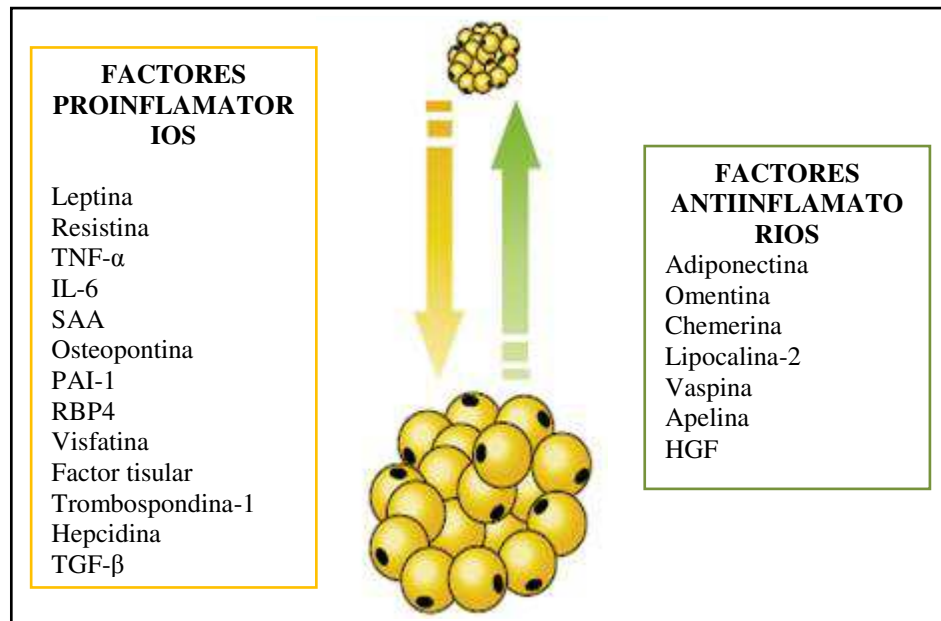


Figura 6 | Citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias secretadas por el adipocito. TNF- α : Factor de necrosis tumoral α , IL-6: Interleucina 6, MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1, PAI-1: Inhibidor del plasminógeno 1, RBP4: proteína transportadora de retinol tipo 4, TGF- β : el factor de crecimiento transformante beta, HGF: factor de crecimiento de hepatocitos [5].

1.4.3.1 LEPTINA

La leptina es una citocina producida principalmente por el adipocito, pero también se expresa en el hipotálamo, el ovario y la placenta [53]. La restricción calórica y la disminución de peso disminuyen los niveles de leptina en sangre lo que activa una respuesta compensatoria con aumento del apetito, inhibición de la actividad del sistema nervioso simpático y disminución del gasto energético [54]. La identificación y caracterización de la leptina en 1994 [53] fue un punto de inflexión en el estudio de la función endocrina del tejido adiposo.

Los efectos de la leptina sobre la homeostasis energética están mediados por el hipotálamo. En condiciones normales cuando aumenta la cantidad de grasa en el adipocito aumenta la secreción de leptina, ésta es liberada a la sangre, atraviesa la barrera hematoencefálica y llega al hipotálamo donde estimula las señales anorexigénicas, aumenta el gasto energético e inhibe la lipólisis [55]. Sin embargo en

las personas obesas el aumento de leptina se acompaña de hiperfagia [56], debido a que presentan resistencia a la leptina. Se postula la hipótesis de que la resistencia a la leptina podría ser debida a una saturación del transporte de leptina al cerebro o a la atenuación de la señal en el hipotálamo [57]. En la obesidad la leptina se comporta como una adipocina proinflamatoria [58].

La hiperleptinemia se ha relacionado recientemente con la arterioesclerosis, un mayor riesgo de infarto de miocardio [59] y la resistencia a la insulina [60].

1.4.3.2 ADIPONECTINA

La adiponectina es la proteína producida por el adipocito más abundante en sangre. Fue identificada a mediados de los años 90 por cuatro grupos investigadores independientes [61-64] y está considerada como una citocina protectora por su actividad antiinflamatoria y sensibilizadora de la insulina.

La adiponectina circula en sangre en forma de multímeros de diferente tamaño, las tres formas más abundantes y de mayor importancia biológica son el trímero de bajo peso molecular, el hexámero de peso molecular intermedio y la forma de alto peso molecular formada por multímeros de entre 12 y 18 moléculas de adiponectina [65]. Existe un amplio consenso en señalar que la concentración de la adiponectina de alto peso molecular (adiponectina de APM) es la que tiene significación clínica en relación a la obesidad, la patología cardiovascular y la diabetes [65-67].

La secreción de adiponectina por el adipocito está regulada hormonalmente y actúa a través de dos receptores, el receptor adipoR1 que se expresa en músculo esquelético, células endoteliales, cardiomiocitos y células pancreáticas y el receptor

adipoR2 que se expresa en el hígado y en las células endoteliales [68]. Esta hormona está considerada como insulino sensibilizante, estimula la captación de glucosa y la oxidación de los ácidos grasos en el músculo. En cambio, en el hígado inhibe la neoglucogénesis y la glucogenolisis [69].

Es conocido que los obesos tienen valores de adiponectina en sangre significativamente más bajos que los sujetos delgados, los valores de adiponectina se correlacionan negativamente con el IMC y con el contenido de grasa corporal, en especial con la grasa visceral [70]. Además, existe una relación inversa entre los niveles de adiponectina en sangre y la resistencia a la insulina. En pacientes con diabetes tipo 2 los niveles de adiponectina están significativamente disminuidos con respecto los sujetos sanos. Los individuos con mutaciones en el gen de la adiponectina presentan un fenotipo obeso con resistencia a la insulina [71, 72], lo que parece indicar que la adiponectina tiene un papel clave en la relación entre obesidad y resistencia a la insulina. Los valores bajos de adiponectina además se relacionan con hipertensión esencial [73] y dislipemia [74] y en general con un aumento del riesgo cardiovascular [75].

1.4.4 FISIOPATOLOGIA DEL TEJIDO ADIPOSO

En condiciones normales el tejido adiposo cumple tres funciones fundamentales:

1. Regulación energética: almacenando triglicéridos y liberando ácidos grasos.

2. Colabora con el metabolismo de la glucosa en el hígado.
3. Secreción de citocinas con funciones específicas.

Cuando se produce un exceso de aporte de nutrientes el exceso energético se puede acumular en el tejido adiposo de dos formas, aumentando el número de adipocitos (hiperplasia) o bien aumentando el tamaño del adipocito (hipertrofia). Aunque está demostrado que la exposición crónica a un exceso calórico también puede estimular la adipogénesis, diferenciación de los adipocitos maduros a partir de las células progenitoras [50], la capacidad de aumentar el número de adipocitos decrece con los años [76]. Por este motivo la respuesta predominante del tejido adiposo ante un balance energético positivo es la hipertrofia del adipocito.

Los adipocitos hipertrofiados sufren una serie de transformaciones que conducen a una activación de las vías de estrés del retículo endoplasmático y a un estado de inflamación crónica de bajo grado del tejido adiposo. Esta inflamación crónica de bajo grado se cree que es el fenómeno que desencadena las alteraciones metabólicas que afectan a todo el organismo (Figura 7) [77]. Las células hipertrofiadas modifican su perfil secretor y secretan citocinas proinflamatorias. Estas citocinas facilitan el reclutamiento de macrófagos procedentes de la circulación sanguínea, y provoca un cambio de polarización de los macrófagos que pasan a ser del tipo M2, secretores de citocinas antiinflamatorias, a macrófagos tipo M1, secretores de citocinas proinflamatorias [78], estableciéndose un círculo vicioso que amplificaría y mantendría la activación de las vías inflamatorias en la obesidad. Como resultado se produce una inflamación crónica del tejido adiposo. Las citocinas proinflamatorias secretadas por los adipocitos y los macrófagos actúan también de forma sistémica favoreciendo el

desarrollo de resistencia a la insulina y alteraciones del endotelio vascular lo que finalmente conduce a la aparición de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes tipo 2 que se asocian a la obesidad [77].

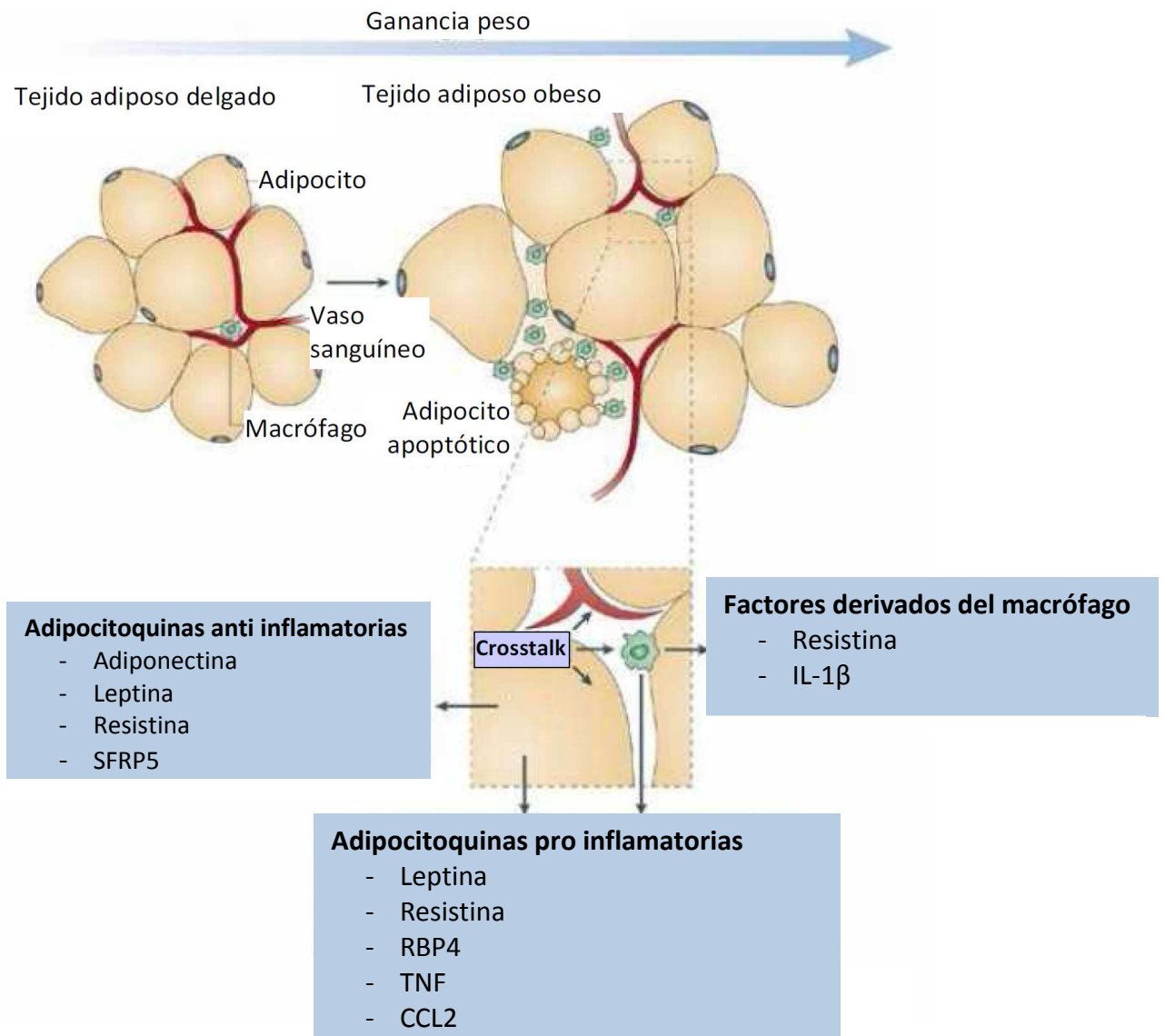


Figura 7 | Inflamación y obesidad: Esquema de los cambios estructurales del tejido adiposo y su relación con las alteraciones metabólicas [4].

Se ha demostrado que biomarcadores de inflamación como el factor de necrosis tumoral α (TNF α), la interleucina 6 (IL-6) o la proteína C reactiva (PCR), se encuentran elevados en la sangre de individuos con obesidad y resistencia a la insulina [79, 80].

Por otra parte, también se ha demostrado que la activación de la proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc (CREB) en el tejido adiposo tiene un papel fundamental en el desarrollo de la resistencia a la insulina que aparece en la obesidad [81]. El bloqueo de la actividad de CREB en el adipocito evita el desarrollo de infiltrados inflamatorios en el tejido adiposo y la aparición de resistencia a la insulina. Uno de los efectos que tiene la inflamación en el tejido adiposo es la disminución de la capacidad de almacenaje de triglicéridos en los adipocitos (ver teoría de la expansibilidad más adelante en este mismo documento) [82].

En resumen, la obesidad es una patología compleja. Múltiples vías endocrinas, inflamatorias y neuronales están alteradas de forma simultánea y producen cambios en el metabolismo celular. Estos cambios afectan principalmente a las células de los tejidos más sensibles a la insulina como son el tejido adiposo, hepático y muscular [32]. Existen diversas teorías sobre las causas que han provocado la extensión epidémica de la obesidad en la sociedad industrializada [12-15, 83, 84], todas ellas señalan como causa principal la falta de sincronía entre la rápida instauración de los cambios en la alimentación y los hábitos de vida que han producido los avances tecnológicos y los mecanismos de adaptación biológicos desarrollados por los seres humanos.

1.4.4.1 TEORÍA DE LA EXPANSIBILIDAD DEL TEJIDO ADIPOSO

En la actualidad se cree que la capacidad de expansión del tejido adiposo podría ser un factor importante en el desarrollo de las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad [82]. Cuando la capacidad oxidativa y de almacenamiento de grasas en el tejido adiposo se satura se produce una respuesta tóxica conocida como

lipotoxicidad [85]. Esta lipotoxicidad produce un flujo de ácidos grasos libres en sangre que se dirige a otros órganos, especialmente al hígado y al músculo esquelético donde los ácidos grasos son almacenados formando depósitos ectópicos de grasa que causan los problemas metabólicos asociados a la obesidad, como la resistencia a la insulina [86].

La teoría de la expansibilidad del tejido adiposo plantea que los trastornos metabólicos en el obeso son debidos en parte a que su tejido adiposo no es capaz de acumular más grasa, ha llegado a su límite. Aunque se sabe que los adipocitos son células muy dinámicas que se adaptan continuamente a los cambios de la demanda energética del organismo, se cree que el número de adipocitos y preadipocitos está fijado desde la infancia, lo que limitaría la capacidad de expansión del tejido adiposo [87]. Está demostrado que el número de adipocitos maduros y preadipocitos difiere en los sujetos obesos respecto a los delgados, este hecho refuerza la hipótesis de que la disminución de la adipogénesis puede ser un mecanismo importante en la patogénesis de la obesidad y de la resistencia a la insulina [88].

La adipogénesis está regulada por factores de transcripción, hormonas y factores locales que favorecen la comunicación entre los preadipocitos del estroma vascular y los adipocitos maduros. Todas estas señales son necesarias para garantizar la expansibilidad del tejido adiposo ante un balance energético positivo y retrasar la aparición de la inflamación del tejido adiposo. En la Figura 8 podemos ver un esquema de cómo: a) en condiciones de ayuno se inhibe la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduro; b) en situaciones de sobre-nutrición los adipocitos se hipertrofian y envían señales que estimulan la diferenciación de los preadipocitos y c) en situación de

sobre alimentación crónica, se supera la capacidad de expansibilidad del tejido adiposo y se produce la acumulación de lípidos ectópicos y la inflamación del tejido adiposo [7].

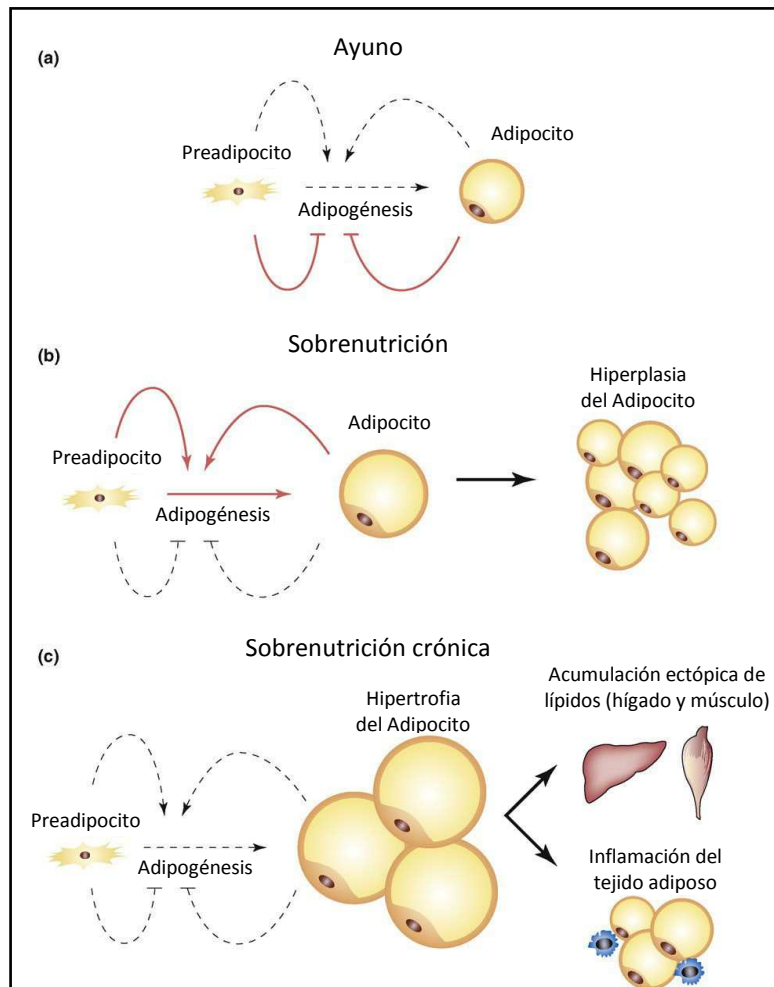


Figura 8 | Factores locales que regulan la adipogénesis: (a) En condiciones de ayuno (b) Sobre alimentación (c) Sobre alimentación crónica [7]

1.4.4.2 TEORÍA DEL GENOTIPO AHORRADOR

En 1962 Neel desarrolló la hipótesis del “genotipo ahorrador” para explicar el aumento epidémico de la obesidad en las sociedades industrializadas. Esta teoría propone que los genes favorecedores de la acumulación de grasa, que ayudaron a nuestros ancestros a sobrevivir en periodos de hambruna son los responsables de la mayor epidemia de la cultura occidental, la obesidad. Los mismos genes que ayudaron

a sobrevivir a nuestros antepasados cazadores y recolectores son los que hoy en día nos hacen acumular tejido adiposo que no podemos eliminar debido a cambios en el tipo de dieta y al predominio de estilo de vida sedentario [13].

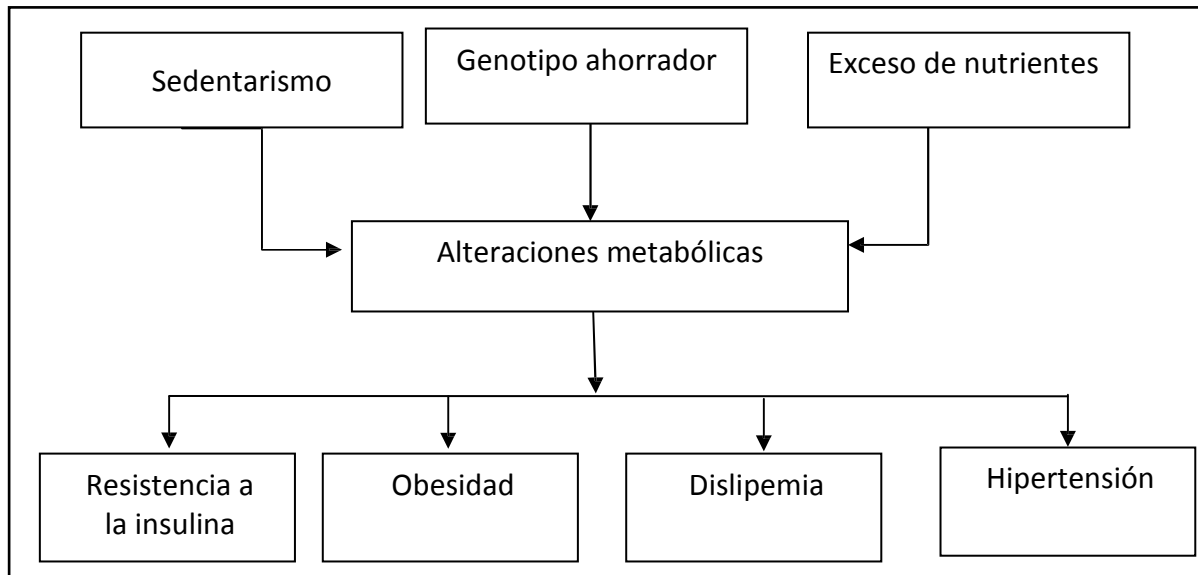


Figura 9 | Genotipo ahorrador: Sedentarismo y dieta hipercalórica conducen a alteraciones metabólicas y obesidad.

1.5 NUEVAS PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA OBESIDAD

1.5.1 WNT5A

Wnt5A forma parte de la familia de proteínas secretadas Wingless type MMTV integration (Wnt). Las proteínas Wnt participan en diversos fenómenos biológicos durante el desarrollo embrionario [89] y en los adultos controlan el mantenimiento y la diferenciación de las células madre [90], promueven la regeneración del hueso [91] y regulan la hematopoyesis [92]. Alteraciones de la señalización Wnt se asocian al

desarrollo de cáncer [93] y se han propuesto como factor asociado al envejecimiento [94] y a la septicemia [95].

1.5.1.1 ESTRUCTURA

La familia Wnt está formada por un conjunto de glucoproteínas secretadas que controla una cascada de procesos esenciales para el desarrollo embriológico, el crecimiento y la diferenciación celular. Las proteínas Wnt tienen un tamaño que oscila entre los 350 y 400 aminoácidos y su estructura se caracteriza por la presencia de múltiples residuos de cisteína. La unión del ácido palmítico a los residuos de cisteína favorece la unión de los ligandos Wnt a la membrana celular [96]. Se cree que el extremo carboxi-terminal es responsable de la especificidad de respuesta de las diferentes Wnt [93].

En la actualidad se han descrito 19 proteínas Wnts clasificadas en dos grupos atendiendo a su capacidad para activar la vía de señalización canónica (Wnt1, Wnt3a y Wnt8) o la vía no canónica (Wnt4, WNT5A y Wnt11).

1.5.1.2 MECANISMOS DE ACCIÓN

El mecanismo de acción de las proteínas Wnt tiene lugar mediante la unión específica de una proteína Wnt a receptores específicos de la superficie celular denominados Frizzled [97]. La unión del ligando Wnt a su receptor conduce a la activación de varias vías intracelulares de transducción de la señal extracelular. Hasta la fecha, existen al menos tres rutas de señalización Wnt mediadas por la proteína Disheveled (Dsv) (Figura 9):

- a) Una ruta canónica o ruta Wnt/ β -catenina [98] en la que interviene la β -catenina
- b) Ruta no canónica o ruta de polaridad celular planar (PCP) que activa a su vez la ruta de JNK (JUN Nterminal cinasa) implicada en la regulación de procesos inflamatorios [99, 100].
- c) La vía Wnt- Ca^{2+} que implica un incremento del Ca^{2+} intracelular.

En las dos últimas rutas, los ligandos Wnts se unen directamente al receptor sin mediar la acción de la β -catenina (Figura 10).

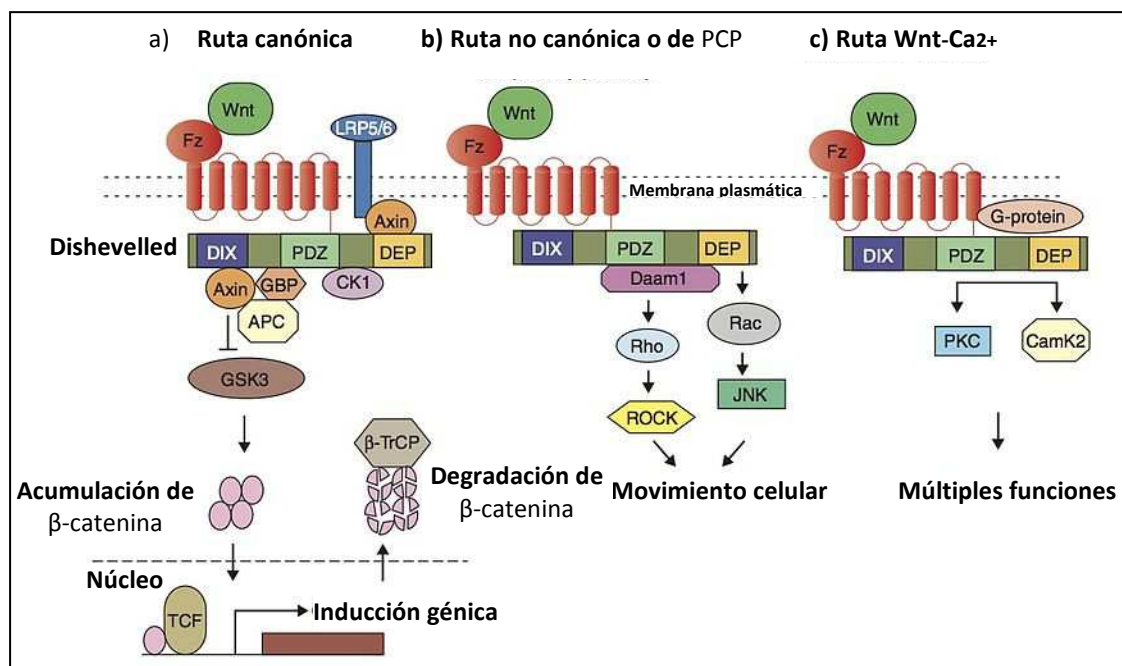


Figura 10 | Vías de señalización Wnt: A) Vía canónica. B) Vía no canónica polaridad celular planar (PCP). C) Vía no canónica Wnt- Ca^{2+} . [3]

WNT5A es una proteína con múltiples funciones debido a la capacidad que tiene para activar las vías de señalización Wnt tanto las canónicas como las no canónicas. Además, puede actuar como activador o inhibidor de la vía canónica Wnt/ β -catenina [101]. Que se active una vía de señalización u otra dependerá del contexto celular en que nos encontremos y del tipo de receptores disponibles.

1.5.1.3 REGULACIÓN

Para asegurar su correcta función, la señal Wnt está regulada a distintos niveles por una amplia gama de moléculas efectoras. Estas moléculas funcionan como agonistas o antagonistas y actúan o bien de forma intracelular modulando los componentes de la maquinaria de transducción de señal o de forma extracelular modulando la interacción ligando–receptor [102].

Los antagonistas se dividen en dos grupos dependiendo de si hay unión directa con Wnt o con algún cofactor:

- Clase SFRP: Se unen directamente a la proteína Wnt. Incluye a los miembros de la familia de proteínas secretadas similar a frizzle (SFRPs), Factor 1 inhibidor de Wnt (WIF-1) y Cerberus. Inhiben todas las vías Wnt.
- Dickkopf (DDK1): Necesita unirse al cofactor LRP5/6 para antagonizar la vía canónica.

Además de antagonistas existen también agonistas de la vía Wnt. En trabajos recientes se ha descrito como la interacción entre las vías canónicas y no canónicas también regulan la propia señal Wnt [103].

1.5.1.4 WNT5A Y TEJIDO ADIPOSO

Las señales Wnt son reguladores locales de la expansión del tejido adiposo, son mediadores entre las células del estroma vascular y los adipocitos, la alteración de estas señales locales puede comprometer la adipogénesis y la expansibilidad de la grasa blanca y por tanto conducir a una disfunción metabólica [7].

Estudios *ex vitro* han demostrado como WNT5A es secretado por los macrófagos que infiltran el tejido adiposo y que inhibe tanto la adipogénesis de células madre humanas mediante la activación de la vía no canónica dependiente de la cinasa C-Jun N-terminal (JNK1) [104], como la actividad de transcripción del receptor gamma activador de la proliferación del peroxisoma (PPARG) conocido factor adipogénico [105, 106].

Recientemente se ha propuesto que la proteína WNT5A podría actuar como una molécula proinflamatoria clave en el desarrollo de la inflamación de bajo grado presente en la obesidad [107]. Estudios epidemiológicos realizados en humanos han demostrado que en pacientes obesos los niveles en suero de WNT5A son más elevados que en individuos delgados [108] y que los niveles de WNT5A en sangre disminuyen en los pacientes obesos después de ser sometidos a un by-pass gástrico [109]. Finalmente, Ouchi y cols. han propuesto que podría ser uno de los factores desencadenantes de la resistencia a la insulina por su capacidad para activar JNK1 en los adipocitos a través de la vía no canónica [110]. No obstante, no existen estudios en pediatría que relacionen la proteína WNT5A con la obesidad infantil.

1.5.2 SFRP5

Los miembros de la familia de proteínas secretadas similar a frizzle (SFRPs), actúan como inhibidores solubles de la señal Wnt y se asocian con diferentes tipos de cáncer [111-113], artritis reumatoide [114], enfermedad coronaria [115] y retinitis pigmentosa [116].

1.5.2.1 ESTRUCTURA

En la actualidad se han descrito 5 tipos de SFRPs en humanos, que comparten una estructura muy similar (Figura 11), SFRP1, SFRP2, SFRP3, SFRP4 y SFRP5. Todas ellas son glucoproteínas de un tamaño aproximado de 30 kDa. En el extremo N-terminal se encuentra el dominio CRD rico en cisteína que es homólogo a la porción extracelular del receptor Frizzled de Wnt [117], por lo que se considera que es el sitio de unión a Wnt.

Tras el dominio CRD y separado por una pequeña región que los une, se encuentra el dominio NTR, caracterizado por presentar una serie de aminoácidos hidrófobos y otros 6 residuos de cistina. Hasta el momento se desconoce la función de este dominio, sin embargo, existen estudios que demuestran que es necesaria la presencia de los dos dominios para que se produzca la inhibición de la señal Wnt [118, 119].

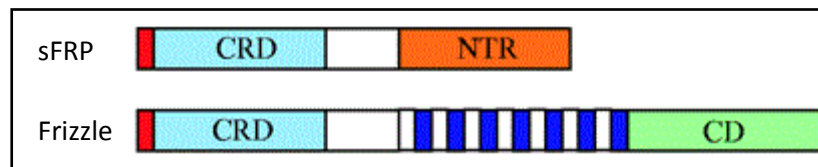


Figura 11| Estructura sFRP: CRD dominio rico en cisteína homólogo al dominio CRD de las proteínas frizzled, receptor de Wnts [6]

Las proteínas sFRPs pueden sufrir modificaciones post-traduccionales, como glicosilaciones o sulfataciones, estas transformaciones podrían conferir diferentes capacidades funcionales a los miembros de la familia [120, 121].

1.5.2.2 MECANISMOS DE ACCIÓN

Los primeros estudios demostraron que las proteínas SFRPs actuaban por unión directa a Wnt, inhibiendo la unión al receptor de membrana y como consecuencia

interrumpiendo la señal Wnt [122]. Posteriormente varios estudios han planteado que además de la unión directa con Wnt existen otros mecanismos de inhibición [123], como la formación de complejos no funcionales con el receptor Frizzled [124].

Estudios realizados en ratones y embriones de *Xenopus* [119] han demostrado que los patrones de expresión de SFRPs son paralelos a los de Wnt. En la actualidad muchos autores opinan que las proteínas SFRPs son algo más que simples antagonistas de la vía Wnt. Se ha propuesto que las SFRPs controlarían el desarrollo morfogénico generando un gradiente de actividad de señal Wnt que se modifica según las necesidades del organismo, o bien que la expresión de SFRPs estaría regulada por las mismas proteínas Wnts [119].

Para aumentar la complejidad del sistema, los SFRPs, en determinadas circunstancias, pueden actuar como activadores de la señal Wnt. Estudios realizados en cultivos celulares demuestran que la actuación de las SFRPs varía según su propia concentración y la concentración de receptores Frizzled disponibles [6].

Bovolenta y cols. [117] propusieron 4 modelos de actuación de las proteínas SFRPs:

- Antagonistas de la señalización de Wnt por secuestro extracelular de Wnt, con reducción de la actividad canónica y no canónica.
- Antagonista de Wnt por bloqueo del receptor Frizzled y reducción de la actividad Wnt por las vías canónica y no canónica.
- Agonista de la vía canónica por unión de SFRP al receptor Frizzled.
- Agonista de las vías canónica y no canónica por facilitar el transporte y la unión de Wnt al receptor.

Además de su papel durante el desarrollo embrionario y la promoción del desarrollo tumoral [125], las SFRPs juegan un papel importante en la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células de los tejidos adultos.

1.5.2.3 REGULACIÓN

Uno de los mecanismos reguladores de la expresión de SFRP5 es la estimulación de la adipogénesis. En estudios realizados *in vitro* se observó que la transcripción y la secreción de SFRP5 aumenta gradualmente con la diferenciación y maduración de los pre-adipocitos, [126].

En los adipocitos maduros disminuye la expresión de mRNA de SFRP5 y la secreción de la proteína después del tratamiento con dexametasona, insulina y TNF- α . Por el contrario el tratamiento con rosiglitazone y metformina aumenta tanto la expresión de mRNA como la secreción de SFRP5. El aumento de la expresión y secreción de SFRP5 podría ser uno de los mecanismos por los cuales los antidiabéticos orales rosiglitazone y metformina mejoran la sensibilidad a la insulina [126].

Por otra parte, parece que la secreción de SFRP5 puede estar regulada por la ingesta. En un estudio realizado en pacientes obesos se observó como la restricción calórica aumentaba los niveles de SFRP5 en sangre de forma significativa lo que sugiere un nuevo mecanismo regulador y abre las puertas a la terapia nutricional [108].

1.5.2.4 SFRP5 Y TEJIDO ADIPOSO

En el tejido adiposo la proteína SFRP5 se une a WNT5A en el espacio extracelular, para restringir sus acciones proinflamatorias y de resistencia a la insulina. En 2010 Ouchi y cols. realizaron un estudio en el que demostraron que los ratones deficientes en SFRP5 alimentados con una dieta rica en grasas presentaban intolerancia a la glucosa, esteatosis hepática e infiltración de macrófagos en el tejido adiposo. A partir de estos resultados los autores propusieron un modelo que explicara el mecanismo de acción de SFRP5 en el tejido adiposo (Figura 12).

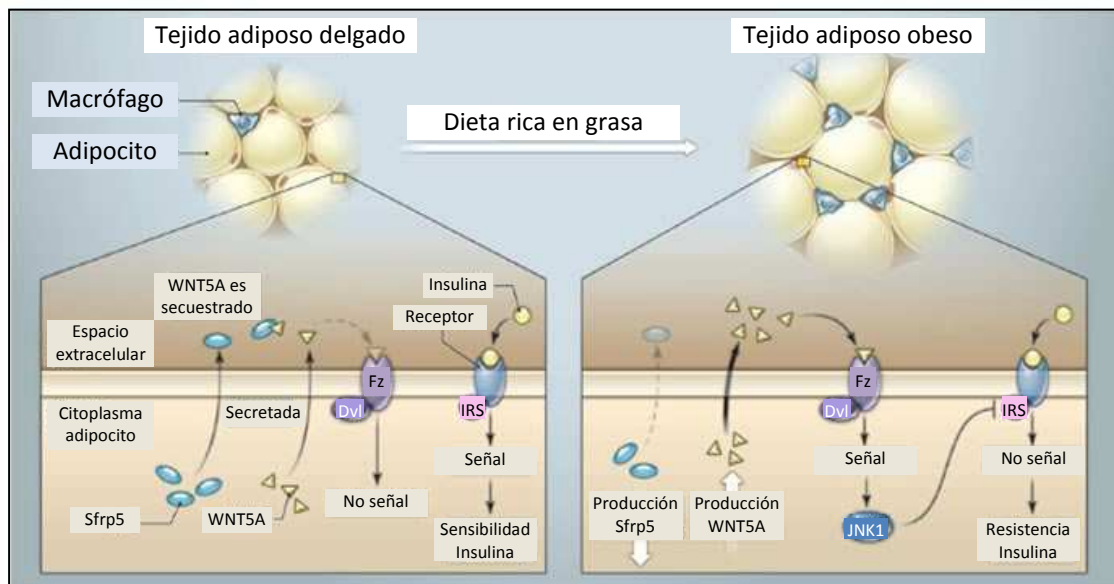


Figura 12 | Modelo de la inhibición de la señal WNT5A (vía no canónica) por parte de SFRP5 y su relación con la resistencia a la insulina [9].

En el tejido adiposo del obeso, WNT5A es secretado por los macrófagos del tejido adiposo donde activa la señal Wnt por la vía no canónica y a su vez activa la cinasa c-Jun N-terminal 1 (JNK1) activando la respuesta inflamatoria e inhibiendo el receptor de la insulina 1 (IRS1) lo que conduce a un aumento de la resistencia a la insulina [127].

Estudios realizados en murinos demostraron diferencias entre los ratos delgados y los obesos en cuanto a WNT5A y SFRP5. Concretamente los ratones delgados

presentaron menor infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, y por lo tanto menores concentraciones de WNT5A. El WNT5A era secuestrado en el espacio extracelular por la proteína SFRP5 secretada por los adipocitos, inhibiendo así la señal Wnt y favoreciendo un fenotipo metabólicamente sano (Figura 12). En cambio, los ratones obesos y diabéticos tipo 2 presentaron hipertrofia del tejido adiposo y en consecuencia un aumento en el número de macrófagos. Los adipocitos hipertrofiados secretaron menores cantidades de SFRP5 y más de WNT5A, el resultado fue un aumento de la unión de WNT5A a su receptor y por lo tanto una activación de la vía Wnt, lo que condujo a la activación de la respuesta inflamatoria y mayor resistencia a la insulina por inhibición de IRS-1 [110]. Por otra parte, el hecho de que la resistencia a la insulina sea sistémica junto con la observación de que la administración de SFRP5 a ratones obesos y diabéticos mejoraba su tolerancia a la glucosa y disminuía la inflamación del tejido adiposo condujo a los autores a proponer que SFRP5 es una nueva citocina con propiedades antiinflamatorias [110].

En estudios realizados en humanos, la alteración del balance entre WNT5A y su inhibidor SFRP5 también ha sido señalada como una de las causas de la inflamación de bajo grado del tejido adiposo y la resistencia a la insulina presentes en individuos obesos [107]. Además, se han relacionado niveles de SFRP5 bajos en sangre con obesidad y diabetes tipo 2 [128, 129] y se ha observado que en pacientes obesos la restricción calórica y consecuente disminución de peso aumenta los niveles de SFRP5 [108], lo que sugiere que la terapia nutricional puede regular el equilibrio WNT5A-SFRP5 y disminuir la inflamación de bajo grado presente en la obesidad.

Aunque no todos los trabajos publicados coinciden en otorgar el papel de nueva citocina antiinflamatoria a SFRP5 [130], si existe un consenso generalizado sobre el

papel potencial de la regulación del eje WNT5A-SFRP5 como diana terapéutica en las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad. No obstante, aún no está claro cuál es la relación entre WNT5A y SFPR5 en la obesidad infantil.

1.5.3 CRTC3

La proteína CRTC3 forma parte de una familia de proteínas CRTCs (CRTC1, CRTC2, y CRTC3) que tienen un papel clave en la regulación y activación de numerosos genes relacionados con el metabolismo energético y la supervivencia celular (Figura 13) [8, 131-133].

Concretamente, CRTC3 se expresa predominantemente en el tejido adiposo y se activa por desfosforilación en respuesta al aumento intracelular del segundo mensajero adenosin monofosfato cíclico (AMPC).

TEJIDO	CRTC	FUNCIÓN METABÓLICA
Hígado	CRTC2 y 3	Aumento de la gluconeogénesis
Tejido adiposo	CRTC3	Aumento de la resistencia a la insulina Obesidad
Células pancreáticas	CRTC2	Aumento de la supervivencia
Hipotálamo	CRTC1	Disminución del apetito Favorece la fertilidad
Músculo esquelético	CRTC1,2,3	Biogénesis mitocondrial
Macrófagos	CRTC3	Conversión a macrófagos reguladores

Figura 13| Funciones metabólicas de los diferentes CRTCs dependiendo del tejido en que se expresen

1.5.3.1 ESTRUCTURA

Todos los CRTCs comparten una estructura muy similar (Figura 14). En el extremo N-terminal se encuentra la zona (CBD) lugar donde se une una proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc (CREB); después se encuentra una zona central, conocida como región reguladora, donde se encuentran varios residuos de serina que son susceptibles de ser fosforilados por cinasas como la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), la cinasa reguladora de la afinidad de los microtúbulos 2 (MARK2) y la cinasa inducida por salt 2 (SIK2). La fosforilación de la serina 162 de CRTC3 por la cinasa SIK2 promueve su unión a la proteína 14-3-3 que mantiene a CRTC3 retenido en el citoplasma. Después viene una pequeña zona de *splicing* alternativo y por último un dominio de transactivación en el extremo C-terminal [134-136].

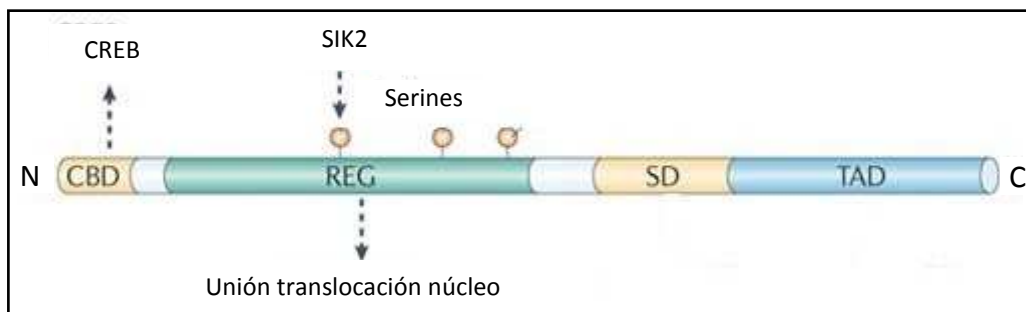


Figura 14| Estructura CRTC: (CBD) zona de unión a CREB, (REG) zona de unión a cinasas, (SD) zona de *splicing* alternativo y (TAD) dominio de transactivación [8].

1.5.3.2 MECANISMOS DE ACCIÓN

En 2010 Song y cols. publicaron un trabajo en la revista *Nature* en el que propusieron que el gen del coactivador-3 de la transcripción regulado por CREB (CRTC3) actuaba como un gen ahorrador. En experimentos realizados en ratones comprobaron que los ratones con el gen CRTC3 silenciado tenían un mayor gasto

energético, no engordaban a pesar de ser alimentados con una dieta rica en grasas y además estaban protegidos contra la esteatosis hepática [137].

CREB es una proteína que actúa como factor de transcripción. Fue descrita por primera vez en 1987 [138]. Se activa por fosforilación y tiene la capacidad de unirse a unos 5.000 genes en los mamíferos [139], pero activa la transcripción solamente de unos 100 genes, hecho que hizo pensar que debían existir otras moléculas que modulaban la capacidad de CREB para activar la expresión génica. La identificación de los CRTCs y su mecanismo de acción [140] proporcionó una explicación de cómo es posible aumentar la especificidad de la señal en la vía de CREB.

Para que se produzca la activación de los genes regulados por CREB es necesario que se produzca la convergencia de dos eventos, de una parte la fosforilación de CREB y por otra parte la desfosforilación de CRTC (Figura 15), esta doble activación explicaría por qué algunas señales que producen la fosforilación de CREB no son capaces de activar la expresión de determinados genes [8].

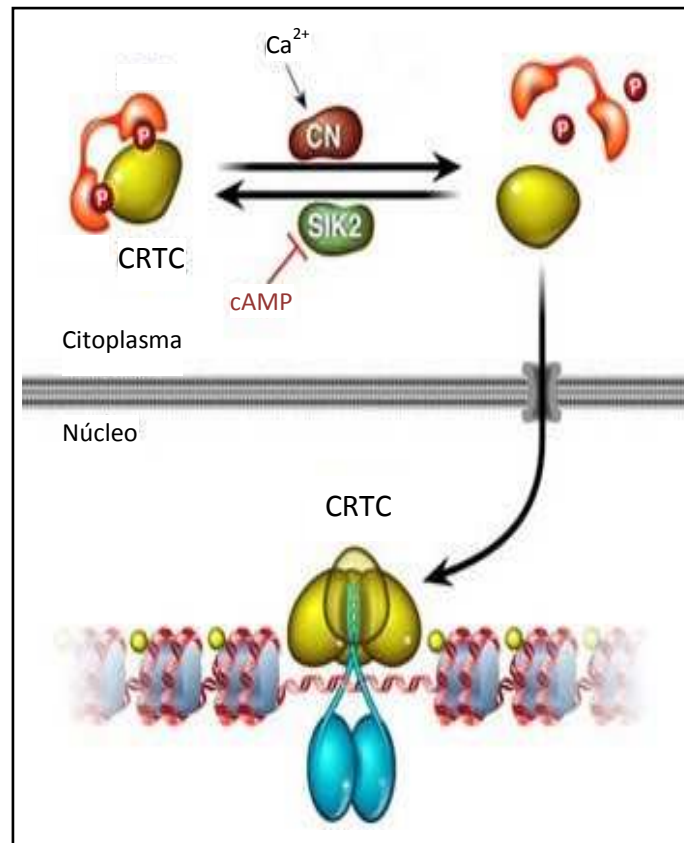


Figura 15 | Activación y Translocación de CRTC: Calmodulina (CN); Cinasa sal inducible 2 (SIK2) proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc (CREB).(adapatado de Montminy lab)

En el estado basal, CRTC3 está fosforilado en la serina 162 por la acción de las cinasas sal inducibles (SIKs) y algunos miembros de la familia de la proteína cinasa activada por AMP (AMPKs) reguladora del balance energético [141, 142]. El aumento de AMPc y Ca²⁺ intracelular, provocan la desfosforilación de CRTC. El CRTC desfosforilado (activo) es capaz de entrar al núcleo y unirse al dominio bZIP de CREB fosforilado (activo) [140, 142] y regular así la actividad de CREB [134-136].

1.5.3.3 REGULACIÓN

La actividad de la proteína CRTC3 en el tejido adiposo está regulada en parte, por señales hormonales:

- 1) La administración de leptina y del agonista β -adrenérgico isoproterenol producen la desfosforilación de CRT3 [137].
- 2) Las catecolaminas activan el receptor β -adrenérgico que se encuentra en la superficie del adipocito. El receptor se acopla a una proteína G que activa la Adenil Ciclasa (AC), enzima que transforma ATP en AMPc [143]. El AMPc por una parte activa la proteína quinasa A (PKA), enzima activadora de CREB [144], y por otra parte inhibe SIK2 [145] que es una enzima inhibidora de la desfosforilación de CRT3, de esta forma el AMPc activa tanto a CREB como a CRT3. No obstante, se ha comprobado que después de una estimulación prolongada con AMPc disminuye la transcripción de los genes diana de CREB en parte debido a la degradación de CRTCs mediada por ubiquitinas [146].

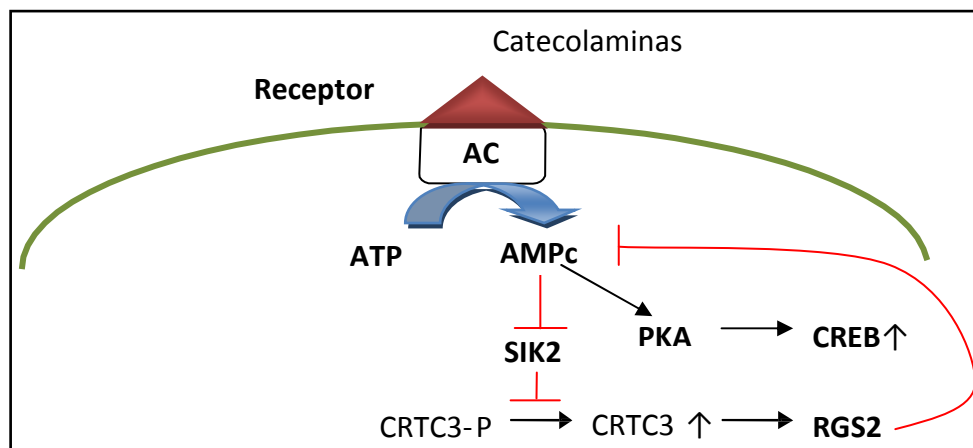


Figura 16 | *Feedback* negativo de CRT3 sobre la señal de AMPc.

Según se desprende de los experimentos realizados en ratones, CRT3 podría ejercer un *feedback* negativo sobre la señal AMPc en el adipocito (Figura 16). Esta hipótesis se apoya en el hecho demostrado de que las señales intracelulares a menudo se auto limitan para evitar que los estímulos hormonales produzcan respuestas crónicas que puedan ser lesivas para el organismo [147].

En situaciones de sobrealimentación con dieta rica en grasas, la estimulación crónica de las catecolaminas no produce un aumento de AMPc sino una disminución de la señal intracelular [148], este hecho puede estar mediado por CRT3 a través de la activación de la expresión del gen regulador de la señal de la proteína G 2 (RGS2), que inhibe la actividad de la AC. Al disminuir la acción lipolítica y de oxidación de los ácidos grasos de las catecolaminas, CRT3 favorecería la acumulación de grasa en épocas de abundancia y preservaría la supervivencia en periodos de escasez, lo que se conoce como genotipo ahorrador.

1.5.3.4 CRT3 Y TEJIDO ADIPOSO

Se sabe que CREB modula el metabolismo lipídico en el adipocito, que su actividad está aumentada en la obesidad y que tiene un papel fundamental en la aparición de la resistencia a la insulina a través de la estimulación de un represor que inhibe la transcripción de adiponectina [81]. Además, es conocido que CRT3 es el coactivador de CREB más abundante en el adipocito y como era de esperar, se ha demostrado que tiene un papel principal en la regulación del metabolismo lipídico en el tejido adiposo y en el desarrollo de la resistencia a la insulina relacionada con la obesidad [137].

Aunque no se conocía el mecanismo, se sabía que en la obesidad está alterada la señal de catecolaminas [149] y que la estimulación de los receptores β - adrenérgicos en los adipocitos por la vía de AMPc aumenta el gasto energético a través del aumento de la lipólisis y la oxidación de los ácidos grasos [150]. Por otra parte otro hecho conocido es que la alteración en la vía de las catecolaminas es una de las causas de la acumulación de grasa ectópica en el hígado y como consecuencia del desarrollo de resistencia a la insulina [151].

En ausencia de obesidad, la leptina, hormona sintetizada en el adipocito, promueve el gasto energético activando receptores del hipotálamo que a su vez actúan estimulando el sistema nervioso simpático. En el tejido adiposo la adrenalina se une a los receptores β -adrenérgicos de los adipocitos produciendo un aumento de la lipólisis en la grasa blanca y el aumento de la oxidación de ácidos grasos en la grasa marrón (Figura 17) [152]. Hasta la fecha no existen estudios que demuestren la presencia de CRTC3 en sangre ni su relación con la obesidad en humanos.

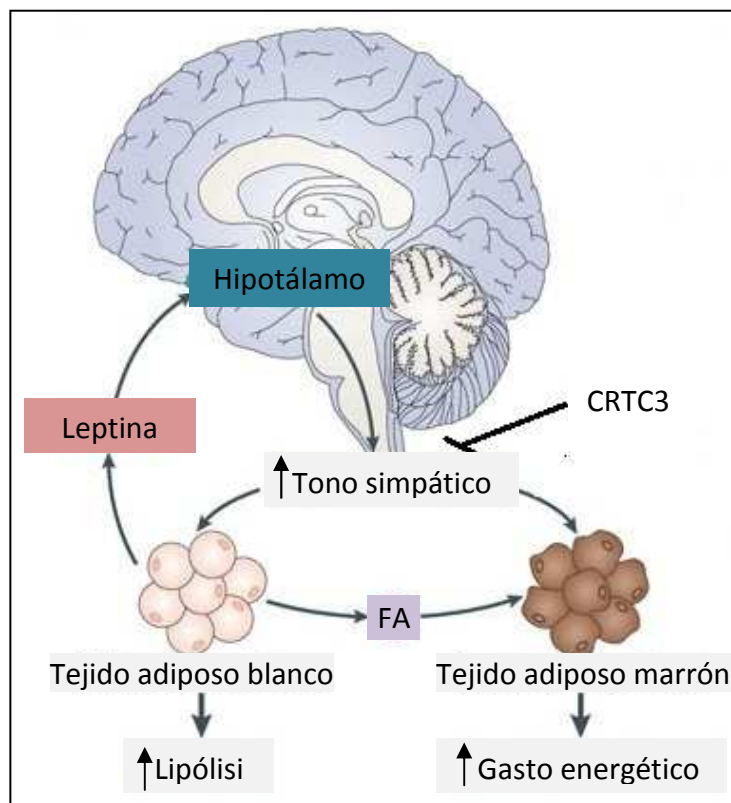


Figura 17 | CRTC3 inhibe la vía de catecolaminas [8]

HIPÓTESIS

Hipótesis

Se ha descrito que las proteínas WNT5A, SFRP5 y CRTC3 podrían estar relacionadas con el metabolismo energético y la obesidad.

Hipótesis 1

Proponemos que el tejido adiposo puede secretar WNT5A, SFRP5 y CRTC3 *ex vivo* y que estas proteínas pueden ser detectadas en sangre periférica de niños prepuberales sanos.

Hipótesis 2

Proponemos que los niveles circulantes en sangre periférica de WNT5A, SFRP5 y CRTC3 están relacionados con la obesidad y con parámetros de disfunción metabólica.

Hipótesis 3

Proponemos que la proteína SFRP5 podría ser una molécula clave para explicar las asociaciones entre WNT5A y el metabolismo energético en la edad pediátrica.

Hipótesis 4

Proponemos que los niveles circulantes en sangre periférica de WNT5A, SFRP5 y CRTC3 en la edad de 7 años pueden predecir el cambio en las variables de obesidad y disfunción metabólica de los niños a los 10 años de edad.

OBJETIVOS

Objetivos

Estudiar la secreción de las proteínas WNT5A, SFRP5 y CRT3 por parte del tejido adiposo y su relación con parámetros de obesidad y resistencia a la insulina en niños sanos prepuberales.

Para tal fin, se ha diseñado un estudio transversal y longitudinal en una muestra de niños sanos prepuberales procedentes de la población general que han sido estudiados con los objetivos concretos de:

1. Estudiar si el tejido adiposo puede secretar WNT5A, SFRP5 y CRT3 *ex vivo*.
2. Determinar si las concentraciones circulantes de WNT5A, SFRP5 y CRT3 están relacionados con marcadores de obesidad (índice de masa corporal y perímetro de la cintura), de resistencia a la insulina (índice HOMA-IR y adiponectina de alto peso molecular) y función hepática (GPT y GGT) en una población pediátrica.
3. Estudiar si las proteínas WNT5A y SFRP5 están interrelacionadas en la circulación y en el medio de cultivo de las biopsias de tejido adiposo en niños prepuberales sanos.
4. Estudiar como las concentraciones basales de WNT5A, SFRP5 y CRT3 se asocian a los marcadores de obesidad (IMC y perímetro de la cintura), de resistencia la insulina (HOMA-IR y adiponectina de alto peso molecular) y función hepática (GPT y GGT) tras tres años de seguimiento de la cohorte.

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 DISEÑO

Estudio clínico observacional en la población pediátrica de referencia de los Centros de Salud de *l'Alt Empordà*. El diseño se basa en un análisis transversal en niños de ~7 años de edad y su posterior seguimiento a los ~10 años de edad.

4.2 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Dr. Josep Trueta de Girona (comité de referencia). Se obtuvo el consentimiento informado de los tutores de todos los niños participantes en el estudio. En todo momento se han respetado los principios fundamentales de la declaración de Helsinki así como la legislación vigente sobre confidencialidad de datos y las normas éticas sobre estudios clínicos en pacientes pediátricos.

4.3 SUJETOS A ESTUDIO

En el estudio transversal se estudiaron 211 niños caucásicos en edad escolar (103 niños y 108 niñas; edad 6.9 ± 0.2 años). Los niños fueron reclutados por los pediatras de los centros de referencia de *l'Alt Empordà* durante la visita del niño sano. La participación en el estudio se cifró entre el 50 y el 70% dependiendo del centro de estudio. Todos los niños eran sanos y tenían todos los parámetros metabólicos dentro de la normalidad.

En el estudio longitudinal fueron estudiados 130 niños (63 niños y 67 niñas; edad 10.3 ± 0.2 años), lo que representa un 61.6 % de los individuos que comenzaron el estudio. Las características del grupo de casos perdidos no diferían significativamente del grupo que continuó en el estudio.

4.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN

Criterios de inclusión de la visita inicial:

1. Niños entre 6 y 9 años sanos pertenecientes al área de referencia.
2. Consentimiento informado firmado por los padres o tutores de los niños participantes.
3. Ausencia de pubertad según los estándares de Marshall y Tanner [153].

Criterios de inclusión de la visita de seguimiento:

1. Niños entre 9 y 12 años sanos incluidos en la primera fase del estudio.
2. Consentimiento informado firmado por los padres o tutores de los niños participantes.

Criterios de exclusión para ambos estudios:

1. Niños con enfermedades crónicas graves, enfermedades inflamatorias crónicas o enfermedades agudas intercurrentes en los últimos 15 días previos a la recogida de muestras, estos últimos niños se reincorporan al estudio una vez hayan pasado unos 15 días después de la resolución del proceso agudo.
2. Alteraciones de los resultados de la analítica básica realizada (hemograma y cribado de la función renal, hepática y tiroidea).
3. Niños que reciban tratamiento médico crónico.
4. Niños de raza no caucásica.
5. Niños sin el consentimiento informado firmado.

4.5 VARIABLES

4.5.1. VARIABLES CLÍNICAS

En todos los pacientes se realizó el examen clínico y la extracción sanguínea en ayunas a primera hora de la mañana.

Se midió la altura con un estadiómetro de Harpender. Para pesar a los niños se utilizaron básculas calibradas con los sujetos vestidos con ropa ligera. Posteriormente se calculó el índice de masa corporal (IMC) según la fórmula $IMC = \text{peso (Kg)} / \text{talla (m}^2\text{)}$. Para este estudio se expresó el IMC como valores tipificados (*z-score*) calculados a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{ValorZ} - IMC = \frac{(\text{valor IMC observado}) - (\text{valor de la media de la población de referencia})}{\text{Desviación estándar de la población de referencia}}$$

Los resultados obtenidos son valores estandarizados por edad y por sexo utilizando valores de referencia regionales [25]. El punto de corte utilizado para determinar la presencia de obesidad fue un valor Z de $IMC \geq 2$ que equivale aproximadamente al percentil 97, valores Z de IMC entre 1.5 y 2 se consideraron como sobrepeso.

El perímetro de la cintura se midió utilizando una cinta métrica con precisión de 1 mm, tomando como punto de referencia el ombligo. El perímetro pélvico se midió utilizando una cinta métrica con precisión de 1 mm, tomando como punto de referencia el diámetro mayor de la cadera. En el estudio se utiliza el perímetro de la cintura z-score calculados a partir de la siguiente fórmula:

Valor z – perímetro de la cintura =

$$= \frac{(\text{valor perímetro cintura observado}) - (\text{valor de la media de muestra})}{\text{Desviación estándar de la muestra}}$$

La tensión arterial sistólica (TAS) y diastólica (TAD), así como la frecuencia cardiaca se midieron en posición supina en el brazo derecho y después de 10 minutos de reposo con un esfigmomanómetro electrónico (Dinamap Pro 100, GE Healthcare, Chalfont ST. Gilles, United Kingdom), la medida se realizó tres veces en cada sujeto en intervalos de 5 minutos entre cada toma, el resultado registrado fue la media de todas las medidas realizadas.

La composición corporal (masa grasa, masa magra y agua corporal) se midió mediante impedanciometría electrónica (Hydra Bioimpedance Analyzer 4200, Xitron Technologies, San Diego, CA), esta técnica no es invasiva y ha sido validada para estudios realizados en niños [154].

4.5.2. VARIABLES ANALÍTICAS

Se realizó una extracción de sangre venosa (máximo 15 ml de sangre), que sirvió para la realización de una analítica general (hemograma, estudio del hierro, función renal y función hepática) y para la elaboración de una seroteca, una plasmoteca y una DNATECA para futuros estudios.

El procedimiento de extracción se realizó en un ambiente tranquilo y por personal especializado. Previo a la extracción se aplicó una crema anestésica local para evitar dolor durante la venopunción.

4.5.2.1. ELABORACIÓN DE UNA SEROTECA Y UNA PLASMOTECA

Para obtener plasma se recogió muestra de sangre venosa en tubos vacuette con EDTA como anticoagulante. El suero se recogió en tubo vacuette con separador de gel inerte y se dejó reposar unos 30 minutos para que se formase el coágulo. Todas las muestras se centrifugaron a 3.500 rpm durante 15 minutos a una temperatura inferior a 8 °C, en un plazo de tiempo siempre inferior a dos horas después de la extracción.

Se hicieron diversas alícuotas de suero, plasma y de fracción celular obtenida a partir del tubo de EDTA. Todas las muestras se guardaron en congelador a -80 °C, etiquetadas de forma anónima.

4.5.2.2. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS Y HORMONALES

Las determinaciones de glucosa (método de la hexoquinasa), HDL-colesterol (método homogéneo detergente selectivo con acelerador), triglicéridos (oxidasa de glicerol fosfato), gamma-glutamil transferasa (GGT) (método substrato de L-gammaglutamil-3-carboxi-4-nitroanilida), aspartato aminotransferasa (GOT) (método NADH sin P-5'-P) y la alanina aminotransferasa (GPT) (método NADH sin P-5'-P), fueron realizadas en un autoanalizador C8000 (Abbott Park, IL, US), con unos CV intra-inter ensayo inferiores al 6 %.

La insulina fue medida mediante immunoquimioluminiscencia (IMMULITE 2000, Diagnostic Products, Los Angeles, CA), el límite de detección de la técnica fue de 0.4 mIU/L y el coeficiente intra-inter ensayo fue menor del 10 %. Para estimar la sensibilidad a la insulina se utilizó el Homeostasis Model Assessment [HOMA-IR] [155]. El modelo ha sido validado en diversas poblaciones pediátricas.

$$Homa - IR = \frac{\text{insulina } (\mu U/ml) \times \text{glucosa } (mmol/L)}{22.5}$$

La proteína C reactiva ultrasensible (PCRus) fue determinada utilizando el inmunoensayo ultrasensible latex CRP Vario (Sentinel Diagnostics, Abbott Diagnostics Europe, Milan, Italy). El límite de detección de la técnica fue de 0.2 mg/L y el coeficiente intra-inter ensayo fue menor del 3 %. Todos los valores obtenidos inferiores a 0.2 mg/L fueron computados como 0.2 mg/L para su utilización en los cálculos estadísticos.

La testosterona y el estradiol se midieron mediante inmunoquimioluminiscencia (Abbot Park, IL, USA), las técnicas tenían un límite de detección de 1 µg/dl, 2.3 ng/dl y 1 pg/ml, respectivamente; el CV de todas las técnicas fue inferior a 6%.

La adiponectina de alto peso molecular (Adiponectina de APM) se cuantificó en suero mediante ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) tipo sándwich (Linco, St. Charles, MO), la técnica tenía un límite de detección de 0.2 ng/ml; el CV de la técnica fue inferior al 4 % [156, 157].

4.5.2.3. DETERMINACIÓN GROSOR DE LA ÍNTIMA MEDIA CAROTIDEA

El grosor de la íntima-media (GIM) se midió por ultrasonografía de alta resolución con un transductor lineal de 12-MHz (MyLabTM25, Esaote, Firenze, Italy). Las imágenes diastólicas se midieron en el lado derecho a nivel de la arteria carótida común, 1-2 cm antes de su bifurcación [158].

Todas las medidas fueron realizadas por un único investigador, experto en ecografía vascular, que desconocía las características clínicas de los participantes. El resultado es el promedio de 5 mediciones sucesivas realizadas durante la diástole cardíaca. El coeficiente de variación intra-individual fue inferior al 6%.

4.5.3 VARIABLES ESPECÍFICAS

4.5.3.1 WNT5A

Para llevar a cabo la determinación cuantitativa de la proteína WNT5A se ha utilizado un kit comercial denominado “*ELISA Kit for Wingless Type MMTV Integration Site Family, Member 5A (WNT5A)*” con numero de catalogo SEP549Mi de Uscn. Este kit utiliza anticuerpos policlonales específicos altamente reactivos contra la WNT5A humana. No se ha detectado una reactividad cruzada con otras proteínas WNT.

El kit para la detección de la WNT5A consiste en una ELISA de fase solida basado en el método de sándwich que utiliza dos anticuerpos policlonales anti-WNT5A para detectar la proteína en seis pasos. Uno de los anticuerpos estaba fijado en la placa bloqueada contra uniones no específicas. A continuación, 100 µl de las muestras no diluidas y los estándares fueron añadidos directamente a cada pocillo e incubados durante 2 horas a 37°C y agitación suave. El segundo paso consistió en lavar la placa tres veces con 400 µl de *wash buffer* y añadir 100 µl del segundo anticuerpo anti-WNT5A (*detection reagent A*) y se incubó una hora a 37°C con agitación suave. Pasada esta hora se lavó de nuevo la placa tres veces con 400 µl de *wash buffer* y se añadieron 100 µl del *detection reagent B* (peroxidasa) y se incubó 30 minutos a 37°C con agitación suave. Pasado este tiempo se lavó 5 veces con el *wash buffer* y se añadieron 90 µl del sustrato de la peroxidasa (TMB). Se incubó 15-25 minutos a 37°C y agitación

suave. La reacción entre la peroxidasa y el TMB resultó en el desarrollo de color amarillo. La cantidad de color fue proporcional a la cantidad de WNT5A presente en las muestras y los estándares. Para poder cuantificarlo se paró la reacción con 50 µl de solución stop (H₂SO₄ 0.5 mol/L).

Finalmente ya se pudo medir la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas de ELISA para obtener la absorbancia de cada una de las muestras. Esta absorbancia sirvió para obtener las concentraciones de WNT5A de cada muestra. Mediante una recta loglineal creada con los estándares y por interpolación de la absorbancia de nuestras muestras en esta, se obtuvieron las concentraciones en ng/ml.

Las características del ensayo fueron: El rango de la curva estándar fue de 0.156 ng/ml a 10 ng/ml. El límite de detección fue de 0.054 ng/ml y el CV fue del 6%. La capacidad total del ensayo es de 96 cuantificaciones y se necesitan: 200 µl del volumen final para poder hacer los duplicados, una recta patrón y controles y blancos en cada ensayo. La duración del ensayo fue aproximadamente de cuatro horas y media. Para evitar la contaminación de las muestras usamos puntas de micropipetas automáticas de un solo uso.

4.5.3.2 SFRP5

Para llevar a cabo la determinación cuantitativa de la proteína SFRP5 se ha utilizado un kit comercial denominado "*High Sensitive ELISA Kit for Secreted Frizzled Related Protein 5 (SFRP5)*" con número de catálogo HEC842Hu de Uscn. Este kit utiliza anticuerpos policlonales específicos altamente reactivos contra la SFRP5 humana. No se ha detectado una reactividad cruzada con otras proteínas análogas.

El kit para la detección de la SFRP5 consiste en una ELISA de fase sólida basado en el método de sándwich que utiliza dos anticuerpos policlonales anti- SFRP5 para detectar la proteína en seis pasos. Uno de los anticuerpos estaba fijado en la placa bloqueada contra uniones no específicas. A continuación, 100 µl de las muestras no diluidas y los estándares fueron añadidos directamente a cada pocillo e incubados durante 2 horas a 37°C y agitación suave. El segundo paso consistió en lavar la placa tres veces con 400 µl de *wash buffer* y añadir 100 µl del segundo anticuerpo anti-WNT5A (*detection reagent A*) y se incubó una hora a 37°C con agitación suave. Pasada esta hora se lavó de nuevo la placa tres veces con 400 µl de *wash buffer* y se añadieron 100 µl del *detection reagent B* (peroxidasa) y se incubó 30 minutos a 37°C con agitación suave. Pasado este tiempo se lavó 5 veces con el *wash buffer* y se añadieron 90 µl del sustrato de la peroxidasa (TMB). Se incubó 15-25 minutos a 37°C y agitación suave. La reacción entre la peroxidasa y el TMB resultó en el desarrollo de color amarillo. La cantidad de color fue proporcional a la cantidad de SFRP5 presente en las muestras y los estándares. Para poder cuantificarlo se paró la reacción con 50 µl de solución stop (H_2SO_4 0.5 mol/L).

Finalmente ya se pudo medir la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas de ELISA para obtener la absorbancia de cada una de las muestras. Esta absorbancia sirvió para obtener las concentraciones de SFRP5 de cada muestra. Mediante una recta loglineal creada con los estándares y por interpolación de la absorbancia de nuestras muestras en esta, se obtuvieron las concentraciones en ng/ml.

Las características del ensayo fueron: El rango de la curva estándar fue de 1.56 ng/ml a 100 ng/ml. El límite de detección fue de 0.51 ng/ml y el CV fue del 4%. La capacidad total del ensayo es de 96 cuantificaciones y se necesitan: 200 µl del volumen final para poder hacer los duplicados, una recta patrón y controles y blancos en cada ensayo. La duración del ensayo fue aproximadamente de cuatro horas y media. Para evitar la contaminación de las muestras usamos puntas de micropipetas automáticas de un solo uso.

4.5.3.3 CRT3

Para llevar a cabo la determinación cuantitativa de la proteína CRT3 se ha utilizado un kit comercial denominado “*ELISA Kit for CREB Regulated Transcription Coactivator 3 (CRT3)*” con numero de catalogo SEE001Hu de Uscn. Este kit utiliza anticuerpos policlonales específicos altamente reactivos contra la CRT3 humana. No se ha detectado una reactividad cruzada con otras proteínas análogas.

El kit para la detección de la CRT3 consiste en una ELISA de fase solida basado en el método de sándwich que utiliza dos anticuerpos policlonales anti- CRT3 para detectar la proteína en seis pasos. Uno de los anticuerpos estaba fijado en la placa bloqueada contra uniones no específicas. A continuación, 100 µl de las muestras no diluidas y los estándares fueron añadidos directamente a cada pocillo e incubados durante 2 horas a 37°C y agitación suave. El segundo paso consistió en lavar la placa tres veces con 400 µl de *wash buffer* y añadir 100 µl del segundo anticuerpo anti-WNT5A (*detection reagent A*) y se incubó una hora a 37°C con agitación suave. Pasada esta hora se lavó de nuevo la placa tres veces con 400 µl de *wash buffer* y se añadieron 100 µl del *detection reagent B* (peroxidasa) y se incubó 30 minutos a 37°C con

agitación suave. Pasado este tiempo se lavó 5 veces con el *wash buffer* y se añadieron 90 µl del sustrato de la peroxidasa (TMB). Se incubó 15-25 minutos a 37°C y agitación suave. La reacción entre la peroxidasa y el TMB resultó en el desarrollo de color amarillo. La cantidad de color fue proporcional a la cantidad de CRT3 presente en las muestras y los estándares. Para poder cuantificarlo se paró la reacción con 50 µl de solución stop (H₂SO₄ 0.5 mol/L).

Finalmente ya se pudo medir la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas de ELISA para obtener la absorbancia de cada una de las muestras. Esta absorbancia sirvió para obtener las concentraciones de CRT3 de cada muestra. Mediante una recta loglineal creada con los estándares y por interpolación de la absorbancia de nuestras muestras en esta, se obtuvieron las concentraciones en ng/ml.

Las características del ensayo fueron: El rango de la curva estándar fue de 0.313 ng/ml a 20 ng/ml. El límite de detección fue de 0.112 ng/ml y el CV fue del 5%. La capacidad total del ensayo es de 96 cuantificaciones y se necesitan: 200 µl del volumen final para poder hacer los duplicados, una recta patrón y controles y blancos en cada ensayo. La duración del ensayo fue aproximadamente de cuatro horas y media. Para evitar la contaminación de las muestras usamos puntas de micropipetas automáticas de un solo uso.

4.6 BIOPSIAS DE TEJIDO ADIPOSEO

Las biopsias de tejido adiposo (TA) visceral y subcutáneo se obtuvieron de 12 niños adicionales (10 niños y 2 niñas, edad 6.1 ± 1.3) las muestras se obtuvieron

durante intervenciones quirúrgicas menores programadas. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado. Todos los pacientes estaban asintomáticos (libres de cualquier enfermedad aguda o crónica), con recuento sanguíneo, función hepática y renal normal.

4.6.1 CULTIVO CELULAR

Las biopsias de TA se cortaron en fragmentos pequeños y se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) con un 5% de albúmina sérica bovina (BSA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Cantidades similares de tejido se distribuyeron en los pocillos de incubación (aproximadamente 300 mg de tejido/pocillo) con 1 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con un 1 % de sodio piruvato, 1 % de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomicina. Las muestras de TA se incubaron durante 48 horas a 37 °C de temperatura con CO₂ al 5%. Pasado este tiempo se guardo por separado el medio de cultivo y el tejido adiposo para medir las concentraciones de WNT5A, SFRP5, CRTC3 y realizar los estudios de viabilidad del TA.

4.6.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

El TA cultivado fue lavado en frío con un suero salino tamponado con fosfato, posteriormente se homogeneizó en solución RIPA (Upstate) suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 4 °C durante 30 minutos. Los restos celulares fueron eliminados por centrifugación a 2000 g durante 15 minutos en centrifuga refrigerada a 4 °C.

Las proteínas WNT5A, SFRP5 y CRT3 fueron medidas en el medio de cultivo y en el lisado de tejido adiposo utilizando los mismos ensayos comerciales empleados para la determinación en suero. Los resultados obtenidos se corrigieron por la concentración de proteínas totales determinadas por el método de Lowry [159] (Architect, Abbott Diagnostics Europe, Milan, Italy). Los CV intra e inter ensayo fueron menores del 4.7 %.

4.6.3 VIABILIDAD DE LAS BIOPSIAS DE TEJIDO ADIPOSO

Se evaluó la viabilidad de las biopsias del tejido adiposo midiendo la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo. La LDH fue medida por la técnica recomendada por la IFCC en que se mide la conversión de L-lacto a piruvato [160] (Architect, Abbott Diagnostics Europe, Milan, Italy). Los CV intra e inter ensayo fueron menores del 4.7 %.

Se consideró que la viabilidad era óptima cuando la concentración de LDH fue inferior a 220 U/L (valor correspondiente al límite superior de normalidad en suero de nuestra técnica).

4.7 ANÁLISIS WESTERN BLOT

Al ser la primera vez que se determinaba el CRT3 en suero humano se validó el kit comercial de ELISA para la detección de la proteína en sangre. Para ello se realizaron una serie de Western Blot en los que se estudió el CRT3 en sangre, tejido adiposo y medio de cultivo. Como control positivo se utilizaron células tumorales de

cáncer de mama MCF-7. Las células se cultivaron en DMEM siguiendo el mismo protocolo que las biopsias de tejido adiposo.

Se utilizó un anticuerpo primario policlonal anti CRT3 diluido 1:500 producido en conejo. El anticuerpo secundario anti conejo se utilizó diluido 1:1.000. Ambos anticuerpos eran de Cell Signaling Technology Inc (Danvers, MA, USA). Tanto las muestras control, como las muestras de tejido adiposo, medio de cultivo y suero siguieron el mismo protocolo para realizar el Western Blot. Se cargó la máxima cantidad de proteína posible según las concentraciones de proteína totales obtenidas para cada muestra y el volumen a cargar en el pocillo. Todas las muestras se incubaron a 70 °C durante 10 minutos con tampón LSD (Lithium Dodecyl Sulfate) y 500 mM de dithiothreitol (DTT) a una concentración 10X como agente reductor (Invitrogen, California, USA). La electroforesis se realizó utilizando el gel comercial bis-Tris al 4-12%, al finalizar se realizó la transferencia a membrana de nitrocelulosa. Después de bloquear la membrana con BSA, se incubó durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario. Acabada la incubación se hizo un lavado con PBS Tween, se incubó una hora con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y se reveló mediante el kit comercial Immobilion Western HRP Substrate (Millipore, Massachusetts, USA).

4.8 RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS

Todos los datos clínicos y experimentales mencionados se recogieron en una base de datos tipo *Microsoft Office Acces 2003*. El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa estadístico SPSS versión 18.0.

En primer lugar se hizo un análisis exploratorio de los datos para identificar los valores atípicos y perdidos. Las variables que no seguían una distribución normal fueron transformadas logarítmicamente. Los resultados de las variables se expresaron como la media \pm el intervalo de confianza del 95%. El nivel de significación estadística se fijó en una $p < 0.05$.

Para evaluar el impacto de las diferentes concentraciones de WNT5A sobre la obesidad y parámetros metabólicos en niños, se segmentó la población en tertiles de WNT5A y se estudiaron los cambios de las variables de interés a lo largo de los grupos de WNT5A mediante el análisis de la varianza (ANOVA). De la misma manera, para el SFRP5 se segmentó la población en cuartiles y en tertiles para estudiar el CRT3 y se realizó el mismo tipo de análisis estadístico anteriormente citado (ANOVA). Además, para la variable SFRP5 se realizó una *Odds Ratio* para ver si existe un efecto lindear en las concentraciones de SFRP5 para el riesgo de obesidad.

Posteriormente se realizaron análisis bivariados para estudiar las asociaciones entre las variables cuantitativas de interés. Para este fin se realizaron gráficos de dispersión y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson. Las asociaciones significativas encontradas en el análisis estadístico bivariado entre WNT5A, SFRP5 y CRT3 con parámetros metabólicos y de obesidad se corrigieron por variables de confusión como el sexo y la edad mediante el análisis de regresión múltiple utilizando el método introducir. El nivel significativo de las pruebas estadísticas se fijó en $p < 0.05$. Las asociaciones de las concentraciones basales de WNT5A, SFRP5A y CRT3 se analizaron mediante los mismos análisis estadísticos y utilizando el valor de las variables a los diez años de edad o bien el cambio en las variables estudiadas como la diferencia entre el valor al cabo de tres años menos el valor basal.

RESULTADOS

5.1 ESTUDIO DE SECRECIÓN PROTEICA EN BIOPSIAS DE TEJIDO

ADIPOSO

Para estudiar si las proteínas WNT5A, SFRP5 y CRTC3 pueden ser secretadas por el tejido adiposo visceral y subcutáneo de niños sanos prepuberales, se cultivaron 12 biopsias de tejido adiposo obtenidas de niños sanos sometidos a operaciones de cirugía no complicada. Además de las muestras de tejido se les hizo una extracción de sangre.

5.1.1 IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEINA CRTC3

5.1.1.1 WESTERN BLOT DE CRTC3

Nuestros resultados demuestran por primera vez que la proteína CRTC3 puede ser detectada tanto en el tejido adiposo como en la sangre de los niños sanos prepuberales. En la Figura 18 se puede observar como la proteína CRTC3 fue detectada en el lisado de células de tejido adiposo tanto visceral como subcutáneo, en los medios condicionados del tejido adiposo visceral y subcutáneo y en la muestra de suero. Es de resaltar que la mayor concentración de CRTC3 se encontró en las muestras de medio condicionado y en especial en el medio condicionado del tejido adiposo visceral.

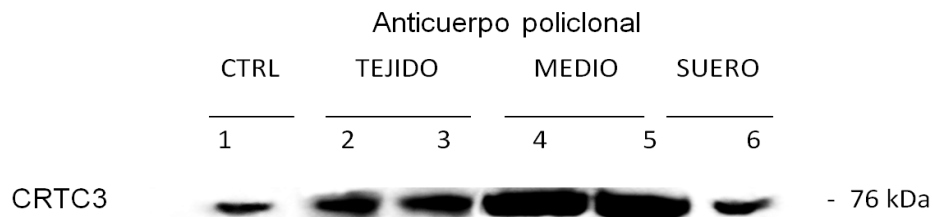


Figura 18 | Western Blot CRTCC3: 1) MCF-7 control positivo; 2) lisado de tejido adiposo visceral; 3) lisado de tejido adiposo subcutáneo; 4) medio de cultivo de tejido adiposo visceral; 5) medio de cultivo de tejido adiposo subcutáneo; 6) suero del niño en edad prepuberal.

5.1.1.2 ELISA DE CRTCC3

Los resultados obtenidos por *western blot* fueron confirmados también por la técnica ELISA (Figura 19). La concentración de CRTCC3 medida en las biopsias de tejido adiposo y en el medio condicionado fue corregida por las proteínas totales determinadas por el método de Lowry.

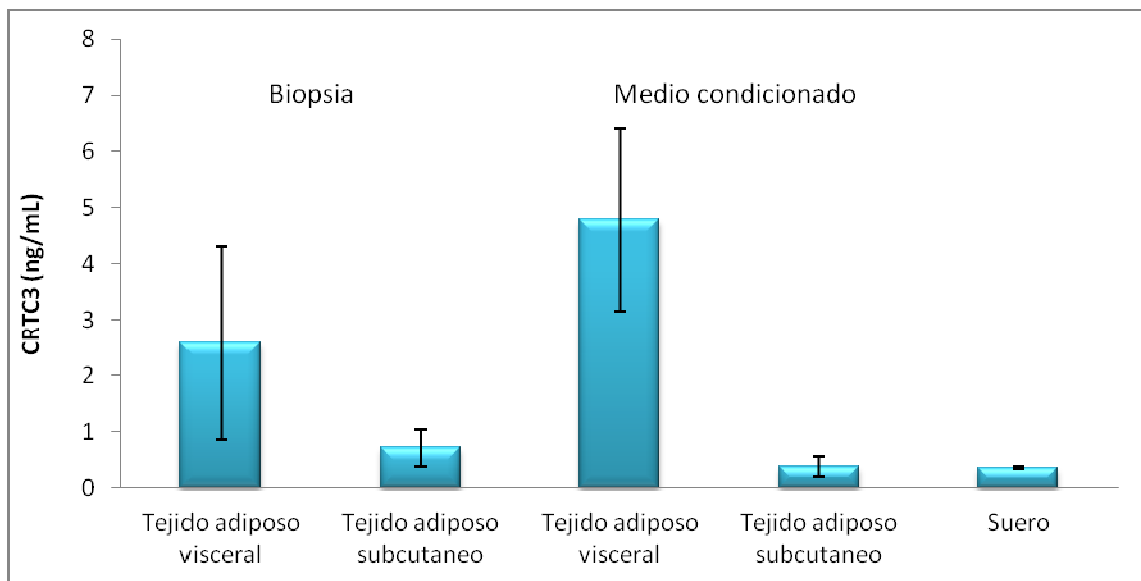


Figura 19 | Identificación por ELISA de CRTCC3 en biopsias de tejido adiposo visceral y subcutáneo, en el medio condicionado visceral y subcutáneo y en el suero de un niño en edad prepuberal.

Mediante esta técnica también se corroboró que la proteína CRTCC3 se detecta en el lisado celular de las biopsias, en el medio condicionado y en el suero de los niños. Además, la concentración de CRTCC3 medida en el tejido adiposo visceral fue también

superior a la hallada en tejido adiposo subcutáneo y en el suero de los pacientes, resultados que concuerdan con los obtenidos por la técnica de *western blot*.

Para confirmar que las concentraciones circulantes eran debidas a secreción y no a lisis celular, se realizó el test de viabilidad con LDH en el medio de cultivo. Las concentraciones de LDH medidas en el medio condicionado de todas las muestras eran inferior al límite superior de normalidad en suero de la técnica empleada en nuestro laboratorio (200 U/L). Estos resultados descartan que el CRT3 encontrado en el medio condicionado sea de origen intracelular y por tanto se deduce que es secretado por el tejido adiposo. Por lo tanto, podemos decir que el CRT3 encontrado en suero es, en parte, originado por la secreción del tejido adiposo.

5.1.2 MEDICIÓN DE LA SECRECIÓN DE WNT5A, SFRP5 Y CRT3 EN TEJIDO ADIPOSO.

Mediante la técnica ELISA se determinó la concentración de WNT5A, SFRP5 y CRT3 en el medio de cultivo condicionado de tejido adiposo y visceral de aquellas muestras que presentaban valores de LDH<200U/L. En la Figura 20 se muestran los resultados obtenidos tras ajustar el resultado por la concentración de las proteínas totales.

Todas las proteínas estudiadas se encontraron en el medio condicionado del tejido adiposo visceral y también del subcutáneo, lo que demuestra que las proteínas son secretadas por el tejido adiposo. Además, se demostró que todas las proteínas

mostraron una concentración mayor en el medio condicionado de origen visceral en comparación con el subcutáneo.

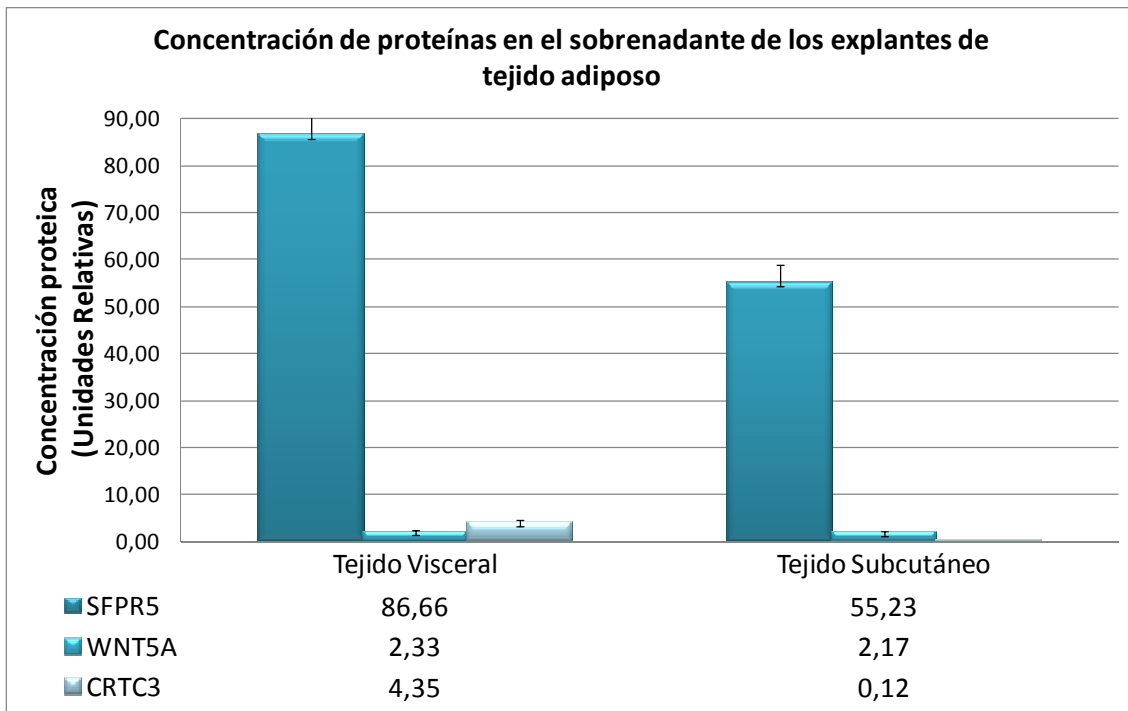


Figura 20| Concentración de las proteínas SFRP5, WNT5A y CRT3 medidas en el medio condicionado de tejido adiposo visceral y subcutáneo.

5.1.2 MEDICIÓN DE LA SECRECIÓN DE WNT5A, SFRP5 Y CRT3 EN SUERO

Para estudiar la presencia y las concentraciones de las tres proteínas en sangre se cuantificaron las proteínas WNT5A, SFRP5 y CRT3 en las muestras de suero de 211 niños sanos en edad prepuberal. En la Tabla 1 se muestra la media y el rango de las concentraciones obtenidas.

Tabla 1 | Medias y rango de concentración en sangre de las proteínas WNT5A, SFRP y CRTC3.

Proteína	Media	Rango inferior	Rango Superior
SFRP5 (ng/mL)	16.1	12.5	19.7
WNT5A (ng/mL)	0.37	0.27	0.48
CRTC3 (ng/mL)	0.30	0.27	0.32

WNT5A: Wingless type MMTV integration site family member 5 class A; CRTC3: Coactivador de la transcripción regulado por CREB; SFRP5: Proteína secretada similar a frizzle número 5.

Los resultados obtenidos muestran que las tres proteínas pueden ser detectadas en sangre mediante la técnica ELISA. Además, la concentración en sangre de la proteína SFRP5 es mucho más elevada que la de las otras dos proteínas estudiadas, observando en sangre, los mismos resultados obtenidos en el medio de cultivo de las biopsias de tejido adiposo.

5.2 COHORTE DE ESTUDIO

Para estudiar la relación entre las concentraciones en sangre de las tres proteínas estudiadas con la obesidad y marcadores de riesgo metabólico y cardiovascular se realizó un estudio transversal en 211 niños sanos de edad prepuberal (108 niñas y 103 niños). Además, los resultados obtenidos se compararon en un estudio longitudinal en el que se estudiaron 130 niños, de los incluidos en el estudio basal, al cabo de 3 años (67 niñas y 63 niños). En la Tabla 2 se muestran las características antropométricas y metabólicas de los niños incluidos en el estudio en el tiempo basal y al cabo de tres años.

Tabla 2| Características antropométricas y metabólicas de los niños estudiados en el estudio inicial y en el seguimiento a los 3 años.

	Basal	Seguimiento	P
N	211	130	
Parámetros clínicos			
Mujer (%)	51.4	51.5	ns
Edad (años)	6.9 (6.8;7.1)	10.3 (10.1;10.6)	--
Obesidad y sobrepeso %	20	15	--
Pubertad %	0	6	
Valor Z del IMC	0.17 (0.19;0.31)	0.04 (-0.15;0.23)	ns
Masa grasa (%)	31.6 (30.7;32.6)	32.5 (31.2;33.9)	ns
Valor Z del perímetro de cintura	-0.15 (-0.29;-0.01)	-0.08 (-0.17;0.15)	<0.0001
TAS (mmHg)	101 (100;103)	103 (101;104)	0.027
GIM Carótida (cm)	0.039 (0.038;0.041)	0.048 (0.047;0.048)	<0.0001
Parámetros de laboratorio			
Colesterol HDL (mg/dL)	55.0 (53.6;56.5)	56.7 (54.7;58.8)	ns
Triglicéridos (mg/dL)	55.8 (53.1;58.5)	59.8 (55.8;63.8)	ns
HOMA-IR	0.65 (0.55;0.74)	0.96 (0.80;1.11)	<0.0001
Adiponectina de APM (mg/L)	8.33 (7.80;8.87)	16.50 (13.59;19.41)	<0.0001
PCR-us (mg/L)	1.03 (0.84;1.22)	1.16 (0.88;1.45)	ns
GPT (U/L)	17.6 (16.7;18.5)	17.3 (16.3;18.3)	ns
GGT (U/L)	12.5 (12.1;12.9)	13.4 (12.9;13.9)	<0.0001

Los valores de las variables se expresan como la media y el intervalo de confianza del 95%. Se compararon las medias con la T de Student para muestras relacionadas, valores p significativos <0.05.

Valor Z del IMC: valor Z del índice de masa corporal; TAS: tensión arterial sistólica; GIM Carótida: grosor de la íntima- media carotídea; Colesterol HDL: Lipoproteína de alta densidad; HOMA-IR: homeostatic model assesment para la resistencia a la insulina; Adiponectina de APM: adiponectina de alto peso molecular; PCR-us: proteína C reactiva ultrasensible; GPT: Alanina aminotransferasa; GGT: Gamma-glutamil transferasa.

Al inicio del estudio se incluyeron 211 con una edad media de 6.9 años, todos eran prepúberes según los estándares de Marshall y Tanner [153], el 51.4 % del sexo femenino. La prevalencia de obesidad fue de un 20 %. Todos los niños incluidos en el estudio eran sanos.

El estudio de seguimiento se realizó aproximadamente tres años después del estudio inicial. Continuaron el estudio 130 niños con un edad media de 10.3 años, el 6 % de los niños del seguimiento eran púberes según los estándares de Marshall y

Tanner, el 51.5 % del sexo femenino. La prevalencia de obesidad fue de un 15 %. Todos los niños incluidos en el estudio eran sanos.

Para evaluar si había habido cambios en las variables de estudio en los 130 niños que continuaron en el seguimiento, se compararon las medias de las variables estudiadas en el momento basal y a los 3 años de seguimiento. La comparación se realizó con una prueba T de Student para muestras relacionadas. Todas las variables cumplían los criterios de normalidad de forma directa o por transformación logarítmica. Los resultados muestran un aumento significativo del Valor Z del perímetro de cintura ($p < 0.0001$), la TAS ($p = 0.027$), el GIM de carótida ($p < 0.0001$), HOMA-IR ($p < 0.0001$) y Adiponectina de APM ($p < 0.0001$) en los niños al cabo de 3 años y una disminución, también significativa, de la GGT ($p < 0.0001$).

5.3 WNT5A ASOCIACIÓN CON LAS VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y METABÓLICAS

5.3.1 ESTUDIO TRANSVERSAL

Para estudiar la asociación entre WNT5A y los marcadores de obesidad y riesgo metabólico, se estudiaron 211 niños (108 niñas y 103 niños) sanos en edad prepuberal, cuya edad media fue de 6.9 años. En la Tabla 3 se muestran las características antropométricas y metabólicas de los sujetos estudiados estratificadas en función de los tertiles de WNT5A en sangre. La comparación de las medias entre grupos se realizó mediante un análisis de varianza ANOVA de un factor (valor p de la tabla). Los

resultados muestran como al aumentar la concentración de WNT5A aumenta la resistencia a la insulina ($p=0.003$), medida como HOMA-IR y el GPT ($p=0.021$) mientras que disminuye la concentración de colesterol HDL ($p=0.003$). En conjunto los resultados muestran que el aumento de la concentración de WNT5A en la sangre de los niños se asocia con un perfil metabólico más desfavorable.

Tabla 3| Variables antropométricas y metabólicas de los sujetos estudiados según tertiles de WNT5A en suero.

	WNT5A tertiles (ng/mL)			P
	0.071 (0.063-0.079)	0.19 (0.168-0.203)	0.85 (0.624-1.085)	
Todos los niños (n=211)	71	70	70	ns
Mujer (%)	51	43	59	ns
Edad (años)	7.3 (6.8;7.7)	6.9 (6.5;7.4)	6.9 (6.5;7.3)	ns
Valor Z del IMC	0.03 (-0.28;0.34)	0.27 (0.00;0.53)	0.16 (-0.10;0.42)	ns
Valor Z perímetro de la cintura	-0.29 (-0.45;-0.08)	-0.13 (-0.34;0.92)	-0.10 (-0.32;0.11)	ns
TAS (mmHg)	104 (102;107)	103 (101;106)	103 (100;105)	ns
GIM de carótida (cm)	0.041 (0.039;0.042)	0.040 (0.038;0.042)	0.040 (0.039;0.042)	ns
Colesterol HDL (mg/dL)	60 (56.7;63.4)	57.7 (54.7;60.7)	53.2 (50.8;55.7)	0.008
Triglicéridos (mg/dL)	51.9 (46.3;57.6)	57.5 (51.1;63.8)	57.4 (51.7;63.2)	ns
HOMA-IR	0.58 (0.37;0.80)	0.73 (0.51;0.94)	0.80 (0.62;0.98)	0.003
Adiponectina de APM (mg/L)	7.3 (6.23;8.4)	7.1 (6.3;8.0)	8.6 (7.7;9.5)	ns
PCRus (mg/L)	1.33 (0.92;1.74)	1.17 (0.77;1.56)	0.86 (0.54;1.18)	ns
GPT (U/L)	16.5 (15.8;17.6)	17.4 (16.2;18.5)	18.9 (17.1;20.7)	0.021
GGT(U/L)	12.3 (11.5;13.1)	13.4 (12.6;14.2)	13.1 (12.2;14.0)	ns

Los valores de las variables se expresan como la media y el intervalo de confianza del 95%. El valor p corresponde a ANOVA de un factor.

Valor Z del IMC: valor Z del índice de masa corporal; TAS: tensión arterial sistólica; GIM Carótida: grosor de la íntima-media carotídea; Colesterol HDL: Lipoproteína de alta densidad; HOMA-IR: homeostatic model assesment para la resistencia a la insulina; Adiponectina de APM: adiponectina de alto peso molecular; PCR-us: proteína C reactiva ultrasensible; GPT: Alanina aminotransferasa; GGT: Gamma-glutamyl transferasa.

En la Tabla 4 se pueden ver los análisis adicionales dónde se analizó el grado de correlación existente entre la concentración de WNT5A y las variables antropométricas de obesidad, así como las variables metabólicas que mostraron diferencias significativas entre los tertiles de concentración de WNT5A.

Tabla 4| Coeficiente de correlación de Pearson entre WNT5A y las variables antropométricas y metabólicas.

Todos los niños (n=211)	r	p
<i>Valor Z del IMC</i>	0.032	ns
<i>Valor Z Perímetro de cintura</i>	0.012	ns
<i>HOMA-IR</i>	0.236	<0.001
<i>GPT (U/l)</i>	0.127	<0.05
<i>GGT (U/l)</i>	0.103	ns
<i>Colesterol HDL (mg/dL)</i>	-0.166	0.032

Valor Z del IMC, valor Z del índice de masa corporal; HOMA-IR, homeostatic model assesment para la resistencia a la insulina; Adiponectina de APM, adiponectina de alto peso molecular. GPT: Alanina aminotransferasa; GGT: Gamma-glutamyl transferasa; Colesterol HDL: Lipoproteína de alta densidad.

La Tabla 4 muestra como existe correlación positiva entre las concentraciones de WNT5A y la resistencia a la insulina medida como el HOMA-IR y la GPT, también existe una correlación negativa entre WNT5A y el colesterol HDL, cuanto mayor es WNT5A menor es el colesterol HDL. En nuestra muestra de estudio, WNT5A no se correlaciona con los parámetros de obesidad como el valor Z del IMC y del perímetro de cintura.

Para estudiar si la asociación existente entre la concentración de WNT5A y el HOMA-IR y la GPT era independiente de variables de confusión como la edad o la obesidad, se realizaron modelos multivariantes (Tabla 5). En un primer análisis se consideró como variable dependiente la resistencia a la insulina expresada como HOMA-IR y se observa que las variables concentración de WNT5A y el valor Z del IMC fueron las dos variables independientes que explican el 41.3 % de la variación del HOMA-IR en el modelo. No fueron variables predictivas la edad, el sexo, la GPT, el colesterol HDL ni la concentración de SFRP5.

En el segundo modelo la variable dependiente era la concentración de GPT y la concentración de WNT5A y el Valor Z del IMC fueron las variables independientes que explicaron un 11.4% de la variabilidad de las concentraciones de GPT en sangre de los niños estudiados. No fueron variables predictivas la edad, el sexo, el HOMA-IR, el colesterol HDL ni la concentración de SFRP5. Los resultados se muestran en la Tabla 5. No se obtuvieron resultados significativos utilizando la variable colesterol HDL como variable dependiente (resultados no mostrados).

Tabla 5| Análisis de regresión multivariado con el HOMA-IR y GPT como variables dependientes.

	β	p	R ²
Todos los niños (n=211)			
HOMA-IR			
Valor Z del IMC	0.483	<0.0001	0.413
WNT5A (ng/mL)	0.131	0.038	
GPT (U/l)			
Valor Z del IMC	0.291	0.001	0.114
WNT5A (ng/mL)	0.214	0.005	

R2 muestra el efecto combinado de las variables independientes.

Las variables no predictivas fueron: Edad, sexo, HOMA-IR, GPT, colesterol HDL y SFRP5.

Valor Z del IMC: valor Z del índice de masa corporal; HOMA-IR: homeostatic model assesment para la resistencia a la insulina; GPT: Alanina aminotransferasa; WNT5A: Wingless type MMTV integration site family member 5 class A.

5.3.2 ESTUDIO LONGITUDINAL

Para determinar el poder predictor de las concentraciones basales de WNT5A en niños sanos a los 7 años de edad, se estudiaron longitudinalmente 130 niños (66 niñas y 64 niños), de los 211 incluidos en el estudio transversal, a los 10 años de edad.

En la Tabla 6 se muestran los cambios en las variables de estudio con respecto a los tertiles de la concentración basal de WNT5A. Nuestros resultados no muestran diferencias significativas entre tertiles en cuanto a los valores de incremento de las variables antropométricas, cardiovasculares y metabólicas estudiadas.

Tabla 6| Cambio en las variables antropométricas y metabólicas de los sujetos estudiados en el estudio longitudinal según tertiles de WNT5A basales en suero.

	WNT5A tertiles (ng/mL)			P
	0.071 (0.063-0.079)	0.19 (0.168-0.203)	0.85 (0.624-1.085)	
Todos los niños (n=211)	43	43	44	--
Mujer (%)	51	43	59	ns
Δ Edad (años)	3.5 (3.1;3.9)	3.4 (3.1;3.7)	3.7 (3.3;4.0)	ns
Δ Valor Z del IMC	-0.19 (-0.50;0.11)	0.13 (-0.13;0.40)	-0.11 (-0.39;0.17)	ns
Δ Perímetro de la cintura	3.13 (11.09;14.21)	2.52 (11.85;14.65)	2.38 (8.88;12.08)	ns
Δ TAS (mmHg)	3.18 (-1.13;7.49)	4.59 (-0.53;9.71)	-0.82 (-7.32;5.68)	ns
Δ GIM de carótida (cm)	0.007 (0.003;0.011)	0.008 (0.005;0.010)	0.007 (0.002;0.011)	ns
Δ Colesterol HDL (mg/dL)	3.29 (-1.08;7.66)	0.95 (-2.25;4.15)	-0.70 (-4.71;3.29)	ns
Δ Triglicéridos (mg/dL)	-3.58 (-11.91;4.77)	5.48 (-4.57;15.53)	8.76 (-1.59;19.12)	ns
Δ HOMA-IR	0.26 (-0.25;0.77)	0.33 (0.07;0.59)	-0.11 (-0.62;0.38)	ns
Δ Adiponectina de APM (mg/L)	9.97 (2.13;17.81)	7.14 (0.94;13.35)	11.32 (1.46;21.19)	ns
Δ PCRus (mg/L)	-1.14 (-2.46;0.17)	0.18 (-0.66;1.01)	0.11 (-1.43;1.66)	ns
Δ GPT (U/L)	1.20 (-1.99;4.39)	-0.16 (-3.36;3.04)	-2.35 (-4.21;-0.49)	ns
Δ GGT(U/L)	1.60 (0.43;2.76)	1.18 (-0.08;2.46)	-0.03 (-1.04;-0.98)	ns

Los valores de las variables se expresan como la media y el intervalo de confianza del 95%. El valor p corresponde a ANOVA de un factor.

Valor Z del IMC: valor Z del índice de masa corporal; TAS: tensión arterial sistólica; GIM Carótida: grosor de la íntima-media carotídea; Colesterol HDL: Lipoproteína de alta densidad; HOMA-IR: homeostatic model assesment para la resistencia a la insulina; Adiponectina de APM: adiponectina de alto peso molecular; PCR-us: proteína C reactiva ultrasensible; GPT: Alanina aminotransferasa; GGT: Gamma-glutamyl transferasa.

5.4 SFRP5 ASOCIACIÓN CON LAS VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y METABÓLICAS

5.4.1 ESTUDIO TRANSVERSAL

Para estudiar la asociación entre la concentración de SFRP5 y marcadores de obesidad y riesgo metabólico en los niños prepuberales, los sujetos estudiados se estratificaron en función de los cuartiles de SFRP5 en sangre (Tabla 7). La comparación entre grupos se realizó mediante el análisis de varianza ANOVA de un factor (valor p de la tabla).

Nuestros resultados mostraron diferencias significativas en cuanto a la edad entre los diferentes cuartiles de SFRP5, también se consideró la posibilidad de que hubiese algún dimorfismo sexual y que el género del individuo actuase como una variable confusora, por este motivo, los resultados de las variables que mostraron diferencias significativas se ajustaron por edad y sexo en los análisis posteriores.

En la Tabla 7 se puede observar como los individuos con una concentración menor de SFRP5 presentan mayores índices antropométricos de obesidad (IMC y perímetro de cintura) comparados con los niños con mayores concentraciones de SFRP5 ($p < 0.0001$). Es de interés mostrar que las bajas concentraciones de SFRP5 se asociaron significativamente con mayor obesidad, la prevalencia de obesidad sólo fue de un 10.5% en el cuartil superior mientras que en el primer cuartil llegó hasta un 43.6% ($p < 0.0001$).

Es remarcable que los niños con una concentración menor de SFRP5 también mostraron niveles mayores de TAS ($p < 0.001$), GIM de carótida ($p < 0.05$) y el marcador

inflamatorio PCR ultrasensible ($p=0.002$). Por el contrario, mostraron niveles más bajos de colesterol HDL ($p<0.05$) y adiponectina de APM ($p=0.002$). Estos resultados dibujan un perfil proinflamatorio y de mayor riesgo cardiovascular asociado a concentraciones bajas de SFRP5. Finalmente, los resultados muestran que las concentraciones bajas de SFRP5 se asocian con concentraciones bajas de WNT5A ($p<0.0001$), cuanto mayor es la concentración de SFRP5 mayor es la concentración de WNT5A.

Tabla 7 | Variables antropométricas y metabólicas de los sujetos estudiados según los cuartiles de SFRP5.

	Todos los sujetos	Cuartiles SFRP5 (ng/mL)				p
		0.55-0.95	0.96-3.99	4.00-10.3	10.4-97.4	
N	211	53	53	52	53	--
Edad (años)	7.6 (7.2; 7.7)	8.5 (8.1; 8.9)	7.6 (7.3; 7.9)	7.3 (7.0; 7.7)	7.2 (6.7; 7.5)	<0.0001
Mujer (%)	48	47	41	47	55	--
Obesidad y sobrepeso %	20	43	15	11	10	<0.0001
Valor Z del IMC	0.51 (0.39; 0.60)	1.18 (0.87; 1.49)	0.51 (0.23; 0.79)	0.46 (0.18; 0.74)	-0.04 (-0.23; 0.14)	<0.0001
Valor Z del perímetro cintura	0.05 (-0.05; 0.15)	0.34 (0.14; 0.55)	0.03 (-0.16; 0.22)	0.09 (-0.13; 0.32)	-0.30 (-0.47; -0.13)	<0.0001
TAS (mmHg)	104 (101; 105)	107 (105; 110)	105 (103; 107)	104 (103; 107)	101 (99; 103)	<0.001
GIM de Carotida (cm)	0.040 (0.039; 0.041)	0.043 (0.041; 0.044)	0.040 (0.039; 0.042)	0.040 (0.039; 0.042)	0.040 (0.038; 0.041)	<0.05
Colesterol HDL (mg/dL)	55.3 (53.7; 57.0)	54.2 (51.5; 56.9)	57.4 (54.7; 60.0)	52.6 (49.9; 55.2)	56.8 (54.1; 59.6)	<0.05
Triglicéridos (mg/dL)	62.7 (59.3;66.1)	67.7 (58.9; 76.5)	56.7 (51.0;62.4)	55.9 (51.6; 60.1)	58.8 (53.5; 64.0)	ns
HOMA-IR	0.83 (0.72; 0.91)	1.08 (0.83; 1.34)	0.74 (0.54; 0.94)	0.74 (0.58; 0.90)	0.75 (0.57; 0.93)	ns
Adiponectina de APM (mg/L)	7.0 (6.7; 7.4)	5.7 (4.9; 6.5)	7.2 (6.4; 7.9)	7.6 (6.8; 8.4)	7.7 (6.9; 8.5)	0.002
PCRus (mg/L)	1.14 (0.95; 1.33)	1.59 (1.31; 1.86)	1.09 (0.82; 1.34)	1.06 (0.79; 1.31)	0.85 (0.59; 1.11)	0.002
GPT (U/L)	18.4 (17.8; 19.0)	18.3 (17.3; 19.3)	18.0 (16.9; 19.0)	19.3 (17.6; 21.0)	17.7 (15.8;19.5)	ns
GGT(U/L)	13.2 (12.9 ;13.5)	14.1 (13.1; 15.0)	13.4 (12.6; 14.2)	13.4 (12.5; 14.3)	12.5 (12.0; 13.1)	ns
WNT5A (ng/mL)	0.23 (0.20; 0.32)	0.06 (0.05; 0.06)	0.15 (0.10; 0.10)	0.33 (0.20; 0.47)	0.40 (0.24; 0.56)	<0.0001

Los valores de las variables se expresan como la media y el intervalo de confianza del 95%. El valor p corresponde a ANOVA de un factor.

Valor Z del IMC, valor Z del índice de masa corporal; TAS, tensión arterial sistólica; GIM Carótida, grosor de la íntima- media carotídea; HOMA-IR, homeostatic model assesment para la resistencia a la insulina; Adiponectina de APM, adiponectina de alto peso molecular; PCR-us, proteína C reactiva ultrasensible.

Debido a las diferencias observadas en cuanto al porcentaje de obesidad según la concentración de SFRP5, se quiso estudiar si las concentraciones bajas de SFRP5 podrían ser un factor de riesgo para desarrollar obesidad. Para tal fin, se calculó la *odds ratio* de la obesidad para cada cuartil de SFRP5, en la Figura 21 se muestran los resultados en crudo y ajustados por edad y sexo.

En el resultado de la regresión logística binaria, la OR ajustada en el primer cuartil fue de 9.77, en el segundo cuartil de 3.16, en el tercer cuartil de 2.65 y en el cuartil superior no se observó asociación entre la concentración de SFRP5 y obesidad. En conclusión, nuestros resultados muestran que son los individuos con una concentración inferior a 0.95 mg/dl de SFRP5 en sangre los que tienen mayor riesgo de ser obesos o tener sobrepeso.

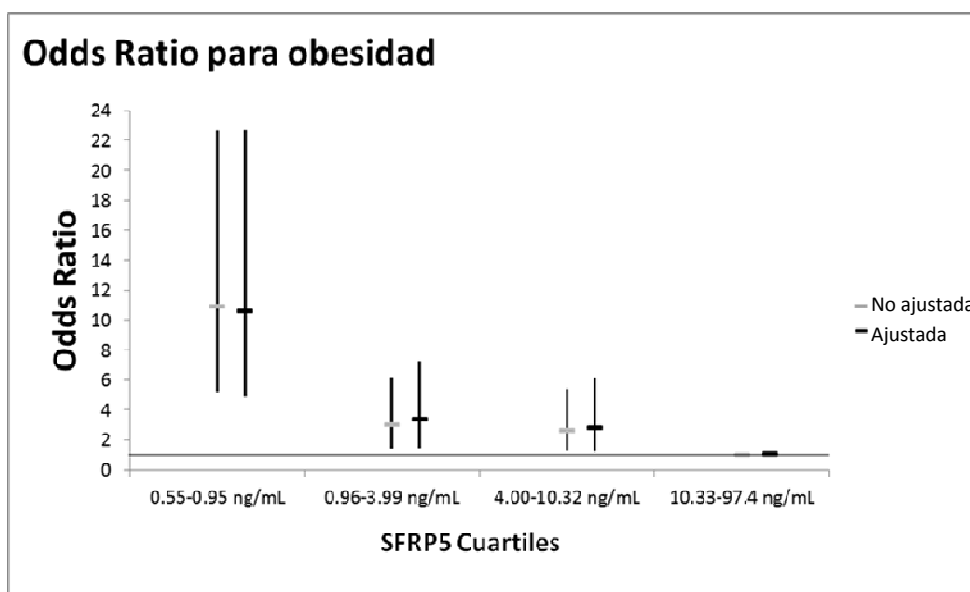


Figura 21 | Odds ratio de obesidad según la concentración de SFRP5

La asociación entre SFRP5 y las variables antropométricas, cardiovasculares y metabólicas ajustadas por sexo y edad se muestran en la Figura 22. La variable antropométrica perímetro de cintura ($p < 0.0001$), cardiovasculares [TAS ($p < 0.001$) y GIM

($p < 0.05$) y los marcadores inflamatorios [PCRus ($p < 0.002$) y adiponectina de APM ($p < 0.002$)] mostraron diferencias significativas después de ser ajustadas por edad y sexo (valor p de las tablas < 0.05) en función de los cuartiles de SFRP5, lo que descarta la influencia de la edad o el género en las diferencias halladas según las concentraciones de SFRP5.

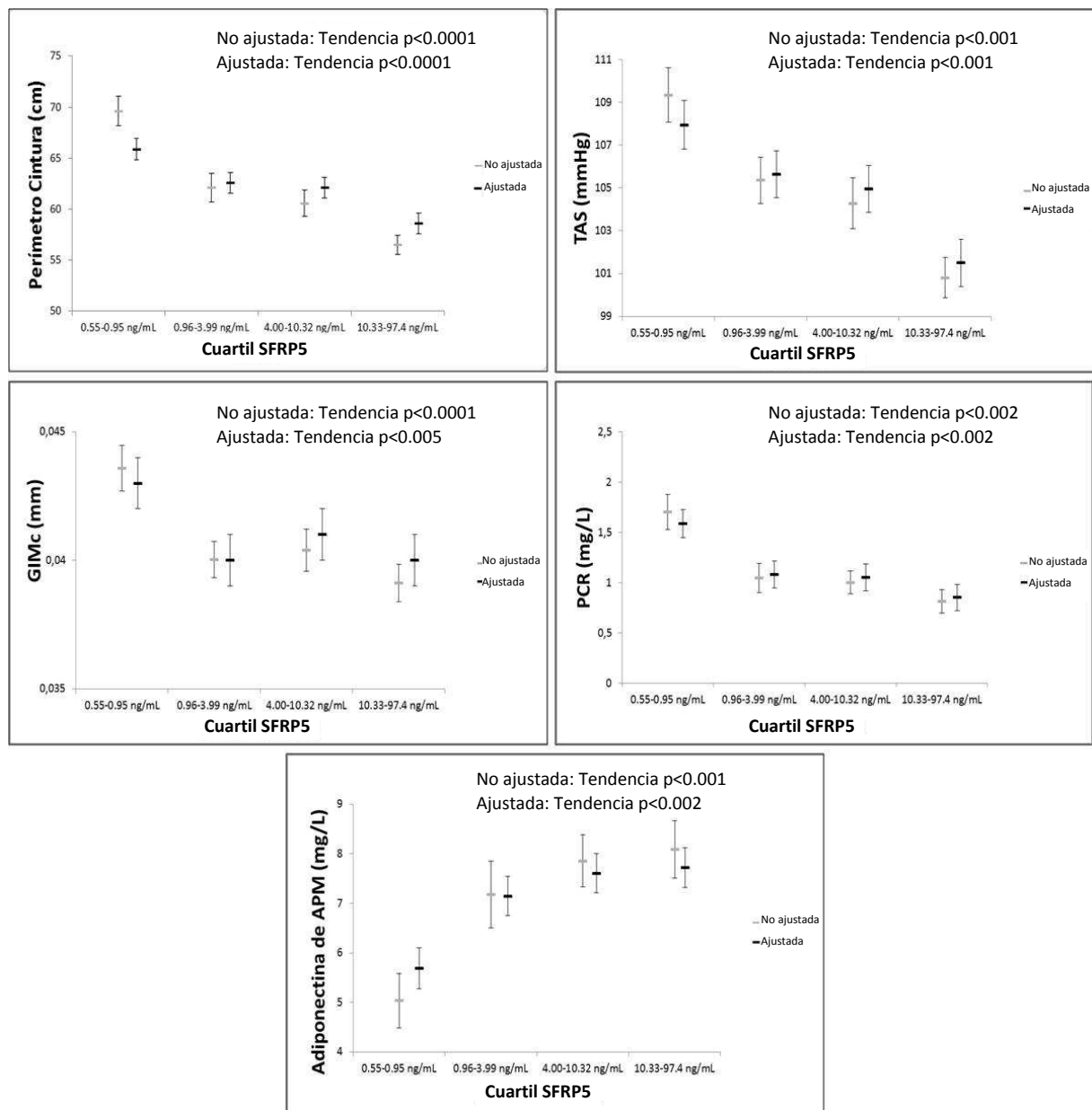


Figura 22] Barras de error no ajustadas y ajustadas por edad, sexo e IMC, de las variables que mostraron diferencias significativas entre cuartiles de la concentración de SFRP5, Los p valores corresponden a modelos lineales generales.

Finalmente, se realizó un análisis de regresión múltiple, siendo la concentración de SFRP5 la variable dependiente, se utilizó el método introducir para incorporar las variables independientes. El modelo resultante muestra que son el IMC y la adiponectina de APM quienes explican de manera independiente un 19.2% de la variabilidad en las concentraciones circulantes de SFRP5 (Tabla 8). Además, en el modelo se puede observar como el valor Z del IMC influye de forma negativa ($\beta = -0.308$), mientras que la adiponectina de APM presenta una correlación positiva con SFRP5 ($\beta = 0.235$), lo que reafirma a la proteína SFRP5 como una molécula anti-inflamatoria.

Tabla 8| Análisis de regresión multivariante con SFRP5 en suero como variable dependiente.

	β	p	R ²
Todos los niños (n=211)			
SFRP5			
Valor Z del IMC	-0.308	<0.0001	0.192
Adiponectina de APM (mg/L)	0.235	<0.0001	

R² muestra el efecto combinado de las variables independientes.

Variables no predictivas: Edad, sexo, perímetro de la cintura, TAS, GIM de la carótida y PCR.

5.4.2 ESTUDIO LONGITUDINAL

Para determinar el poder predictor de las concentraciones basales de SFRP5 en niños sanos a los 7 años de edad, se estudiaron longitudinalmente 130 niños (66 niñas y 64 niños), de los 211 incluidos en el estudio transversal, a los 10 años de edad.

En la Tabla 9 se muestran los cambios en las variables de estudio con respecto a la concentración basal de SFRP5. En el estudio longitudinal, y debido al bajo número de niños incluidos, se optó por segmentar la muestra en tertiles en lugar de hacerlo en cuartiles, como se había hecho en el estudio transversal. Nuestros resultados no muestran diferencias significativas entre tertiles en cuanto a los valores de incremento de las variables antropométricas, cardiovasculares y metabólicas estudiadas. Además, es de destacar que en el estudio transversal el porcentaje de sobrepeso y obesidad en el cuartil inferior (43%) es muy superior al del estudio longitudinal (22.2%), además, no se observan diferencias significativas en cuanto al porcentaje de obesidad entre los tertiles de SFRP5 en el estudio longitudinal.

Tabla 9| Cambios en los valores de las variables antropométricas y metabólicas en el estudio de seguimiento según los tertiles SFRP5 basal

	Tertiles SFRP5 (ng/mL)			P
	0.55-4.83	4.84-13.76	13.77-97.4	
Todos los niños (n=130)	43	43	44	--
Mujer (%)	52	42	59	ns
Δ Edad (años)	3.7 (3.4;4.0)	3.4 (3.1;3.7)	3.7 (3.4;3.9)	ns
Sobrepeso y obesidad %	22	19	17	ns
Δ Valor Z del IMC	-0.16 (-0.41;-0.09)	-0.06 (-0.25;0.14)	-0.02 (-0.21;0.18)	ns
Δ Valor Z Perímetro de la cintura	0.05 (-0.19;0.30)	-0.28 (-0.52;-0.20)	-0.13 (-0.34;0.80)	ns
Δ TAS (mmHg)	2.66 (0.24;3.66)	2.14 (-1.37;5.65)	2.97 (-0.61;6.55)	ns
Δ GIM de carótida (cm)	0.008 (0.005;0.011)	0.007 (0.005;0.010)	0.007 (0.005;0.010)	ns
Δ Colesterol HDL (mg/dL)	2.13 (-1.05;5.31)	1.24 (-1.72;4.19)	-0.06 (-2.53;2.40)	ns
Δ Triglicéridos (mg/dL)	3.79 (-4.91;12.50)	7.68 (0.86;14.50)	1.58 (-7.09;10.26)	ns
Δ HOMA-IR	0.26 (-0.03;0.55)	0.23 (-0.05;0.52)	0.35 (0.03;0.68)	ns
Δ Adiponectina de APM (mg/L)	12.79 (3.70;21.87)	9.80 (4.45;15.16)	7.65 (2.12;13.18)	ns
Δ PCRus (mg/L)	-0.86 (-2.21;0.48)	-0.04 (-0.76;0.67)	0.42 (-0.11;0.96)	ns
Δ GPT (U/L)	0.20 (-2.25;2.97)	0.11 (-2.33;2.56)	-0.54 (-2.75;1.66)	ns
Δ GGT(U/L)	0.72 (-0.19;1.64)	0.63 (-0.40;1.67)	1.36 (0.54;2.17)	ns

Los valores de las variables se expresan como la media y el intervalo de confianza del 95%. El valor p corresponde a la ANOVA de un factor.

Δ: incremento de la variable; valor Z del IMC: valor Z del índice de masa corporal; TAS: tensión arterial sistólica; GIM Carótida: grosor de la íntima- media carotídea; Colesterol HDL: Lipoproteína de alta densidad; HOMA-IR: homeostatic model assesment para la resistencia a la insulina; Adiponectina de APM: adiponectina de alto peso molecular; PCR-us: proteína C reactiva ultrasensible; GPT: Alanina aminotransferasa; GGT: Gamma-glutamyl transferasa.

5.5 EJE WNT5A-SFRP5

Es conocido que existe una relación fisiopatológica entre SFRP5 y WNT5A, además, cuando realizamos la comparación entre cuartiles de SFRP5 ya vimos como WNT5A aumentaba proporcionalmente en relación a la concentración de SFRP5 (Tabla 7) en nuestra muestra de estudio.

Para estudiar el comportamiento de nuestras variables con respecto a la acción conjunta de las dos proteínas consideradas como un eje funcional se analizó el grado de correlación existente entre las dos proteínas. Los resultados muestran que en la sangre de la muestra de los 211 niños sanos prepuberales se observa una correlación fuertemente positiva y significativa entre WNT5A y SFRP5 ($r=0.436$; $p<0.0001$; Figura 23). Así mismo, en el medio condicionado de tejido adiposo visceral de 9 niños prepuberales sanos ($r=0.96$; $p<0.0001$; Figura 24) y en el medio condicionado de tejido adiposo subcutáneo de 12 niños prepuberales sanos ($r=0.724$; $p=0.001$; Figura 24) también se observa una relación positiva y significativa. Los resultados en el medio condicionado fueron corregidos por las proteínas totales y la concentración de LDH.

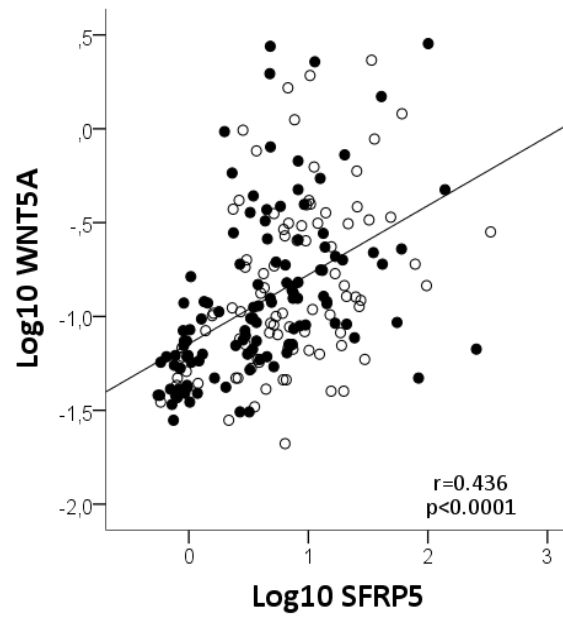


Figura 23 | Diagrama de dispersión entre log de WNT5A y log de SFRP5 en suero. Los círculos negros y blancos representan niños y niñas respectivamente.

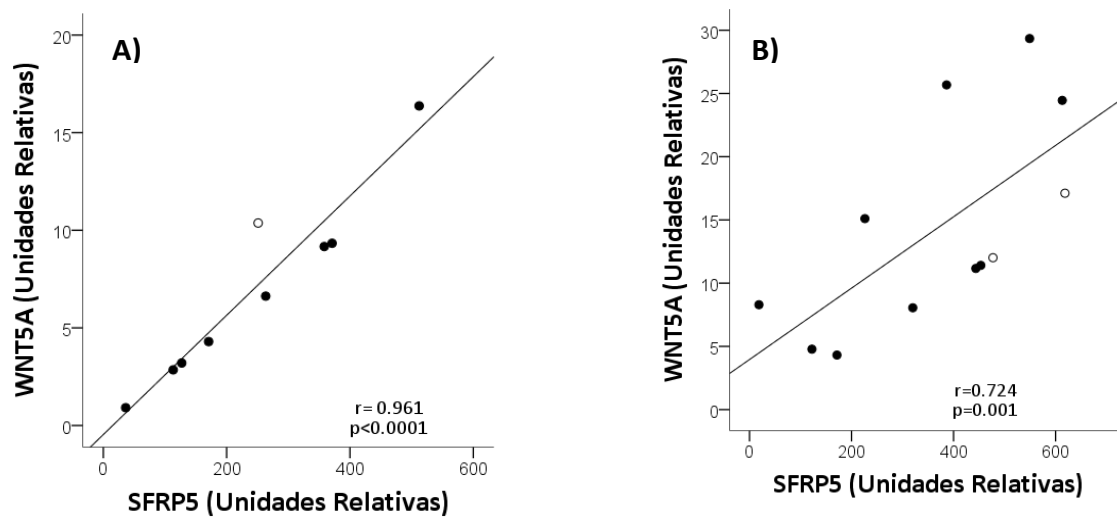


Figura 24 | Diagrama de dispersión entre log de WNT5A y log de SFRP5: A) en medio condicionado de tejido adiposo visceral; B) en medio condicionado de tejido adiposo subcutáneo. Los círculos negros y blancos representan niños y niñas respectivamente.

5.5.1 EJE WNT5A-SFRP5: ASOCIACIÓN CON VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y METABÓLICAS

Para estudiar si la concentración de SFRP5 modificaba la asociación entre WNT5A y las variables antropométricas y metabólicas estudiadas, se segmentó la muestra de estudio en función de la mediana de SFRP5 (4.81 ng/ml; Tabla 10).

Nuestros resultados muestran que cuando las concentraciones de SFRP5 son menores a la mediana de nuestra muestra se observa que existe correlación positiva significativa entre WNT5A y el HOMA-IR ($r=0.339$; $p<0.001$), la GPT ($r=0.344$; $p<0.0001$) y la GGT ($r=0.264$; $p<0.001$), sin embargo, cuando la concentración de SFRP5 es superior a 4.81 ng/ml las correlaciones desaparecen. Las medidas antropométricas de obesidad valor Z del IMC y del perímetro de cintura no se correlacionan con WNT5A.

Estos resultados nos vuelven a indicar que bajas concentraciones de SFRP5 se asocian con un perfil metabólicamente desfavorable en los niños con altas concentraciones de WNT5A, pudiendo altas concentraciones de SFRP5 anular las acciones pro-inflamatorias de la molécula WNT5A.

Tabla 10 | Coeficientes de correlación de Pearson entre WNT5A y variables antropométricas y metabólicas, en función de la mediana de la concentración de SFRP5.

	Mediana de SFRP5 (ng/mL)			
	SFRP5 ≤ 4.81 (n=106)		SFRP5 > 4.81 (n=105)	
	r	p	r	p
Valor Z del IMC	0.080	ns	0.230	ns
Valor Z del perímetro cintura	0.139	ns	-0.072	ns
HOMA-IR	0.339	<0.001	0.155	ns
Colesterol HDL (mg/dL)	-0.78	ns	-0.089	ns
Adiponectina de APM (mg/L)	0.114	ns	0.027	ns
GPT (U/l)	0.344	<0.0001	-0.086	ns
GGT (U/l)	0.264	<0.001	-0.020	ns

WNT5A: Wingless type MMTV integration site family member 5 class A; SFRP5: Proteína secretada similar a frizzle número 5; Valor Z del IMC: valor Z del índice de masa corporal; HOMA-IR: homeostatic model assesment para la resistencia a la insulina; Colesterol HDL: Lipoproteína de alta densidad; Adiponectina de APM: adiponectina de alto peso molecular; GPT: Alanina aminotransferasa; GGT: Gamma-glutamyl transferasa.

Para comprobar estadísticamente si la concentración de WNT5A, considerada en función de la concentración de SFRP5, era una variable explicativa de la resistencia a la insulina expresada como HOMA-IR y de la enzima hepática GPT se realizaron dos modelos diferentes de regresión multivariantes (Tabla 11).

El análisis de regresión lineal múltiple confirmó que las asociaciones solo eran significativas en los sujetos con concentración de SFRP5 inferior o igual a 4.81 ng/ml. En este grupo la concentración de WNT5A y el valor Z del IMC explicaban de manera independiente un 60.5 % de la variabilidad del HOMA-IR y un 20.4 % de la variabilidad de la GPT.

Tabla 11 | Análisis de regresión multivariante con el HOMA-IR y la GPT como variable dependiente en los niños con SFRP5 \leq 4.81 ng/mL.

	β	p	R ²
SFRP5 \leq 4.81 ng/mL (n= 106)			
HOMA-IR			
Valor Z del IMC	0.715	<0.0001	0.605
WNT5A (ng/mL)	0.171	0.032	
GPT (U/l)			
Valor Z del IMC	0.361	0.019	0.204
WNT5A (ng/mL)	0.330	0.003	

R² muestra el efecto combinado de las variables independientes.

Las variables no predictivas fueron: sexo, edad, GPT, HOMA-IR y SFRP5.

5.5.2 EJE WNT5A-SFRP5: ASOCIACIÓN CON VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y METABÓLICAS. ESTUDIO LONGITUDINAL.

En el estudio longitudinal de los resultados se realizó el análisis de correlación entre WNT5A basal y el cambio de las variables HOMA-IR y GPT al cabo de 3 años de seguimiento. Para tal fin, se segmentó la muestra por la mediana de SFRP5 basal (4.81 ng/mL).

Los resultados, como se puede ver en la Tabla 12, no fueron significativos para ninguna de las variables, ni siquiera para concentraciones bajas de SFRP5. El escaso número de niños (40 niños) con concentración de SFRP5 inferior a 4.81 ng/mL reduce mucho el poder estadístico y puede ser causa de un falso resultado negativo. Estudios con un mayor número de niños en el seguimiento serían necesarios para esclarecer el

poder predictor de las concentraciones de WNT5A y SFRP5 a los 7 años de edad en la resistencia a la insulina y el GPT a los 10 años de edad.

Tabla 12] Coeficientes de correlación de Pearson entre WNT5A y el incremento a los 3 años de variables antropométricas y metabólicas, en función de la mediana de la concentración de SFRP5 basal.

	Mediana de SFRP5 (ng/mL)			
	SFRP5 ≤ 4.81 (n=40)		SFRP5 > 4.81 (n=90)	
	r	p	r	p
Δ IMC-z score	0.312	ns	-0.112	ns
Δ HOMA-IR	0.077	ns	-0.101	ns
Δ TAS (mmHg)	0.117	ns	-0.150	ns
Δ Colesterol HDL (mg/dL)	-0.170	ns	-0.337	ns
Δ GPT (U/l)	0.289	ns	0.215	ns

Δ: incremento de la variable; WNT5A: Wingless type MMTV integration site family member 5 class A; SFRP5: Proteína secretada similar a frizzle número 5; Valor Z del IMC, valor Z del índice de masa corporal; *HOMA-IR*, homeostatic model assesment para la resistencia a la insulina; TAS, tensión arterial sistólica; Colesterol HDL: Lipoproteína de alta densidad; GPT: Alanina aminotransferasa.

5.6 CRT3: ASOCIACIÓN CON VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y METABÓLICAS

5.6.1 ESTUDIO TRANSVERSAL

Para estudiar la asociación entre CRT3 y los marcadores de obesidad y riesgo metabólico en los niños, se estudiaron los mismos 211 niños sanos que para las proteínas WNT5A y SFRP5. En este caso, los sujetos se estratificaron según los tertiles de CRT3 en sangre, los resultados de las variables antropométricas, cardiovasculares y metabólicas estudiadas en función de los tertiles de CRT3 se presentan en la Tabla 13.

Nuestros resultados muestran que los sujetos con concentraciones más bajas de CRT3 presentan valores más bajos del valor Z del IMC ($p=0.005$), perímetro de la cintura ($p=0.003$) y TAS ($p=0.007$) en comparación con los sujetos con concentraciones de CRT3 en los tertiles superiores, además, las concentraciones de CRT3 más bajas se asociaron con niveles de adiponectina en sangre significativamente superiores ($p=0.003$). El conjunto de resultados dibuja un perfil metabólico más favorable en aquellos niños con menores concentraciones de CRT3 en sangre.

Tabla 13 | Variables antropométricas y metabólicas de los sujetos estudiados según los tertiles de CRTC3.

	Todos los sujetos	CRTC3 tertiles (ng/mL)			p
		0.090-0.200	0.201-0.316	0.317-1.037	
n	211	70	71	70	--
Mujer (%)	51.0	45.1	54.5	55.6	--
Edad (años)	6.8 (6.7;7.0)	6.7 (6.4;7.0)	6.8 (6.6;7.1)	7.1 (6.8;7.3)	ns
Sobrepeso y obesidad (%)	20	17	27	18	ns
Valor Z del IMC	0.13 (-0.01;0.28)	-0.19 (-0.39;0.01)	0.35(0.08;0.63)	0.23 (-0.02;0.49)	0.005
Perímetro cintura (cm)	56.1 (55.0;57.1)	53.9 (52.3;55.5)	57.0 (55.0;58.9)	57.5 (55.5;59.5)	0.003
TAS (mmHg)	101 (100;103)	98 (97;101)	103 (101;106)	102 (100;104)	0.007
GIM de carótida (cm)	0.040 (0.039;0.041)	0.039 (0.038;0.041)	0.039 (0.037;0.041)	0.041 (0.038;0.043)	ns
Colesterol HDL (mg/dL)	55.0 (53.9;56.5)	56.7 (54.1;59.4)	54.2 (51.9;56.5)	54.1 (51.3;56.8)	ns
Triglicéridos (mg/dL)	55.7 (53.1;58.4)	53.9 (49.4;58.5)	57.3 (52.1;62.5)	56.0 (52.0;60.0)	ns
HOMA-IR	0.62 (0.53;0.73)	0.53 (0.39;0.68)	0.71 (0.54;0.89)	0.63 (0.53;0.73)	ns
Adiponectina de APM (mg/L)	8.3 (7.8;8.9)	9.6 (8.6;10.5)	7.9 (7.0;8.8)	7.5 (6.5;8.5)	0.003
PCRus (mg/L)	1.60 (1.20;2.03)	1.53 (0.84;2.21)	1.90 (1.04;2.76)	1.36 (0.85;1.87)	ns

Los valores de las variables se expresan como la media y el intervalo de confianza del 95%. El valor p corresponde a una ANOVA de un factor.

Valor Z del IMC: valor Z del índice de masa corporal; TAS: tensión arterial sistólica; GIM Carótida: grosor de la íntima- media carotídea; Colesterol HDL: Lipoproteína de alta densidad; HOMA-IR: homeostatic model assesment para la resistencia a la insulina; Adiponectina de APM: adiponectina de alto peso molecular; PCR-us: proteína C reactiva ultrasensible.

Resultados similares se obtuvieron en los análisis de correlación simple (Tabla 14). Concretamente, la concentración de CRT3 se correlacionó positivamente con el Valor Z del IMC ($r=0.166$; $p=0.017$), el perímetro de la cintura ($r=0.207$; $p=0.003$) y la TAS ($r=0.164$; $p=0.018$) y de forma negativa con la adiponectina de APM ($r=-0.228$; $p=0.001$) en todos los sujetos estudiados.

De manera adicional, se segmentó la muestra en función el IMC de los niños para poder estudiar las correlaciones en función del sobrepeso y obesidad. Nuestros resultados muestran que las correlaciones entre la concentración de CRT3 y el Valor Z del IMC ($r=0.379$; $p=0.015$), el perímetro de la cintura ($r=0.479$; $p=0.002$) y la adiponectina de APM ($r=-0.351$; $p=0.031$) son más potentes en los niños con mayor peso ($n=44$). Además, en estos niños también aparecen correlaciones significativas y positiva entre las concentraciones de CRT3 y el GIM carotídeo ($r=0.410$; $p=0.012$) y la PCR ultrasensible ($r=0.373$; $p=0.025$).

Tabla 14 | Coeficientes de correlación de Pearson de CRT3 y variables antropométricas y metabólicas. En todos los sujetos y estratificados en función del valor Z del IMC.

	Todos los sujetos n= 211		Niños con IMC normal (Valor Z del IMC< 1; n= 167)		Niños con sobrepeso y obesidad (Valor Z del IMC≥ 1; n= 44)	
	r	p	r	p	r	p
Edad (años)	0.088	ns	0.149	ns	0.123	ns
Valor Z del IMC	0.166	0.017	-0.022	ns	0.379	0.015
Perímetro cintura (cm)	0.207	0.003	0.097	ns	0.479	0.002
TAS (mmHg)	0.164	0.018	0.084	ns	-0.083	ns
GIM de carótida (cm)	0.074	ns	0.150	ns	0.410	0.012
Colesterol HDL (mg/dL)	0.015	ns	0.024	ns	-0.221	ns
Triglicéridos (mg/dL)	0.101	ns	0.102	ns	0.164	ns
HOMA-IR	0.770	ns	0.128	ns	0.114	ns
Adiponectina de APM (mg/L)	-0.228	0.001	-0.143	ns	-0.351	-0.031
PCRus (mg/L)	-0.015	ns	0.030	ns	0.373	0.025

Valor Z del IMC: valor Z del índice de masa corporal; TAS: tensión arterial sistólica; GIM Carótida: grosor de la íntima- media carotídea; Colesterol HDL: Lipoproteína de alta densidad; HOMA-IR: homeostatic model assesment para la resistencia a la insulina; Adiponectina de APM: adiponectina de alto peso molecular; PCR-us: proteína C reactiva ultrasensible.

Para comprobar que las correlaciones anteriormente encontradas no eran debidas a variables confusoras, se realizaron diferentes modelos de regresión múltiple.

En un primer análisis de regresión múltiple, se consideró el Valor Z del IMC como variable dependiente tanto en la muestra completa de los 211 niños prepuberales como en los subgrupos de niños en función del IMC (Tabla 15). En la muestra completa de niños y en los niños más delgados la concentración de CRT3 en suero no fue una variable predictiva del IMC. Sin embargo, en los niños con obesidad y sobrepeso, se encontró un modelo en el que la concentración de CRT3 era la única variable independiente que explicaba un 14.3% de la variación del valor Z del IMC. No fueron variables predictivas en el modelo el sexo, la edad, el perímetro de la cintura, la TAS, el GIM de carótida, el HOMA-IR, la PCRus y la adiponectina de APM.

Tabla 15 | Análisis de regresión lineal multivariante con el Valor Z del IMC basal como variable dependiente. Subgrupos de acuerdo al IMC-z score.

	β	p	R ²
Todos los sujetos (n= 211)			
PCRus (mg/L)	0.326	<0.0001	0.275
HOMA-IR	0.271	<0.001	
Colesterol HDL (mg/dL)	-0.160	0.045	
Niños con IMC normal (Valor Z del IMC < 1; n= 167)			
HOMA-IR	0.254	<0.001	0.093
PCRus (mg/L)	0.162	0.033	
Niños con sobrepeso y obesidad (Valor Z del IMC ≥ 1; n= 44)			
CRT3	0.379	0.015	0.143

R² muestra el efecto combinado de las variables independientes.

Variables no predictivas: Edad, sexo, perímetro de la cintura, TAS, el GIM de carótida, PCRus y adiponectina de APM.

En el segundo modelo de regresión múltiple también realizado tanto en la muestra completa de niños como en los grupos en función del IMC, se consideró como variable dependiente las concentraciones de CRT3 (Tabla 16). En este caso, el perímetro de la cintura fué la variable independiente predictiva del 33.2% de los valores de CRT3 solamente en los niños con sobrepeso y obesidad. No fueron variables predictivas el sexo, la edad, el IMC-z score, HDL, TAS, HOMA-IR, PCRus y adiponectina de APM.

Tabla 16| Análisis de regresión lineal multivariante con CRT3 como variable dependiente en la muestra completa de niños y en los subgrupos en función del IMC.

	β	p	R ²
Todos los niños (n= 211)			
Perímetro de la cintura	0.128	ns	0.022
Niños con IMC normal (Valor Z del IMC< 1; n= 167)			
Perímetro de la cintura	0.032	ns	-0.011
Niños con sobrepeso y obesidad (Valor Z del IMC≥ 1; n= 44)			
Perímetro de la cintura	0.532	0.009	0.332

R² muestra el efecto combinado de las variables independientes.

Variables no predictivas: Edad, sexo, el IMC-z score, HDL, TAS, HOMA-IR, PCRus y adiponectina de APM.

5.6.2 ESTUDIO LONGITUDINAL

Para determinar el poder predictor de las concentraciones basales de CRT3 en niños sanos a los 7 años de edad, se estudiaron longitudinalmente 130 niños (66 niñas y 64 niños), de los 211 incluidos en el estudio transversal, a los 10 años de edad.

En la Tabla 17 y la Figura 25 se muestran cambios en el incremento del valor Z del IMC ($p=0.004$), la TAS ($p=0.022$), el colesterol HDL ($p=0.045$) y la adiponectina de alto peso molecular ($p=0.007$) en relación a los tertiles de las concentraciones basales de CRT3. Concretamente, valores bajos de CRT3 en sangre a los 7 años de edad predicen un mayor adelgazamiento de los niños, cambios negativos en los valores de la TAS y un aumento significativamente mayor de colesterol HDL y adiponectina de alto peso molecular en comparación con los niños con mayores concentraciones de CRT3 basal. Estos resultados nos indican que los niños con menores concentraciones de CRT3 a los 7 años de edad presentan un fenotipo metabólico más favorable a los 10 años de edad.

Tabla 17| Cambios en los valores de las variables antropométricas y metabólicas en el estudio de seguimiento estratificados según los tertiles de concentración de CRT3 basales.

	Todos los sujetos	Tertiles CRT3 (ng/mL)			P
		0.066-0.200	0.201-0.341	0.342-1.687	
n	115	38	38	39	--
Mujer (%)	50.2	48.2	53.1	49.4	--
Δ Edad (años)	3.5 (3.4;3.7)	3.6 (3.5;4.0)	3.6 (3.4;3.9)	3.4 (3.1;3.6)	ns
Δ Valor Z IMC	-0.06 (-0.17;0.05)	-0.24 (-0.47;0.01)	-0.12 (-0.29;0.05)	0.15 (0.02;0.30)	0.004
Δ Perímetro de la cintura (cm)	13.8 (12.7;15.0)	13.3 (11.2;15.4)	14.5 (12.1;16.8)	13.8 (12.1;15.4)	ns
Δ TAS (mmHg)	1.69 (-0.07;3.46)	-0.46 (-3.38;2.45)	0.18 (-3.28;3.64)	5.30 (2.54;8.07)	0.022
Δ GIM de carótida (cm)	0.008 (0.006;0.009)	0.008 (0.007;0.011)	0.008 (0.005;0.011)	0.007 (0.006;0.009)	ns
Δ Colesterol HDL (mg/dL)	0.59 (-0.86;2.06)	3.33 (0.93;5.75)	-0.09 (-3.14;2.95)	-1.48 (-3.45;0.48)	0.045
Δ Triglicéridos (mg/dL)	1.74 (-0.32;3.72)	1.87 (-1.97;5.72)	2.96 (-0.82;6.76)	0.40 (-2.81;3.61)	ns
Δ HOMA-IR	0.32 (0.20;0.43)	0.25 (0.04;0.46)	0.38 (0.19;0.57)	0.32 (0.11;0.52)	ns
Δ Adiponectina de APM (mg/L)	8.44 (5.39;11.49)	22.21 (7.11;21.71)	6.94 (2.88;11.01)	3.35 (0.87;5.83)	0.007
Δ PCRus (mg/L)	-0.04 (-0.16;-0.08)	0.01 (-1.18;0.20)	-0.01 (-0.23;-0.21)	-0.11 (-0.35;0.12)	ns

Los valores de las variables se expresan como la media y el intervalo de confianza del 95%. El valor p corresponde a la ANOVA de un factor.

Δ: incremento de la variable; valor Z del IMC: valor Z del índice de masa corporal; TAS: tensión arterial sistólica; GIM Carótida: grosor de la íntima- media carotídea; Colesterol HDL: Lipoproteína de alta densidad; HOMA-IR: homeostatic model assesment para la resistencia a la insulina; Adiponectina de APM: adiponectina de alto peso molecular; PCR-us: proteína C reactiva ultrasensible.

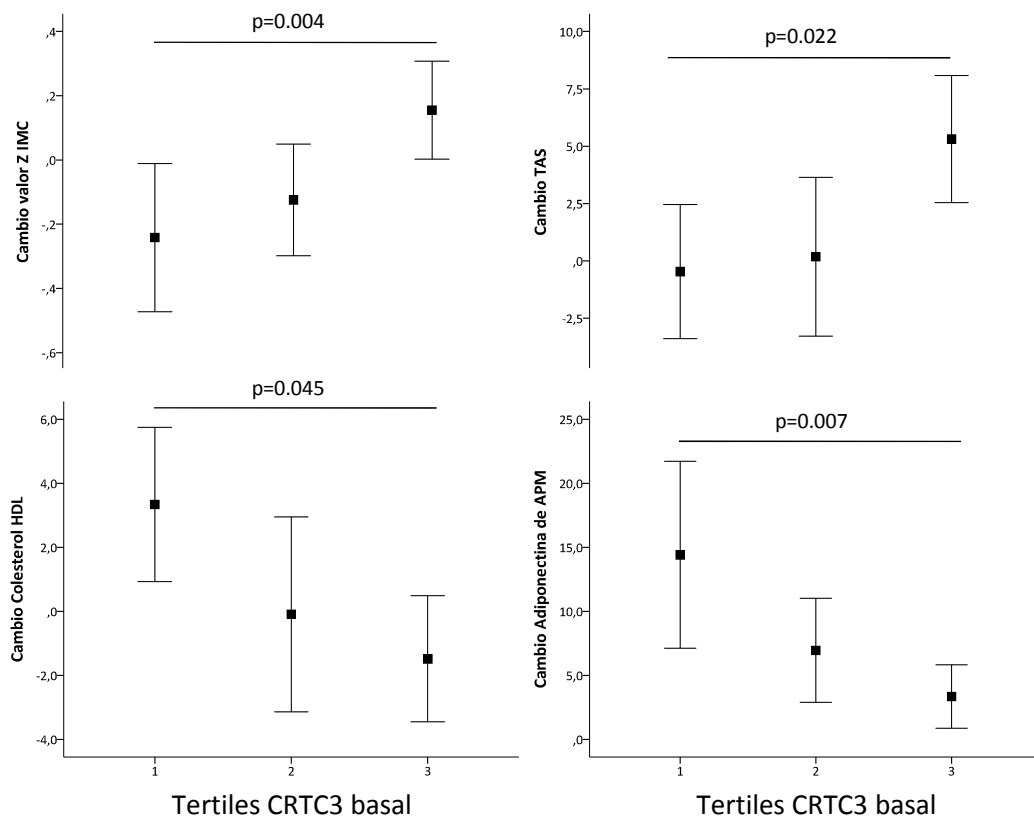


Figura 25 | Gráfico de barras de error de los cambios en el valor Z del IMC, la adiponectina de APM y el colesterol HDL respecto a la concentración de CRT3 basal en tertiles.

Para comprobar que las correlaciones anteriormente encontradas no eran debidas a variables confusoras, se realizaron varios modelos de regresión múltiple. En el primer análisis de regresión múltiple, se consideró el cambio en el valor Z del IMC como variable dependiente y se observó que las concentraciones basales de CRT3, junto con el valor Z del IMC basal eran las dos variables que explicaban de manera independiente un 11.4 % del cambio observado en el valor Z del IMC tras los 3 años de seguimiento (Tabla 18).

El segundo modelo se construyó utilizando el cambio en las concentraciones de la adiponectina de APM como variable dependiente. En este caso se observó que la

concentración de CRT3 basal era la única variable independiente que explicaba un 10.1% del cambio observado en las concentraciones de la adiponectina de APM al cabo de los tres años de seguimiento (Tabla 18).

No se obtuvieron resultados significativos para la TAS ni el colesterol HDL en los modelos multivariantes (resultados no mostrados).

Tabla 18 | Modelos de regresión lineal del estudio longitudinal en que las variables dependientes son el cambio en el valor Z del IMC y el cambio en la adiponectina de APM (n=115).

	β	p	R ²
Cambio valor Valor Z del IMC			
Valor Z del IMC basal	-0.205	0.035	
Pubertad	0.134	ns	
Años de seguimiento	0.023	ns	
CRTC3 basal	0.327	0.001	0.114
Cambio adiponectina de APM			
Adipo APM basal	0.133	ns	
Pubertad	0.095	ns	
Años seguimiento	0.053	ns	
CRTC3 basal	-0.271	0.014	
Sexo (niñas)	0.122	ns	0.101

R² muestra el efecto combinado de las variables independientes.

Variabes no predictivas: Edad, sexo, TAS, PCRus, HDL, -IR, PCRus y adiponectina de APM.

Nuestros resultados muestran que las concentraciones basales de CRT3 en sangre de niños sanos prepuberales podrías ser un buen marcador del incremento del valor Z del IMC y de la disminución de las concentraciones de adiponectina de alto peso molecular tras tres años de seguimiento.

DISCUSIÓN

Los resultados derivados de este estudio indican que las proteínas WNT5A, SFRP5 y CRT3 son secretadas por el tejido adiposo visceral y subcutáneo en niños sanos prepuberales. Además niveles altos de la proteína WNT5A se relacionan con una mayor resistencia a la insulina y GPT, mientras que valores altos de la proteína SFRP5 se asocia con una hiperadiponectinemia y con valores más bajos del índice de masa corporal. Por otra parte, los niveles altos de la proteína CRT3 en suero se relacionan con un mayor índice de masa corporal y perímetro de cintura en aquellos niños menos delgados y predice un mayor aumento en el índice de masa corporal y menor en la adiponectina de APM en el estudio longitudinal. Finalmente, el estudio del eje WNT5A-SFRP5 ha demostrado que las dos proteínas se relacionan positivamente tanto en el medio condicionado de las biopsias de tejido adiposo como en el suero de los niños sanos. Además, nuestros resultados demuestran que las concentraciones bajas de SFRP5 en sangre, potencian las relaciones de WNT5A con el aumento de la resistencia a la insulina y la concentración de un marcador hepático como es la GPT.

6.1 SECRECIÓN DE LAS PROTEÍNAS WNT5A, SFRP5 Y CRT3 POR EL TEJIDO ADIPOSO VISCERAL Y SUBCUTÁNEO.

Estudios previos en adultos han demostrado que las proteínas WNT5A y SFRP5 son secretadas por el tejido adiposo humano [98, 126] pero se desconoce qué tipo de tejido adiposo es el principal secretor de estas dos proteínas.

Numerosos trabajos afirman que las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad se relacionan principalmente con los depósitos de grasa visceral [161-163]. Este hecho se explica por el perfil secretor más pro-inflamatorio que presenta el tejido adiposo visceral comparado con el subcutáneo [164]. Además, estudios clínicos han

demostrado que los individuos con obesidad central o visceral presentan mayor riesgo de padecer enfermedad coronaria, diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensión y dislipidemia, comparados con aquellos en que predomina el aumento de grasa subcutánea [165].

Hasta el momento, CRT3 se ha considerado como una proteína con actividad intracelular, cuya actividad más importante es la de ser coactivador de CREB en el núcleo. Recientemente, se ha relacionado el gen de CRT3 con el desarrollo de la obesidad metabólicamente complicada, pero no existen estudios previos que demuestren que CRT3 puede ser secretada por el tejido adiposo. En los últimos años, se han descrito un gran número de proteínas con localización dual, que han sido encontradas en el espacio intracelular y al extracelular [166-168]. Además, se ha demostrado que alguna de estas proteínas duales, como las proteínas de shock térmico de 70 kDa, pueden actuar de manera diferente dependiendo de su localización [166].

Nuestro trabajo demuestra, que el tejido adiposo de niños en edad prepuberal también es capaz de secretar WNT5A y SFRP5, además, es el primero en demostrar que el tejido adiposo humano es capaz de secretar la proteína CRT3. La presencia de CRT3 en sangre aumenta la certidumbre de que la familia de proteínas CRTCs puede ejercer más de una función y no actuar exclusivamente como cofactor de CREB [169, 170]. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que se ha descrito que CRT3 puede ejercer efectos metabólicos en el tejido adiposo, el hígado y el tejido muscular [137, 171, 172], por lo que no descartamos que el CRT3 secretado por el tejido adiposo, pueda actuar de forma endocrina sobre estos tejidos. No obstante, son necesarios estudios funcionales para poder determinar si CRT3 soluble es una

proteína con función endocrina o si simplemente es un producto de eliminación del tejido adiposo.

Nuestros resultados también indican que las tres proteínas presentan concentraciones más elevadas en el medio condicionado del tejido adiposo visceral en comparación con el subcutáneo. Como era de esperar, la concentración de las dos proteínas pro-inflamatorias WNT5A y CRT3 fue más alta en el medio condicionado procedente del tejido adiposo visceral. Pero es más sorprendente que SFRP5, considerada una proteína antiinflamatoria, también esté en mayor concentración en el medio condicionado del tejido adiposo visceral. Una posible explicación para esta observación es que la proteína SFRP5 ejerce su efecto antiinflamatorio por ser un inhibidor de WNT5A y aumenta cuando aumenta la cantidad de WNT5A para contrarrestar su efecto pro-inflamatorio en niños sanos. Estos resultados podrían indicar que altas concentraciones de WNT5A y CRT3 y bajas concentraciones de SFRP5 podrían estar relacionadas con un perfil metabólico menos favorable de la obesidad.

En el presente estudio, también se aportan evidencias que las tres proteínas pueden ser cuantificadas en sangre periférica de los niños prepuberales sanos estudiados, por lo que sugerimos que el origen de la presencia de las tres proteínas en suero es, en parte, el producto de la secreción del tejido adiposo en condiciones fisiológicas. Finalmente, y debido a que es el tejido adiposo visceral el responsable de una mayor secreción de las tres proteínas, nuestros resultados apuntan a que WNT5A, SFRP5 y CRT3 en suero podrían ser buenos marcadores de alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad.

6.2 WNT5A, SFRP5 Y CRTC3 EN SANGRE: MARCADORES DE OBESIDAD Y RESISTENCIA A LA INSULINA

La obesidad metabólicamente complicada está considerada por la OMS como una de las pandemias que provocan mayor morbilidad y mortalidad. El tratamiento más efectivo contra la obesidad es la prevención, por ello el estudio de marcadores serológicos en la edad pediátrica es una herramienta muy útil para encontrar a aquellos individuos con más riesgo de presentar obesidad y alteraciones metabólicas en la edad adulta.

6.2.1 WNT5A CIRCULANTE: RELACIÓN CON OBESIDAD Y VARIABLES METABÓLICAS

Estudios *in vitro* han demostrado que son los macrófagos que infiltran el tejido adiposo los que secretan WNT5A y que una de sus funciones sería la de inhibir la adipogénesis [104], posiblemente mediante la inhibición de la actividad de transcripción del receptor gamma activador de la proliferación del peroxisoma (PPARG) conocido factor adipogénico [105, 106]. Estudios epidemiológicos realizados en pacientes obesos, han propuesto que la proteína WNT5A podría actuar como una molécula proinflamatoria clave en el desarrollo de la inflamación de bajo grado presente en la obesidad [107]. Además, han demostrado que en pacientes obesos los niveles en suero de WNT5A son más elevados que en individuos delgados [108] y que los niveles de WNT5A en sangre disminuyen en los pacientes obesos que pierden peso después de ser sometidos a un by-pass gástrico [109].

Nuestro estudio es el primero en cuantificar las concentraciones de WNT5A en suero de pacientes pediátricos sanos, mostrando un rango de concentración que oscila entre 0.268 y 0.483 ng/mL. Algunos estudios realizados en adultos han publicado que las concentraciones de WNT5A en adultos sanos son prácticamente indetectables, sólo existe un estudio publicado en adultos sanos sin sobrepeso en el que se detectaron concentraciones de WNT5A con valores 4 veces inferiores a las de nuestro estudio [173]. En los individuos adultos, la obesidad se suele asociar con el aumento del tamaño de los adipocitos preexistentes (hipertrofia) y a un bajo índice de adipogénesis contrarrestado proporcionalmente por apoptosis adipocitaria [87]. Por el contrario, en los niños en edad prepuberal y los adolescentes predomina la expansión del tejido adiposo a partir del aumento del número de nuevos adipocitos (hiperplasia), con una tasa de proliferación superior en los obesos en comparación con los sujetos delgados. Esta situación evitaría, al menos durante algún tiempo, la aparición de la hipertrofia del tejido adiposo y la aparición de un perfil secretor pro-inflamatorio en edad temprana [174]. Las alteraciones de la adipogénesis en la infancia favorecen el desarrollo de obesidad asociada a complicaciones metabólicas en la edad adulta [175].

Considerando que la actividad adipogénica de los niños es muy superior a la de los adultos [176], resulta sorprendente encontrar concentraciones más altas de un inhibidor de la adipogénesis como es WNT5A en los niños respecto a adultos. En el tejido adiposo, WNT5A actúa como una proteína proinflamatoria e inhibidora de la adipogénesis, pero en otros tejidos, la vía de señalización WNT y WNT5A son esenciales para una correcta morfogénesis [177], creemos por tanto que la presencia de WNT5A en sangre de niños en edad prepuberal podría ser un reflejo del correcto desarrollo y maduración de diferentes tejidos, incluido el tejido adiposo. Sin embargo,

no podemos descartar que WNT5A tenga un efecto anti-adipogénico en el tejido adiposo de los niños sanos prepuberales y que este efecto sea contrarrestado por la proteína SFRP5, su inhibidor en el adipocito.

Finalmente, Ouchi y cols. han propuesto que WNT5A podría ser uno de los factores desencadenantes de la resistencia a la insulina por su capacidad para activar JNK1 en los adipocitos en roedores [110]. En este sentido, nuestros resultados demuestran que ya desde la edad prepuberal concentraciones elevadas de la proteína WNT5A se asocian positivamente con la resistencia a la insulina y la GPT, y negativamente con el colesterol HDL. Tal y como se ha comentado anteriormente, WNT5A está considerada como una molécula proinflamatoria clave en el desarrollo de la inflamación de bajo grado presente en la obesidad [107]. A pesar de que en nuestro estudio, WNT5A no se ha relacionado con parámetros de obesidad, la relación observada con la resistencia a la insulina podría ser debida a una inflamación de bajo grado del tejido adiposo y una acumulación ectópica de grasa en el hígado dibujando un perfil metabólico menos favorable en aquellos niños que presentan concentraciones mayores de WNT5A.

En el estudio longitudinal no se observaron asociaciones significativas ni con obesidad ni con marcadores de alteración metabólica. Es muy probable que el escaso número de sujetos incluidos en el estudio de seguimiento (130 niños) sea el motivo por el cual no se hayan obtenido resultados significativos.

6.2.2 SFRP5 CIRCULANTE: RELACIÓN CON OBESIDAD Y VARIABLES METABÓLICAS

En 2010 se publicó un trabajo realizado en ratones, en el se afirma que SFRP5 es una nueva adipocina con efectos anti-inflamatorios semejantes a los de la adiponectina [110]. Los resultados de este estudio indican que los ratones deficientes en SFRP5 y alimentados con una dieta hipercalórica desarrollaban intolerancia a la glucosa, esteatosis hepática y su tejido adiposo presentaba signos de inflamación. Sin embargo, los resultados en humanos son contradictorios. Por una parte, se han publicado estudios que confirman que SFRP5 es una adipocina con propiedades anti-inflamatorias, cuya concentración está disminuida en la obesidad y la diabetes tipo 2 [108, 109, 128, 129]. Por otra parte, otras publicaciones niegan las propiedades anti-inflamatorias de SFRP5 [178, 179], e incluso, afirman que las concentraciones de SFRP5 se asocian positivamente con la diabetes tipo 2 [173]. Finalmente, Carstensen y cols. publicaron un estudio en 2014 en donde sugerían que las acciones de SFRP5 dependen del tipo celular y del estado metabólico del individuo [180]. Es muy posible que los resultados contradictorios se deban a que los estudios publicados hasta el momento se han realizado en sujetos con obesidad y diabetes tipo 2, en los que el grado de afectación metabólica era muy dispar y por tanto no comparable.

Nuestros resultados demuestran que la concentración de SFRP5 es menor en los niños obesos o con sobrepeso, corroborando algunos de los hallazgos publicados en adultos [108, 128, 129]. Concretamente, los niños con una concentración de SFRP5 inferior o igual a 0.95 ng/ml tienen una probabilidad 9 veces mayor de ser obesos

respecto a los niños con mayor concentración de SFRP5. Además un nivel bajo de SFRP5 también se asocia a un aumento del perímetro de la cintura, marcador conocido de obesidad central directamente relacionado con el riesgo metabólico [181]. Estos resultados concuerdan con otro estudio publicado en niños donde se mostró una relación entre SFRP5 y el perímetro de la cintura en niños obesos [182]. Además, en dicho estudio los niños obesos y con síndrome metabólico tenían una concentración menor de SFRP5, que aumentaba después de una intervención en el estilo de vida y su consecuente adelgazamiento y mejora metabólica.

Nuestros resultados también han demostrado que los niños con concentraciones bajas de SFRP5 tiene valores más altos de PCRus, conocido marcador de inflamación de bajo grado [183] y valores más bajos de adiponectina de alto peso molecular, proteína anti-inflamatoria con propiedades insulinosensibilizantes. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en adultos diabéticos y mujeres con ovario poliquístico [128]. En conjunto estos resultados muestran un perfil más pro-inflamatorio en los niños con bajas concentraciones de SFRP5 en sangre.

Finalmente, en nuestro estudio, SFRP5 se asoció con un aumento del riesgo de padecer enfermedad coronaria arterial, como ya se había asociado en adultos con enfermedad coronaria [115], mostrando una correlación inversa entre la concentración en suero de SFRP5 con la presión arterial sistólica y el GIM de carótida, un marcador precoz de arteriosclerosis, y una relación directa con el colesterol HDL. Estos resultados abren la posibilidad de utilizar las concentraciones de SFRP5 como marcador de arteriosclerosis. No obstante, es necesaria la realización de más estudios para esclarecer esta relación, ya que estas asociaciones desaparecieron tras corregir los resultados por variables de confusión.

En conclusión, los niños prepuberales con concentraciones bajas de SFRP5 en suero presentan un perfil metabólico, inflamatorio y cardiovascular menos favorable. Lo que se sugiere que las concentraciones bajas de SFRP5 podrían ser utilizadas como marcador precoz de riesgo metabólico en edad pediátrica.

Tal como sucedió con la proteína WNT5A, en el estudio longitudinal no se observaron asociaciones significativas entre SFRP5 con la obesidad y marcadores metabólicos y cardiovasculares. Como consecuencia de la participación en nuestro estudio, muchos niños obesos siguieron un plan de adelgazamiento, hecho que se corrobora en el estudio longitudinal. Creemos que la pérdida de peso, junto al bajo número de niños incluidos en el seguimiento podría ser la causa de no observar resultados significativos en nuestro estudio. Sería necesario poder realizar un estudio longitudinal con un mayor número de niños obesos y no obesos para poder esclarecer el papel predictor de las concentraciones de SFRP5 en cuanto a la obesidad y riesgo metabólico en la infancia.

6.2.3 CRT3 CIRCULANTE: RELACIÓN CON OBESIDAD Y VARIABLES METABÓLICAS

Desde el punto de vista antropológico y evolutivo, una de las finalidades más importantes de la alimentación es la supervivencia de la especie y del individuo. En épocas de escasez de alimentos, la capacidad de almacenar energía en forma de grasa supone una ventaja evolutiva. Se utiliza el término genotipo o fenotipo ahorrador para describir una variedad de rasgos metabólicos y genéticos que favorecen la disminución del gasto energético [184].

El gen de *CRTC3* es considerado como un gen ahorrador que favorece la aparición de obesidad y la resistencia a la insulina en ratones. La proteína *CRTC3* ejerce su acción impidiendo la unión de las catecolaminas al receptor beta adrenérgico del adipocito. Ratones con el gen de *CRTC3* silenciado que eran alimentados con una dieta hipercalórica y rica en grasas, estaban protegidos frente a la obesidad, la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática [137]. En su conjunto estos resultados indican que la inactivación del gen de *CRTC3* aumenta el gasto energético.

Hasta la fecha solamente existen dos trabajos en adultos humanos en los que se haya estudiado la relación del gen *CRTC3* con la obesidad. En uno de ellos se asoció el polimorfismo S72N de *CRTC3* con el aumento del riesgo de padecer obesidad en población hispana [137] mientras que en el otro se describió la relación entre varios polimorfismos de *CRTC3* con el riesgo a sufrir obesidad e hipercolesterolemia en población asiática [185]. No obstante, no existe ningún trabajo ni en animales ni humanos en el que se haya demostrado la presencia de *CRTC3* en sangre ni tampoco se ha realizado ningún estudio en edad pediátrica.

Nuestros resultados demuestran, no solamente que *CRTC3* puede ser cuantificado en sangre, sino que además concentraciones elevadas de *CRTC3* se relacionan con mayores índices de obesidad en niños en edad prepuberal. Adicionalmente, concentraciones más elevadas de *CRTC3* se asocian con niveles de adiponectina más bajos y tensión arterial sistólica más elevada, lo que indica un perfil metabólico y cardiovascular menos favorable en aquellos niños con concentraciones más elevadas de *CRTC3* en sangre. Resultó interesante comprobar que al estudiar separadamente a los niños según su IMC, se observó que solamente los niños con sobrepeso y obesidad presentaban una correlación positiva entre *CRTC3*, el GIM

carotideo y la PCRus y una correlación negativa con la adiponectina de alto peso molecular, mientras que en los niños delgados no existía ninguna correlación. En conjunto estos resultados apuntan a que CRT3 se asocia a un perfil metabólico, cardiovascular e inflamatorio menos favorable en niños prepuberales, en especial en los niños que presentaban sobrepeso u obesidad.

En el estudio multivariante se comprobó que en los niños con sobrepeso y obesidad, el perímetro de la cintura explicaba el 33% de la variabilidad de la concentración de CRT3 en sangre de los niños estudiados. Es sabido que el perímetro de la cintura es un marcador de adiposidad visceral [163]. Este hecho, juntamente con los resultados obtenidos en el estudio de la secreción de CRT3 realizados en las biopsias de tejido adiposo, señalan al tejido adiposo visceral como el máximo secretor de CRT3, por lo que sugerimos que la concentración de CRT3 en sangre de los niños en edad prepuberal puede ser un buen marcador de la cantidad de grasa visceral presente en los niños.

En el estudio de seguimiento, observamos que los niños con menores concentraciones de CRT3 a los 7 años de edad, al cabo de tres años presentan una disminución de la TAS y un mayor incremento del colesterol HDL. Un resultado interesante fue comprobar cómo la concentración de CRT3 a los 7 años de edad es un marcador que predice el incremento en el IMC al cabo de tres años así como una disminución de la adiponectina de alto peso molecular. Los niños con mayores concentraciones de CRT3 a la edad de 7 años al cabo de tres años presentan un perfil metabólico más desfavorable que los niños con concentraciones más bajas de CRT3. Es conocido que la obesidad infantil es un factor de riesgo para el desarrollo de la obesidad en la edad adulta [186], nosotros creemos que la concentración de CRT3 en

edad prepuberal podría ser un nuevo marcador del riesgo de desarrollar obesidad en la edad adulta.

Hasta la actualidad no existe ningún estudio que relacione la adiponectina con el CRT3. En un trabajo realizado sobre adipocitos se describió como la expresión de adiponectina disminuye considerablemente cuando es estimulada la señal beta-adrenérgica [187], en ratones, el gen de CRT3 promueve la obesidad atenuando la señal beta-adrenérgica [137], aunque somos conscientes de que son necesarios estudios adicionales que demuestren que los adipocitos humanos tratados con CRT3 disminuyen la secreción de adiponectina, una posible explicación de la relación inversa entre CRT3 y adiponectina sería que CRT3 podría disminuir la síntesis de adiponectina a través de la inhibición de la señal beta-adrenérgica.

Estudios previos han demostrado que la inactivación del gen de CRT3 protege de la aparición de obesidad en ratones [137], y que ciertos polimorfismos del gen de CRT3 se asocian a obesidad en humanos [137, 185], por todo ello, creemos que es posible que exista un componente genético que explique por qué en los niños con sobrepeso y obesidad es donde encontramos correlación entre la concentración de CRT3 y el aumento del IMC. Hubiera sido muy interesante completar nuestro estudio con un análisis genético para demostrar que las concentraciones de CRT3 en sangre pueden ser un marcador precoz de polimorfismos de CRT3 asociados con obesidad.

Al igual que sucede con otras proteínas duales [166], en este estudio sugerimos que la proteína CRT3 podría ser transportada a través de la sangre y actuar sobre células diana modificando su respuesta a estímulos hormonales y de esta forma favorecer el desarrollo de obesidad. No obstante, no se puede descartar que la CRT3 soluble pueda ser solamente un producto de eliminación sin ninguna actividad

fuera del ámbito intracelular. Son necesarios más estudios para establecer si CRT3 es un nuevo marcador subrogado de obesidad o una nueva adipocina que juega un papel activo en el desarrollo de la obesidad.

En conclusión, el presente trabajo sugiere, por primera vez, que las concentraciones elevadas de CRT3, debidas a un aumento de tejido adiposo visceral en niños con sobrepeso u obesidad, se asocian a un perfil metabólico e inflamatorio menos favorable en edad prepuberal. En niños delgados, hipotetizamos que valores bajos de CRT3 en sangre estarían contribuyendo a un mayor gasto energético. En conjunto, estos resultados hacen pensar que podríamos estar ante una nueva adipocina relacionada con la obesidad asociada a trastornos metabólicos (Figura 26).

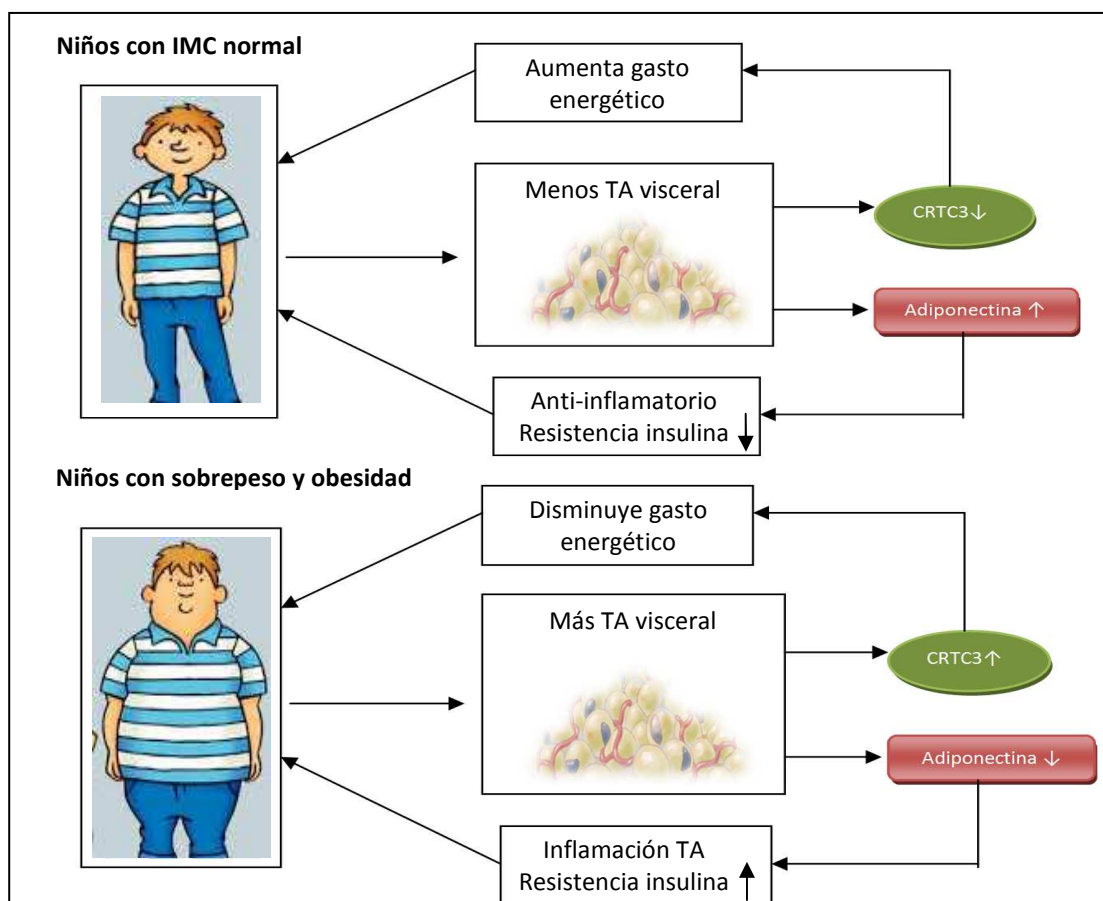


Figura 26 | Modelo propuesto de asociación entre la proteína CRT3 con el tejido adiposo visceral y la adiponectina en función del IMC de niños sanos.

6.3 EJE WNT5A-SFRP5

Se cree que la obesidad produce una alteración del equilibrio entre las concentraciones de WNT5A y SFRP5 [9]. Concretamente, se ha postulado que en la obesidad se producen alteraciones del tejido adiposo que cambian su perfil secretor provocando un aumento de la producción de WNT5A y una disminución de la producción de SFRP5. Los pocos estudios poblacionales realizados en humanos en que se ha determinado la concentración de WNT5A y SFRP5 circulante se han realizado en poblaciones adultas de obesos o diabéticos [108, 109, 173, 178] y en ninguno de ellos se ha analizado la correlación entre la concentración de las dos proteínas en sangre.

El presente trabajo es el primero en estudiar la correlación entre las concentraciones de las proteínas WNT5A y SFRP5 en sangre de sujetos sanos y en el medio condicionado procedente del cultivo de tejido adiposo visceral y subcutáneo. Nuestros hallazgos demuestran que en niños sanos, las concentraciones de WNT5A y SFRP5, tanto en sangre como en el medio condicionado de tejido adiposo visceral y subcutáneo, se correlacionan positivamente. Además, se ha podido comprobar que en sangre la concentración de SFRP5 es aproximadamente 44 veces superior a la de WNT5A.

En adultos con alteraciones metabólicas las concentraciones de WNT5A y SFRP5 se pueden detectar en sangre, en cambio, en adultos sanos se observan concentraciones elevadas de SFRP5 mientras que WNT5A disminuye o incluso se vuelve indetectable [108, 173]. Creemos que en los adultos obesos con hipertrofia del tejido adiposo aumenta la producción de WNT5A y disminuye la de SFRP5. Por el contrario en los niños, en los que el tejido adiposo es capaz de responder al exceso de ingesta calórica

con un aumento hiperplásico del tejido adiposo, siempre que hay un aumento de la concentración de WNT5A se corresponde con un aumento proporcional de SFRP5 que tiene una finalidad compensatoria. El resultado final es que en niños metabólicamente sanos el balance entre las dos proteínas está claramente decantado a favor de SFRP5. En adultos obesos, a pesar de tener concentraciones de WNT5A más bajas que las halladas en los niños, los efectos deletéreos de WNT5A no son contrarrestados eficazmente debido a que tienen concentraciones de SFRP5 muy bajas (Figura 27). Estudios fisiopatológicos realizados en pacientes obesos demuestran que el tejido adiposo de los obesos responde a la estimulación con agentes inflamatorios aumentando la expresión génica y la concentración circulante de WNT5A, mientras que el mismo estímulo no afecta a la producción de SFRP5 [109].

Debido a la relación positiva observada entre las dos proteínas, se quiso estudiar si las asociaciones clínicas observadas para la proteína WNT5A dependen de los niveles de SFRP5. Nuestros resultados demostraron que cuando las concentraciones de SFRP5 eran inferiores a la mediana de la muestra, los niveles de WNT5A en sangre se correlacionaban de forma positiva con el HOMA-IR y la GPT. Creemos que estos resultados demuestran que cuando la presencia de WNT5A no puede ser contrarrestada con un aumento de producción de SFRP5 los efectos deletéreos de WNT5A sobre el metabolismo pueden llegar a expresarse. Estos resultados no se confirmaron en el estudio de seguimiento, aunque no descartamos la posibilidad de que sea un falso resultado negativo, debido a que el número de sujetos con SFRP5 bajo fue muy pequeño y se redujo el poder estadístico del análisis.

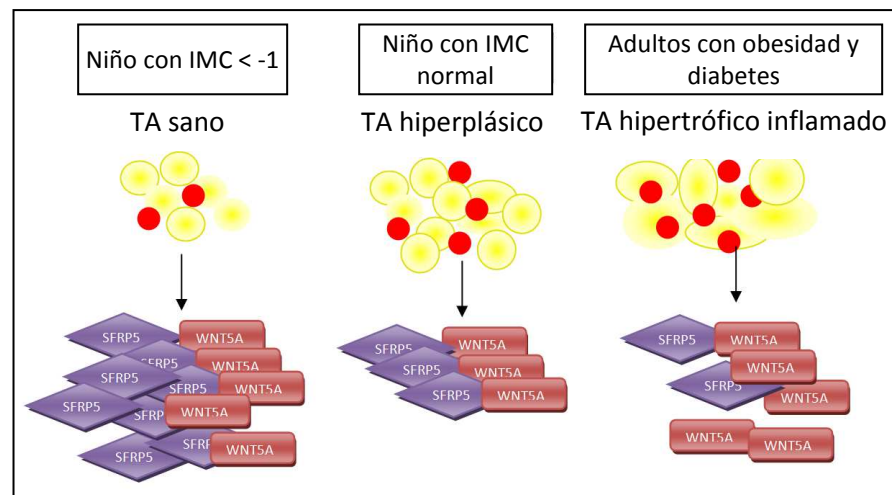


Figura 27 | Modelo propuesto de asociación entre las proteínas WNT5A y SFRP5 en función del IMC de los niños y comparación con los adultos con patología.

6.5 DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

En resumen, los resultados derivados de esta tesis doctoral demuestran que las proteínas WNT5A, SFRP5 y CRT3 son secretadas por el tejido adiposo visceral y subcutáneo en niños sanos prepuberales, siendo el tejido adiposo visceral el principal secretor. Además, las concentraciones bajas de SFRP5 y elevadas de WNT5A y CRT3 se acompañan con un perfil metabólico disfuncional, consistente en una relativa disminución de la adiponectina en sangre, aumento de la resistencia a la insulina y aumento del índice de masa corporal (Figura 28).

Finalmente, el estudio del eje WNT5A-SFRP5 ha mostrado que las dos proteínas se relacionan positivamente tanto en el medio condicionado de las biopsias de tejido adiposo como en el suero de los niños sanos. Además, nuestros resultados demuestran que las concentraciones bajas de SFRP5 en sangre potencian la relación entre WNT5A y el aumento de la resistencia a la insulina y la concentración GPT.

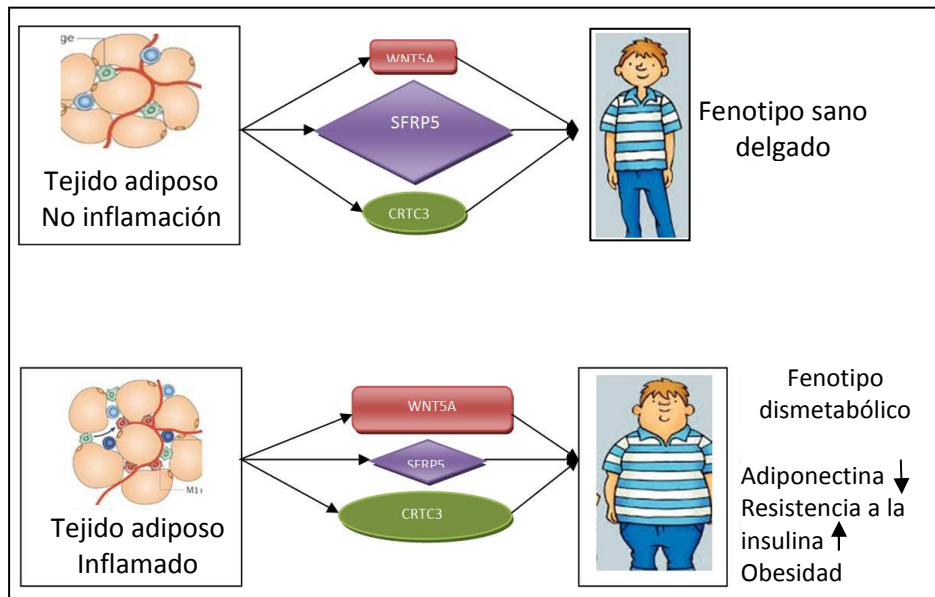


Figura 28 | Modelo propuesto de asociación entre las proteínas WNT5A, SFRP5 y CRT3 en relación a la inflamación del tejido adiposo y el fenotipo metabólico en niños delgados y obesos.

CONCLUSIONES

1. Las proteínas WNT5A, SFRP5 y CRT3 son secretadas por el tejido adiposo visceral y subcutáneo y sus concentraciones pueden ser cuantificadas en sangre periférica de niños sanos prepuberales.
2. Las concentraciones más altas de WNT5A se relacionan con una mayor resistencia a la insulina y GPT. Estas asociaciones se potencian en los niños con niveles de SFRP5 inferiores a la media.
3. Un incremento de la concentración de SFRP5 se asocia con un aumento de la adiponectina de alto peso molecular y con valores más bajos del índice de masa corporal en escolares sanos.
4. Los valores altos de CRT3 en suero se relacionan con un mayor índice de masa corporal y perímetro de cintura en aquellos niños menos delgados.
5. Las proteínas WNT5A y SFRP5 se relacionan positivamente tanto en el medio condicionado de las biopsias de tejido adiposo como en el suero de los niños sanos.
6. Valores altos de CRT3 en la edad de 7 años predicen un mayor aumento de índice de masa corporal y menor en la adiponectina de APM en los mismos niños a los 10 años de edad.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO, *European Ministerial Conference on Counteracting Obesity. Istanbul, Turkey*. 2006.
2. Steiner, G. and G.F. Cahill, Jr., *Adipose Tissue Physiology*. Ann N Y Acad Sci, 1963. **110**: p. 749-53.
3. Habas, R. and I.B. Dawid, *Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier?* J Biol, 2005. **4**(1): p. 2.
4. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 772-83.
5. Ouchi, N., et al., *Adipokines in inflammation and metabolic disease*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(2): p. 85-97.
6. Kawano, Y. and R. Kypta, *Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 13): p. 2627-34.
7. Christodoulides, C., et al., *Adipogenesis and WNT signalling*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(1): p. 16-24.
8. Altarejos, J.Y. and M. Montminy, *CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(3): p. 141-51.
9. Oh, D.Y. and J.M. Olefsky, *Medicine. Wnt fans the flames in obesity*. Science, 2010. **329**(5990): p. 397-8.
10. Fernandez-Real, J.M., et al., *Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition*. Diabetes Care, 2003. **26**(5): p. 1362-8.
11. Hotamisligil, G.S. and E. Erbay, *Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 923-34.
12. Ley, R.E., et al., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1022-3.
13. Neel, J.V., *Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"?* Am J Hum Genet, 1962. **14**: p. 353-62.
14. Watve, M.G. and C.S. Yajnik, *Evolutionary origins of insulin resistance: a behavioral switch hypothesis*. BMC Evol Biol, 2007. **7**: p. 61.
15. Egger, G. and B. Swinburn, *An "ecological" approach to the obesity pandemic*. Bmj, 1997. **315**(7106): p. 477-80.
16. Spiegelman, B.M. and J.S. Flier, *Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture*. Cell, 1996. **87**(3): p. 377-89.
17. Eknoyan, G., *Adolphe Quetelet (1796-1874)--the average man and indices of obesity*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(1): p. 47-51.
18. Quiles, J.L., et al., *Dietary intake and anthropometric measures in a Spanish students group*. Int J Vitam Nutr Res, 1996. **66**(4): p. 371-7.
19. Cook, S., et al., *Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994*. Arch Pediatr Adolesc Med, 2003. **157**(8): p. 821-7.
20. (NIH), N.I.o.H., *Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults—the evidence report*. Obes Res, 1998. **6**: p. 51–209.
21. Barnett, A.H., *The importance of treating cardiometabolic risk factors in patients with type 2 diabetes*. Diab Vasc Dis Res, 2008. **5**(1): p. 9-14.
22. Bray, G.A., et al., *Relation of central adiposity and body mass index to the development of diabetes in the Diabetes Prevention Program*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(5): p. 1212-8.

23. Aranceta, J., et al., *Estudio DORICA: Dislipemia, obesidad y riesgo cardiovascular*. 2004, Madrid: Editorial Panamericana 125-156.
24. WHO, *Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee*. World Health Organ Tech Rep Ser, 1995. **854**: p. 1-452.
25. Carrascosa Lezcano, A., et al., [*Spanish cross-sectional growth study 2008. Part II. Height, weight and body mass index values from birth to adulthood*]. *An Pediatr (Barc)*, 2008. **68**(6): p. 552-69.
26. Carrascosa, A., et al., *Spanish growth studies 2008. New anthropometric standards*. *Endocrinol Nutr*, 2008. **55**(10): p. 484-506.
27. Lobstein, T. and M.L. Frelut, *Prevalence of overweight among children in Europe*. *Obes Rev*, 2003. **4**(4): p. 195-200.
28. Ogden, C.L., M.D. Carroll, and K.M. Flegal, *High body mass index for age among US children and adolescents, 2003-2006*. *Jama*, 2008. **299**(20): p. 2401-5.
29. Sanchez-Cruz, J.J., et al., *Prevalence of child and youth obesity in Spain in 2012*. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 2013. **66**(5): p. 371-6.
30. Lobstein, T., L. Baur, and R. Uauy, *Obesity in children and young people: a crisis in public health*. *Obes Rev*, 2004. **5 Suppl 1**: p. 4-104.
31. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. *Nature*, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
32. Qatanani, M. and M.A. Lazar, *Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu*. *Genes Dev*, 2007. **21**(12): p. 1443-55.
33. Schenk, S., M. Saberi, and J.M. Olefsky, *Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(9): p. 2992-3002.
34. Hubert, H., et al., *Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study*. *Circulation*, 1983. **67**(5): p. 968-77.
35. Yusuf, S., et al., *Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study*. *Lancet*, 2004. **364**(9438): p. 937-52.
36. Van Gaal, L.F., I.L. Mertens, and C.E. De Block, *Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease*. *Nature*, 2006. **444**(7121): p. 875-80.
37. Must, A., et al., *Long-term morbidity and mortality of overweight adolescents. A follow-up of the Harvard Growth Study of 1922 to 1935*. *N Engl J Med*, 1992. **327**(19): p. 1350-5.
38. Huynh, Q., et al., *Relative contributions of adiposity in childhood and adulthood to vascular health of young adults*. *Atherosclerosis*, 2013. **228**(1): p. 259-64.
39. Osiniri, I., et al., *Carotid intima-media thickness at 7 years of age: relationship to C-reactive protein rather than adiposity*. *J Pediatr*, 2012. **160**(2): p. 276-280 e1.
40. Reinehr, T. and R. Wunsch, *Intima media thickness-related risk factors in childhood obesity*. *Int J Pediatr Obes*, 2011. **6 Suppl 1**: p. 46-52.
41. Soriano-Rodriguez, P., et al., *Physiological concentrations of serum cortisol are related to vascular risk markers in prepubertal children*. *Pediatr Res*, 2010. **68**(5): p. 452-5.
42. Calabro, P., et al., *Release of C-reactive protein in response to inflammatory cytokines by human adipocytes: linking obesity to vascular inflammation*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **46**(6): p. 1112-3.

43. Ford, E.S., W.H. Giles, and W.H. Dietz, *Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey*. *Jama*, 2002. **287**(3): p. 356-9.
44. Freedman, D.S., et al., *Inter-relationships among childhood BMI, childhood height, and adult obesity: the Bogalusa Heart Study*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2004. **28**(1): p. 10-6.
45. Cao, L., et al., *White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis*. *Cell Metab*, 2011. **14**(3): p. 324-38.
46. Wozniak, S.E., et al., *Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article*. *Dig Dis Sci*, 2009. **54**(9): p. 1847-56.
47. Cypess, A.M., et al., *Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(15): p. 1509-17.
48. Huang, T.T., et al., *Growth of visceral fat, subcutaneous abdominal fat, and total body fat in children*. *Obes Res*, 2001. **9**(5): p. 283-9.
49. Eaton, S.B. and M. Konner, *Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications*. *N Engl J Med*, 1985. **312**(5): p. 283-9.
50. Sarjeant, K. and J.M. Stephens, *Adipogenesis*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(9): p. a008417.
51. Lafontan, M., *Advances in adipose tissue metabolism*. *Int J Obes (Lond)*, 2008. **32 Suppl 7**: p. S39-51.
52. Kershaw, E.E. and J.S. Flier, *Adipose tissue as an endocrine organ*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(6): p. 2548-56.
53. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. *Nature*, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
54. Friedman, J.M. and J.L. Halaas, *Leptin and the regulation of body weight in mammals*. *Nature*, 1998. **395**(6704): p. 763-70.
55. Ahima, R.S., et al., *Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting*. *Nature*, 1996. **382**(6588): p. 250-2.
56. Caro, J.F., et al., *Leptin: the tale of an obesity gene*. *Diabetes*, 1996. **45**(11): p. 1455-62.
57. Munzberg, H. and M.G. Myers, Jr., *Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance*. *Nat Neurosci*, 2005. **8**(5): p. 566-70.
58. Vendrell, J., et al., *Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity*. *Obes Res*, 2004. **12**(6): p. 962-71.
59. Shanker, J., et al., *Relationship of adiponectin and leptin to coronary artery disease, classical cardiovascular risk factors and atherothrombotic biomarkers in the IARS cohort*. *Thromb Haemost*, 2012. **108**(4): p. 769-80.
60. Yadav, A., et al., *Role of leptin and adiponectin in insulin resistance*. *Clin Chim Acta*, 2012. **417**: p. 80-4.
61. Nakano, Y., et al., *Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma*. *J Biochem*, 1996. **120**(4): p. 803-12.
62. Maeda, K., et al., *cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **221**(2): p. 286-9.
63. Hu, E., P. Liang, and B.M. Spiegelman, *AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(18): p. 10697-703.
64. Scherer, P.E., et al., *A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(45): p. 26746-9.

65. Pajvani, U.B., et al., *Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity*. J Biol Chem, 2004. **279**(13): p. 12152-62.
66. Aso, Y., et al., *Comparison of serum high-molecular weight (HMW) adiponectin with total adiponectin concentrations in type 2 diabetic patients with coronary artery disease using a novel enzyme-linked immunosorbent assay to detect HMW adiponectin*. Diabetes, 2006. **55**(7): p. 1954-60.
67. Kobayashi, H., et al., *Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin*. Circ Res, 2004. **94**(4): p. e27-31.
68. Yamauchi, T., et al., *Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects*. Nature, 2003. **423**(6941): p. 762-9.
69. Cook, J.R. and R.K. Semple, *Hypoadiponectinemia--cause or consequence of human "insulin resistance"?* J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(4): p. 1544-54.
70. Cnop, M., et al., *Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex*. Diabetologia, 2003. **46**(4): p. 459-69.
71. Kondo, H., et al., *Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome*. Diabetes, 2002. **51**(7): p. 2325-8.
72. Schwarz, P.E., et al., *Hypoadiponectinemia is associated with progression toward type 2 diabetes and genetic variation in the ADIPOQ gene promoter*. Diabetes Care, 2006. **29**(7): p. 1645-50.
73. Iwashima, Y., et al., *Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension*. Hypertension, 2004. **43**(6): p. 1318-23.
74. Okamoto, Y., et al., *Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome*. Clin Sci (Lond), 2006. **110**(3): p. 267-78.
75. Kumada, M., et al., *Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(1): p. 85-9.
76. Neese, R.A., et al., *Measurement in vivo of proliferation rates of slow turnover cells by ²H₂O labeling of the deoxyribose moiety of DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15345-50.
77. Olefsky, J.M. and C.K. Glass, *Macrophages, inflammation, and insulin resistance*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 219-46.
78. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 175-84.
79. Arkan, M.C., et al., *IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 191-8.
80. Frohlich, M., et al., *Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study*. Diabetes Care, 2000. **23**(12): p. 1835-9.
81. Qi, L., et al., *Adipocyte CREB promotes insulin resistance in obesity*. Cell Metab, 2009. **9**(3): p. 277-86.
82. Virtue, S. and A. Vidal-Puig, *Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(3): p. 338-49.
83. Kau, A.L., et al., *Human nutrition, the gut microbiome and the immune system*. Nature, 2012. **474**(7351): p. 327-36.
84. Ozanne, S.E. and C.N. Hales, *Thrifty yes, genetic no*. Diabetologia, 1998. **41**(4): p. 485-7.

85. Medina-Gomez, G. and A. Vidal-Puig, [*Adipose tissue as a therapeutic target in obesity*]. *Endocrinol Nutr*, 2009. **56**(8): p. 404-11.
86. Unger, R.H., *Lipotoxic diseases*. *Annu Rev Med*, 2002. **53**: p. 319-36.
87. Spalding, K.L., et al., *Dynamics of fat cell turnover in humans*. *Nature*, 2008. **453**(7196): p. 783-7.
88. Tchoukalova, Y., C. Koutsari, and M. Jensen, *Committed subcutaneous preadipocytes are reduced in human obesity*. *Diabetologia*, 2007. **50**(1): p. 151-7.
89. van Amerongen, R. and R. Nusse, *Towards an integrated view of Wnt signaling in development*. *Development*, 2009. **136**(19): p. 3205-14.
90. Nusse, R., et al., *Wnt signaling and stem cell control*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2008. **73**: p. 59-66.
91. Minear, S., et al., *Wnt proteins promote bone regeneration*. *Sci Transl Med*, 2010. **2**(29): p. 29ra30.
92. Staal, F.J. and T.C. Luis, *Wnt signaling in hematopoiesis: crucial factors for self-renewal, proliferation, and cell fate decisions*. *J Cell Biochem*, 2010. **109**(5): p. 844-9.
93. Clevers, H. and R. Nusse, *Wnt/beta-catenin signaling and disease*. *Cell*, 2012. **149**(6): p. 1192-205.
94. Liu, H., et al., *Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging*. *Science*, 2007. **317**(5839): p. 803-6.
95. Pereira, C., et al., *Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(3): p. 504-10.
96. Kurayoshi, M., et al., *Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling*. *Biochem J*, 2007. **402**(3): p. 515-23.
97. He, X., et al., *A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A*. *Science*, 1997. **275**(5306): p. 1652-4.
98. Prestwich, T.C. and O.A. Macdougald, *Wnt/beta-catenin signaling in adipogenesis and metabolism*. *Curr Opin Cell Biol*, 2007. **19**(6): p. 612-7.
99. Gao, C. and Y.G. Chen, *Dishevelled: The hub of Wnt signaling*. *Cell Signal*, 2010. **22**(5): p. 717-27.
100. Komiya, Y. and R. Habas, *Wnt signal transduction pathways*. *Organogenesis*, 2008. **4**(2): p. 68-75.
101. Mikels, A.J. and R. Nusse, *Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context*. *PLoS Biol*, 2006. **4**(4): p. e115.
102. Cruciat, C.M. and C. Niehrs, *Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **5**(3): p. a015081.
103. Gordon, M.D. and R. Nusse, *Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(32): p. 22429-33.
104. Bilkovski, R., et al., *Adipose tissue macrophages inhibit adipogenesis of mesenchymal precursor cells via wnt-5a in humans*. *Int J Obes (Lond)*, 2011. **35**(11): p. 1450-4.
105. Kennell, J.A. and O.A. MacDougald, *Wnt signaling inhibits adipogenesis through beta-catenin-dependent and -independent mechanisms*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(25): p. 24004-10.

106. Takada, I., et al., *A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(11): p. 1273-85.
107. Bilkovski, R., et al., *Role of WNT-5a in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes*. J Biol Chem, 2010. **285**(9): p. 6170-8.
108. Schulte, D.M., et al., *Pro-inflammatory wnt5a and anti-inflammatory sFRP5 are differentially regulated by nutritional factors in obese human subjects*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e32437.
109. Catalan, V., et al., *Activation of non-canonical Wnt signaling through WNT5A in visceral adipose tissue of obese subjects is related to inflammation*. J Clin Endocrinol Metab, 2014: p. jc20141191.
110. Ouchi, N., et al., *Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity*. Science, 2010. **329**(5990): p. 454-7.
111. Wang, H., et al., *Methylation of SFRP5 is related to multidrug resistance in leukemia cells*. Cancer Gene Ther, 2014. **21**(2): p. 83-9.
112. Xie, Q., et al., *Epigenetic silencing of SFRP1 and SFRP5 by Hepatitis B Virus X protein enhances hepatoma cell tumorigenicity through wnt signaling pathway*. Int J Cancer, 2013.
113. Zhao, C., et al., *GEC-derived SFRP5 inhibits Wnt5a-induced macrophage chemotaxis and activation*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e85058.
114. Kwon, Y.J., et al., *Secreted frizzled-related protein 5 suppresses inflammatory response in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes through down-regulation of c-Jun N-terminal kinase*. Rheumatology (Oxford), 2014.
115. Miyoshi, T., et al., *Low serum level of secreted frizzled-related protein 5, an anti-inflammatory adipokine, is associated with coronary artery disease*. Atherosclerosis, 2014. **233**(2): p. 454-9.
116. Jones, S.E., et al., *Modulated expression of secreted frizzled-related proteins in human retinal degeneration*. Neuroreport, 2000. **11**(18): p. 3963-7.
117. Bovolenta, P., et al., *Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 6): p. 737-46.
118. Bhat, R.A., et al., *Structure-function analysis of secreted frizzled-related protein-1 for its Wnt antagonist function*. J Cell Biochem, 2007. **102**(6): p. 1519-28.
119. Jones, S.E. and C. Jomary, *Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns*. Bioessays, 2002. **24**(9): p. 811-20.
120. Chong, J.M., et al., *Disulfide bond assignments of secreted Frizzled-related protein-1 provide insights about Frizzled homology and netrin modules*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 5134-44.
121. Zhong, X., et al., *Regulation of secreted Frizzled-related protein-1 by heparin*. J Biol Chem, 2007. **282**(28): p. 20523-33.
122. Moon, R.T., et al., *Structurally related receptors and antagonists compete for secreted Wnt ligands*. Cell, 1997. **88**(6): p. 725-8.
123. Bafico, A., et al., *Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling*. J Biol Chem, 1999. **274**(23): p. 16180-7.
124. Dann, C.E., et al., *Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains*. Nature, 2001. **412**(6842): p. 86-90.

125. Surana, R., et al., *Secreted frizzled related proteins: Implications in cancers*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1845**(1): p. 53-65.
126. Lv, C., et al., *Sfrp5 expression and secretion in adipocytes are up-regulated during differentiation and are negatively correlated with insulin resistance*. Cell Biol Int, 2012. **36**(9): p. 851-5.
127. Aguirre, V., et al., *The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307)*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 9047-54.
128. Hu, W., et al., *Circulating Sfrp5 is a signature of obesity-related metabolic disorders and is regulated by glucose and liraglutide in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **98**(1): p. 290-8.
129. Hu, Z., H. Deng, and H. Qu, *Plasma SFRP5 levels are decreased in Chinese subjects with obesity and type 2 diabetes and negatively correlated with parameters of insulin resistance*. Diabetes Res Clin Pract, 2013. **99**(3): p. 391-5.
130. Mori, H., et al., *Secreted frizzled-related protein 5 suppresses adipocyte mitochondrial metabolism through WNT inhibition*. J Clin Invest, 2012. **122**(7): p. 2405-16.
131. Altarejos, J.Y., et al., *The Creb1 coactivator Crtc1 is required for energy balance and fertility*. Nat Med, 2008. **14**(10): p. 1112-7.
132. Brunet, A., *A CRTC1 link between energy and life span*. Cell Metab, 2011. **13**(4): p. 358-60.
133. Koo, S.H., et al., *The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism*. Nature, 2005. **437**(7062): p. 1109-11.
134. Bittinger, M.A., et al., *Activation of cAMP response element-mediated gene expression by regulated nuclear transport of TORC proteins*. Curr Biol, 2004. **14**(23): p. 2156-61.
135. Conkright, M.D., et al., *TORCs: transducers of regulated CREB activity*. Mol Cell, 2003. **12**(2): p. 413-23.
136. Iourgenko, V., et al., *Identification of a family of cAMP response element-binding protein coactivators by genome-scale functional analysis in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12147-52.
137. Song, Y., et al., *CRTC3 links catecholamine signalling to energy balance*. Nature, 2010. **468**(7326): p. 933-9.
138. Montminy, M.R. and L.M. Bilezikjian, *Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene*. Nature, 1987. **328**(6126): p. 175-8.
139. Zhang, X., et al., *Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(12): p. 4459-64.
140. Sreaton, R.A., et al., *The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector*. Cell, 2004. **119**(1): p. 61-74.
141. Fu, A. and R.A. Sreaton, *Using kinomics to delineate signaling pathways: control of CRTC2/TORC2 by the AMPK family*. Cell Cycle, 2008. **7**(24): p. 3823-8.
142. Katoh, Y., et al., *Silencing the constitutive active transcription factor CREB by the LKB1-SIK signaling cascade*. Febs J, 2006. **273**(12): p. 2730-48.
143. Lafontan, M., et al., *Adrenergic regulation of adipocyte metabolism*. Hum Reprod, 1997. **12 Suppl 1**: p. 6-20.
144. Meinkoth, J.L., et al., *Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase*. Mol Cell Biochem, 1993. **127-128**: p. 179-86.

145. Henriksson, E., et al., *The AMPK-related kinase SIK2 is regulated by cAMP via phosphorylation at Ser358 in adipocytes*. *Biochem J*, 2012. **444**(3): p. 503-14.
146. Liu, Y., et al., *A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange*. *Nature*, 2008. **456**(7219): p. 269-73.
147. Hagiwara, M., et al., *Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(8): p. 4852-9.
148. Landsberg, L., *Feast or famine: the sympathetic nervous system response to nutrient intake*. *Cell Mol Neurobiol*, 2006. **26**(4-6): p. 497-508.
149. van Baak, M.A., *The peripheral sympathetic nervous system in human obesity*. *Obes Rev*, 2001. **2**(1): p. 3-14.
150. Bachman, E.S., et al., *betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance*. *Science*, 2002. **297**(5582): p. 843-5.
151. Denzer, C., et al., *Gender-specific prevalences of fatty liver in obese children and adolescents: roles of body fat distribution, sex steroids, and insulin resistance*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(10): p. 3872-81.
152. Schwartz, M.W. and D.G. Baskin, *Leptin and the brain: then and now*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(6): p. 2344-5.
153. Marshall, W.A. and J.M. Tanner, *Growth and physiological development during adolescence*. *Annu Rev Med*, 1968. **19**: p. 283-300.
154. Jaffrin, M.Y. and H. Morel, *Body fluid volumes measurements by impedance: A review of bioimpedance spectroscopy (BIS) and bioimpedance analysis (BIA) methods*. *Med Eng Phys*, 2008. **30**(10): p. 1257-69.
155. Matthews, D.R., et al., *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. *Diabetologia*, 1985. **28**(7): p. 412-9.
156. Finucane, F.M., et al., *Correlation of the leptin:adiponectin ratio with measures of insulin resistance in non-diabetic individuals*. *Diabetologia*, 2009. **52**(11): p. 2345-9.
157. Ibanez, L., et al., *Metformin treatment for four years to reduce total and visceral fat in low birth weight girls with precocious pubarche*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(5): p. 1841-5.
158. Kawasaki, T., et al., *Non-invasive assessment of the age related changes in stiffness of major branches of the human arteries*. *Cardiovasc Res*, 1987. **21**(9): p. 678-87.
159. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, 1951. **193**(1): p. 265-75.
160. Schumann, G., et al., *IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. Part 3. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of lactate dehydrogenase*. *Clin Chem Lab Med*, 2002. **40**(6): p. 643-8.
161. Despres, J.P. and I. Lemieux, *Abdominal obesity and metabolic syndrome*. *Nature*, 2006. **444**(7121): p. 881-7.
162. Taksali, S.E., et al., *High visceral and low abdominal subcutaneous fat stores in the obese adolescent: a determinant of an adverse metabolic phenotype*. *Diabetes*, 2008. **57**(2): p. 367-71.
163. Shah, R.V., et al., *Visceral Adiposity and the Risk of Metabolic Syndrome Across Body Mass Index: The MESA Study*. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2014. **7**(12): p. 1221-35.

164. Fontana, L., et al., *Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans*. *Diabetes*, 2007. **56**(4): p. 1010-3.
165. Fox, C.S., et al., *Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study*. *Circulation*, 2007. **116**(1): p. 39-48.
166. Arnoys, E.J. and J.L. Wang, *Dual localization: proteins in extracellular and intracellular compartments*. *Acta Histochem*, 2007. **109**(2): p. 89-110.
167. Bonaldi, T., et al., *Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion*. *Embo J*, 2003. **22**(20): p. 5551-60.
168. Robinson, M.B., et al., *Extracellular heat shock protein 70: a critical component for motoneuron survival*. *J Neurosci*, 2005. **25**(42): p. 9735-45.
169. Amelio, A.L., M. Caputi, and M.D. Conkright, *Bipartite functions of the CREB co-activators selectively direct alternative splicing or transcriptional activation*. *Embo J*, 2009. **28**(18): p. 2733-47.
170. Wang, Y., et al., *The CREB coactivator CRTC2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis*. *Nature*, 2009. **460**(7254): p. 534-7.
171. Samarajeewa, N.U., et al., *CREB-Regulated Transcription Co-Activator Family Stimulates Promoter II-Driven Aromatase Expression in Preadipocytes*. *Horm Cancer*, 2013. **4**(4): p. 233-41
172. Watts, A.G., et al., *The distribution of messenger RNAs encoding the three isoforms of the transducer of regulated cAMP responsive element binding protein activity in the rat forebrain*. *J Neuroendocrinol*, 2011. **23**(8): p. 754-66.
173. Lu, Y.C., et al., *Circulating secreted frizzled-related protein 5 (Sfrp5) and wingless-type MMTV integration site family member 5a (Wnt5a) levels in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2013. **29**(7): p. 551-6.
174. Martos-Moreno, G.A., et al., *Adipokines in childhood obesity*. *Vitam Horm*, 2013. **91**: p. 107-42.
175. Landgraf, K., et al., *Evidence of early alterations in adipose tissue biology and function and its association with obesity-related inflammation and insulin resistance in children*. *Diabetes*, 2014.
176. Aucouturier, J., P. Duche, and B.W. Timmons, *Metabolic flexibility and obesity in children and youth*. *Obes Rev*, 2011. **12**(5): p. e44-53.
177. Nishita, M., et al., *Cell/tissue-tropic functions of Wnt5a signaling in normal and cancer cells*. *Trends Cell Biol*, 2010. **20**(6): p. 346-54.
178. Carstensen, M., et al., *Sfrp5 correlates with insulin resistance and oxidative stress*. *Eur J Clin Invest*, 2013. **43**(4): p. 350-7.
179. Ehrlund, A., et al., *Characterization of the Wnt inhibitors secreted frizzled-related proteins (SFRPs) in human adipose tissue*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013. **98**(3): p. E503-8.
180. Carstensen, M., et al., *Effect of Sfrp5 on cytokine release and insulin action in primary human adipocytes and skeletal muscle cells*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e85906.
181. Klein, S., et al., *Waist Circumference and Cardiometabolic Risk: a Consensus Statement from Shaping America's Health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, the Obesity Society; the American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association*. *Obesity (Silver Spring)*, 2007. **15**(5): p. 1061-7.

182. Tan, X., et al., *SFRP5 correlates with obesity and metabolic syndrome and increases after weight loss in children*. Clin Endocrinol (Oxf), 2014. **81**(3): p. 363-9.
183. Visser, M., et al., *Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults*. Jama, 1999. **282**(22): p. 2131-5.
184. Wells, J.C., *Thrift: a guide to thrifty genes, thrifty phenotypes and thrifty norms*. Int J Obes (Lond), 2009. **33**(12): p. 1331-8.
185. Ou, Z., et al., *CRTC3 polymorphisms were associated with the plasma level of total cholesterol and the risks of overweight and hypertriglyceridemia in a Chinese Han population*. Mol Biol Rep, 2013.
186. Hedley, A.A., et al., *Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002*. Jama, 2004. **291**(23): p. 2847-50.
187. Fasshauer, M., et al., *Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes*. FEBS Lett, 2001. **507**(2): p. 142-6.