

*Estudi del canal de glicerol AQP7
i de l'adipoquina ZAG en l'àmbit
de l'obesitat, la diabetis tipus 2
i la síndrome metabòlica.
Dues proteïnes implicades
en la lipòlisi del teixit adipós*

M. Victòria Ceperuelo Mallafre

La col·lecció CUM LAUDE té com a objectiu editar les millors tesis doctorals en llengua catalana de la Universitat Rovira i Virgili. S'emmarca dins del Pla de política lingüística i pretén estimular l'ús de la llengua catalana en la redacció de les tesis, i prestigiar el català com a llengua de ciència i de recerca.

Aquesta col·lecció neix de la convocatòria d'edició de tesis doctorals en llengua catalana impulsada per la Comissió de Política Lingüística de la Universitat Rovira i Virgili.

¶ Aquesta editorial és membre de la Xarxa Vives i de l'UNE, fet que garanteix la difusió i comercialització de les seves publicacions a escala estatal i internacional.

Estudi del canal de glicerol AQP7 i de
l'adipoquina ZAG en l'àmbit de l'obesitat,
la diabetis tipus 2 i la síndrome metabòlica.
Dues proteïnes implicades en la lipòlisi
del teixit adipós

M^a Victòria Ceperuelo Mallafre



Tarragona, 2011

Aquesta tesi doctoral, dirigida per Joan Vendrell Ortega, va ser presentada al Departament de Medicina i Cirurgia de la Universitat Rovira i Virgili el 2010 i va obtenir la menció de *cum laude*.

Edita:
Publicacions URV

1a edició: abril 2011
ISBN: 978-84-694-2416-2

Publicacions de la Universitat Rovira i Virgili:
Av. Catalunya, 35 - 43002 Tarragona
Tel. 977 558 474 - Fax: 977 558 393
www.urv.cat/publicacions
publicacions@urv.cat

Aquesta edició ha estat possible gràcies a un ajut del Comissionat per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya.

Aquesta edició està subjecta a una llicència Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported de Creative Commons. Per veure'n una còpia, visiteu <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/> o envieu una carta a Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, California 94105, USA.

Índex

PREFACI	7
AGRAÏMENTS	11
ABREVIATURES	15
INTRODUCCIÓ	19
HIPÒTESI I OBJECTIUS	69
RESULTATS	77
DISCUSSIÓ	113
CONCLUSIONS	133
REFERÈNCIES	137

Prefaci

L'obesitat és una malaltia crònica causada per factors molt diversos, tant genètics com ambientals. No es tracta d'un simple problema estètic, sinó que constitueix una veritable amenaça per a la nostra salut, ja que incrementa les possibilitats de patir altres malalties com la diabetis, la dislipèmia, la hipertensió, i les malalties articulars, de la vesícula biliar, coronàries i respiratòries, entre d'altres. L'excés exagerat de pes és un dels problemes de salut pública més preocupants, sobretot perquè la tendència continua anant a l'alça. En les últimes dècades, els canvis socioambientals han influït en la creació d'un estil de vida caracteritzat pels mals hàbits alimentaris i la falta d'activitat física. Amb això, hi ha hagut un increment de malalties com la diabetis, la hipertensió i l'arteriosclerosi, que quan apareixen associades defineixen el que s'ha donat a conèixer com a síndrome metabòlica (SM). L'acumulació de greix abdominal, tant visceral com subcutani, és present en el començament de les diferents patologies que conformen la SM. Per tal de poder avançar en noves dianes terapèutiques que millorin aquestes malalties és necessari conèixer millor la biologia del teixit adipós i els seus components.

El teixit adipós blanc (WAT, de l'anglès *white adipose tissue*), a més a més de tenir activitat metabòlica i endocrina, té la funció de mantenir la major part de les reserves energètiques. Així doncs, disposa de la capacitat per sintetitzar (lipogènesi) i emmagatzemar triglicèrids (TG) durant l'alimentació i la capacitat d'hidrolitzar TG (lipòlisi) i alliberar àcids grassos lliures (AG) i glicerol, durant el dejuni. La regulació de la lipòlisi és essencial per garantir un adequat subministrament de lípids i un ade-

quat metabolisme de la glucosa en els teixits que utilitzen AG lliures i en els que utilitzen glicerol. En resposta a canvis en l'estat nutricional, la lipòlisi és regulada a través de senyals hormonals i bioquímiques. Aquestes senyals modulen l'activitat d'enzims lipolítics i proteïnes accessòries, permetent la màxima capacitat de resposta del teixit adipós a canvis en les necessitats energètiques. L'obesitat principalment es caracteritza per un excés de WAT i un augment de la mida dels adipòcits com a conseqüència d'un increment de TG emmagatzemats en l'adipòcit. Per tant, les alteracions en el procés de la lipòlisi estan freqüentment associades amb l'obesitat.

Així doncs, tenint en compte la importància d'un adequat metabolisme lipídic en l'adipòcit per mantenir l'homeòstasi del teixit adipós de forma equilibrada, s'ha proposat analitzar el paper de dues proteïnes implicades en la lipòlisi del teixit adipós, d'una banda el canal de glicerol aquaporina 7 (AQP7) i per altra l'adipoquina glicoproteïna Zinc- \square 2 (ZAG), en el context de l'obesitat, la SM i la diabetis *mellitus* tipus 2 (DM2).

Ja fa uns anys, l'any 1997, es va identificar l'AQP7, un canal que permet el pas de glicerol a través de la membrana cel·lular de l'adipòcit. En models animals s'ha vist que si s'elimina l'aquaporina (AQP) específica del teixit adipós (AQP7), el glicerol no és capaç de sortir de la cèl·lula i es va acumulant a l'interior. És a dir, es produeix una hipertròfia de l'adipòcit, que si es manté en el temps porta a obesitat. També s'ha comprovat que aquesta AQP pot tenir un paper important en la sensibilitat a la insulina. Una altra proteïna identificada no fa massa temps (1999) és l'aquaporina 9 (AQP9), el canal de glicerol específic del fetge. La regulació coordinada d'aquests canals dóna lloc a un balanç de glicerol òptim entre la sortida de l'adipòcit i l'entrada al fetge. Per tant, un adequat circuit del glicerol en el teixit adipós sembla que podria ser important a l'hora de mantenir un correcte equilibri metabòlic, que en el cas de trobar-se alterat, podria afavorir el desenvolupament d'obesitat i de diabetis.

L'altra proteïna que està rebent atenció recentment pel seu potencial com a molècula lipolítica és l'adipoquina anomenada ZAG. Aquesta proteïna que afecta el metabolisme de l'adipòcit, actua com a factor mobilitzador de lípids (LMF, de l'anglès *Lipid mobilizing factor*) estimulant la

lipòlisi en el teixit adipós. Això ha fet que hagi estat proposat com a factor candidat en la regulació del pes corporal. En adipòcits humans i de ratolí el tractament amb ZAG estimula la lipòlisi i selectivament redueix el greix corporal en ratolins normals i obesos. La supressió de ZAG en l'obesitat podria estar relacionada amb el seu paper en la regulació del metabolisme lipídic. Aquest fet obre la porta a la possibilitat que ZAG pugui ser una diana útil en el tractament de l'obesitat en humans.

Agraïments

La realització de la present tesi doctoral no hagués estat possible sense tots aquells que han posat el seu gra de sorra. Per tant, vull agrair sincerament a tots aquells que m'heu acompanyat, ajudat i recolzat durant aquests anys, però tampoc em vull oblidar d'aquells que han estat en moments previs (avis, companys d'estudis, de feina, professors i amics) i que de manera no tan directa han col·laborat. A tots ells MOLTES GRÀCIES!!

Primer de tot, al director de la tesi, al Dr. Joan J. Vendrell Ortega. Gràcies Joan per donar-me l'oportunitat de formar-me com investigadora, per confiar tant en mi, per ensenyar-me tant a nivell científic com personal, per recolzar-me sempre que ho he necessitat, per escoltar-me, per transmetre'm tant positivisme i per la teva dedicació i supervisió.

A les codirectores, la Dra. Merce Miranda i la Dra. Matilde Rodríguez Chacón. Gràcies a les dues per haver-me iniciat en el món de la recerca, per ensenyar-me, pels vostres consells i per la vostra entrega i guia.

Al Lluís Gallart i a la Dra. Cristina Gutiérrez per estar sempre allí, per la predisposició a resoldre'm tots els dubtes que m'han sorgit, ja siguin tècnics i/o estadístics, entre molts d'altres, gràcies per la vostra amabilitat i per fer-me sentir bé!

A la Míriam i a la Elsa, més que bones companyes de feina, pel dia a dia, per compartir moments d'estrès, de nerviosisme, d'alegries, d'assajos, i molts d'altres que tant m'han ajudat.

A la Maria de la Cova, gràcies pel gran suport tant administratiu com personal.

A tots ells i a la resta del grup, a les endocrines Ana Megía, Esther Solano, Inma Simón i Silvia Näf, a la Vero, al Dr. Xavier Escoté, al Dr. Antonio Garcia España, al Javier i al Nacho pel vostre suport, la vostra col·laboració i la vostra ajuda en el treball diari.

Agrair també a tots aquells que potser sense adonar-se'n han format part d'aquesta recerca, us sona l'aquaporina?:

Als meus amics,

Gràcies “amparitos” Lourdes, Pat i Ana, per estar en els moments bons i dolents, per escoltar-me, per fer-me riure, per les festes, pels viatges, entre moltes altres coses. És a dir, gràcies per tot el viscut amb vosaltres que tant m'ha ajudat durant aquests anys. Gràcies Ana per llegir la tesi i pels teus suggeriments. A elles, a tota la gran família del bàsquet (especialment a la Vadillo, Sánchez, Jose, Oskar, Anna, Borrells, Jordi, Laura, Víctor, Marta, Javi i a tots i totes que han estat en algun moment messer femení) i a les companyes de la uni (Eli, Pusi, Pili, Inma i Bibiana), per infinitats de coses, per la vostra amistat, per donar-me forces, per recolzar-me, pel treball en equip, pels vostres comentaris i consells, gràcies per fer-me costat.

I a la meva família pel seu suport incondicional,

Al meu germà gran Manel, per ser molt bon model a seguir, pels grans consells, per encomanar-me il·lusió i satisfacció en la realització de la tesi i per la teva ajuda i comentaris en la redacció. Al germà petit, al Joan, gràcies per ajudar-me sempre que ho he necessitat, tant a nivell informàtic com personal en el dia a dia, gràcies per ser com ets i donar-me energia, vitalitat i estimació.

Agraixo també a la Danae i a la Belén la vostra ajuda i col·laboració. Gràcies Danae pels teus suggeriments en la redacció de la tesi. I també als petits de la casa, Daniel i Alejandro, que sense ser massa conscients m'han donat molts bons instants de lleure que tant m'han ajudat. Vull donar gràcies també a la meva àvia Carmen, pels bons moments i per tanta estimació.

Per acabar, un dels agraïments més gran per als meus pares, Manel i M^a Victòria, que de ben segur que són uns dels que han sentit més

vegades la paraula aquaporina. GRÀCIES per tot, sobretot per ser els principals "culpables" de què ara mateix pugui estar escrivint tot això. Gràcies per entendre'm, per recolzar-me, per escoltar-me, per ajudar-me, per tanta paciència, per confiar tant en mi i no segueixo perquè no acabaria mai. Gràcies per estar sempre al meu costat i per donar tot el possible i més.

Abreviatures

En la present tesi s'inclouen taules, figures i articles en anglès, així doncs, per tal de facilitar la lectura i unificar les abreviatures s'ha considerat més adequat posar algunes abreviacions que representen a les paraules angleses.

AC: Adenilat ciclasa

ADA: American Diabetes Association

ADN: Àcid desoxiribonucleic

AG: Àcids grassos

AKT: Proteïna quinasa B (PKB)

APP: Proteïnes de fase aguda

AQP/s: Aquaporina/es

AQP7: Aquaporina 7

AQP9: Aquaporina 9

AQPap: Aquaporin adipose

ARN(m): Àcid ribonucleic (missatger)

ATGL: Lipasa adiposa de triglicèrids

BAT: Teixit adipós marró

CAMP: Adenosina monofosfat cíclica

C/EBP α : CCAAT Enhancer Binding Protein α

CETP: Proteïna transportadora d'esters de colesterol

DAG: Diacilglicèrids o diglicèrids

DM2: Diabetis mellitus tipus 2

EPA: Àcid eicosapentaenoic

FABP: Proteïna de membrana plasmàtica d'unió a àcids grassos
FAT o CD36: Translocasa d'àcids grassos
FATP: Proteïna transportadora d'àcids grassos
GK: Glicerol quinasa
GLPF: Glicerol facilitador
GTP: Guanosin trifosfat
GWAS: Estudis d'associació del genoma complet
HDL: Lipoproteïna d'alta densitat
HOMA-IR: Model d'homeòstasi de la resistència a la insulina
HSL: Lipasa sensible a hormones
ICM: índex de cintura i maluc
IL-1: Intereleucina 1
IL-6: Interleucina 6
IMC: Índex de massa corporal
IRE: Element de resposta a la insulina
IRS-1: Substrat 1 del receptor de la insulina
IRS-2: Substrat 2 del receptor de la insulina
KO: Knockout
LMF/s: Factor/s mobilitzador/s de lípids
MAG: Monoacilglicèrids o monoglicèrids
MCP-1: Proteïna quimiotàctica dels monòcits
MGL: Lipasa monoacilglicerol
MHC-1: Complex principal d'histocompatibilitat de classe 1
NCEPATPIII: National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III
NPA: motiu conservat asparagina-prolina-alanina
OMS: Organització mundial de la salut
PAD: Pressió arterial diastòlica
PAI-1: Inhibidor de l'activador del plasminogen tipus 1
PAS: Pressió arterial sistòlica
PCR: Proteïna C reactiva
PDE: Fosfodiesterasa
PEPCK: Fosfoenol piruvat carboxiquinasa
PIF: Factors inductors de proteòlisi
PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa
PKA: Proteïna quinasa A

PLIN: Perilipina

PPAR γ : Receptor gamma activat per proliferadors de peroxisomes

PPRE: Element de resposta als receptors activats per proliferadors de peroxisomes

RI: Resistència a la insulina

RXR α : Receptor α de l'àcid retinoic

SAT: Teixit adipós (abdominal) subcutani

SGBS: Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel

SM: Síndrome metabòlica

SNPs: Polimorfismes de nucleòtid únic

TG o TAG: Triglicèrids o triacilglicèrids

TNF α : Factor de necrosi tumoral α

TZD/s: Tiazolidinediona/es

UCP/s: Proteïna/es desacoblant/s

UTR: Regió no traduïda del gen

VAT: Teixit adipós (abdominal) visceral

WAT: Teixit adipós blanc

WT: Wildtype

ZAG o AZGP1: Glicoproteïna Zinc- α 2

Introducció

1. Obesitat i sobrepès

1.1 Definició

L'obesitat i el sobrepès es defineixen com una acumulació anormal o excessiva de greix que pot ser perjudicial per a la salut.

L'índex de massa corporal (IMC) és una indicació simple de la relació entre el pes i la talla (kg/m^2) que s'utilitza freqüentment per identificar el sobrepès i l'obesitat en els adults, tant a nivell individual com poblacional. L'IMC constitueix la mesura poblacional més útil del sobrepès i l'obesitat, doncs la forma de calcular-lo no varia en funció del sexe ni de l'edat en la població adulta. No obstant això, s'ha de considerar com una mesura aproximativa, doncs pot no correspondre al mateix grau d'obesitat en diferents individus. L'organització mundial de la salut (OMS) defineix el sobrepès com un IMC igual o superior a $25 \text{ kg}/\text{m}^2$, i l'obesitat com un IMC igual o superior a $30 \text{ kg}/\text{m}^2$. Aquests llinars serveixen de referència per a les avaluacions individuals, però hi ha proves que el risc de malalties cròniques en la població ja augmenta progressivament a partir d'un IMC de $21 \text{ kg}/\text{m}^2$ (veure taula 1) [1].

Taula 1: Classificació Internacional d'obesitat segons l'IMC. Font: Adaptada d'OMS 1995, 2000 i 2004.

Classificació	IMC(kg/m ²)
	Punts de tall
Pes insuficient	<18,50
Primesa severa	<16,00
Primesa moderada	16,00 - 16,99
Primesa lleu	17,00 - 18,49
Rang normal	18,50 - 24,99
Sobrepès	≥25,00
Preobesitat	25,00 - 29,99
Obesitat	≥30,00
Obesitat classe I	30,00 - 34,99
Obesitat classe II	35,00 - 39,99
Obesitat classe III (mòrbida o severa)	≥40,00

1.2 Prevalença

El sobrepès i l'obesitat són factors de risc importants de les malalties cardiovasculars que constitueixen la primera causa de mort. Encara que abans es considerava un problema exclusiu dels països més desenvolupats econòmicament, el sobrepès i l'obesitat estan augmentant espectacularment en els països d'ingressos baixos i mitjans. Això es deu, entre altres coses, als canvis socioambientals, que han influït en la creació d'un estil de vida caracteritzat per la sobrealimentació i la falta d'activitat física.

En molts països europeus la seva prevalença s'ha triplicat des del 1980. Els últims càlculs de l'OMS indiquen que l'any 2005 hi havia en tot el món aproximadament uns 1600 milions d'adults (majors de 15 anys) amb sobrepès, almenys 400 milions d'adults obesos i 20 milions de menors de 5 anys amb sobrepès. A més a més, l'OMS calcula que el 2015 hi hauran aproximadament 2300 milions d'adults amb sobrepès i més de 700 milions amb obesitat [1,2].

1.3 Patogènesi

La patogènesi de l'obesitat probablement és molt més complexa que el simple paradigma d'un desequilibri entre la ingesta i la producció d'energia.

Clàssicament l'obesitat es defineix com un problema d'un mal balanç nutricional, s'ingereixen més calories de les que es gasten, és a dir, es genera un excés de calories que s'emmagatzemen en forma de greix. És clar que no només la quantitat de greix corporal és important en la determinació del risc de malalties, sinó que també ho és la seva distribució. Per exemple, un increment de la circumferència de la cintura, com a mesura de l'obesitat abdominal, es relaciona amb un major risc de malaltia crònica i mortalitat, independentment de l'IMC com a mesura d'obesitat general [3].

Encara que els factors ambientals juguen un paper important en el desenvolupament de l'obesitat, diversos estudis demostren que els factors genètics tenen una contribució significativa en la seva etiologia (figura 1). Els mecanismes genètics de la regulació del pes corporal són complexos, i cada vegada és més evident que existeix un important nombre de gens implicats en l'obesitat. Molts llocs genètics han estat identificats com associats a l'obesitat, malgrat això, aquestes localitzacions només expliquen una petita part de la variació genètica subjacent en el desenvolupament de l'obesitat. Recentment, estudis d'associació del genoma complet (GWAS, de l'anglès *Genome-wide association studies*) han ampliat el nombre de llocs de susceptibilitat genètica de l'obesitat, mitjançant la identificació de nous polimorfismes de nucleòtid únic (SNPs, de l'anglès *Single Nucleotide Polymorphisms*) associats amb l'IMC i el pes, i per tant, que contribueixen al risc d'obesitat [4, 5, 6].

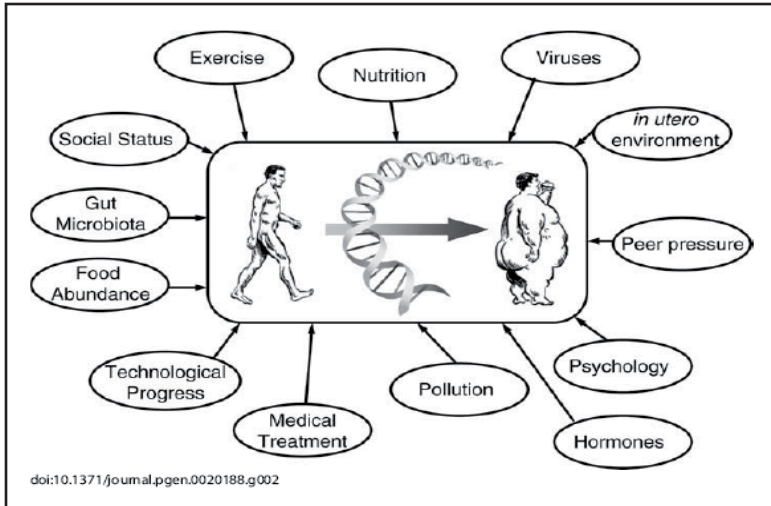


Figura 1. Interaccions gèniques i ambientals en l'obesitat.

Les interaccions complexes que tenen lloc en l'obesitat poligènica demostren que factors genètics, socials, de comportament i ambientals són capaços d'influenciar en el fenotip de l'obesitat. Font: Mutch *et alii* (2006) [4].

1.4 Importància clínica

L'obesitat s'associa a un excés de teixit adipós blanc (WAT, de l'anglès *white adipose tissue*) i representa un risc per a la salut degut a la seva associació amb nombroses complicacions metabòliques, com la resistència a la insulina (RI), la diabetis *mellitus* tipus 2 (DM2), la dislipèmia, la hipertensió arterial i les malalties cardiovasculars. A nivell cel·lular, l'augment de teixit adipós pot ser degut a un increment en la mida dels adipòcits (hipertrofia) o al nombre d'adipòcits (hiperplàsia) [7,8].

Ja fa uns anys, al 1947, Vague apuntava la importància que té la distribució del greix corporal sobre la morbiditat dels pacients obesos. Així que, les complicacions més comunes trobades en pacients obesos estaven majoritàriament relacionades amb la localització de l'excés de greix més que amb l'excés de pes en si mateix. Ja en aquest pioner treball es descrivia l'obesitat androide o de tipus masculina (obesitat superior) com l'obesitat d'alt risc [9]. Posteriorment, diversos estudis han

confirmat que l'alta proporció de greix abdominal és un factor de risc més gran pel desenvolupament de la malaltia coronària i la DM2, incrementant la taxa de mortalitat relacionada amb elles [10]. Actualment, l'obesitat abdominal representa un problema major, tant en clínica com en salut pública [11].

Diversos estudis han atribuït les complicacions metabòliques de l'obesitat a l'augment en teixit adipós visceral (VAT, de l'anglès *visceral adipose tissue*), amb un increment associat dels nivells d'àcids grassos lliures (AG) en la vena porta. Tot i amb això, altres estudis han posat en dubte la hipòtesi que solament el VAT sigui responsable d'aquestes complicacions de l'obesitat, suggerint que el teixit adipós abdominal subcutani (SAT, de l'anglès *subcutaneous adipose tissue*) podria també contribuir a la síndrome metabòlica (SM) [8].

Més del 80% dels casos de DM2 es troben associats a l'obesitat, i el risc de desenvolupar diabetis s'incrementa de manera exponencial amb el grau d'obesitat i en especial amb la distribució de predomini central (abdominal) del greix corporal. El nexa comú entre obesitat i DM2 més important és la reducció de la sensibilitat a la insulina, sent una de les preguntes claus el paper que juga el teixit adipós en tot això, quedant encara per aclarir les bases moleculars d'aquesta associació.

2. Resistència a la insulina, prediabetis i diabetis

La resistència a la insulina (RI) afecta principalment els òrgans sensibles a la insulina (el múscul, el teixit adipós i el fetge), per raó de no poder utilitzar-la correctament. El pàncrees intenta mantenir la demanda alta d'insulina produint-ne més. Arriba un moment en què el pàncrees no pot suportar la necessitat d'insulina, i augmenta en excés la glucosa en el corrent sanguini. Moltes persones amb RI tenen nivells alts de glucosa i d'insulina en la sang. La gent amb nivells de glucosa en sang més alt del normal (anomalia de la glucèmia basal o intolerants a la glucosa), però encara sense criteris diagnòstics de diabetis, representen un grup d'alt risc a desenvolupar DM2 i a patir malalties cardiovasculars amb més alta prevalença que la població general.

La diabetis és una malaltia crònica provocada per una producció insuficient d'insulina per part del pàncrees combinat amb una ineficient utilització de la mateixa per a l'organisme. La insulina és una hormona que regula el sucre en la sang (glucèmia). La hiperglucèmia (augment de la glucèmia) és un efecte freqüent de la diabetis no controlada, i amb el temps produeix importants lesions en molts sistemes orgànics, i en particular als vasos sanguinis i al sistema nerviós. Entre les formes principals de la diabetis cal destacar-ne dues:

- La diabetis tipus 1 es caracteritza per una absència de la producció d'insulina per destrucció de la cèl·lula beta, habitualment d'origen autoimmune. Sense l'administració diària d'insulina exògena, aquest tipus de diabetis porta ràpidament a la mort. Els símptomes, que poden aparèixer

bruscament,consisteixen en una producció excessiva d'orina (poliúria), set (polidípsia), gana constant, pèrdua de pes i fatiga.

- La diabetis tipus 2 es deu a una combinació entre una deficiència en la secreció d'insulina associat a una resistència perifèrica que fa que l'organisme no utilitzi eficaçment la insulina. El 90% dels pacients amb diabetis són del tipus 2, que sovint s'associa a la falta d'activitat física i al pes corporal excessiu. Els símptomes poden ser similars als de la diabetis tipus 1, però menys accentuats. En conseqüència, és possible que la malaltia només es diagnostiqui al cap d'uns anys de l'inici, quan ja han aparegut les complicacions. Fins fa poc, aquest tipus de diabetis només s'observava en adults, però ara es comença a veure en nens obesos.

Les alteracions de la tolerància a la glucosa i de la glucèmia en el dejuni són trastorns de transició entre la normalitat i la diabetis. Els pacients amb aquest trastorns tenen major risc de progressar cap a la DM2, encara que aquest fet no és inevitable [12, 13].

3. Síndrome metabòlica

La síndrome metabòlica (SM) és el nom d'un conjunt de factors de risc lligats al sobrepès i a l'obesitat, la dislipidèmia, la hipertensió i la RI, que augmenten les probabilitats de patir malalties coronàries i altres problemes de salut com la diabetis. Segons la *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III), la SM es diagnostica amb la presència de tres dels següents cinc factors de risc [14]:

- Una gran cintura (perímetre de la cintura de més de 102 cm per homes i més de 88 cm per dones), que representa una obesitat abdominal (forma de poma, veure figura 2). L'excés de greix en l'àrea abdominal és un factor de risc més gran per a les malalties coronàries que l'excés de greix en altres parts dels cos.
- Nivells plasmàtics de triglicèrids (TG) elevats (150 mg/dl o més).
- Nivells plasmàtics baixos de lipoproteïna d'alta densitat (HDL, de l'anglès *high density lipoprotein*) lligada al colesterol (per sota de 40 mg/dl en homes i per sota de 50 mg/dl per dones).
- Hipertensió, pressió sanguínia més alta del normal (130/85 mm Hg o més).
- Hiperglucèmia, nivells de glucosa plasmàtica, en dejú, més alts del normal (110 mg/dl o més).

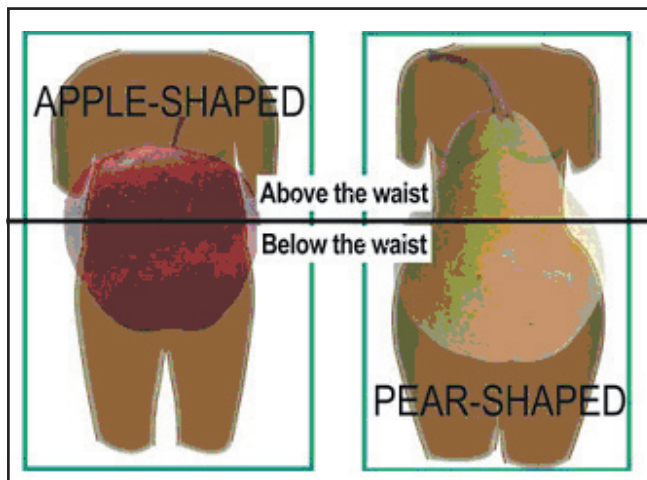


Figura 2. Distribució de l'excés de greix corporal.

L'obesitat androide o central és aquella en la qual el greix està principalment localitzat a la cara, a la regió cervical, al tòrax, i a l'abdomen (forma de poma) i l'obesitat ginoide o perifèrica quan el greix es localitza preferentment als malucs, al glutis i a la regió femoral (forma de pera) [9]. Font: *Banner Publication*. "Metabolic syndrome: A deadly mix". November 6, 2008 - Vol. 2, No. 15.

4. El teixit adipós

4.1 Anatomia

En mamífers, l'òrgan adipós es troba distribuït en diferents localitzacions: dos dipòsits subcutanis (anterior i posterior) i diversos dipòsits viscerals. Tots els dipòsits estan compostats per adipòcits (tipus cel·lular que predomina) blancs i marrons. La quantitat relativa dels adipòcits en cada dipòsit depèn de diversos factors com l'edat, espècie, condicions ambientals i nutricionals, i és responsable del color [15, 16]. Els dos tipus d'adipòcits (blanc i marró), a part de les diferències de coloració, presenten diferències en el seu origen embrionari, en la morfologia, distribució, expressió gènica i funció [15, 17]. Els adipòcits marrons tenen forma polièdrica, són més petits que els blancs [16] i són multiloculars amb abundants mitocondries que expressen grans quantitats de proteïna desacoblant (UCP1, de l'anglès *uncoupling protein 1*), la qual és la responsable de l'activitat termogènica del teixit [15, 17]. El teixit adipós blanc (WAT, de l'anglès *white adipose tissue*) està format principalment per adipòcits blancs esfèrics, de mida variable en els diferents dipòsits, uniloculars (cada cèl·lula només té una vacuola lipídica) i contenen mitocondries molt diferents a les del teixit adipós marró (BAT, de l'anglès *brown adipose tissue*) [16, 17]. El WAT és el majoritari en humans adults i juga un paper important en el metabolisme lipídic i en el de la glucosa. Dos papers crucials d'aquest teixit adipós semblen contribuir a aquesta funció: el WAT com a òrgan secretor i com a òrgan de magatzem d'energia.

4.2 El teixit adipós blanc com a òrgan secretor

Estudis dels darrers anys han posat de manifest la gran importància del WAT com a productor de determinades substàncies (hormones i citocines) amb acció endocrina, paracrina i autocrina. Entre aquestes substàncies secretades es troben: molècules implicades en el metabolisme de la glucosa (adiponectina, resistina), en el metabolisme lipídic (proteïna transportadora d'esters de colesterol, CETP, de l'anglès *cholesteryl ester transfer protein*), en la regulació del pes corporal (leptina, adiponectina), substàncies relacionades amb la inflamació (factor de necrosi tumoral, TNF α , de l'anglès *tumor necrosis factor alpha*; interleucina 1, IL-1; interleucina 6, IL-6), amb la funció vascular (angiotensina; inhibidor de l'activador del plasminogen tipus 1, PAI-1, de l'anglès *plasminogen activator inhibitor-1*), amb la funció reproductora (estrògens), entre d'altres (per a més detalls, veure taula 2).

Adipocytokine	Full name	Effects on
Leptin	Leptin	Food intake, fat mass
Adiponectin	Adiponectin	Insulin resistance, inflammation
Resistin	Resistin	Insulin resistance, inflammation
Visfatin	Visfatin	Insulin resistance
Omentin	Omentin	Insulin resistance
Vaspin	Visceral adipose tissue-derived serpin	Insulin resistance
Apelin	Apelin	Vasodilatation
CETP	Cholesteryl ester transfer protein	Lipid metabolism
LPL	Lipoprotein lipase	Lipid metabolism
HSL	Hormone sensitive lipase	Lipid metabolism
A-FABP 4 (aP2)	Adipocyte fatty acid-binding protein 4	Lipid metabolism
Perilipin	Perilipin	Lipid metabolism
RBP ^a	Retinol-binding protein ^a	Lipid metabolism
ASP	Acylation stimulating protein	Lipid metabolism
AT II	Angiotensin II	Blood pressure
ACE	Angiotensin converting enzyme	Blood pressure
AGT	Angiotensinogen	Blood pressure
TNF- α	Tumour necrosis factor- α	Inflammation
IL-6	Interleukin-6	Inflammation
CRP	C-reactive protein	Inflammation
Adipsin	Adipocyte trypsin/complement factor D	Inflammation
MCP-1	Macrophage chemo attractant protein-1	Macrophage attraction
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1	Macrophage activation
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1	Fibrinolysis

Taula 2. Adipoquines. Font: Hajer *et alii* 2008 [18].

Els nivells plasmàtics d'aquestes proteïnes (conegudes com adipoquines) habitualment s'incrementen amb l'augment del teixit adipós i

amb el volum de l'adipòcit, excepte els nivells d'adiponectina que disminueixen en l'obesitat [17, 18].

Aquesta llista s'està augmentant dia rere dia amb noves molècules, com per exemple la recentment identificada glicoproteïna Zinc- \square 2 (ZAG), que sembla que estigui implicada en el metabolisme lípidic i en la regulació del pes corporal.

4.3 El teixit adipós blanc com a òrgan de magatzem d'energia

El WAT és considerat el principal òrgan de magatzem d'energia, amb un 95% de lípids mantinguts com a TG, on la lipogènesi (síntesi de TG) i la lipòlisi (hidròlisi de TG) tenen lloc en funció del balanç total d'energia corporal. En situacions de requeriment energètic, com el dejuni o l'exercici, té lloc la hidròlisi de les reserves de TG a AG, els quals són importants fuels oxidatius per altres teixits, i glicerol, que són alliberats a la sang (figura 3). Els AG poden ser oxidats o utilitzats per la reesterificació en l'adipòcit per sintetitzar TG (figura 3).

Els òrgans que expressen l'enzim glicerol quinasa (GK), com ara el fetge i el ronyó (en l'adipòcit l'activitat d'aquest enzim en condicions normals és baixa) capturen el glicerol plasmàtic, que majoritàriament prové del teixit adipós, i el transformen en glucosa a través de la gluconeogènesi. Per aquest motiu, el glicerol es considera un dels principals factors que determina els nivells de glucosa plasmàtica [19-22]. Les bases moleculars per la sortida de glicerol de l'adipòcit han estat recentment caracteritzades (2000) amb el descobriment de la proteïna aquaporina 7 (AQP7) (figura 3) [23].

Pel que fa al transport dels AG lliures, prèviament es pensava que era per difusió simple, però ja fa uns anys que s'han identificat unes proteïnes de membrana que faciliten el transport dels AG en els adipòcits, com ara la proteïna de membrana plasmàtica d'unió a AG (FABP, de l'anglès *plasma membrane fatty acid-binding protein*) [24], la proteïna transportadora d'AG (FATP, de l'anglès *fatty acid transport protein*) [25] i la translocasa d'AG (FAT, de l'anglès *fatty acid translocase* o CD36) [26] (figura 3).

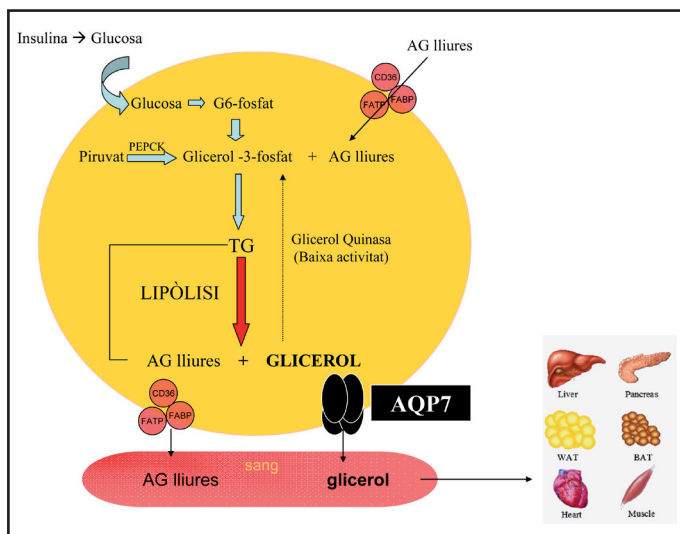


Figura 3. Paper de l'AQP7 en l'adipòcit en situació de requeriment energètic.

Durant el dejuni o l'exercici, els TG s'hidrolitzen a glicerol i AG, ambdós productes són alliberats al corrent sanguini. El glicerol surt del teixit adipós a través de l'AQP7, un canal de glicerol principalment expressat en adipòcits madurs.

4.4 Regulació de la lipòlisi en l'adipòcit

La lipòlisi és regulada per diferents hormones, fonamentalment per la insulina i les catecolamines. Les catecolamines s'uneixen a receptors α i/o β -adrenèrgics de la superfície cel·lular. Com es mostra en la figura 4, els β -receptors regulen una cascada de reaccions que, via nivells elevats d'adenosina monofosfat cíclica (camp, de l'anglès *cyclic adenosine monophosphate*), activen la proteïna quinasa A (PKA) que fosforila la perilipina (PLIN) i la lipasa sensible a hormones (HSL, de l'anglès *hormone sensitive lipase*). Després de la ingesta, els nivells elevats d'insulina promouen l'acumulació de TG en el teixit adipós. La insulina inhibeix la lipòlisi activant l'enzim fosfodiesterasa (PDE, de l'anglès *phosphodiesterase*), que hidrolitza el cAMP, aleshores disminueix l'activació de la PKA i l'HSL, i conseqüentment, es produeix menys hidròlisi de TG (figura 4). S'ha pos-

tulat la hipòtesi que el VAT té més activitat lipolítica que el SAT, ja que conté més receptors α -adrenèrgics en la superfície de la cèl·lula i té una menor sensibilitat als efectes contra lipolítics de la insulina [27-29].

La lipòlisi és catalitzada per 3 lipases: la lipasa adiposa de triglicèrids (ATGL, de l'anglès *adipocyte triglyceride lipase*, o *desnutrin*), la qual principalment catalitza el pas inicial de la hidròlisi de triacilglicèrids (TAG) a la formació de diacilglicèrids (DAG) i AG; l'HSL, que catalitza la hidròlisi de TAG, DAG i monoacilglicèrids (MAG) a raó de 1:10:1 *in vitro*; i la lipasa monoacilglicerol (MGL, de l'anglès *monoacylglycerol lipase*), que hidrolitza els MAG a glicerol i AG lliures (figura 4) [30].

La PLIN i possiblement altres proteïnes de la superfície de la gota lipídica són les principals reguladores de la lipòlisi, protegint o exposant els TG de la gota lipídica a les lipases (figura 4) [29].

Algunes citocines inflammatòries com el TNF α són capaces d'inhibir l'expressió de PLIN, a nivell d'ARNm i de proteïna. Els nivells elevats d'aquestes molècules en l'obesitat podrien contribuir a l'augment de la lipòlisi basal (figura 4) [31].

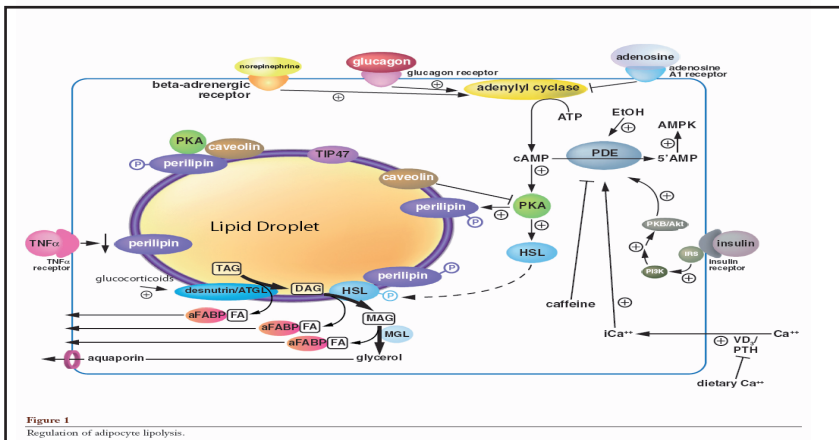


Figura 4. Regulació de la lipòlisi en l'adipòcit. Font: Duncan *et alii* 2007 [31].

Així doncs, una mala regulació de la lipòlisi pot donar lloc a anormalitats metabòliques. La reducció de l'activitat lipolítica pot contribuir a l'acumulació de TG en el teixit adipós i afavorir l'aparició d'obesitat. L'obesitat sovint s'associa amb un augment de la lipòlisi basal i amb una disminució de la lipòlisi estimulada per catecolamines. L'alteració de la sensibilitat dels adipòcits a la senyalització de la insulina, incloent els efectes contra lipolítics d'aquesta hormona, podria contribuir a un increment de la lipòlisi basal en l'obesitat [31]. A l'altre extrem de l'espectre, tindrem la síndrome de lipodistròfia, en què una excessiva lipòlisi portaria a una pèrdua de pes amb una redistribució de TG en els dipòsits de teixit adipós, els quals podrien augmentar els nivells circulants d'AG i el manteniment ectòpic de TG. Aquestes anormalitats estan associades amb el desenvolupament de RI. Per tant, una bona regulació de la lipòlisi és crucial tant per al manteniment de l'energia corporal com per a la prevenció de malalties metabòliques [30, 31].

5. Les Aquaporines

5.1 La Família

Les aquaporines (AQPs) són canals que permeten el pas d'aigua i/o altres petits soluts a través de la membrana cel·lular. Són proteïnes petites (d'uns 30 kDa aproximadament), hidrofòbiques i integrals de membrana i en la majoria de tipus cel·lulars es localitzen a la membrana plasmàtica. Fins avui es coneixen 13 AQPs diferents, classificades en 3 subfamílies: les aquaporines (figura 5), les aquagliceroporines (figura 5) i les superaquaporines [32-37].

Les AQPs, són canals específics d'aigua, aquest grup el formen l'AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 i AQP8 (figura 5). L'AQP3, AQP7, AQP9 i AQP10 pertanyen a la subfamília de les aquagliceroporines (figura 5), aquestes canalitzen tant aigua com altres petits soluts, com el glicerol i la urea. Per últim, el grup de les superaquaporines, que està format per AQP11 i AQP12, les quals tenen una baixa homologia (~20%) respecte les altres AQPs i no tenen el motiu conservat asparagina-prolina-alanina (NPA), característic de la família [36,38].

Les AQPs són una família de proteïnes enormement distribuïdes en vertebrats, invertebrats i plantes, i s'expressen en molts tipus cel·lulars i teixits diferents (taula 3).

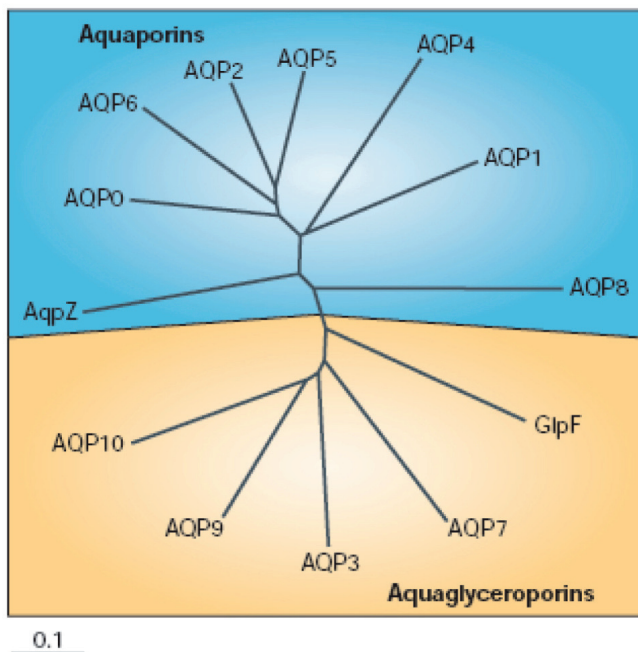


Figura 5. Família de les aquaporines.

En aquesta figura es mostren les proteïnes permeables a l'aigua (aquaporines) i les permeables al glicerol (aquagliceroporines). També es mostren les homòlogues d'*E. Coli* (AqpZ i GlpF). L'escala representa la distància entre homòlegs. Font: Agre *et alii* 2002 [32].

Taula 3. Distribució de les aquaporines en mamífers. Font: Adaptada de Takata *et alii* 2004 [35].

AQUAPORINA	ÒRGAN
AQP 0	Ull
AQP 1	Ronyó, vas sanguini, vas limfàtic, vesícula, pàncrees, vies respiratòries, pulmó, peritoneu, conducte eferent, vas deferent, vesícules seminals, parts pròximes als vasos deferents, cervell, ull, orella
AQP 2	Ronyó, vas deferents, orella
AQP 3	Ronyó, urèter, bufeta urinària, uretra, cavitat bucal, esòfag, estómac, ili, còlon, cavitat nassal, tràquea, pulmó, pell, cervell, ull, orella
AQP 4	Ronyó, múscul esquelètic, estómac, cavitat nassal, tràquea, pulmó, cervell, ull, orella
AQP 5	Glàndula salival, estómac, duodè, pàncrees, vies respiratòries, pulmó, glàndula sudorípara, ull, glàndula lacrimal, orella
AQP 6	Ronyó
AQP 7	Ronyó, teixit adipós (adipòcits), sistema immune, testicles, orella
AQP 8	Ronyó, glàndula salival, fetge, pàncrees, intestí, vies respiratòries, testicles
AQP 9	Fetge, testicles, epidídim, vasos deferents, cervell, leucòcits, ovari, tracte digestiu, orella, placenta
AQP 10	Intestí

5.2 Estructura molecular

La mida de les AQPs normalment oscil·la entre 250 i 300 aminoàcids. Són molt hidrofòbiques, s'organitzen en sis segments d'estructura α -hèlix que travessen la membrana (dominis transmembrana), units per cinc llaços connectors (tres nanses extracel·lulars i dues intracel·lulars) i els extrems amino i carboxi terminal es troben en el citoplasma. Dos dels llaços (un extracel·lular i l'altre intracel·lular) es pleguen cap a la membrana i s'aproximen per formar el porus. Les regions altament

conservades estan presents en aquests llaços, cadascuna conté el motiu conservat: asparagina-prolina-alanina (NPA) [39, 40] (figura 6).

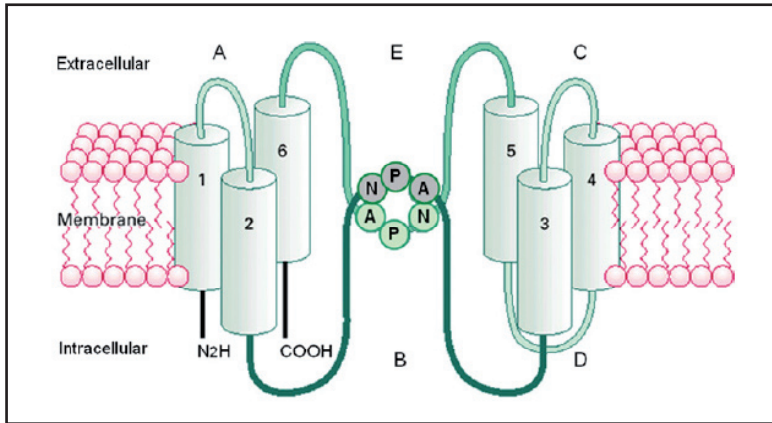


Figura 6. Estructura de l'aquaporina. Font: Chen YC *et alii* 2005 [41].

L'estructura resultant tanca una zona central estreta que s'eixampla obrint-se cap als dos costats de la membrana. Aquest particular plegament en forma de rellotge d'arena (veure figura 7), posa en contacte els triplets NPA per formar el lloc més estret del porus.

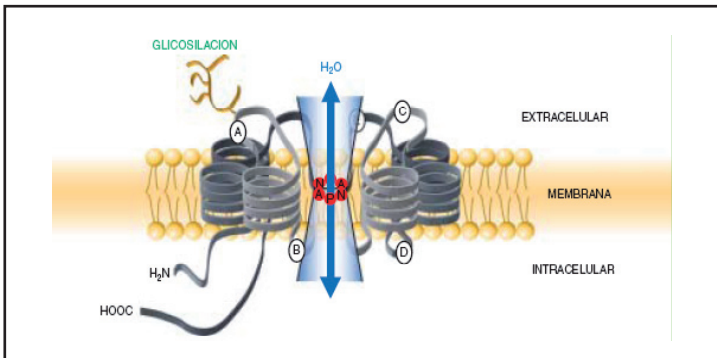


Figura 7. El rellotge d'arena. Font: Echevarría and Zardoya 2006 [42].

Encara que cada AQP constitueix per si sola un canal, en la membrana cel·lular aquestes proteïnes s'agrupen de 4 en 4 (figura 8). Sembla que el tetràmer dóna més estabilitat al complex.

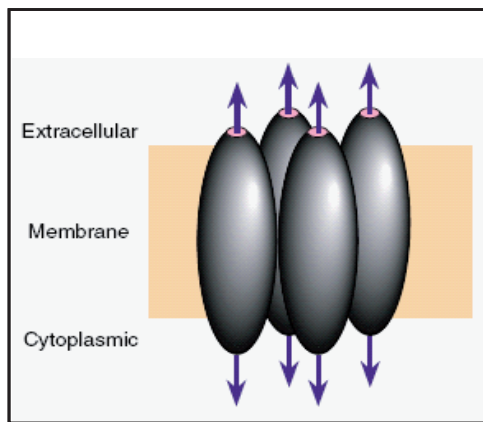


Figura 8. Tetràmer d'AQP. Cada monòmer és un canal d'aigua.

Font: Verkman 2005 [43].

5.3 Aquaporina 7: AQP7 o AQPap

5.3.1 El gen

El gen *AQP7* va ser inicialment identificat i clonat a partir de testicle de rata i es demostrà que tenia una alta homologia amb *AQP3* i una estructura i funcionalitat semblant [44]. També, l'any 1997, Kuriyama *et alii* clonà *AQP7* de teixit adipós humà (l'anomenà *AQP9*, però posteriorment es demostrà que es tractava d'*AQP7*) [45]. *AQP7*, també anomenat *aquaporin adipose (AQPap)*, ha estat clonat independentment com a únic gen de la família expressat en teixit adipós humà [23,46].

En humans, l'estructura gènica va ser determinada per Kondo *et al.* l'any 2002 [47]. El gen *AQP7* humà, localitzat al cromosoma 9, (9p13.3-21.1), està format per 8 exons (figura 9), i té unes 18 kb. En la regió promotora conté un element putatiu de resposta als receptors activats per

proliferadors de peroxisomes (PPRE, de l'anglès *peroxisome proliferator response element*) situat a la posició -46/-62 i un element putatiu de resposta a la insulina (IRE, de l'anglès *insulin response element*) a la posició -542/-536 (veure figura 9).



Figura 9. Estructura del gen AQP7 humà.

Font: Adaptada de Kondo *et alii* 2002 [47].

5.3.2 La proteïna

L'AQP7 és una proteïna que consta de 342 aminoàcids i té un pes molecular de 37.232 Da. És un canal d'aigua i glicerol (d'entrada i sortida) que s'ubica en la membrana plasmàtica de l'adipòcit. Tot i que en alguns estudis es parla de la possibilitat d'algun altre canal de glicerol en l'adipòcit [28,47,48], actualment és considerat com l'únic canal de glicerol en el teixit adipós pels següents motius [46]:

- Té permeabilitat al glicerol i s'expressa abundantment en teixit adipós i en adipòcits diferenciats 3T3-L1 (línia cel·lular de preadipòcits compromesa a diferenciar-se a adipòcits, derivada de cèl·lules embrioniques de ratolí).
- Durant la diferenciació d'adipòcits 3T3-L1 s'incrementa la sortida de glicerol, estimulada amb epinefrina (catecolamina), en paral·lel amb l'augment dels nivells d'ARNm d'AQP7.
- En adipòcits 3T3-L1, la incubació amb HgCl₂ bloqueja totalment la sortida de glicerol, estimulada amb epinefrina, i l'addició de mercaptoetanol recupera la sortida. La inhibició de la permeabilitat al glicerol per HgCl₂ és una característica comuna de les AQPs.
- No es detecten nivells d'ARNm d'AQP3 ni d'AQP9 (les altres aquagliceroporines) en teixit adipós ni en adipòcits aïllats *in vitro* [23].

5.3.3 Mutacions gèniques i anàlisis funcionals

En humans s'han identificat tres mutacions de canvi de sentit (R12C, V59L i G264V) i dues mutacions silencioses (A103A i G250G). La mutació R12C es troba a l'exó 3, en el nucleòtid 206, es tracta d'una substitució d'una C per una T, que porta al canvi d'una arginina per una cisteïna en la posició 12; la V59L es localitza en el nucleòtid 347 (exó 4), és una substitució d'una G per una C, que comporta el canvi d'una glicina per una valina en la posició 59 i l'última mutació de canvi de sentit és la G264V, es troba en l'exó 8, concretament en el nucleòtid 963, en la qual apareix una T en comptes d'una G i dóna lloc a una valina en lloc d'una glicina en la posició 264 (figura 10) [47].

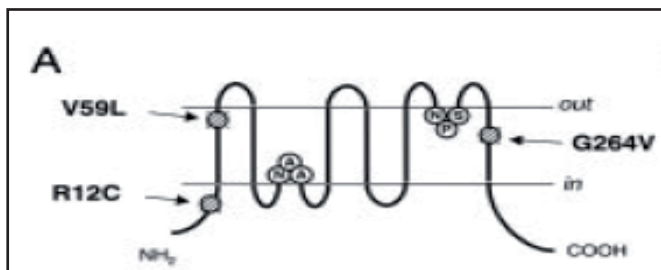


Figura 10. Localització de les 3 mutacions de canvi de sentit.

NAA i NPS són residus d'aminoàcids que formen el motiu NPA altament conservat en la família de les AQPs. Font: Kondo *et alii* 2002 [47].

En anàlisis funcionals utilitzant oòcits de *Xenopus* s'ha posat de manifest que la permeabilitat a l'aigua i al glicerol s'altera en aquells oòcits que expressen la proteïna amb la mutació G264V i no s'altera en els oòcits que expressen la proteïna amb les mutacions R12C i V59L (veure figura 11) [47]. Murata *et al.* documentà que el motiu conservat GxxxGxxxG en el tercer i sisè domini transmembrana són importants per la funcionalitat de la família d'AQPs [49]. A260, G264 i G268 formen el sisè domini transmembrana en l'AQP7 humana. Per tant, considerant això, el defecte funcional en el mutant G264V podria estar causat per la disrupció d'aquest motiu.

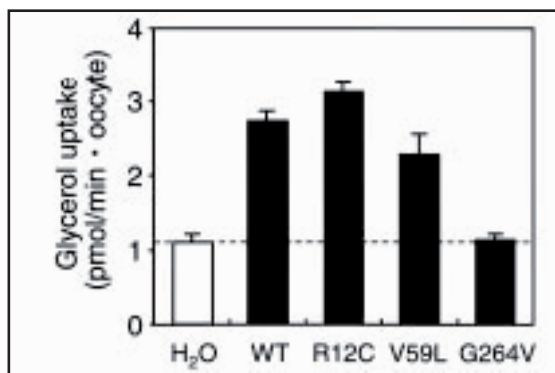


Figura 11. Permeabilitat al glicerol d'òcits injectats amb aigua o amb ARNs de *wildtype* (WT) o de mutats. Font: Kondo *et alii* 2002 [47].

De moment, en humans només s'ha dut a terme un estudi d'associació d'aquestes mutacions, en una població japonesa de 160 individus, en què les freqüències de la presència de la mutació eren menors al 10%, en els 3 casos, i no es trobà associació amb l'obesitat i/o la diabetis. Endemés, considerant el fet que la mutació G264V podria alterar la funcionalitat de la proteïna com a canal de glicerol, en aquest mateix treball van estudiar el subjecte homozigot per aquesta mutació. Aquest subjecte presentava un pes corporal normal, una concentració plasmàtica de glicerol normal en estat basal, però una falta d'increment durant l'exercici. Això suggerí que AQP7 juga un paper en el flux de glicerol de l'adipòcit, però també hi ha la possibilitat que existeixi algun altre mecanisme [47].

5.3.4 Distribució tissular

S'ha demostrat, en ratolins, que l'AQP7 s'expressa sobretot en el WAT, el BAT i en el testicle, i que a més a més s'expressa dèbilment en el múscul esquelètic i cardíac i en el ronyó [46]. L'any 2007, Matsumura *et alii* demostrà que l'AQP7 s'expressa també en illots pancreàtics [50].

5.3.5 Localització en el teixit adipós

En adipòcits estables 3T3-L1 s'ha demostrat que AQP7 es localitza a la perifèria del nucli. A curt termini, sota condicions lipolítiques, les catecolamines estimulen els receptors adrenèrgics localitzats a la superfície cel·lular dels adipòcits. L'activació d'aquests receptors porta al trasllat de l'HSL a la gota lipídica i d'AQP7 a la membrana cel·lular (veure figura 12). A més a més, a llarg termini, els nivells d'ARNm d'AQP7 estan elevats en resposta a la disminució de l'activitat de la cascada de senyalització de la insulina. Aquest procés ha estat suggerit com un mecanisme pel qual les catecolamines podrien induir RI [23].

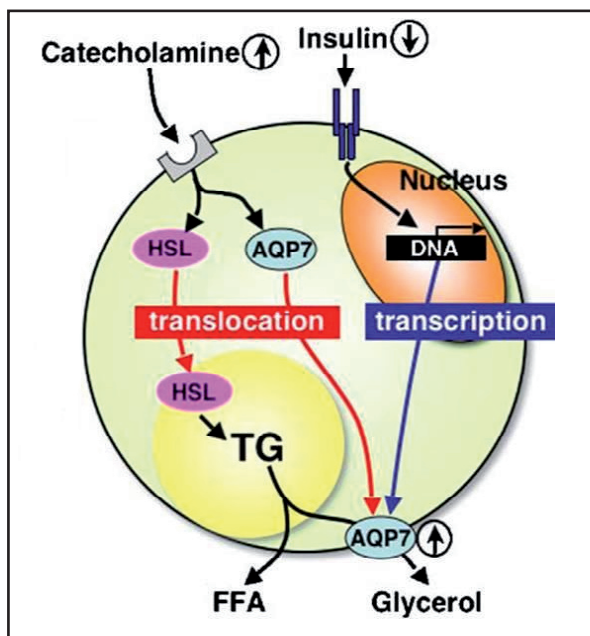


Figura 12. Desplaçament de l'AQP7 en condicions lipolítiques per estimulació de catecolamines. Font: Hibuse *et alii* 2006 [20].

En la figura 13 es mostra el desplaçament de la proteïna AQP7 del citoplasma a la membrana cel·lular, que Kishida *et alii* demostrà *in vitro*, amb cèl·lules tractades amb epinefrina, la qual estimula la lipòlisi [23].

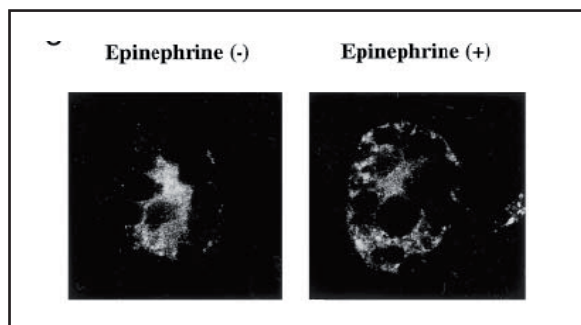


Figura 13. Localització de l'AQP7 en cèl·lules 3T3-L1.

Detecció de la proteïna AQP7 per immunocitoquímica en cèl·lules 3T3-L1 en el dia 7 de diferenciació, tractades o no amb epinefrina.

Font: Kishida *et alii* 2000 [23].

5.3.6 Regulació

En els ratolins està descrit que l'expressió d'ARNm i l'activitat del promotor del gen *AQP7* estan negativament regulades per la insulina, a través d'IRE en el seu promotor (a -443/-437 i -152/-146, [T(G/A)TTTT(G/T)]) [46]. En el promotor del gen humà s'han identificat 3 regions idèntiques o similars, designades com IRE1[TGTTTTC], IRE2[TGTTTCT] i IRE3[TATTTTG]. A més a més, s'ha comprovat que la seqüència IRE2 (-542/-536) és necessària per l'efecte supressor de la insulina en la transcripció del gen. Aquest fet suggerí que la transcripció del gen *AQP7* humà és regulada en resposta a les condicions nutricionals (figura 14) a través d'IRE [47]. En situació de dejuni, la sortida de glucosa del fetge és la principal font de glucosa plasmàtica i la sortida de glicerol dels adipòcits és la major font de substrat necessari. Per tant, durant el dejuni es requereixen sistemes efectius per la sortida de glicerol dels adipòcits i la seva absorció pel fetge. La pèrdua del transport de glicerol podria afectar els nivells de metabòlits i hormones en la sang, interferir en el cicle TG-AG i en el metabolisme de la glucosa en el fetge i en el múscul (consum de glucosa) [19].

El receptor gamma activat per proliferadors de peroxisomes (PPAR γ , de l'anglès *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) és el principal regulador de la diferenciació d'adipòcits i regula diversos gens

específics del teixit adipós a nivell transcripcional. PPAR α forma heterodímers amb el receptor α de l'àcid retinoic (RXR α), s'uneix a PPRE en el promotor d'AQP7 i indueix l'expressió d'ARNm d'AQP7 en adipòcits. Per tant, el lloc PPRE en el promotor del gen és important per l'alta expressió d'ARNm d'AQP7 en adipòcits diferenciats i és responsable de la inducció de la transcripció d'AQP7 per tiazolidinediones (TZDs), les quals són agents sensibilitzadors d'insulina i lligands exògens de PPAR α . En els humans, l'expressió abundant d'AQP7 en teixit adipós s'atribueix a l'expressió específica i abundant de PPAR α [51]. Les TZDs, com pioglitazona i rosiglitazona, són agents antidiabètics orals que incrementen la sensibilitat a la insulina, via estimulació de PPAR α . En ratolins, s'ha demostrat que l'administració de pioglitazona o rosiglitazona incrementa l'expressió d'AQP7 en teixit adipós (figura 14) [51, 52].

Ja s'ha esmentat anteriorment que les catecolamines indueixen la lipòlisi, i ho fan a través de l'activació de proteïnes Gs i adenilat ciclase (AC) en concordança amb la inducció clàssica de receptors α -adrenèrgics (veure figura 21), incrementant la sortida d'AG i glicerol de l'adipòcit al corrent sanguini. Per tant, seria d'esperar que l'isoproterenol, una catecolamina sintètica, incrementés a llarg termini l'expressió d'AQP7. Tanmateix, en ratolins s'ha demostrat una resposta paradoxal, l'isoproterenol en adipòcits 3T3-L1 reprimeix l'expressió d'AQP7 (figura 14). En un context fisiològic, es podria pensar en un balanç entre l'estimulació de la lipòlisi i la inhibició de l'expressió d'AQP7, probablement restringint, fins a cert punt, la sortida de glicerol de l'adipòcit. Alternativament, aquesta repressió d'AQP7 podria desencadenar altres mecanismes de sortida de glicerol de l'adipòcit encara desconeguts [53]. En estat de RI, el balanç entre l'estimulació de la lipòlisi i la repressió del gen AQP7 induït per catecolamines podria estar perjudicat. Amb tot, cal dir que, les observacions fetes en adipòcits aïllats o cultius cel·lulars no necessàriament reflecteixen els processos que tenen lloc en la regulació de tot l'organisme. Per tant, són necessaris més treballs per tal de clarificar el veritable impacte de l'estimulació adrenèrgica [54].

A més a més, l'AQP7 en humans té 6 llocs de fosforilació per PKA, fet que també suggereix que estigui regulada pels nivells de cAMP dependents de la PKA [20, 55].

Pel que fa al TNF α , un altre potent inductor de la RI i activador de la lipòlisi, també ha estat demostrat en ratolins que reprimeix l'expressió del gen *AQP7* (figura 14) [53].

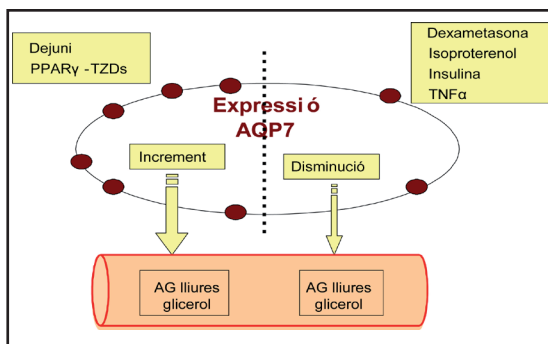


Figura 14. Regulació de l'expressió d'*AQP7* en adipòcits de ratolí sota influències nutricionals i neuroendocrines. L'expressió d'*AQP7* en el teixit adipós és augmentada en situació de dejuni i per les PPAR γ -TZDs i disminuïda per la insulina (situació d'alimentació), la dexametasona (glucocorticoide), el TNF α i l'isoproterenol (agonista α -adrenèrgic). Font: Adaptada de Frühbeck *et alii* 2006 [56].

5.3.7 L'*AQP7* en el context de l'obesitat i la RI

La supressió del gen *AQP7* s'associa amb l'aparició d'obesitat en ratolins adults (veure figura 15.B) [57,58]. Les últimes nocions sobre la funcionalitat de l'*AQP7* provenen en gran part de la creació de 2 línies independents de ratolins amb absència del gen, ratolins *knockout* (KO). En una d'aquestes línies, aquests ratolins mantienien el pes corporal respecte els ratolins *wildtype* (WT) fins les 12 setmanes d'edat, a partir d'aleshores començaven a acumular greix i a ser més pesats (veure figura 15) [57]. En l'altra línia de ratolins *AQP7* KO, generada per Hara-Chikuma *et al.*, els ratolins no presentaven un excés de pes però tenien un augment significatiu de l'acumulació de greix corporal total [58]. Les diferències en el pes corporal de les dues línies de ratolí podrien ser atribuïdes a patrons genètics diferents.

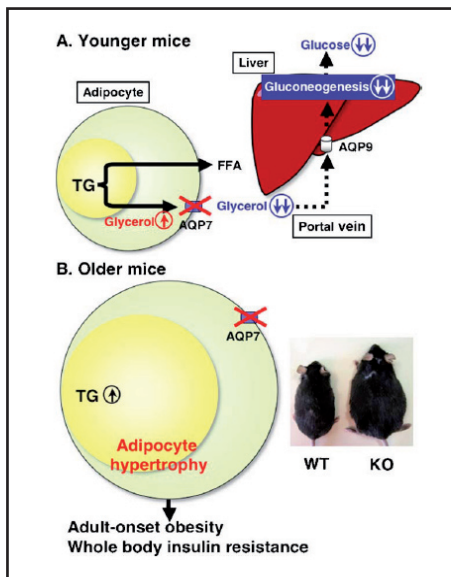


Figura 15. Representació esquemàtica del paper fisiològic d'AQP7 en ratolins AQP7 KO. A. En situació de dejuni, els ratolins joves KO tenen els nivells de glicerol plasmàtics disminuïts, això desencadena una severa hipoglucèmia en comparació amb els WT. B. Esquema de l'adipòcit hipertrofic d'un ratolí KO a les 12 setmanes d'edat, el qual desenvolupa obesitat i RI, i a la part esquerra, fotografia d'un ratolí WT i un KO de 40 setmanes d'edat. Font: Hibuse *et alii* 2006 [20].

Actualment es considera que la principal causa de l'augment de pes en els ratolins AQP7 KO és l'acumulació excessiva de TG en els adipòcits subcutanis i viscerals. Aquest excés de greix no resulta d'una disminució de la lipòlisi (mesurada a través de l'activitat de l'HSL, que és el principal regulador del procés lipolític) ni d'un increment de l'adipogènesi (PPAR α i C/EBP α , 2 importants factors de transcripció involucrats en l'adipogènesi, no afectats per l'eliminació d'AQP7), sinó que la raó principal de l'augment de teixit adipós, en els ratolins deficients en AQP7, és la progressiva hipertrofia dels adipòcits, caracteritzats per un increment de la gota lipídica (veure figura 15). En la figura 16 es pot

veure com la disrupció del gen redueix la permeabilitat al glicerol en la membrana plasmàtica dels adipòcits i, aleshores, porta a una acumulació de glicerol intracel·lular. L'augment de l'activitat enzimàtica de la GK en els adipòcits dels ratolins KO accelera la síntesi de TG, donant lloc a una progressiva acumulació de greix i alteracions metabòliques, com ara nivells elevats d'AG lliures, hiperglicèmia i RI [48, 54, 57, 58].

Tot i que en els ratolins KO joves es trobés una disminució de les concentracions plasmàtiques en dejú de glicerol i glucosa (veure figura 15.A), la secreció de glicerol de l'adipòcit no es considera completament abolida, suggerint altres mecanismes que podrien estar involucrats en la sortida de glicerol, per exemple la difusió i/o altres canals de glicerol. En canvi, ratolins KO adults tenien les concentracions plasmàtiques de glucosa i insulina augmentades, com es mostra en la figura 16. A més a més, aquests ratolins tenien menys activitat de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K, de l'anglès *phosphoinositide 3-kinase*) associada al substrat 1 del receptor de la insulina (IRS-1, de l'anglès *insulin receptor substrate 1*) i menys fosforilació d'Akt (PKB, proteïna quinasa B), és a dir, sembla que la supressió d'*AQP7* causi danys en la senyalització de la insulina, de manera que la insulina no exerceix l'efecte antilipolític en els adipòcits (figura 16). A llarg termini, la supressió d'*AQP7* també sembla que tingui conseqüències en el fetge, com que no surt tant de glicerol de l'adipòcit fa que hi entri menys al fetge (figura 17). En aquest teixit, la insulina també falla al no exercir l'efecte inhibidor en la gluconeogènesi, degut a la baixa activitat de PI3K associada al substrat 2 del receptor de la insulina (IRS-2, de l'anglès *insulin receptor substrate 2*), com es mostra en la figura 17.

Per tant, l'eliminació d'*AQP7* en els ratolins podria estar acompanyada per un desenvolupament de la RI pels mecanismes comentats, amb una relació directa amb l'edat [57].

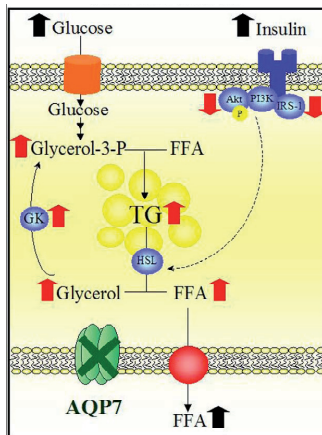


Figura 16. Efecte de l'eliminació d'AQP7 en la homeòstasi lipídica en el teixit adipós. Les fletxes tallades indiquen inhibició i les fletxes contínues estimulació. Font: Rodríguez *et alii* 2006 [54].

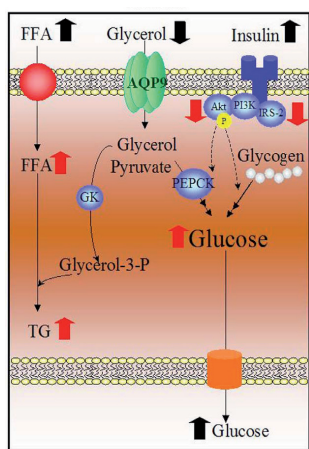


Figura 17. Efecte, a llarg termini, de la poca entrada de glicerol al fetge, com a conseqüència de l'eliminació d'AQP7, en la homeòstasi de la glucosa en el fetge. Les fletxes tallades indiquen inhibició i les fletxes contínues estimulació. Font: Rodríguez *et alii* 2006 [54].

Pel que fa als humans, fins avui, els estudis són escassos i limitats a determinacions d'ARNm, sense estudis funcionals en adipòcits. S'ha vist que *AQP7* s'expressa tant en SAT com en VAT, amb una expressió més alta en dones respecte als homes [59]. En SAT, els homes obesos tenen menys expressió del gen *AQP7* que els homes prims [54, 60, 61]; en canvi, quant a l'expressió d'*AQP7* en el VAT, es parla d'una tendència a augmentar en els obesos respecte als prims, com a mecanisme compensatori, per tal de facilitar la sortida de glicerol del teixit adipós i reduir l'entrada de glicerol als hepatòcits (a través de l'aquaporina 9, *AQP9*) en condicions d'obesitat i DM2 [62].

Per tant, es podria dir que la deficiència d'*AQP7* en l'adipòcit, influeix tant en el metabolisme del glicerol com en el de la glucosa. De totes maneres, són necessaris més estudis relacionats amb l'expressió gènica i l'estabilitat de la proteïna per establir millor un mecanisme ferm de la participació d'*AQP7* en l'etiopatogènesi d'aquests trastorns metabòlics. Una comprensió més profunda de la regulació d'*AQP7* i d'*AQP9* en òrgans metabòlics claus podria ser útil per a dissenyar fàrmacs dirigits a aquests canals de membrana cel·lular pel control de l'obesitat i/o de la DM2.

5.4 Aquaporina 9: *AQP9*

Ja s'ha mencionat prèviament que l'*AQP9* pertany a la subfamília de les aquagliceroporines, és a dir, que és capaç de canalitzar aigua, glicerol i altres petits soluts a través de la membrana.

El gen *AQP9* va ser clonat a partir de leucòcits humans [63] tenint en compte la hipòtesi que totes les cèl·lules sanguínies necessiten AQP's en els vasos, que els eritròcits expressen *AQP1* i *AQP3*, i que no s'havia identificat cap AQP en els leucòcits. Independentment, *AQP9* també va ser identificat al fetge, com a transportador d'urea, mitjançant la clonació amb oòcits *Xenopus* [64]. Donat que el fetge té un parell de transportadors d'urea, el paper de l'*AQP9* en el transport de la urea no és clar. L'*AQP9* també funciona com a mecanisme de captació de glicerol al fetge [65].

5.4.1 Distribució tissular i funcionalitat

L'AQP9 s'expressa en una varietat de teixits (veure taula 3 de la distribució de les AQPs). En diversos estudis utilitzant oòcits *Xenopus* s'ha demostrat que l'AQP9 de rata és capaç de canalitzar urea, manitol, sorbitol i uracil, a més a més d'aigua i glicerol [63, 64, 66]. Avui en dia, l'AQP9 és l'únic canal de glicerol identificat present a les cèl·lules del fetge, localitzat a la membrana plasmàtica [65, 67-69].

El greix visceral intraabdominal s'acumula principalment en el mesenteri. La distribució anatòmica del greix visceral intraabdominal indica que els productes alliberats de l'adipòcit visceral flueixen directament al fetge, a través de la vena porta. El glicerol, derivat de la hidròlisi de TG, entra al fetge a través d'aquesta ruta, i actua com a substrat de la gluconeogènesi en condicions lipolítiques [69]. A més a més, sembla que l'AQP9, altament expressada en el fetge, podria tenir un important paper en el glicerol hepàtic. S'ha observat en ratolins AQP9 KO (AQP9^{-/-}), un augment dels nivells de glicerol plasmàtic i dels nivells de TG, fet que podria estar causat per l'absència d'AQP9 en la membrana plasmàtica dels hepatòcits d'aquests ratolins, provocant una alteració en l'entrada de glicerol al fetge. Com a conseqüència d'aquesta alteració en l'entrada de glicerol, tenint en compte que en situacions de requeriment energètic el glicerol és un substrat important per la síntesi de glucosa hepàtica, AQP9 podria tenir un efecte sobre el metabolisme de la glucosa. Així doncs, s'ha observat que ratolins obesos KO per AQP9, en dejú, tenien nivells circulants de glucosa més baixos que els salvatges, és a dir, que els ratolins AQP9 KO tenen menys capacitat per generar glucosa en resposta al dejuni a causa de la falta del canal d'entrada de glicerol en els hepatòcits. Malgrat tot, s'ha de tenir en compte que existeixen mecanismes compensatoris. Així doncs, s'ha demostrat que en dejú, els ratolins AQP9 KO són capaços d'utilitzar de manera eficient l'administració exògena de glicerol per la producció de glucosa, probablement el glicerol és convertit en glucosa en òrgans gluconeogènics secundaris, com el ronyó o l'intestí, compensant així la disminució de l'entrada de glicerol al fetge [65, 69].

5.4.2 Regulació

La majoria d'estudis sobre la regulació d'AQP9 se centren en l'expressió d'aquesta AQP en el fetge en condicions metabòliques diferents.

De la mateixa manera que en AQP7, s'ha demostrat, en ratolins, que la insulina redueix els nivells d'ARNm d'AQP9, a través d'un element de resposta negatiu a la insulina localitzat en el promotor (-496 a -502). En ratolins en condicions deficientes d'insulina, l'administració d'estreptozotocina, un tòxic de la cèl·lula beta que s'utilitza per a induir diabetis, provoca un augment dels nivells d'ARNm i de proteïna d'AQP9 i després del tractament amb insulina aquests nivells estan normalitzats. En rata i ratolí, els nivells d'ARNm i de proteïna d'AQP9 s'incrementen en situació de dejuni i disminueixen després de la ingesta [70,71]. Aquest patró de canvis és similar al de la GK, la qual està involucrada en la conversió de glicerol a glicerol-3-fosfat, i al de la fosfoenol piruvat carboxiquinasa (PEPCK), que és el principal enzim de la gluconeogènesi [69].

En hepatòcits, de la línia cel·lular d'un hepatoblastoma humà (HepG2, *Human hepatocellular liver carcinoma cell line*), el tractament amb TZD incrementa l'expressió d'AQP9 [72], similar a l'efecte de la pioglitazona en l'expressió d'AQP7 en adipòcits 3T3-L1 [51].

5.5 Regulació i coordinació del canal de glicerol del teixit adipós (AQP7) i del fetge (AQP9)

En apartats anteriors ja s'ha fet menció de l'efecte repressor de la insulina en l'expressió tant d'AQP7 en els adipòcits com d'AQP9 en els hepatòcits. Les concentracions d'insulina plasmàtica canvien segons l'estat nutricional, per tant, l'expressió d'AQP7 i AQP9 en els adipòcits i en el fetge, respectivament, augmenten o disminueixen en relació a les necessitats nutritives (veure figura 18).

En ratolins, en situació de dejuni, els nivells d'ARNm d'AQP7 són elevats, l'AQP7 es desplaça a la membrana plasmàtica i serveix com a una eficient sortida de glicerol en els adipòcits. El dejuni també incrementa els nivells d'ARNm d'AQP9 en el fetge, l'augment del flux de glicerol directe de la vena porta al fetge i l'augment d'AQP9 podrien

contribuir a una major entrada de glicerol en els hepatòcits. En el fetge, el glicerol és un dels substrats per la gluconeogènesi. Així que, el dejuni induïx la lipòlisi en els adipòcits i la gluconeogènesi en el fetge. La cascada de glicerol del teixit adipós al fetge es manté per la regulació coordinada d'AQP7 i AQP9 sota situacions de dejuni (figura 18) [70].

Després de l'alimentació, l'augment dels nivells plasmàtics d'insulina interromp la lipòlisi en els adipòcits i suprimeix la producció de glucosa al fetge. Els ratolins tenen els nivells d'ARNm d'AQP7 disminuïts en condicions d'alimentació (figura 18), mentre que el transportador de glucosa (GLUT4) es trasllada a la membrana plasmàtica i duu glucosa als adipòcits. Els adipòcits mantenen els TG per esterificació de glucosa i AG lliures. Els nivells de glicerol de la vena porta disminueixen, paral·lelament amb la reducció dels nivells d'ARNm d'AQP7 i AQP9, a l'adipòcít i al fetge respectivament (figura 18) [20].

Tot i així, en ratolins resistent a la insulina, AQP7 i AQP9 estan sobre expressats malgrat la hiperinsulinèmia (figura 18). Conseqüentment, augmenta la sortida de glicerol de les cèl·lules adiposes i l'ús del glicerol per la gluconeogènesi hepàtica, augmentant així la hiperglicèmia [54, 70].

A continuació, en la figura 18, es mostra un esquema de com les dues AQPs responen de manera coordinada en diferents situacions nutritives i de com afecten en l'homeòstasi lipídica i de la glucosa.

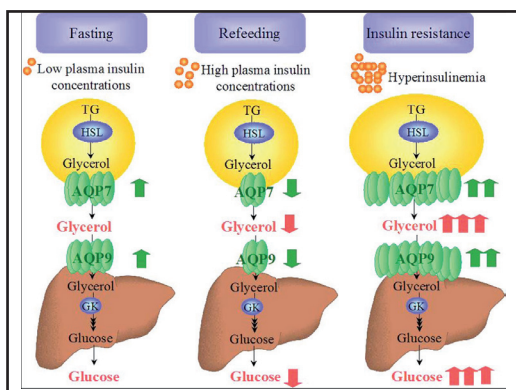


Figura 18. Funció coordinada d'AQP7 i AQP9 en la homeòstasi dels lípids i de la glucosa. Font: Rodríguez *et alii* 2006 [54].

Així que, la regulació coordinada de l'AQP del teixit adipós (AQP7) i la del fetge (AQP9) és decisiva en el metabolisme de la glucosa sota circumstàncies fisiològiques com l'obesitat i la DM2 associada a l'obesitat [23, 70].

6. Factors mobilitzadors de lípids: LMFs

A més a més de la importància del circuit de glicerol en el teixit adipós també ho és la mobilització dels AG com a combustible per altres teixits, com ara el BAT, el múscul esquelètic i el fetge (figura 19). El glicerol i els AG provenen de la hidròlisi dels TG emmagatzemats en el WAT, com ja s'ha mencionat, la no correcta funcionalitat de la lipòlisi pot contribuir a la patogènesi de l'obesitat i de la RI. Recentment, està rebent un especial interès l'adipoquina ZAG, la qual sembla que actua com a factor mobilitzador de lípids (LMF, de l'anglès *Lipid mobilizing factor*), estimulant la lipòlisi en el teixit adipós (figura 19).

Els tumors produeixen factors com són ara els LMFs, els quals indueixen el trencament de TG a AG i glicerol, i els factors inductors de proteòlisi (PIF, de l'anglès *Proteolysis Inducing Factor*), els quals indueixen la degradació de proteïnes (aminoàcids) en el múscul esquelètic. El TNF α també contribueix en aquests processos. Aquests són importants substrats per a la gluconeogènesi, que poden ser utilitzats pel fetge per a la síntesi de proteïnes de fase aguda (APP, de l'anglès *Acute Phase Proteins*). Els tumors converteixen la glucosa en lactat, el qual es transfereix al fetge, on és reconvertit a glucosa. Aquest cicle (figura 20) utilitza una gran quantitat d'energia i podria contribuir a la caquèxia.

La caquèxia es caracteritza per una pèrdua de greix corporal, causada per un increment en la lipòlisi, més que per una disminució en la lipogènesi (figura 19 i 20). Els LMFs indueixen la lipòlisi en adipòcits blancs de ratolins per un procés que és atenuat per l'antagonista β -adrenoreceptor SR59230A, indicant que l'efecte està regulat a través d'un β -adrenoreceptor, com es mostra en la figura 19. Els LMFs s'uneixen

xen al β 3-adrenoreceptor a través d'un lloc d'unió d'alta afinitat que és comparable als altres β 3-agonsites. Això indica que els β 3-antagonistes específics podrien ser útils en la reducció de la pèrdua de lípids i en la despesa d'energia en la caquèxia causada pel càncer (figura 19) [74]. Per tant, es podria dir que la pèrdua de teixit adipós, en situacions de caquèxia provocada per alguns tipus de càncer, està associada, en part, amb la producció de LMFs.

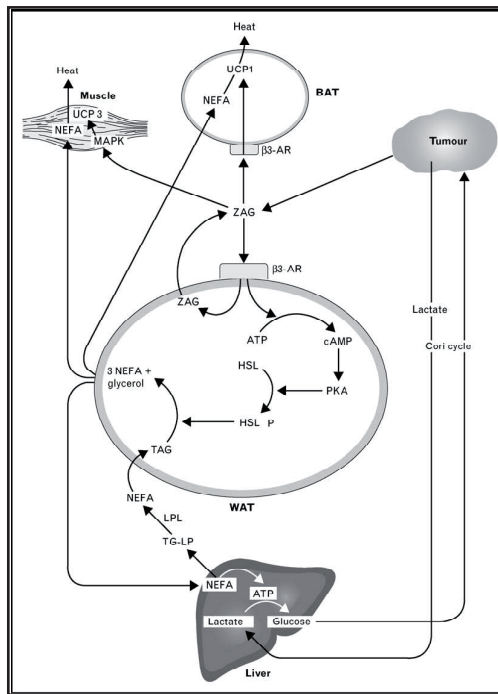


Figura 19. Paper de ZAG en situació de caquèxia causada pel càncer. Aquesta proteïna no només és capaç d'estimular la lipòlisi a través de l'HSL, sinó que també incrementa la utilització dels AG no esterificats (NEFA) a través d'un augment dels nivells d'UCPs en el BAT i en el múscul esquelètic. Font: Tisdale 2009a [73].

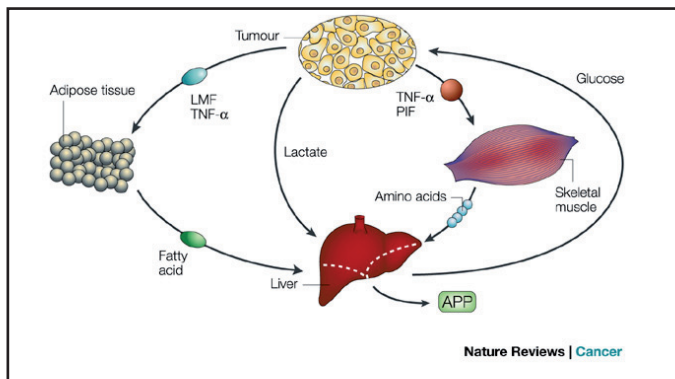


Figura 20. Cicle de Cori amb fonts de substrats gluconeogènics.

Font: Tisdale 2002 [74].

6.1 Glicoproteïna Zinc-□ 2: ZAG o AZGP1

ZAG és una adipoquina que té una seqüència altament homòloga als LMFs, fet que suggereix que pugui tenir un paper important en la mobilització de lípids.

6.1.1 El gen

El gen humà va ser descrit per Freije *et al.* l'any 1991 [75]. ZAG està localitzat al cromosoma 7q22.1, consta de 4 exons i 3 introns. La seqüència completa d'ADN del gen funcional consta de 9,3 kb. El primer exó, des de 5'-UTR al sisè aminoàcid (glicina), l'exó 2 va des de l'aminoàcid 6 al 93 (glicina), el tercer exó del 93 al 185 (aspartat) i l'exó 4 va des de l'aminoàcid 185 al final de l'ARNm. L'exó 4 conté la 3'-UTR, incloent AATAAA, que probablement representa la senyal de poliadenilació del gen [75-77].

6.1.2 La proteïna

La glicoproteïna Zinc-□ 2 (ZAG, també coneguda com AZGP1) rep aquest nom pel fet de ser capaç de precipitar amb sals de zinc i per la seva mobilitat electroforètica en la regió de les □2 globulines. Aquesta

proteïna va ser inicialment aïllada de plasma humà, és un polipèptid de cadena senzilla de 40 kDa que està present en la majoria dels fluids corporals (saliva, llet, orina, suor, etc.) [78]. Les anàlisis en la seqüència d'aminoàcids revelen que ZAG és similar a les proteïnes del complex principal d'histocompatibilitat de classe 1 (MHC-1, de l'anglès *Major Histocompatibility Complex*). Les molècules del MHC-1 són heterodímers consistents en una cadena pesada d'unió no covalent a la membrana associada amb β 2-microglobulina (β 2m), una proteïna soluble que serveix com a cadena lleugera. Les molècules de classe I s'uneixen a pèptids derivats de proteïnes intracel·lulars i les presenten a les cèl·lules T citotòxiques durant la resposta immune. ZAG es compon de 3 dominis, amb un 30-40% de similitud en la seqüència d'aminoàcids als 3 dominis extracel·lulars de les cadenes pesades del MHC-1 [79].

L'estructura cristal·lina de ZAG consisteix en un solc similar al solc d'unió de pèptids del MHC-1, l'estructura i l'entorn del solc reflecteixen el seu paper en la immunoregulació i en el catabolisme lipídic [80,81]. Aquestes observacions indiquen que ZAG podria ser capaç d'unir diferents pèptids, antígens i lligands. D'aquí que es suggereixi que ZAG té diverses funcions de presentació de pèptids i funcions d'interacció amb cèl·lules T [82].

6.1.3 Funcionalitat

Després del descobriment de ZAG l'any 1961 [83], molts investigadors encara estan treballant en aquesta molècula. Fins i tot ara, encara no és clara la seva funció. A causa de la seva presència i als diferents graus d'expressió en diversos teixits i fluids corporals se li atribueixen diverses funcions descrites a continuació:

- Fertilitat
 - La presència de ZAG en el plasma seminal humà a altes concentracions postula el seu paper en la fertilització. Per la seva capacitat mobilitzadora de lípids, ZAG podria jugar un paper en el procés de motilitat de l'esperma, ja que és capaç d'unir-se a la membrana de l'esperma i iniciar la mobilitat [84,85].

- Transport de proteïnes
 - A causa de l'eliminació de residus de l'extrem COOH-terminal, la proteïna actua com a molècula soluble del MHC-1, que dirigeix el transport de substàncies no polimòrfiques o processos de reconeixement intracel·lular [77]. Els estudis de cristal·lografia de ZAG sobre la importància dels dominis a1-a2 suggereixen que el solc es pot unir a lligands hidrofòbics petits [86, 87]. ZAG ha estat proposat per regular el metabolisme lipídic [88] i la seva funció podria ser modulada per la unió al solc de molècules similars als lípids. De la mateixa manera que una molècula soluble, probablement ZAG degrada i elimina subproductes d'ARN després de la transformació dins de les cèl·lules, així com ARNs sintetitzats incorrectament o malsesos [89]. Per poder aclarir la importància de les propietats hidrofòbiques del lligand de ZAG i entendre la funció de ZAG en la unió i el transport d'aquests lligands són necessaris més estudis in vivo.
- Immunoregulació
 - L'alta similitud, en la seqüència i en l'estructura, amb les molècules del MHC-1 fa que es consideri ZAG com a un membre de la superfamília de les immunoglobulines. ZAG podria tenir un paper en l'expressió de la resposta immune [80, 81, 90, 91].
- Adhesió cel·lular
 - Aquesta proteïna podria tenir propietats d'adhesió cel·lular entre cèl·lules i matrius extracel·lulars a causa de la presència de Arg-Gly-Asp (residus 231-233) en el domini a3 [92].
- Activitat ARNasa
 - ZAG inhibeix la proliferació de la línia cel·lular de tumor oral gràcies a l'activitat ARNasa. L'activitat ARNasa podria ser important per la seva funció fisiològica. Com ja s'ha dit anteriorment, ZAG

està àmpliament distribuïda en diversos òrgans i fluids corporals. En aquests òrgans, l'activitat biològica de ZAG ha estat associada amb infecció, immunoregulació i activitat antitumoral [93].

- Regulació de la producció de melanina
 - ZAG inhibeix la síntesi de melanina en cèl·lules de melanoma de ratolí (B16) a nivell post-transcripcional. A més a més, sembla disminuir el creixement de la cèl·lula tumoral i la síntesi de melanina de manera més significativa *in vivo* que *in vitro*, suggerint que té un mecanisme diferent *in vivo* i *in vitro*. Tot i la seva activitat inhibidòria, es requereix un nivell mínim de ZAG per la síntesi de melanina [82].
- Dificultat de proliferació tumoral
 - ZAG regula, de manera negativa, la quinasa dependent de ciclina, la qual és responsable de regular la transició de G₂-M, un pas limitant en el cicle cel·lular, suggerint que aquesta proteïna indirectament juga un paper en dificultar la proliferació cel·lular [94]. Pertany a la família de les macroglobulines, que participen activament en la inhibició del creixement i proliferació tumoral. La capacitat de les macroglobulines d'unir-se a les hidrolases fa possible la inhibició de la invasió del tumor [95]. Al mateix temps, un excés del complex hidrolasa/macroglubulinapot activar l'apoptosi [96].
- Mobilització lipídica
 - ZAG és homòloga al LMF en la seqüència d'aminoàcids, en la mobilitat electroforètica i en la immunoreactivitat, i això comporta una activitat biològica similar. De la mateixa manera que el LMF, s'ha demostrat en ratolins que ZAG estimula, *in vivo* i *in vitro*, la lipòlisi en adipòcits [97,98]. Aquesta estimulació sembla que sigui a través de la interacció d'aquesta proteïna amb els receptors β -adrenèrgics

i que estigui associada amb una activació de l'AC en la membrana plasmàtica de l'adipòcit, de manera dependent de GTP, com es mostra en la següent figura (figura 21) [88,99].

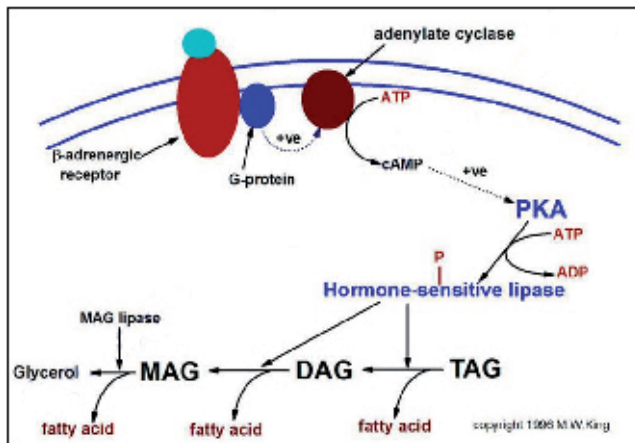


Figura 21. Mecanisme d'estimulació de la lipòlisi per ZAG. La proteïna s'uneix al receptor β -adrenèrgic de la membrana plasmàtica de l'adipòcit i s'activa l'AC, això comporta un augment dels nivells de cAMP, els quals activen la PKA, que fosforila i activa l'HSL. L'HSL, juntament amb altres lipases, hidrolitza els TAG a AG i glicerol. Font: Adaptada de <http://themedicalbiochemistrypage.org/mobile/fatty-acid-oxidation.php>.

La pèrdua de pes corporal en ratolins podria ser atribuïda exclusivament a la pèrdua de greix, que pot ser deguda a l'activitat lipolítica de ZAG [97]. Per tant, aquests fets, fan que es plantegi la hipòtesi del paper de ZAG com a gen candidat en la regulació del pes corporal.

6.1.4 ZAG com a nova adipoquina

Tenint en compte la funció secretora dels adipòcits i l'efecte lipolític de ZAG, es creu que aquesta proteïna pot ser produïda directament pel tei-

xit adipós i actuar com a nou factor proteic influenciant en la degradació de lípids (figura 22).

Així doncs, s'ha vist que ZAG s'expressa tant en WAT de ratolins com en adipòcits 3T3-L1. Recentment, diversos estudis *in vitro* utilitzant precursors d'adipòcits (preadipòcits) d'una persona amb síndrome de sobrecreixement, cèl·lules SGBS (Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel), demostren que ZAG s'expressa, tant a nivell d'ARNm com de proteïna, en adipòcits diferenciats i no en preadipòcits. També s'ha observat la seva expressió en adipòcits humans aïllats [100,101]. A més a més, els estudis en models de ratolins que desenvolupen caquèxia induïda per un tumor (pèrdua de pes corporal i de massa de greix) observen que aquests ratolins tenen els nivells d'ARNm i de proteïna de ZAG en WAT força més elevats. Aquests resultats suggereixen que ZAG, produït per l'adipòcit,

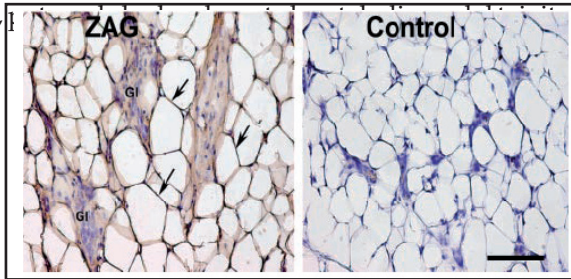


Figura 22. Detecció immunohistoquímica de ZAG en teixit adipós de glàndula mamària. Es detecta immunoreactivitat en el citoplasma dels adipòcits (de color marró, senyalitzat amb fletxes). Font: Bing *et alii* 2004 [100].

6.1.5 Regulació

Avui en dia la regulació de ZAG en el WAT encara no és prou coneguda, però segons sembla, pot ser modulada per factors que afecten directament el procés de la lipòlisi.

En un primer estudi en adipòcits 3T3-L1 se suggereix que, almenys en ratolins, els glucocorticoides, com per exemple la dexametasona, i els agonistes β -adrenèrgics, com el BRL37344, podrien estimular l'expressió de ZAG [100]. A més a més, també s'ha demostrat *in vitro* l'efecte lipolític potent que té ZAG sobre si mateix a través dels receptors β -

adrenèrgics [102]. Tot i això, no sabem si els efectes lipolítics de ZAG podrien estar modulats també a través dels receptors $\alpha 1$ o $\alpha 2$ -adrenèrgics. Estudis en models de ratolins amb caquèxia varen observar que l'àcid eicosapentaenoic (EPA), un antagonista del receptor dels glucocorticoides, atenuava la pèrdua de pes corporal i l'expressió de ZAG en WAT, corroborant, *in vivo*, que els glucocorticoides són també responsables de l'augment de l'expressió de ZAG en el teixit adipós, de manera que els glucocorticoides estimulen la lipòlisi a través d'un increment de ZAG [98, 102].

En adipòcits humans també s'ha demostrat que hi ha diversos factors que influencien en l'expressió gènica de ZAG. La rosiglitazona, un agonista del PPAR α , és capaç d'induir els nivells d'ARNm de ZAG, per tant, podríem dir que el receptor nuclear PPAR α està involucrat en la regulació de la producció de ZAG. En canvi, el TNF α , una citocina pro inflamatòria, porta a una disminució de la seva expressió. Els efectes inhibidors del TNF α i els estimuladors de la rosiglitazona sobre la síntesi de ZAG en els adipòcits són similars a la regulació de l'adiponectina per aquests 2 factors, això podria apuntar a una possible relació entre les dues adipoquines [101]. Totes aquestes possibles vies de modulació de la síntesi de ZAG en el WAT s'il·lustren en la figura 23.

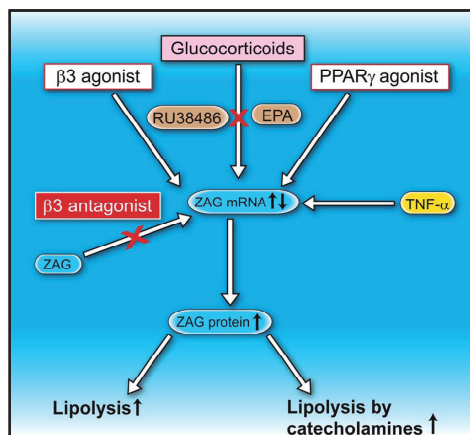


Figura 23. Possibles mecanismes reguladors de la producció de ZAG en WAT. Font: Tisdale 2009b [103].

6.1.6 ZAG en el context de l'obesitat, la SM i la RI

Tal com ja s'ha comentat prèviament, ZAG ha estat proposat com a nou candidat en la patogènesi de l'obesitat, però la majoria dels estudis s'han realitzat en ratolins i en anàlisis *in vitro*.

Se sap que, *in vitro*, ZAG estimula la lipòlisi en adipòcits tant de ratolí com d'humans. A més a més, molt probablement ZAG promou la utilització de lípids, possiblement a través de l'estimulació de l'expressió d'UCPs en el BAT i en el múscul esquelètic, fet que podria contribuir a augmentar el consum energètic així com la mobilització de lípids durant la caquèxia.

L'expressió de ZAG en teixit adipós es relaciona inversament amb la massa de greix corporal. S'ha demostrat que models de ratolins amb caquèxia tenen els nivells d'ARNm i de proteïna de ZAG augmentats, mentre que els nivells de leptina estan fortament suprimits [100, 104]. Els efectes de ZAG en la pèrdua de greix han estat estudiats en un recent treball, en el qual ratolins KO per ZAG són susceptibles de guanyar pes, el qual s'associa amb una reducció de la lipòlisi en els adipòcits [105]. Aquest fet es troba reforçat en treballs en els quals s'ha estudiat l'efecte

de l'administració exògena de ZAG en diferents models de ratolins. El tractament amb ZAG causa una reducció selectiva del greix corporal tant en ratolins genèticament obesos (*ob/ob*) com en ratolins normals [88, 106].

Els estudis en humans han confirmat la presència d'aquesta proteïna en el teixit adipós. De fet, s'ha demostrat l'expressió de ZAG, a nivell d'ARNm i de proteïna tant en SAT com en VAT. Així mateix, s'ha pogut observar, analitzant cultius cel·lulars d'adipòcits humans diferenciats, que aquesta adipoquina pot ser secretada al medi [100, 101].

Fins ara, els estudis en cohorts de pacients amb i sense obesitat han estat molt limitats. En la literatura científica, el primer treball en què es parla de diferències d'expressió entre primis i obesos apareix al 2008. En aquest estudi s'analitza una petita cohort de 18 pacients, i es comenta per primera vegada que els subjectes amb obesitat podrien tenir nivells d'expressió de ZAG en SAT disminuïts respecte els subjectes primis. A més a més, també es parla de la possible relació entre l'expressió d'aquesta adipoquina i determinats factors de risc metabòlics, com ara els nivells circulants d'altres adipoquines, per exemple l'adiponectina i la leptina, i el perímetre de la cintura [107].

Avui en dia sabem que l'alteració en la regulació de la secreció d'adipoquines del teixit adipós pot estar implicada en la patogènesi de la RI [108, 109] i per tant, jugar un paper rellevant en la patogènesi de les malalties cardiovasculars [110] i de la SM. Tot i així, encara no és clar que l'expressió de ZAG en SAT i VAT estigui influenciada per l'expansió de massa de greix en l'obesitat i la seva possible associació amb la RI. A més a més, tot i que es relacioni ZAG amb la pèrdua de lípids, no es pot assegurar que els nivells de ZAG circulants estiguin associats amb l'obesitat o la SM [111].

Hipòtesi i objectius

Hipòtesi

El teixit adipós blanc (WAT) és el reservori d'energia més gran del cos humà i la principal font de combustible metabòlic. Així doncs, la majoria de les reserves d'energia s'emmagatzemen en les cèl·lules grasses en forma de TG. Per tant, els factors que controlen l'emmagatzematge i la mobilització dels TG en els adipòcits esdevenen elements claus en la regulació de l'acumulació de greix en els diferents dipòsits de l'organisme.

Recents treballs revelen que la lipòlisi no és una simple via metabòlica, estimulada per catecolamines i inhibida per la insulina, sinó que nous descobriments sobre la regulació de la lipòlisi per factors endocrins i paracrins i de les proteïnes que participen en la hidròlisi de TG porten a una reavaluació de la complexitat de les diverses vies de transducció de senyals. Els passos involucrats en l'alteració de la regulació de la lipòlisi, observats en l'obesitat, han estat només en part identificats. Així doncs, el nostre interès se centra en avançar el coneixement del paper que poden jugar molècules, que si bé no són noves (ni la seva identificació) si que ho és el coneixement del seu paper en la homeòstasi de l'adipòcit. Per això, s'ha proposat estudiar dues molècules implicades en la regulació de la lipòlisi, l'AQP7 i la ZAG, que semblen estar involucrades en el fenotip de l'obesitat, de la diabetis tipus 2 i/o de la síndrome metabòlica.

Per una banda s'estudia l'AQP7, que és una proteïna implicada en la lipòlisi, però no involucrada directament en el procés catalític. En un nou concepte, s'estableix com la permeabilitat al glicerol en les cèl·lules

de greix és capaç de modular la mida de l'adipòcit i, per tant, contribuir al desenvolupament de l'obesitat. En ratolins s'ha demostrat que la deficiència d'AQP7 en els adipòcits comporta una acumulació de glicerol intracel·lular i una hipertròfia cel·lular, com a conseqüència d'un augment de l'activitat de la glicerol quinasa, promovent l'acumulació de lípids en el teixit adipós.

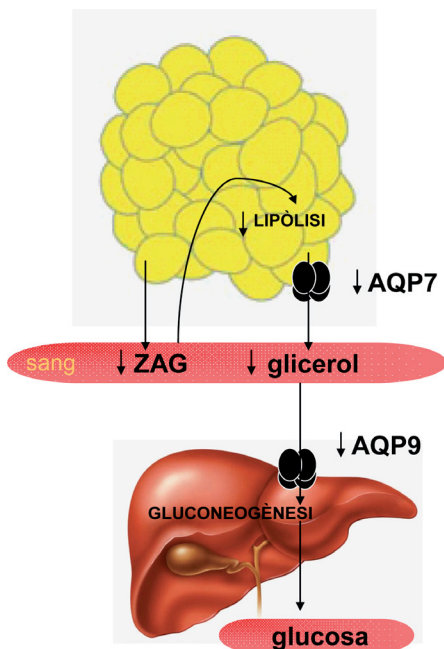
L'altra proteïna d'interès és la ZAG. Les seves funcions biològiques són encara poc conegudes, però el fet que tingui una seqüència amb una gran similitud al LMF, fa que es consideri com una proteïna implicada en el metabolisme lipídic, estimulante la lipòlisi. En estudis murins s'ha vist que ratolins amb caquèxia tenen els nivells d'ARNm i de proteïna de ZAG augmentats. Aquests resultats permeten plantejar la possibilitat que ZAG podria servir com a factor proteic en la modulació local del metabolisme lipídic i contribuir a la reducció de l'adipositat que es produeix en la caquèxia causada pel càncer. Darrerament s'ha demostrat que ZAG estimula l'expressió d'adiponectina en cèl·lules 3T3-L1, suggerint que ZAG també podria influenciar en la producció d'altres adipoquines. Per tant, es planteja la possibilitat de ZAG com a molècula candidata en la regulació del pes corporal.

Davant d'aquestes evidències, es proposa que AQP7 i ZAG poden tenir un paper rellevant en la patogènesi de l'obesitat i de la DM2, a través de la regulació de l'homeòstasi del teixit adipós.

Es planteja que:

1. L'expressió d'AQP7 i ZAG podria estar alterada per la presència d'obesitat i DM2 en el teixit adipós humà, ambdues condicions associades amb la resistència a la insulina, amb una transcripció adipogènica diferencial, en el context d'un ambient inflamatori local i sistèmic.
2. Així mateix, podria existir un *feed-back* regulador entre l'expressió d'AQP7 en el teixit adipós i el principal canal de glicerol del fetge (AQP9).

La següent figura mostra de manera esquemàtica el possible paper participatiu d'aquestes dues proteïnes en el context de l'obesitat.



Objectius

Objectiu general

L'objectiu global de la tesi és ampliar els coneixements de dues proteïnes lipolítiques, l'AQP7 i l'adipoquina ZAG, en el context de l'obesitat, la diabetis tipus 2 i la síndrome metabòlica.

Objectius específics

Estudi 1: Comprovar la hipòtesi que els nivells d'expressió d'AQP7 podrien estar afectats per la presència d'obesitat i diabetis tipus 2 en humans.

1. Determinar l'expressió d'AQP7 en mostres humanes de teixit adipós subcutani en obesitat i diabetis tipus 2 i relacionar-ho amb gens marcadors d'inflamació i d'adipogènesi.
2. Anàlisi de les mutacions de canvi de sentit, ja descrites, del gen AQP7. Analitzar la freqüència de les mutacions en paral·lel amb l'expressió del gen, la resistència a la insulina i la concentració de glicerol plasmàtic en un grup de subjectes caucàsics amb diferents graus d'adipositat i diabetis tipus 2.

Estudi 2: Estudiar la relació entre l'expressió d'*AQP7* en el teixit adipós (subcutani i visceral) i d'*AQP9* en el fetge i la tolerància a la glucosa en l'obesitat severa.

1. Determinar els nivells d'ARNm d'*AQP7* en teixit adipós subcutani i en visceral i d'*AQP9* en el fetge segons l'estat de tolerància a la glucosa (normoglicèmics, intolerants a la glucosa i diabètics tipus 2).
2. Estudiar la relació entre els nivells d'expressió d'*AQP7* en teixit adipós subcutani i visceral i els d'*AQP9* en el fetge en el context de l'obesitat severa humana, obesitat de classe III segons l'OMS (IMC \geq 40.00).

Estudi 3: Aprofundir en el paper de ZAG en el metabolisme del teixit adipós.

1. Anàlisi dels nivells plasmàtics i dels nivells d'expressió d'ARNm de ZAG en una cohort de prims i obesos.
2. Estudi de la relació dels nivells plasmàtics de ZAG amb factors de risc cardiometabòlics.
3. Examinar la relació entre els nivells circulants i l'expressió gènica en teixit adipós de ZAG depenent de la presència de síndrome metabòlica.
4. Estudiar la relació de l'expressió gènica de ZAG amb gens lipolítics i adipoquines específiques del teixit adipós.

Resultats

ESTUDI 1

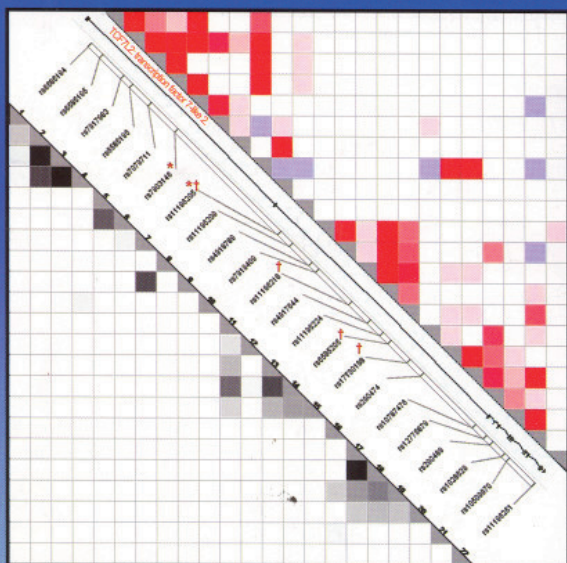
*Adipose tissue expression of the glycerol channel
aquaporin-7 gene is altered in severe obesity
but not in type 2 diabetes*

J Clin Endocrinol Metab. (2007); 92(9):3640-5



Volume 92
Number 9
September 2007

THE JOURNAL OF
CLINICAL
ENDOCRINOLOGY
& **METABOLISM**



PUBLISHED MONTHLY BY
THE ENDOCRINE SOCIETY

<http://jcem.endojournals.org>

Adipose Tissue Expression of the Glycerol Channel Aquaporin-7 Gene Is Altered in Severe Obesity But Not in Type 2 Diabetes

V. Ceperuelo-Mallafre, M. Miranda, M. R. Chacón, N. Vilarrasa, A. Megia, C. Gutiérrez, J. M. Fernández-Real, J. M. Gómez, E. Caubet, G. Frühbeck, and J. Vendrell

Endocrinology and Diabetes Unit (V.C.-M., M.M., M.R.C., A.M., C.G., J.V.), Research Department, University Hospital of Tarragona Joan XXIII, "Pere Virgili" Institute, 43007 Tarragona, Spain; Endocrinology and Diabetes Unit (N.V., J.M.G.), University Hospital of Bellvitge 08907, Barcelona, Spain; Diabetes, Endocrinology, and Territorial Nutrition Unit of Girona (J.M.F.-R.), University Hospital "Dr. Josep Trueta", and CIBER Fisiopathology of Obesity (CB06/03/010), Health Institute Carlos III, 17007 Girona, Spain; Surgery Service (E.C.), Hospital de Sta Tecla, 43003 Tarragona, Spain; and Metabolic Research Laboratory (G.F.), Department of Endocrinology, University Clinic of Navarra, University of Navarra, 31080 Pamplona, Spain

Context: Aquaporin-7 is required for efflux of glycerol from adipocytes and influences whole-body glucose homeostasis in animal studies.

Objective: Our objective was to test the hypothesis that *AQP7* gene expression levels may be affected by presence of obesity and type 2 diabetes in humans.

Design: The obesity study cohort consisted of 12 lean, 22 nonseverely obese, and 13 severely obese subjects. The type 2 diabetes study cohort consisted of 17 lean and 39 obese type 2 diabetic patients. Circulating levels of plasma soluble proteins monocyte chemoattractant protein-1, TNF receptors 1 and 2, and IL-6 and glycerol were measured. The sc adipose tissue gene expression of *AQP7*, *MCP-1*, *IL-6*, *TNF α* , *PPAR γ* , and *SREBP1c* genes was measured by real-time PCR. *AQP7* gene mutation analysis was performed.

Results: Severely obese women showed lower *AQP7* expression levels compared with lean and nonseverely obese ($P < 0.001$). Moreover, circulating glycerol concentration was lower in severely obese subjects, but no correlation with *AQP7* adipose tissue expression was observed. *AQP7* expression was negatively related with proinflammatory genes (for monocyte chemoattractant protein-1, $r = -0.203$ and $P = 0.044$; for *TNF α* , $r = -0.209$ and $P = 0.036$). Concerning adipogenic factors, *AQP7* expression levels were found to be positively determined by *PPAR γ* mRNA expression levels ($r = 0.265$; $P = 0.012$). *AQP7* expression did not show differences regarding the presence of type 2 diabetes.

Conclusion: Expression of *AQP7* is down-regulated in women with severe obesity. The expression of this glycerol channel is not affected by type 2 diabetes. (*J Clin Endocrinol Metab* 92: 3640–3645, 2007)

WHITE ADIPOSE TISSUE is considered as the largest energy storage organ, with more than 95% of lipid stored as triglyceride, where lipogenesis and lipolysis occur in response to whole-body energy balance. Triglycerides are hydrolyzed to free fatty acids and glycerol by lipases in states of energy requirement such as fasting and exercise, and both products are released into the bloodstream. Plasma glycerol comes mainly from adipose tissue and is captured by the liver, where it is turned to glucose by the gluconeogenesis pathway. Thus, glycerol is one of the main factors that determine plasmatic glucose levels (1–4).

The molecular basis for the secretion and uptake of glycerol has been recently characterized with the discovery of the aquaporin (AQP) family of proteins. The *AQP7* gene is a

member of this family of membrane channels implicated in controlling fat and in turn glucose metabolism. The *AQP7* gene was cloned from human adipose tissue and is responsible for glycerol permeability and other small solutes (5). The release of glycerol in mouse 3T3-L1 cells increases during differentiation to adipocytes in parallel with increasing *AQP7* mRNA levels (6). The *AQP7* gene contains a putative peroxisome proliferator response element and a putative insulin response element in the promoter region (5). Adipose tissue *AQP7* expression is regulated by fasting-refeeding, insulin, dexamethasone, *TNF α* , isoproterenol, and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α and - γ (6–9). *AQP7*-knockout mice models developed obesity and insulin resistance, had impaired plasma glycerol permeability (altered uptake or secretion rates) compared with wild-type mice, and exhibited accumulated excess glycerol and triglyceride concentrations in adipocytes (10–12).

In humans, *AQP7* has been shown to be equally expressed in omental and sc adipose tissue, with higher expression in women than in men (13). Studies on *AQP7* expression in human adipose tissue are scarce but suggest that the *AQP7* gene is less expressed in sc adipose tissue of obese compared with lean male subjects (14). Three missense mutations (R12C, V59L, and G264V) have been identified in human

First Published Online June 12, 2007

Abbreviations: AQP, Aquaporin; B, unstandardized coefficient; BMI, body mass index; CI(B), confidence interval for B; CV, coefficient of variation; HDL, high-density lipoprotein; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; sMCP-1, soluble monocyte chemoattractant protein-1; TNFR, TNF receptor; WHR, waist-to-hip ratio.

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

subjects in a Japanese cohort. Nevertheless, the frequency of these mutations was not associated with obesity or type 2 diabetes. Functional analysis showed that the permeability of water and glycerol is disturbed in *Xenopus* oocytes expressing G264V mutant protein (5).

Taking into consideration the above-mentioned observations, we suggest that *AQP7* gene expression could be altered by the presence of obesity and type 2 diabetes in humans, both conditions associated with insulin resistance, differential adipogenic transcription, and higher local and systemic inflammatory environment. Therefore, the aim of the present study was to analyze *AQP7* gene expression in human sc adipose tissue biopsies in obesity and type 2 diabetes and to relate it to inflammatory and adipogenic markers. Likewise, a preliminary study of described gene mutation frequencies was also performed in our Caucasian cohort to analyze its frequency in obese and type 2 diabetic patients.

Subjects and Methods

Obesity and type 2 diabetes studies

A group of 103 subjects was recruited at the Hospital Universitari Joan XXIII (Tarragona, Spain), Hospital Sant Pau i Santa Tecla (Tarragona, Spain), and Hospital de Bellvitge (Barcelona, Spain). All subjects were of Caucasian origin and reported that their body weight had been stable for at least 3 months before the study. They had no systemic disease other than obesity or type 2 diabetes, and all were free of any infections in the previous month before the study. Liver and renal diseases were specifically excluded by biochemical work-up.

Obesity study cohort. Overweight and nonsevere obesity were defined as a body mass index (BMI) between 25.0 and 39.9 kg/m² and severe obesity being considered when the BMI was higher than 40 kg/m² (15). Normal weight was considered in individuals with a BMI less than 25.0 kg/m². According to these criteria, three groups were studied: 12 lean subjects, 22 nonseverely obese subjects, and 13 severely obese subjects. All subjects were nondiabetic (Table 1).

Type 2 diabetes cohort. Patients were classified as having type 2 diabetes mellitus according to the American Diabetes Association criteria (16) with a stable metabolic control in the previous 6 months, as defined by stable glycosylated hemoglobin values. According to these criteria, there were 17 type 2 diabetic lean and 39 type 2 diabetic obese subjects. Pharmacological treatment of the patients with type 2 diabetes mellitus was as follows: insulin, 9.8%; oral hypoglycemic agents, 68.3%; statins, 45.0%; fibrates, 0%; blood-pressure-lowering agents, 47.5%. For the intergroup comparisons between nondiabetic obese and type 2 diabetic patients, we selected 33 nondiabetic obese and 39 type 2 diabetic obese subjects for the study of type 2 diabetes, matched for BMI (Table 2).

Anthropometric measurements

Height was measured to the nearest 0.5 cm and body weight to the nearest 0.1 kg. BMI was calculated as weight (kilograms) divided by height (meters) squared. Waist circumference was measured midway between the lowest rib margin and the iliac crest. Hip circumference was determined as the widest circumference measured over the greater trochanter. Waist-to-hip ratio (WHR) was accordingly calculated.

Analytical methods

Plasma and serum samples were stored at -80 C until analytical measurements were performed, except for glucose, which was immediately determined after blood was drawn.

Serum glucose was measured using the glucose analyzer YSI 2300 STAT Plus (YSI Inc., Yellow Springs, OH). Total serum cholesterol was measured through the reaction of cholesterol esterase/cholesterol oxidase/peroxidase. High-density lipoprotein (HDL) cholesterol was quantified after precipitation with polyethylene glycol at room temperature. Total serum triglycerides were measured through the reaction of glycerol-phosphate-oxidase and peroxidase.

Plasma soluble monocyte chemoattractant protein-1 (sMCP-1) levels were measured by (h)MCP-1 Biotrak ELISA kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK); the sensitivity of the assay was less than 10 pg/ml, and the coefficients of variation (CV) were less than 10%. Soluble TNF receptor 1 (sTNFR1) and 2 (sTNFR2) were determined by solid-phase enzyme immunoassay with amplified reactivity (BioSource Europe, Nivelles, Belgium). The limit of detection was 50 pg/ml for sTNFR1 and 0.1 ng/ml for sTNFR2, and the intra- and interassay CV

TABLE 1. Selected subjects for the study of obesity: anthropometric and analytical characteristics and relative mRNA levels (arbitrary units)

	Lean (n = 12)	Nonseverely obese (n = 22)	Severely obese (n = 13)	P
Anthropometric and analytical characteristics				
Age (yr)	47.0 (36.2–66.5)	59.0 (45.8–64.2)	41.0 (33.5–50.5)	0.017
Females/males (n)	4/8	9/13	12/1	0.004
BMI (kg/m ²)	22.8 (22.4–24.0)	29.7 (27.4–33.3)	48.5 (44.3–57.5)	<0.001
WHR	0.91 (0.79–0.95)	0.94 (0.90–1.02)	0.92 (0.84–0.99)	0.211
Fasting glucose (mM)	5.36 ± 0.47	5.54 ± 0.78	5.49 ± 0.66	0.312
Insulin (μIU/ml)	3.06 (2.13–5.12)	3.37 (1.81–5.34)	10.14 (4.09–14.05)	0.024
Triglyceride (mM)	0.99 (0.77–1.17)	1.16 (0.93–1.57)	1.40 (1.12–1.85)	0.118
HDL cholesterol (mM)	1.32 ± 0.19	1.21 ± 0.32	1.25 ± 0.22	0.555
Cholesterol (mM)	4.37 (3.96–5.34)	5.67 (5.14–5.92)	4.91 (4.29–5.57)	0.029
Glucose (μM)	361.26 ± 165.61	451.52 ± 180.22	233.53 ± 78.10	0.003
hsCRP (mg/liter)	0.85 (0.66–2.82)	0.96 (0.69–2.25)	12.80 (8.98–21.65)	0.001
sTNFR1 (ng/ml)	1.64 (0.86–3.36)	1.67 (1.13–2.16)	2.29 (1.64–2.34)	0.206
sTNFR2 (ng/ml)	6.21 (4.27–8.27)	4.28 (3.22–5.63)	5.44 (4.08–7.86)	0.063
sMCP-1 (pg/ml)	516.08 (358.99–555.16)	406.34 (205.10–504.51)	289.97 (116.12–441.94)	0.045
sIL-6 (pg/ml)	0.69 (0.30–2.26)	0.52 (0.32–1.49)	3.07 (1.63–5.61)	0.031
Relative mRNA levels (arbitrary units)				
<i>AQP7</i>	7.48 ± 4.31	6.91 ± 7.06	2.22 ± 2.17 ^{a,b}	<0.001
<i>MCP-1</i>	26.64 ± 18.49	62.08 ± 46.36	219.37 ± 277.28 ^a	0.004
<i>IL-6</i>	1.99 ± 1.24	5.37 ± 9.53	35.31 ± 24.54 ^{a,b}	<0.001
<i>TNFα</i>	0.16 ± 0.10	0.23 ± 0.20	0.95 ± 0.77 ^{a,b}	<0.001
<i>PPARγ</i>	36.03 ± 25.75	47.25 ± 45.22	78.38 ± 96.56	0.725
<i>SREBP1c</i>	51.16 ± 54.89	33.76 ± 29.94	12.95 ± 16.88	0.004

^a Difference vs. lean.

^b Difference vs. nonseverely obese.

TABLE 2. Selected subjects for the study of type 2 diabetes mellitus: anthropometric and analytical characteristics and relative mRNA levels (arbitrary units)

	Nondiabetes (n = 33)	Type 2 diabetes (n = 39)	P
Anthropometric and analytical characteristics			
Age (yr)	49.0 (41–61.5)	60.0 (52–70.0)	0.005
Females/males (n)	21/12	25/14	0.967
BMI (kg/m ²)	34.3 (29.4–47.3)	33.7 (28.4–47.8)	0.765
WHR	0.94 (0.89–1.01)	0.92 (0.88–0.96)	0.377
Fasting glucose (mM)	5.52 ± 0.74	8.84 ± 2.25	<0.001
Insulin (μIU/ml)	4.68 (2.85–9.41)	8.04 (5.61–11.46)	0.051
Triglyceride (mM)	1.30 (1.01–1.74)	1.68 (1.29–2.10)	0.014
HDL cholesterol (mM)	1.24 (1.10–1.36)	1.22 (1.01–1.37)	0.792
Cholesterol (mM)	5.50 (4.67–5.85)	5.18 (4.33–5.68)	0.196
Glycerol (μM)	373.48 ± 186.97	333.35 ± 192.40	0.399
hsCRP (mg/liter)	1.48 (0.74–9.46)	1.77 (0.91–6.41)	0.729
sTNFR1 (ng/ml)	1.84 (1.18–2.29)	2.27 (1.95–3.17)	0.008
sTNFR2 (ng/ml)	4.51 (3.65–5.97)	5.60 (4.54–6.74)	0.027
sMCP-1 (pg/ml)	373.39 (182.60–447.19)	316.58 (240.75–412.56)	0.854
sIL-6 (pg/ml)	0.80 (0.32–1.75)	1.17 (0.60–2.44)	0.294
Relative mRNA levels (arbitrary units)			
AQP7	5.21 ± 6.31	5.76 ± 6.15	0.328
MCP1	121.98 ± 183.27	212.60 ± 334.07	0.086
IL-6	16.64 ± 21.79	58.50 ± 51.28	0.598
TNFα	0.52 ± 0.61	0.53 ± 0.59	0.432
PPARγ	60.01 ± 71.50	146.74 ± 173.60	0.011
SREBP1c	25.85 ± 28.01	12.96 ± 10.47	0.016

were less than 7% and less than 9%, respectively. Circulating sIL-6 was determined by an ultrasensitive solid-phase enzyme immunoassay (BioSource). The mean of the minimum detectable concentration was 0.039 pg/ml. Intra- and interassay CV were less than 9.8% and less than 11.2%, respectively. Plasma high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) was determined by a highly sensitive immunonephelometry kit (Dade Behring, Marburg, Germany).

Plasma glycerol levels were analyzed by using a free glycerol determination kit, a quantitative enzymatic determination assay (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). Intra- and interassay CV were less than 6% and less than 9.1%, respectively.

Serum insulin concentrations were measured by a monoclonal immunoradiometric assay (Coat-A-Count insulin; Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA). Intra- and inter-assay CV were of 6.6% and 7.1%.

Adipose tissue samples

All adipose tissue samples were obtained from sc abdominal depots during abdominal elective surgical procedures (gastric bypass operation, cholecystectomy, and surgery of abdominal hernia).

Preoperative anthropometric measurements were made and blood samples were collected before the surgical procedure. All patients had fasted overnight, and at the beginning of surgery, 2–4 g sc fat tissue was removed by scalpel from each proband and immediately introduced in RNALater (Sigma-Aldrich) and stored at –80 C until RNA extraction.

Informed written consent was obtained, and the purpose, nature, and potential risks of the study were explained to the subjects. The experimental protocol was approved by the ethics committee of the hospital.

Total RNA isolation and RT

Total RNA was extracted from 400–500 mg frozen sc adipose tissue by using RNeasy Lipid Tissue Midi Kit (QIAGEN Science, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. The RNA was treated with 55 U RNase-free DNase (QIAGEN) before column elution to avoid contamination with genomic DNA. The RNA integrity was electrophoretically verified by ethidium bromide staining and its purity by the OD₂₆₀/OD₂₈₀ absorption ratio.

One microgram of RNA was reverse transcribed to cDNA by using Promega RT system (Promega Corp., Madison, WI); 20 μl RT mixture contained 1X RT buffer [10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1%

Triton X-100], 1 mM of each dNTP, 1 U/μl recombinant RNasin ribonuclease inhibitor, 15 U AMV reverse transcriptase, and 0.5 μg random primers. The cDNA reaction was incubated for 10 min at 25 C followed by 60 min at 42 C and then heated 5 min at 95 C.

Real-time PCR

Real-time quantitative PCR analyses were performed with 2 μl cDNA on LightCycler Instrument (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), using the SYBR green fluorescence method and in a final volume of 20 μl. The following primers were used: for specific AQP7, 5'-caaatgtctctc-ggtccg-3' and 5'-gactcgaagcaaac-3'; for MCP-1, 5'-tctgtcgtctcgtc-catag-3' and 5'-cagatctcttgccacaat-3'; for PPARγ, 5'-ctatggagttcatgct-tgtg-3' and 5'-gtactgacatttattt-3'; for sterol-responsive element binding protein 1c (SREBP1c), 5'-aagtggaatgcggcgg-3' and 5'-atcggggctg-gcggg-3'; for TNFα, 5'-gagcactgaagcatgatcc-3' and 5'-gctgttatctc-cagctca-3'; and for IL-6, 5'-cgctcatctcgtcagc-3' and 5'-tgatgtttacc-cagc-3'. The housekeeping genes used to normalize gene expression were as follows: β-actin, 5'-ggactcggagaagatgg-3' and 5'-agcactgtt-tggctacag-3'; and cyclophilin A (CYPA), 5'-caatgctggaaccaacac-3' and 5'-gctccaacatattcgtctctt-3'.

The purity of each amplified product was confirmed by melting curve analysis and by adjusting the detection of the fluorescent signal to avoid primer-dimer detection.

Expression data were calculated with external standard curve, created with serial dilutions of a cloned PCR fragment from the respective gene, using LightCycler Software version 3.5 (Roche Diagnostics). Values are expressed as a ratio to the β-actin or CYPA expression.

Analysis of missense mutations

G to T substitution at exon 8 of the AQP7 gene led to the amino acid substitution from glycine to valine at position 264 (G264V) (5). We searched for this mutation in 178 Caucasian subjects. These included 127 nondiabetic subjects (37 lean and 90 obese) and 51 type 2 diabetic subjects (14 lean and 37 obese). The following primers were used: 5'-TGAACCGCAGCTTGAC-CTTTG-3' and 5'-TGGCTTTCATACCCACAGA-3'; and for sequencing, 5'-GTAGCCTGGGGATGACTCCT-3'.

The PCR products were directly sequenced on an ABI PRISM 310 automatic sequencer.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by using the SPSS/PC + statistical package (version 13 for Windows; SPSS, Chicago, IL). For clinical and anthropometric variables, normal distributed data are expressed as mean value \pm SD, and for variables with no Gaussian distribution, values are expressed as median (25–75th percentile). For statistical analysis of expression variables that did not have a Gaussian distribution, values were logarithmically transformed.

Differences in clinical or laboratory parameters between groups were compared by using ANOVA with a *post hoc* Scheffé correction or a Student's *t* test. A univariate general linear model was used to analyze differences between groups correcting for confounding variables. Differences in sex between studied groups were analyzed by Pearson's χ^2 test. Associations between quantitative variables were evaluated by Pearson/Spearman's correlation analysis, and correction for confounding and interacting variables was performed using a stepwise multiple linear regression analysis. Results are expressed as unstandardized coefficient (B) and 95% confidence interval for B [95% CI(B)]. Statistical significance occurred if a computed two-tailed probability value was < 0.05.

Results

Obesity study

The main anthropometric and analytical characteristics of the studied population are shown in Table 1. Our data showed that severely obese patients had significantly lower glycerol concentrations than nonseverely obese.

Relative mRNA expression in sc adipose tissue

Table 1 shows the relative expression levels of the different studied genes. Regarding AQP7, severely obese subjects showed significantly decreased expression levels when compared with lean and nonseverely obese. Given that the groups were mismatched for gender and taking into account that our group of severely obese subjects was composed mainly of women, an analysis was performed to verify whether the observed differences were due to BMI. A univariate general linear model was constructed considering only women and the results showed that AQP7 expression had significant lower levels with increasing BMI ($P = 0.001$). Therefore, we can conclude that AQP7 gene expression is reduced in severely obese women. Reduction in AQP7 expression in the adipose tissue in severely obese men was not confirmed because of the absence of an adequate number of subjects in this group.

Additionally, severely obese patients had significantly higher mRNA levels of MCP-1, IL-6, and TNF α and lower mRNA levels for SREBP1c. No significant differences were found in PPAR γ expression among the studied groups.

Type 2 diabetes study

The main anthropometric and analytical characteristics of the studied population are shown in Table 2. No significant differences were found in glycerol concentrations between the nondiabetic obese cohort and the obese type 2 diabetic subjects.

Relative mRNA expression in sc adipose tissue

AQP7 expression in adipose tissue was similar in nondiabetic and type 2 diabetes (Table 2). Obese patients with type 2 diabetes, showed significantly increased PPAR γ mRNA

expression levels and significantly reduced SREBP1c mRNA levels when compared with nondiabetic obese subjects.

Correlation and regression analysis results

For bivariate correlation analysis, all of the studied population was included ($n = 103$). We found that AQP7 mRNA expression levels were positively associated with age ($r = 0.197$; $P = 0.046$) and PPAR γ ($r = 0.265$; $P = 0.012$) and negatively associated with BMI ($r = -0.473$; $P < 0.001$), hsCRP ($r = -0.264$; $P = 0.019$) and MCP-1 ($r = -0.203$; $P = 0.044$) and TNF α ($r = -0.209$; $P = 0.036$) mRNA expression. The independence of the associations was evaluated by linear regression analysis, including sex and presence of type 2 diabetes as confounding variables. We found that AQP7 mRNA expression was positively associated with PPAR γ [B = 0.248, $P = 0.002$, and 95% CI(B) = 0.102/0.394 in women, and B = 0.321, $P = 0.004$, and 95% CI(B) = 0.114/0.529 in men] and negatively associated with TNF α mRNA in men [B = -0.329, $P = 0.005$, and 95% CI(B) = -0.549/-0.109].

Determination of G264V mutation of the AQP7 gene in human Caucasian subjects

From the 178 subjects analyzed for G264V mutation, 14 presented the studied mutation (8%). The distribution of the mutation in the obese and diabetic population did not show differences ($\chi^2 = 0.15$ and $P = 0.69$ between lean and obese subjects, and $\chi^2 = 2.34$ and $P = 0.12$ between nondiabetic and type 2 diabetic patients). Frequency distribution is shown in Table 3. Only one homozygous subject who had type 2 diabetes and was overweight (BMI = 28) was identified and had glycerol levels below the 10th percentile.

Discussion

The AQP7 gene was cloned from human white adipose tissue, and it operates as a water-glycerol channel. In humans, it is abundantly expressed in white adipose tissue, although expression has been found also in sperm, kidney, and skeletal muscle (6). Modulation of AQP7 expression has been suggested to play a role in the development of obesity in rodents (10–12). Only two previous works analyzed AQP7 expression in human obesity, describing lower levels in small cohorts (six and five subjects) of obese people (14, 17). Our results are in accordance with these preliminary findings, showing lower AQP7 expression levels in sc adipose tissue from severely obese nondiabetic women.

The metabolic outcome of adipose tissue may be different according to the anatomical origin; however, no differences

TABLE 3. Frequency of G264V mutation in AQP7 gene

	n	G264V
Lean		
Nondiabetes	37	2 (5.4%)
Type 2 diabetes	14	1 (7.1%)
Obese		
Nondiabetes	90	5 (5.5%)
Type 2 diabetes	37	6 ^a (16.2%)

The obese group includes obese and severely obese subjects.

^a One of the six subjects was homozygous for G264V mutation. The other mutations were identified in heterozygous form.

between omental and sc fat appear to exist regarding AQP7 expression (13). In the same study, sexual dimorphism with higher levels in women has been described, although only 10 men and four women were analyzed (13). We have not found gender differences in AQP7 expression in subjects without severe obesity (data not shown). However, we cannot assume this observation for severely obese subjects, because in our case, this group was mainly constituted by women.

The biological function of this gene as a glycerol channel has been studied in animal models deficient for AQP7 (10–11). Only in one model were lower glycerol plasma circulating levels detected (12), whereas others (11) did not find serum glycerol parameters altered; however, they found a reduction in glycerol permeability in 3T3-L1 knockdown adipocytes (10). In our study in humans, plasma glycerol levels were found to be significantly lower in severely obese women, and despite lower AQP7 mRNA expression in these subjects, no correlation was detected between gene expression and glycerol circulating levels. A possible explanation for this lack of correlation could be due to the existence of an alternative glycerol secretion in human adipocytes, as has been suggested by other authors (3, 5, 10).

Promoter studies on the AQP7 human gene have identified a putative insulin response motif that mediates insulin suppression of the human AQP7 gene as well as one putative regulatory element for PPAR γ (5), similar to what happened in the genomic structure of the mouse gene (18). In animal studies, it is well documented that AQP7-deficient mice or 3T3-L1 knockdown adipocytes exhibit an altered insulin state (11). In humans, we have shown that mRNA AQP7 expression in sc adipose tissue is not affected in obese type 2 diabetic patients when compared with their nondiabetic counterparts. Likewise, glycerol circulating levels were similar in both cohorts with independence of AQP7 expression, albeit it is known that plasma glycerol levels depend on several factors within the adipocytes, including the rate of lipolysis, cytoplasmic glycerol concentration, and plasma-membrane glycerol permeability. Although these results may argue against a direct implication of AQP7 on the insulin resistance state, additional experiments need to be done to determine whether there are any alterations at the posttranscriptional level altering glycerol permeability. In fact, AQP7 sc expression was negatively related to local proinflammatory expression genes in adipose tissue, such as MCP-1 and TNF α , which are associated with poor environmental insulin sensitivity. This observation is in agreement with *in vitro* studies with differentiated 3T3-L1 adipocytes where suppression of AQP7 expression was mediated by TNF α stimulation (8), a cytokine involved in the pathogenesis of insulin resistance. Concerning adipogenic factors, AQP7 expression levels were found to be positively determined by PPAR γ mRNA expression, reinforcing the implication of the peroxisome proliferator response element site as a transcriptional regulatory element.

Genotypic characterization of our Caucasian population on the AQP7 gene showed up to 8% of the subjects with the G264V mutation. Despite that this frequency was higher than the one reported by Kondo *et al.* (5) in the Japanese population, we failed to find an association with obesity or type 2 diabetes. However, a more adequately powered statistical

association analysis in Caucasian subjects should be performed before a definite conclusion in the genetic susceptibility to both comorbidities can be stated. We detected absence of R12C and V59L gene variants (data not shown). It is worth mentioning that 43% of the subjects that carried the G264V mutation were both obese and type 2 diabetic, in contrast to 0% in the Japanese population (5).

Additionally, we detected a homozygous subject for the G264V mutation, who had plasma glycerol levels within the normal values, in agreement with the one described by Kondo *et al.* (5), suggesting once more the hypothesis of an alternative glycerol channel in adipocytes.

Although our studied sample was insufficient for determining genetic associations, the observed frequencies are clearly different from those reported in the Japanese population. Other association studies have been published with a correct sample size, which report that an A–953G variant, which negatively modulates AQP7 expression, in the AQP7 promoter, is associated with higher risk of being obese or having type 2 diabetes in women (17). However, although their results are statistically significant, there are odds ratio values close to the null hypothesis when analyzing the confidence interval, which means that this will be not accomplished in all –953G subjects. However, we have not detected down-regulation of AQP7 in type 2 diabetic patients.

In conclusion, the present study shows that sc adipose tissue AQP7 expression in severely obese women is down-regulated and has lower plasma glycerol levels. Additional studies need to be done to confirm whether this statement is accomplished also in severely obese men. Additionally, we report that type 2 diabetes does not affect AQP7 expression. A clear relation between AQP7 and PPAR γ expression has been observed, and local proinflammatory gene expression shows a negative relationship with AQP7 expression in adipose tissue.

Further studies are needed on human AQP7 adipocyte physiology (glycerol secretion and its regulation) to clarify its role in glucose homeostasis, insulin resistance, and adipocyte biology.

Acknowledgments

We thank Silvia Quiroga for technical assistance.

Received March 8, 2007. Accepted June 6, 2007.

Address all correspondence and requests for reprints to: Joan Vendrell, Secció d'Endocrinologia, Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona, C/ Dr. Mallafre Guasch, 4, 43007 Tarragona, Spain. E-mail: jvo@com.es.

This study was supported by the following grants from the Instituto de Salud Carlos III: Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (REDIMET); RD06/0015/0011, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) 04-0377, FIS 05-1994, and FIS 07-1024. M.R.C. is supported by a fellowship from the FIS CP06/00119.

Disclosure Information: All authors have nothing to declare.

References

1. Fruhbeck G 2005 Obesity: aquaporin enters the picture. *Nature* 438:436–437
2. Hibuse T, Maeda N, Nagasawa A and Funahashi T 2006 Aquaporins and glycerol metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1758:1004–1011
3. Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M 2004 Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab* 30:294–309
4. Reshef I, Olszang Y, Cassuto H, Blum B, Croniger CM, Kalhan SC, Til-

- ghman SM, Hanson RW 2003 Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem* 278:30413–30416
5. Kondo H, Shimomura I, Kishida K, Kuriyama H, Makino Y, Nishizawa H, Matsuda M, Maeda N, Nagaretani H, Kihara S, Kurachi Y, Nakamura T, Funahashi T, Matsuzawa Y 2002 Human aquaporin adipose (AQPap) gene. Genomic structure, promoter analysis and functional mutation. *Eur J Biochem* 269:1814–1826
 6. Kishida K, Kuriyama H, Funahashi T, Shimomura I, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Nishizawa H, Matsuda M, Takahashi M, Hotta K, Nakamura T, Yamashita S, Tochino Y, Matsuzawa Y 2000 Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. *J Biol Chem* 275:20896–20902
 7. Kishida K, Shimomura I, Nishizawa H, Maeda N, Kuriyama H, Kondo H, Matsuda M, Nagaretani H, Ouchi N, Hotta K, Kihara S, Kadowaki T, Funahashi T, Matsuzawa Y 2001 Enhancement of the aquaporin adipose gene expression by a peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J Biol Chem* 276:48572–48579
 8. Fasshauer M, Klein J, Lossner U, Klier M, Kralisch S and Paschke R 2003 Suppression of aquaporin adipose gene expression by isoproterenol, TNF α , and dexamethasone. *Horm Metab Res* 35:222–227
 9. Walker CG, Holness MJ, Gibbons GF, Sugden MC 2007 Fasting-induced increases in aquaporin 7 and adipose triglyceride lipase mRNA expression in adipose tissue are attenuated by peroxisome proliferator-activated receptor α deficiency. *Int J Obes* 10.1038/sj.jco.0803555
 10. Maeda N, Funahashi T, Hibuse T, Nagasawa A, Kishida K, Kuriyama H, Nakamura T, Kihara S, Shimomura I, Matsuzawa Y 2004 Adaptation to fasting by glycerol transport through aquaporin 7 in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17801–17806
 11. Hara-Chikuma M, Sahara E, Rai T, Ikawa M, Okabe M, Sasaki S, Uchida S, Verkman AS 2005 Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7 deficient mice: adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation. *J Biol Chem* 280:15493–15496
 12. Hibuse T, Maeda N, Funahashi T, Yamamoto K, Nagasawa A, Mizunoya W, Kishida K, Inoue K, Kuriyama H, Nakamura T, Fushiki T, Kihara S, Shimomura I 2005 Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:10993–10998
 13. Sjöholm K, Palming J, Olofsson LE, Gummesson A, Svensson PA, Lystig TC, Jennische E, Brandberg J, Torgerson JS, Carlsson B, Carlsson LM 2005 A microarray search for genes predominantly expressed in human omental adipocytes: adipose tissue as a major production site of serum amyloid A. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2233–2239
 14. Marrades MP, Milagro FI, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ 2006 Differential expression of aquaporin 7 in adipose tissue of lean and obese high fat consumers. *Biochem Biophys Res Commun* 339:785–789
 15. World Health Organization 2000 Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation Geneva. WHO Tech Rep Ser 894. 1st ed. Geneva: World Health Organization, 2000
 16. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of the Diabetes Mellitus 1997 Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20:1183–1197
 17. Prudente S, Flex E, Morini E, Turchi F, Capponi D, De Cosmo S, Tassi V, Guida V, Avogaro A, Folli F, Maiani F, Fruttitta L, Dallapiccola B, Trischitta V 2007 A functional variant of the adipocyte glycerol channel aquaporin 7 gene is associated with obesity and related metabolic abnormalities. *Diabetes* 56: 1468–1474
 18. Kishida K, Shimomura I, Kondo H, Kuriyama H, Makino Y, Nishizawa H, Maeda N, Matsuda M, Ouchi N, Kihara S, Kurachi Y, Funahashi T, Matsuzawa Y 2001 Genomic structure and insulin-mediated repression of the aquaporin adipose (AQPap), adipose-specific glycerol channel. *J Biol Chem* 276:36251–36260

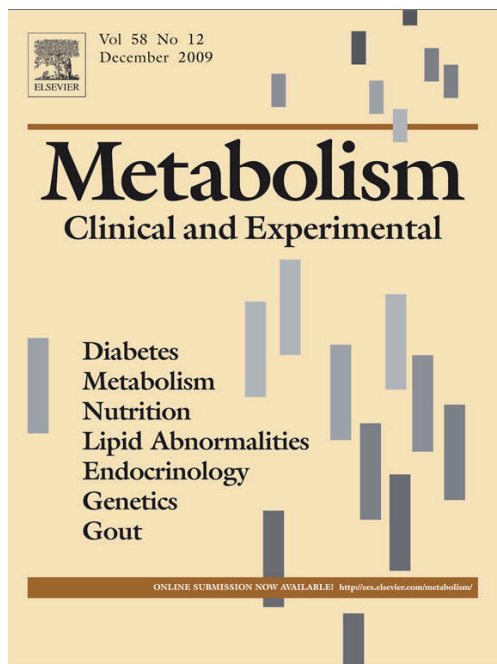
JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

ESTUDI 2

*Gene expression of paired abdominal adipose AQP7
and liver AQP9 in patients with morbid obesity:
relationship with glucose abnormalities*

Metabolism (2009); 58(12):1762-8

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

Available online at www.sciencedirect.com

Metabolism Clinical and Experimental 58 (2009) 1762–1768

Metabolism
 Clinical and Experimental
www.metabolismjournal.com

Gene expression of paired abdominal adipose *AQP7* and liver *AQP9* in patients with morbid obesity Relationship with glucose abnormalities

Merce Miranda^{a,b,*}, Victòria Ceperuelo-Mallafre^{c,a,b,1}, Albert Lecube^{b,c}, Cristina Hernandez^{b,c},
 Matilde R. Chacon^{a,b}, Jose M. Fort^d, Lluís Gallart^{a,b}, Juan A. Baena-Fustegueras^d,
 Rafael Simó^{b,c}, Joan Vendrell^{a,b,e}

^aUnitat de Recerca, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, IISPV, 43007 Tarragona, Spain^bCIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)^cDiabetes and Metabolism Research Group, Vall d'Hebron University Hospital, 08035 Barcelona, Spain^dEndocrinology Surgery Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebrón, Institut de Recerca Vall d'Hebrón, Universitat Autònoma de Barcelona, 08035 Barcelona, Spain^eUniversitat Rovira i Virgili, 43201 Tarragona, Spain

Received 17 April 2009; accepted 16 June 2009

Abstract

The trafficking of glycerol from adipose and hepatic tissue is mainly mediated by 2 aquaporin channel proteins: *AQP7* and *AQP9*, respectively. In rodents, both aquaporins were found to act in a coordinated manner. The aim was to study the relationship between adipose *AQP7* and hepatic *AQP9* messenger RNA expression and the presence of glucose abnormalities simultaneously in morbid obesity. Adipose tissue (subcutaneous [SAT] and visceral [VAT]) and liver biopsies from the same patient were obtained during bariatric surgery in 30 (21 male and 9 female) morbidly obese subjects. Real-time quantification of *AQP7* in SAT and VAT and hepatic *AQP9* gene expression were performed. A 75-g oral glucose tolerance test was performed in all subjects. The homeostasis model assessment of insulin resistance and lipidic profile were also determined. Visceral adipose tissue *AQP7* expression levels were significantly higher than SAT *AQP7* ($P = .009$). Subcutaneous adipose tissue *AQP7* positively correlated with both VAT *AQP7* and hepatic *AQP9* messenger RNA expression ($r = 0.44$, $P = .013$ and $r = 0.45$, $P = .012$, respectively). The correlation between SAT *AQP7* and liver *AQP9* was stronger in intolerant and type 2 diabetes mellitus subjects ($r = 0.602$, $P = .011$). We have found no differences in compartmental *AQP7* adipose tissue distribution or *AQP9* hepatic gene expression according to glucose tolerance classification. The present study provides, for the first time, evidence of coordinated regulation between adipose aquaporins, with a greater expression found in visceral fat, and between subcutaneous adipose *AQP7* and hepatic *AQP9* gene expression within the context of human morbid obesity.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Adipose tissue has a major role as an energy storage organ where many metabolic changes occur in response to the whole-body energy balance. Under lipogenic conditions, insulin increases glucose transport into the cell; and glucose is converted to glycerol-3-phosphate. Likewise, lipoprotein

lipase activated by insulin recruits fatty acids from circulation into the adipocytes; and both are esterified into triglyceride (TG). Conversely, under lipolytic conditions, catecholamines stimulate adrenergic receptors that translocate hormone-sensitive lipase, which is a key enzyme in hydrolyzing TG to free fatty acids (FFA) and glycerol. Free fatty acids and glycerol are used for thermogenesis and gluconeogenesis, respectively. In fasting states, gluconeogenesis from the liver is the main source of plasma glucose [1]; and about 22% of total glucose production comes from glycerol in humans [2], the adipose tissue being the main source of plasma glycerol. Trafficking of glycerol from

* Corresponding author.

E-mail address: mmiranda.hj23.ics@gencat.cat (M. Miranda).¹ These authors contributed equally to this work.

adipose and hepatic tissue is mainly mediated by 2 aquaporin channel proteins: *AQP7* and *AQP9*, respectively. *AQP7* is the sole described channel that permits the exit of glycerol from adipocytes, and plasma glycerol is introduced into the hepatocytes by the *AQP9* [1,3]. Both aquaporins act in a coordinated manner. In animal studies, feeding state reduces the messenger RNA (mRNA) expression of the adipose *AQP7* and results in a reduction of glycerol release from adipocytes [4]. Feeding also reduces liver *AQP9* mRNA expression and glycerol-induced gluconeogenesis [1]. However, obese and insulin-resistant *db/db* mice show increased *AQP7* and *AQP9* mRNA levels (in mesenteric fat and liver, respectively), despite hyperinsulinemia [1]. Increased glycerol release from adipocytes in parallel with increased gluconeogenesis induced by the high glycerol levels in portal vein results in hyperglycemia through the pathologic induction of liver *AQP9* [1].

Adult *AQP7*-knockout animals develop obesity by increasing hypertrophic adipocytes in epididymal white adipose tissue with higher intracellular glycerol content compared with wild-type mice [5]. Moreover, *AQP7*-knockout mice develop severe insulin resistance associated with obesity. These observations have led us to propose *AQP7* as a new factor influencing not only glycerol but also glucose metabolism.

Studies on *AQP7* in human obesity are scarce and have shown differences according to the source of the adipose tissue. In this regard, lower *AQP7* mRNA levels have been described in subcutaneous adipose tissue (SAT) samples from subjects with severe obesity than those obtained in lean subjects [6–8]. By contrast, higher *AQP7* mRNA expression has been found in visceral adipose tissue (VAT) from massively obese subjects [9]. *AQP7* mRNA levels in type 2 diabetes mellitus (T2D) subjects were similar to those in nondiabetic controls in both adipose depots [6,9]. With regard to *AQP9* gene expression in the liver, it appears to be down-regulated by insulin, potentially via an “insulin-responsive element” in the *AQP9* promoter. In this sense, there is only 1 study showing a down-regulation of this gene in liver biopsies obtained from obese T2D patients [9].

The close regulatory mechanism depicted by these 2 aquaporins and their role in glycerol and glucose metabolism would suggest a need to increase our knowledge of its behavior in human obesity. To shed light on this issue, we have studied paired *AQP7* mRNA expression in adipose (SAT and VAT) tissue and *AQP9* mRNA hepatic expression in biopsies from a cohort of morbidly obese patients. In addition, the relationship between *AQP7* and *AQP9* mRNA expression and the presence of glucose abnormalities were also investigated.

2. Methods and materials

We recruited 30 consecutive morbidly obese subjects of Caucasian origin who underwent gastric bypass surgery at

the University Hospital Vall d'Hebron (Barcelona, Spain). All patients met the eligibility criteria established by the guidelines of the National Institutes of Health Consensus Conference [10]. The preoperative evaluations included assessment by an endocrinologist, a psychiatrist, and a pneumonologist to identify and treat all comorbid medical conditions before operation. None of the subjects presented evidence of metabolic disease other than obesity, diabetes, and dyslipidemia. No T2D patients were receiving glitazone treatment. All hypolipidemic and oral hypoglycemic agents were stopped at least 72 hours before the surgical procedure.

Before the surgical procedure, a 75-g oral glucose tolerance test was performed on those patients in whom diabetes was not previously diagnosed; and patients were classified according to American Diabetes Association criteria [11].

The ethics committee approved the study, and informed consent was obtained from all enrolled patients.

2.1. Anthropometric measurements

Height was measured to the nearest 0.5 cm and body weight to the nearest 0.1 kg. Body mass index was calculated as weight (kilograms) divided by height (meters) squared. Waist circumference was measured midway between the lowest rib margin and the iliac crest.

2.2. Histologic studies of liver

Hematoxylin-eosin and trichrome stains of all liver biopsies were reviewed by a pathologist without knowledge of the clinical data and were then classified according to the criteria of Brunt [12]. The following parameters were graded in the biopsies: (a) steatosis, 0 to 3; (b) hepatocyte ballooning, 0 to 3; (c) lobular inflammation, 0 to 3; and (d) portal inflammation, with or without different fibrosis stages, 0 to 4.

2.3. Collection and processing of samples

All patients had fasted overnight, at least 12 hours before undergoing the surgical procedure. Two experienced surgeons in abdominal surgery performed all the laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass procedures. Blood samples were collected before the surgical procedure from the antecubital vein, 20 mL of blood with EDTA (1 mg/mL) and 10 mL of blood in silicone tubes. Fifteen milliliters of collected blood was used for the separation of plasma. Plasma and serum samples were stored at -80°C until analytical measurements were performed. Five milliliters of blood with EDTA was used for the determination of glycated hemoglobin (HbA_{1c}).

During the surgical procedure, adipose tissue samples from SAT and VAT were obtained, as well as a liver biopsy from the same patient included in the study. Adipose tissue samples were washed in phosphate-buffered saline $1\times$, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . The liver biopsies were collected in an RNA preservative solution (RNAlater; Sigma-Aldrich,

St Louis, MO). After RNA later solution was removed, the samples were immediately frozen in liquid nitrogen and were stored at -80°C .

2.4. Analytical methods

Glucose, cholesterol, and TG plasma levels were determined in a Hitachi 737 autoanalyzer (Boehringer Mannheim, Marburg, Germany) using the standard enzyme methods. High- and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol was quantified after precipitation with polyethylene glycol at room temperature (PEG-6000). Plasma insulin was determined by radioimmunoassay (Coat-A-Count Insulin; Diagnostic Products, Los Angeles, CA) in all subjects of the study, except in T2D patients treated with insulin. The HbA_{1c} was measured by chromatography microcolumn (IsoLab, Akron, OH). Plasma high-sensitivity C-reactive protein was determined by a highly sensitive immunonephelometry kit (Dade Behring, Marburg, Germany). Plasma glycerol levels were analyzed using a free glycerol determination kit, a quantitative enzymatic determination assay (Sigma-Aldrich). Intra- and interassay coefficients of variation were less than 6% and less than 9.1%, respectively. Nonesterified free fat acid (NEFA) serum levels were determined in an Advia 1200 autoanalyzer (Siemens, Munich, Germany) using an enzymatic method developed by Wako Chemicals (Neuss, Germany). Assay sensitivity was 0.01 mEq/L, and the inter- and intraassay coefficients of variation were lower than 8%.

The homeostasis model assessment of insulin resistance was calculated as $[\text{glucose (milligrams per deciliter)} \times \text{insulin (micro-international units per liter)}] / 405$ [13].

2.5. Gene expression relative quantification

Four hundred to 500 mg of frozen adipose tissue and 200 mg of frozen liver tissue were homogenized with an Ultra-Turrax 8 (Ika, Staufen, Germany). Total RNA was extracted using an RNeasy Lipid Tissue Midi Kit (QIAGEN Science, Hilden, Germany) for adipose tissues and an RNeasy Midi Kit (QIAGEN) for hepatic biopsies, duly following the manufacturer's instructions. Total RNA was treated with 55 U RNase-free DNase (QIAGEN) before column elution to avoid contamination with genomic DNA.

A total of 1.5 μg of RNA was reverse transcribed to complementary DNA (cDNA) using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) in a final volume of 20 μL .

Real-time quantitative polymerase chain reaction was performed with 1 μL of cDNA on a 7900HT Fast Real-Time PCR System using Taqman Assays (Applied Biosystems). Three replicate reactions per sample and gene were performed. SDS software 2.3 and RQ Manager 1.2 were used to analyze the results with the comparative C_t method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Data were expressed as an n-fold difference relative to the calibrator (a mix of 3 tissues). The C_t values for each sample were normalized with the

geometric mean of 2 endogenous controls: *PPIA* (cyclophilin A) and *ACTB* (β -actin).

2.5.1. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS/PC+ statistical package (version 15 for Windows; SPSS, Chicago, IL). For clinical and anthropometric variables, normally distributed data are expressed as mean value \pm SD; and for variables with no Gaussian distribution, values are expressed as median (75th percentile). For statistical analysis of expression variables that did not have a Gaussian distribution, values were logarithmically or inversely transformed.

Differences in clinical/laboratory parameters or expression variables between groups were compared by using analysis of variance with a post hoc Scheffe correction. Interactions among factors as well as the effects of covariates and covariate interactions with factors were assessed by general linear model univariate analysis. Associations between quantitative variables were evaluated by Pearson or Spearman (for non-Gaussian-distributed variables) correlation analysis. Correction for confounding and interacting variables was performed using a stepwise multiple linear regression analysis. Results are expressed as multiple correlation coefficient (R). Statistical significance occurred if a computed 2-tailed probability value was $< .050$.

3. Results

3.1. Aquaporin expression levels according to glucose tolerance status

Clinical and laboratory variables of the study participants are summarized in Table 1. The T2D obese patients were significantly older than normoglycemic (NG) subjects (50.14 ± 6.01 vs 41.08 ± 5.90 years, $P = .018$); and therefore, this was taken into account in the statistical analysis. Impaired glucose tolerance (IGT) and T2D subjects showed significantly increased fasting glucose levels compared with NG subjects. Low total and LDL cholesterol levels in the T2D patients were mainly due to the high percentage (43%) of preoperative statin treatments. Circulating serum glycerol and NEFA levels were not significantly different between the studied groups (Table 1).

We did not find any statistical difference in mRNA expression of *AQP7* in adipose tissue (SAT and VAT) or *AQP9* in the liver according to glucose tolerance classification, despite controlling for age (Table 1). Subjects with IGT or T2D showed a strong positive correlation between subcutaneous adipose *AQP7* and *AQP9* mRNA levels ($r = 0.602$, $P = .011$) (Fig. 1).

3.1.1. Aquaporin expression in the entire obese cohort

When the whole sample was considered ($n = 30$), *AQP7* expression levels were compared in both adipose depots and analyzed by sex using a univariate general linear model. The results showed that *AQP7* levels differed between adipose depots ($P = .009$, with a partial η^2 of 11.5%, which reports

Table 1
Clinical, anthropometric, and analytical characteristics (units) and relative mRNA levels (arbitrary units) according to glucose tolerance classification

	NG (n = 12)	IGT (n = 11)	T2D (n = 7)
Anthropometric and analytical characteristics			
Age (y)	41.1 ± 5.9	48.2 ± 8.5	50.1 ± 6.0*
Female/male (n)	4/8	2/9	3/4
BMI (kg/m ²)	43.3 ± 5.1	44.5 ± 5.6	43.2 ± 4.1
Waist circumference (cm)	124.3 (133.6)	125.0 (128.5)	126.3 (147.1)
Antihypertensive treatment (%)	33.3	45.4	71
Hypolipidemic agents (%)	–	27.2	42.8
Oral hypoglycemic agents (%)	–	18	71
Fasting glucose (mg/dL)	89.5 (97.3)	110.5 (118.3)*	113.0 (163.0) [†]
Insulin (μIU/mL)	15.8 ± 7.4	20.6 ± 11.5	11.0 ± 7.5
HOMA-IR	3.48 ± 1.55	5.41 ± 3.10	4.25 ± 2.53
HbA _{1c} (%)	5.25 ± 0.34	5.76 ± 0.44	7.72 ± 2.28 ^{†‡}
TG (mg/dL)	119.5 (200.3)	128.0 (155.8)	150.0 (178.0)
Cholesterol (mg/dL)	190.0 (212.0)	208.0 (243.3)	134.0 (153.0)* [†]
HDL cholesterol (mg/dL)	43.0 ± 12.8	49.5 ± 7.3	39.1 ± 7.1
LDL cholesterol (mg/dL)	117.0 ± 25.8	134.3 ± 43.7	69.5 ± 14.1* [§]
Glycerol (μmol/L)	131.0 ± 51.0	109.8 ± 25.2	120.5 ± 24.5
NEFA (mmol/L)	0.64 ± 0.18	0.63 ± 0.14	0.79 ± 0.27
hs-CRP (mg/L)	0.47 (0.84)	1.30 (1.88)*	1.05(1.27)
Relative mRNA levels (arbitrary units)			
<i>AQP7</i> SAT	1.02 ± 0.45	1.13 ± 0.27	0.83 ± 0.35
<i>AQP7</i> VAT	1.33 ± 0.75	1.36 ± 0.61	1.30 ± 0.51
<i>AQP9</i> liver	4.31 (7.75)	4.19 (5.67)	3.04 (11.15)

BMI indicates body mass index; HDL, high-density lipoprotein; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance.

Differences vs NG: * $P < .05$; [†] $P < .01$.

Differences vs IGT: [‡] $P < .05$; [§] $P < .01$.

the proportion of total variability attributable to depot origin) (Fig. 2) but not with sex. No differences attributable to sex were found for *AQP9* expression levels ($P = .158$).

The SAT and VAT *AQP7* adipose depots were positively correlated ($r = 0.449$, $P = .013$) (Fig. 3). No other clinical or analytical variables were found to be associated with *AQP7* adipose expression. Subcutaneous adipose tissue *AQP7* and

hepatic *AQP9* showed a positive correlation ($r = 0.459$, $P = .012$). Hepatic *AQP9* expression also showed a negative correlation with plasma TG levels ($r = -0.399$, $P = .036$).

To test the strength of these associations, we constructed a linear regression model for each aquaporin to analyze the

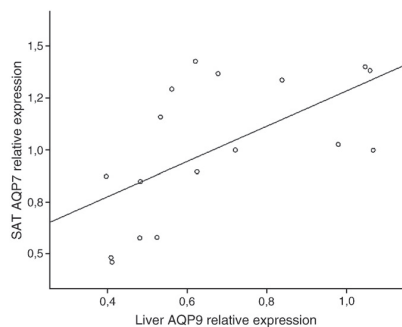


Fig. 1. Correlation between SAT *AQP7* and *AQP9* mRNA levels in IGT and T2D subjects (arbitrary units) ($r = 0.602$, $P = .011$).

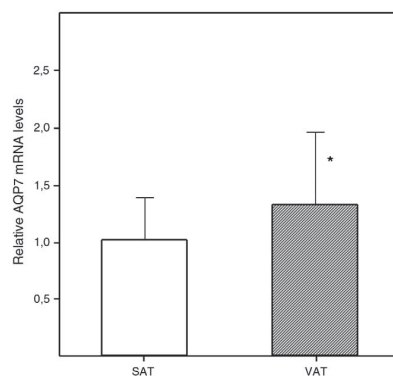


Fig. 2. Levels of expression of VAT *AQP7* relative to SAT *AQP7* (n = 30, mean ± SD; * $P = .009$).

1766

M. Miranda et al. / Metabolism Clinical and Experimental 58 (2009) 1762–1768

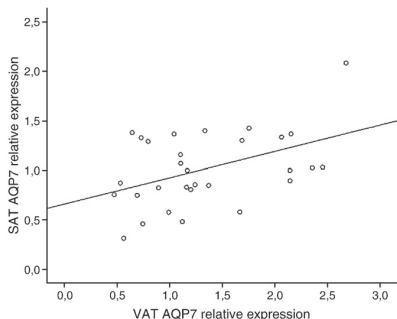


Fig. 3. Correlation between SAT and VAT *AQP7* mRNA levels (arbitrary units) ($r = 0.449$, $P = .013$).

main effects, as well as an interaction term for sex, age, and hypolipidemic or hypoglycemic treatment effects, for each aquaporin. Subcutaneous adipose tissue *AQP7* and VAT *AQP7* were positively related with SAT *AQP7* as dependent variable ($R = 0.508$, $P = .019$) and with VAT *AQP7* as dependent variable ($R = 0.627$, $P = .004$). Hepatic *AQP9* expression remained negatively associated with plasma TG concentration and with SAT *AQP7* expression ($R = 0.623$, $P = .008$ and $P = .010$, respectively).

We did not find any relationship between the hepatic mRNA levels of *AQP9* and the degree of hepatic steatosis or fibrosis.

4. Discussion

The present study provides, for the first time, evidence of a coordinated regulation between subcutaneous adipose *AQP7* and hepatic *AQP9* gene expression within the context of human morbid obesity. Moreover, SAT *AQP7* and hepatic *AQP9* mRNA levels are positively correlated. In addition, a negative association between liver *AQP9* mRNA expression and circulating TG levels is described independently of glucose metabolic status.

It has been suggested that adipose tissue has 2 functionally different preadipocytes. These 2 “pools” (VAT and SAT) of adipose tissue depots receive differential sympathetic innervations and have different enlargement rates with a characteristic release of hormones and metabolites specific for each tissue compartment [3]. Adipose tissue distribution depends on many factors, and sex is one of the main contributors for explaining body fat distribution. Thus, it is well known that estrogens increase the size and number of subcutaneous adipocytes and attenuate lipolysis [14]. In a previous report in which

AQP7 expression was analyzed in both SAT and VAT in a small cohort of morbidly obese subjects, sex dimorphism was suggested, showing increased expression levels in women [15]. However, in our study, we failed to find differences attributable to sex, in accordance with our previous observation in nonsevere obese subjects [6]. Likewise, visceral fat showed greater *AQP7* levels than SAT, confirming a previous observation in isolated visceral adipocytes in which *AQP7* was overexpressed in comparison with subcutaneous adipocytes [15]. Increased lipolytic activity of visceral adipocytes may be partly responsible for these differences. In comparison with subcutaneous fat, VAT is more sensitive to catecholamine-induced lipolysis and less sensitive to the antilipolytic effects of insulin. In fact, increased expression of lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase in visceral vs subcutaneous fat has been reported [16,17].

We have found no differences in compartmental *AQP7* adipose tissue gene expression according to glucose metabolic status. It may be worth considering that, in morbid obesity, the presence of insulin resistance does not influence the greatest expression of *AQP7* observed in VAT. In fact, this observation has been made for other lipolytic genes, like adipose triglyceride lipase, which catalyzes the initial step in TG hydrolysis and has a close regulation with insulin. This enzyme is not differentially expressed between visceral and subcutaneous fat, despite being related to insulin sensitivity independently of body fat mass and fat distribution [16].

Similar assumptions may be deduced from the analysis of hepatic *AQP9* expression in our morbidly obese cohort. Glucose tolerance distribution did not influence *AQP9* liver expression. However, the design of our study does not permit to discard an effect of insulin on human *AQP9* mRNA liver expression. In fact, most of our patients showed a notable degree of insulin resistance before surgery, which could contribute to explaining the absence of differences in *AQP9* gene expression observed after glucose tolerance classification. Furthermore, a close correlation between subcutaneous *AQP7* and hepatic *AQP9* expression was observed mainly in intolerant and T2D patients. *AQP7* and *AQP9* mRNA expression has been shown to be coordinately regulated by plasma concentrations of insulin in rodents, in accordance with nutritional condition, such as fasting and refeeding. These facts indicate the possible involvement of aquaglyceroporphins in pathophysiological glucose metabolism [1]. Our work supports these observations, showing a robust correlation between SAT *AQP7* and *AQP9* liver expression mainly in patients with an altered glucose metabolism. It remains to be determined whether *AQP7* and *AQP9* protein levels have similar profiles to mRNA because the present study was conducted only by examining mRNA levels.

Visceral adipose tissue has drainage over the portal venous system with a direct flow to the liver, and it is reasonable to assume that the main dependence for *AQP9*

expression comes from visceral fat. We have no satisfactory explanation for this preferential association between SAT and hepatic aquaglyceroporins; however, the strong relationship between SAT and VAT aquaporins (26% of SAT *AQP7* variability was explained by VAT *AQP7* levels) may be partly responsible for this association. We know that the transversal design of our study does not permit to infer mechanistic conclusions, and we are conscious that many other variables could be related with fat and hepatic aquaporin coordination. Therefore, one is tempted to speculate as to an alternative glycerol secretion channel in adipocytes, as has been suggested by many authors [18–20]. To date, 4 aquaglyceroporins have been described (*AQP3*, 7, 9, and 10), with glycerol transport ability, close to diffusion rates and with a low conductance to water. Although the expression of *AQP3* in mice liver [21] and *AQP9* in pig adipose tissue [22] has been described, to our knowledge, in humans no other aquaglyceroporin in adipose tissue and liver than *AQP7* and *AQP9* has been described. Moreover, we have not found *AQP10* expression in adipose tissue (data not shown).

Measurement of circulating glycerol levels underestimated the glycerol released into the portal vein by adipose tissue before its clearance by the liver [23]. This could help interpret the absence of correlation observed between aquaglyceroporin expression in both adipose and hepatic tissues, and circulating glycerol levels, although the negative association between plasma TG levels and *AQP9* expression reveals an indirect role of *AQP9* in glycerol metabolism, in agreement with the metabolic findings described in *AQP9*-knockout mice [24]. Besides, FFA release into circulation by adipocyte lipolysis is also undervalued because of the reesterification of the FFA in adipose tissue. Thus, in humans, the recycling in this tissue has been estimated to be as high as 40% [25]. Finally, it is important to note that we did not find any relationship between *AQP9* expression in the liver and the degree of hepatic steatosis or fibrosis. Therefore, it seems that *AQP9* expression is not essential in regulating fatty liver deposits. In agreement with these findings, Rojek et al [24] found no apparent histologic abnormalities in the liver between control mice and *AQP9*-knockout mice.

One limitation to our study is the fact that protein levels were not measured, which would show whether they are correlated with gene expression.

In summary, we have found that glucose tolerance status does not seem to influence adipose *AQP7* and hepatic *AQP9* expression in morbidly obese patients. However, a close relationship between SAT *AQP7* and hepatic *AQP9* was found mainly in subjects with glucose metabolic abnormalities. Adipose aquaglyceroporins appeared to be regulated coordinately with a greater expression found in visceral fat in our morbidly obese cohort. More mechanistic studies are needed to further explore the implication and response of *AQP7* and *AQP9* in physiologic and pathologic glucose homeostasis.

Acknowledgment

This work was supported by FIS 07/1024, FIS08/1195 awarded by the Spanish Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas is an ISCIII project. The authors gratefully acknowledge the invaluable collaboration of the Servei de Recursos Científics i Tècnics of Universitat Rovira i Virgili and Elsa Maymo for technical assistance. Dr Matilde R Chacon is supported by a fellowship awarded by the Fondo de Investigación Sanitaria CP06/00119.

References

- [1] Kuriyama H, Shimomura I, Kishida K, Kondo H, Furuyama N, Nishizawa H, et al. Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9. *Diabetes* 2002;51:2915–21.
- [2] Baba H, Zhang XJ, Wolfe RR. Glycerol gluconeogenesis in fasting humans. *Nutrition* 1995;11:149–53.
- [3] Wintour EM, Henry BA. Glycerol transport: an additional target for obesity therapy? *Trends Endocrinol Metab* 2006;17:77–8.
- [4] Kishida K, Kuriyama H, Funahashi T, Shimomura I, Kihara S, Ouchi N, et al. Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. *J Biol Chem* 2000;275:20896–902.
- [5] Hibuse T, Maeda N, Funahashi T, Yamamoto K, Nagasawa A, Mizunoya W, et al. Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:10993–8.
- [6] Ceperuelo-Mallafré V, Miranda M, Chacón MR, Vilarrasa N, Megia A, Gutiérrez C, et al. Adipose tissue expression of the glycerol channel aquaporin-7 gene is altered in severe obesity but not in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3640–5.
- [7] Marrades MP, Milagro FI, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. Differential expression of aquaporin 7 in adipose tissue of lean and obese high fat consumers. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339:785–9.
- [8] Prudente S, Flex E, Morini E, Turchi F, Capponi D, De Cosmo S, et al. A functional variant of the adipocyte glycerol channel aquaporin 7 gene is associated with obesity and related metabolic abnormalities. *Diabetes* 2007;56:1468–74.
- [9] Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Pastor C, Rotellar F, Silva C, Rodríguez A, et al. Influence of morbid obesity and insulin resistance on gene expression levels of *AQP7* in visceral adipose tissue and *AQP9* in liver. *Obes Surg* 2008;18:695–701.
- [10] Gastrointestinal surgery for severe obesity: National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. *Am J Clin Nutr* 1992;55:615S–9S.
- [11] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2007;30:S4–S41.
- [12] Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis definition and pathology. *Semin Liver Dis* 2001;21:3–16.
- [13] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment; insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–9.
- [14] Mattsson C, Olsson T. Estrogens and glucocorticoid hormones in adipose tissue metabolism. *Curr Med Chem* 2007;14:2918–24.
- [15] Sjöholm K, Palming J, Olofsson LE, Gummeson A, Svensson PA, Lystig TC, et al. A microarray search for genes predominantly expressed in human omental adipocytes: adipose tissue as a major production site of serum amyloid A. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2233–9.

Author's personal copy

1768

M. Miranda et al. / *Metabolism Clinical and Experimental* 58 (2009) 1762–1768

- [16] Berndt J, Kralisch S, Klötting N, Ruschke K, Kern M, Fasshauer M, et al. Adipose triglyceride lipase gene expression in human visceral obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008;116:203-10.
- [17] Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000;21:697-738.
- [18] Kondo H, Shimomura I, Kishida K, Kuriyama H, Makino Y, Nishizawa H, et al. Human aquaporin adipose (AQPap) gene. Genomic structure, promoter analysis and functional mutation. *Eur J Biochem* 2002;269:1814-26.
- [19] Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab* 2004;30:294-309.
- [20] Maeda N, Funahashi T, Hibuse T, Nagasawa A, Kishida K, Kuriyama H, et al. Adaptation to fasting by glycerol transport through aquaporin 7 in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:17801-6.
- [21] Patsouris D, Mandard S, Voshol PJ, Escher P, Tan NS, Havekes LM, et al. PPARalpha governs glycerol metabolism. *J Clin Invest* 2004;114:94-103.
- [22] Li X, Lei T, Xia T, Chen X, Feng S, Chen H, et al. Molecular characterization, chromosomal and expression patterns of three aquaglyceroporins (AQP3, 7, 9) from pig. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008;149:468-76.
- [23] Coppack SW, Chinkes DL, Miles JM, Patterson BW, Klein S. A multicompartamental model of in vivo adipose tissue glycerol kinetics and capillary permeability in lean and obese humans. *Diabetes* 2005;54:1934-41.
- [24] Rojek AM, Skowronski MT, Füchtbauer EM, Füchtbauer AC, Fenton RA, Agre P, et al. Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:3609-14.
- [25] Reshef L, Olswang Y, Cassuto H, Blum B, Croniger CM, Kalhan SC, et al. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem* 2003;278:30413-6.

ESTUDI 3

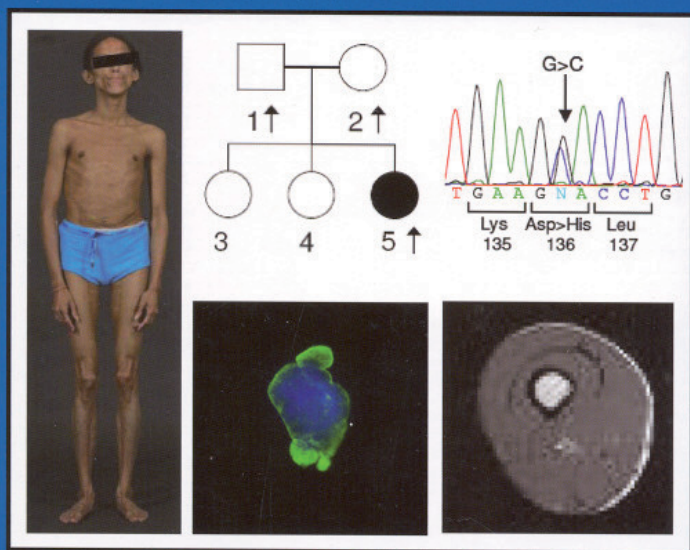
Circulating and adipose tissue gene expression of zinc-alpha2-glycoprotein in obesity: its relationship with adipokine and lipolytic gene markers in subcutaneous and visceral fat

J Clin Endocrinol Metab. (2009); 94(12):5062-9

JCEM™

THE JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM

Volume 94 • Number 12 • December 2009 • jcem.endojournals.org



Circulating and Adipose Tissue Gene Expression of Zinc- α 2-Glycoprotein in Obesity: Its Relationship with Adipokine and Lipolytic Gene Markers in Subcutaneous and Visceral Fat

V. Ceperuelo-Mallafre, * S. Naf, * X. Escote, * E. Caubet, J. M. Gomez, M. Miranda, M. R. Chacon, J. M. Gonzalez-Clemente, L. Gallart, C. Gutierrez, and J. Vendrell*

Endocrinology and Diabetes Unit (V.C.-M., S.N., X.E., M.M., M.R.C., L.G., C.G., J.V.), Research Department, University Hospital of Tarragona Joan XXIII, Pere Virgili Institute, 43007 Tarragona, Spain; Diabetes Surgery Service (E.C.), Hospital de Sta Tecla, 43003 Tarragona, Spain; Endocrinology and Diabetes Unit (J.M.G.), University Hospital of Bellvitge, 08907 Barcelona, Spain; and Diabetes Endocrinology and Nutrition Department (J.M.G.-C.), Hospital de Sabadell Institut Universitari Parc Tauli, Universitat Autònoma de Barcelona, 08208 Sabadell, Spain

Context: Zinc- α 2-glycoprotein (ZAG) is a soluble protein similar to the class I major histocompatibility complex heavy chain, which has been implicated in lipid catabolism. We hypothesized that ZAG mRNA expression in adipose tissue may be linked with lipolytic and adipokine gene expression and have a close relationship with clinical phenotype.

Objectives: The objective of the study was to analyze ZAG gene expression in human adipose tissue from lean and obese subjects. ZAG circulating plasma levels and its relationship with cardiometabolic risk factors were also studied.

Design: Seventy-three Caucasian (43 male and 30 female) subjects were included. Plasma and adipose tissue [sc (SAT) and visceral (VAT)] from the same patient were studied. mRNA of *PPAR- γ* , hormone-sensitive lipase (*HSL*), adipose triglyceride lipase, *adiponectin*, *omentin*, *visfatin*, and ZAG were quantified. Plasma concentrations of ZAG were determined with ELISA.

Results: ZAG plasma levels showed a negative correlation with insulin ($r = -0.39$; $P = 0.008$) and the homeostasis model assessment for insulin resistance index ($r = -0.36$; $P = 0.016$). No differences in ZAG circulating levels according to body mass index classification were observed.

ZAG expression in SAT was significantly reduced in overweight and obese individuals compared with lean subjects ($P < 0.001$ and $P = 0.007$, respectively). ZAG mRNA expression in both SAT and VAT depots were negatively correlated with many clinical and metabolic cardiovascular risk factors. After multiple linear regression analysis, SAT ZAG was mainly predicted by *adiponectin* mRNA expression ($B = 0.993$; $P < 0.0001$) and plasma triglyceride levels ($B = -0.565$; $P = 0.006$). VAT ZAG expression was predicted by *adiponectin* expression ($B = 0.449$; $P < 0.0001$), and *HSL* VAT expression ($B = 0.180$; $P = 0.023$).

Conclusions: The present study provides evidence of a role of ZAG gene in adipose tissue metabolism, with a close association with *adiponectin* gene expression in sc and visceral fat. (*J Clin Endocrinol Metab* 94: 5062–5069, 2009)

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in U.S.A.

Copyright © 2009 by The Endocrine Society
doi: 10.1210/jc.2009-0764 Received April 7, 2009. Accepted September 16, 2009.
First Published Online October 21, 2009

* V.C.-M., S.N., X.E., and J.V. contributed equally to this work.

For editorial see page 4668

Abbreviations: ATGL, Adipose triglyceride lipase; BMI, body mass index; C1, cycle threshold; CV, coefficient of variation; HDL, high-density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; HSL, hormone-sensitive lipase; LMF, lipid-mobilizing factor; MetS, metabolic syndrome; NEFA, nonesterified free fat acid; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; RNase, ribonuclease; SAT, sc adipose tissue; VAT, visceral adipose tissue; ZAG, zinc- α 2-glycoprotein.

Adipose tissue is the source of a wide variety of molecules involved in the regulation of energy balance, body weight, appetite, and carbohydrate metabolism. Some of these proteins have an autocrine function on adipose tissue homeostasis and in turn, they are secreted into the peripheral circulation with a systemic effect on metabolic events.

Zinc- α 2-glycoprotein (ZAG) was originally described as a soluble protein closely related to class 1 family antigens of the major histocompatibility complex (1). ZAG was initially isolated from human plasma but is widely distributed in many body fluids such as saliva, milk, urine, sweat, *etc.* (2). The biological functions of ZAG are heterogeneous, with data suggesting potential roles in the progression of prostate, breast and bladder cancer, dementia, cell cycle inhibition, and melanin synthesis. Likewise, actions involving cell adhesion, immunoregulation and ribonuclease (RNase) activity have been described (3). Because of the similarities of ZAG with lipid-mobilizing factor (LMF), interest is focused on this protein as a possible contributor to the lipolysis observed in cachectic patients suffering from malignant tumors (4–6). Lipolysis is a process catalyzed by a cAMP-dependent protein kinase A, and both LMF and ZAG are associated with an activation of the adenylate cyclase in adipocyte plasma membranes (6).

ZAG may directly stimulate lipolysis through interaction with a β 3-adrenoreceptor, suggesting a role in lipid catabolism (7). Administration of recombinant human ZAG in mice causes a decrease in body weight entirely attributed to body fat loss, suggesting that ZAG would be coupled with an increase in energy expenditure (7). It is expressed and secreted by mature human adipocytes and has actions mediated by the TNF- α and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ (8). All of the above has led ZAG to be considered as a new adipokine with potential beneficial effects in obesity.

A recent study in a ZAG-deficient mouse model demonstrated increased body weight in comparison with wild-type mice during treatment with a lipid-rich diet. This effect was correlated with a decreased production of glycerol from epididymal-isolated adipocytes indicating reduced lipolytic activity (9).

Despite much evidence from animal and *in vivo* studies on humans, there are no clear data about the clinical relevance of ZAG in human obesity and related metabolic abnormalities. A recent report failed to find this circulating protein as a discriminator between healthy subjects and patients with metabolic syndrome (10). In contrast, expression levels of ZAG in human sc adipose tissue have been found to be down-regulated in a small cohort of obese men compared with lean subjects (11). All of the

above evidence has led us to hypothesize that ZAG mRNA expression in adipose tissue may have a close relationship with adipocyte expression of other adipokine and lipolytic genes and that this may be influenced by the adipose tissue location and clinical phenotype. To test this hypothesis, we analyzed ZAG mRNA expression levels simultaneously in sc (SAT) and visceral adipose tissue (VAT) in a cohort of lean and obese subjects. Its relationship with some lipolytic genes and ZAG circulating plasma levels was also explored.

Subjects and Methods

Processing and selection of study samples

Adipose tissue, serum, and plasma samples were selected from an adipose tissue biobank collection. Subjects were recruited by the endocrinology and surgery departments at the University Hospital Joan XXIII (Tarragona, Spain) to contribute to the biobank. Appropriate institutional review board approval and adequate biobank informed consent were obtained from all participants. Biobanking samples included total adipose tissue from sc and visceral origin, serum, plasma, and DNA. All patients had fasted overnight, at least 12 h before surgical procedure. Blood samples were collected before the surgical procedure from the antecubital vein. Plasma and serum samples were stored at -80°C until analytic measurements were performed. VAT and SAT samples from the same individual were obtained during the surgical procedure. Adipose tissue samples were collected, washed in PBS one time, immediately frozen in liquid N_2 , and stored at -80°C .

Samples were selected according to stratification by age, gender, and body mass index (BMI). A cohort of 73 subjects matched for age and gender with a BMI range of 19.82–38.54 kg/m^2 , was selected for the study. All subjects were of Caucasian origin and reported that their body weight had been stable for at least 3 months before the study. All subjects were scheduled for an elective surgical procedure (cholecystectomy or surgery for abdominal hernia), and they had no metabolic diseases other than obesity. They had been free of any infections in the month preceding the study. Exclusion criteria were presence of liver or renal diseases, malignancy, inflammatory chronic disease, and pharmacological treatments that may alter lipidic profile. The hospital's ethics committee approved the study.

Anthropometric measurements

Height was measured to the nearest 0.5 cm and body weight to the nearest 0.1 kg. BMI was calculated as weight (kilograms) divided by height (meters) squared. Waist circumference was measured midway between the lowest rib margin and the iliac crest.

The metabolic syndrome (MetS) was defined according to the U.S. National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines (12).

Analytical methods

Levels of glucose, cholesterol, and triglyceride in plasma were determined in an ADVIA 1200 (Siemens AG, Munich, Germany) autoanalyzer using the standard enzyme methods. High-density

lipoprotein (HDL) cholesterol was quantified after precipitation with polyethylene glycol at room temperature (PEG-6000). Plasma insulin was determined by RIA (Coat-A-Count insulin; Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA). Sensitivity was 2.6 mU/ml, and intra- and interassay coefficients of variation (CVs) were less than 5%. Plasma glycerol levels were analyzed by the use of a free glycerol determination kit in a quantitative enzymatic determination assay (FG01000; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) according to the manufacturer's instructions. Intra- and interassay CVs were less than 6% and less than 9.1%, respectively. Nonesterified free fat acid (NEFA) serum levels were determined in an Advia 1200 autoanalyzer (Siemens) using an enzymatic method developed by Wako Chemicals (Neuss, Germany). Assay sensitivity was 0.01 mEq/liter and the inter- and interassay CVs were lower than 8%. Plasma adiponectin levels were measured using a standardized RIA kit from Linco Research (St. Charles, MO). The kit has a sensitivity of 1 ng/ml in 100 μ l sample size and range of 1–200 ng/ml. All samples were diluted 1:500. The intra- and interassay CVs were 8 and 12%, respectively. Serum leptin levels were determined by a human ELISA kit (AssayMax human leptin ELISA kit; Assaypro, St. Charles, MO), the intra- and interassay CVs were 4 and 7.7%, respectively. The kit has a sensitivity of less than 150 pg/ml.

Soluble TNF receptor 2 was determined by solid-phase enzyme immunoassay with amplified reactivity (BioSource Europe S.A., Nivelles, Belgium). The limit of detection was 0.1 ng/ml and the intra- and interassay CVs were less than 7% and less than 9%, respectively. Circulating IL-6 (serum IL-6) was determined by an ultrasensitive solid-phase enzyme immunoassay (BioSource). The sensitivity of the assay was 0.039 pg/ml. Intra- and interassay CVs were less than 9.8% and less than 11.2%, respectively.

Plasma ZAG levels were measured by sandwich ELISA (BioVendor Laboratory Medicine, Inc., Palackeho, Czech Republic).

The assay sensitivity was 0.673 ng/ml. The intra- and interassay CVs were less than 5 and 6.6%, respectively.

Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was determined according to the following equation: fasting plasma glucose (millimoles per liter) \times fasting plasma insulin (microinternational units per milliliter)/22.5 (13).

Gene expression relative quantification

We analyzed relative mRNA expression levels in SAT and VAT of PPAR γ , hormone-sensitive lipase (HSL), adipose triglyceride lipase (ATGL), adiponectin, omentin, visfatin, and ZAG.

Frozen adipose tissue (400–500 mg) was homogenized with an Ultra-Turrax 8 (Ika, Staufen, Germany). Total RNA was extracted by using RNeasy lipid tissue midi kit (QIAGEN Science, Hilden, Germany), and total RNA was treated with 55 U RNase-free deoxyribonuclease (QIAGEN) following the manufacturer's instructions.

Total RNA (250 ng) was reverse transcribed to cDNA by using a high-capacity cDNA reverse transcription kit with RNase inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, CA) in a final volume of 20 μ l. One hundred ten nanograms of cDNA were used for quantitative real-time PCR with duplicates. Cycle threshold (Ct) value for each sample was normalized with the expression of PPIA (cyclophilin A). Real-time quantitative PCR was performed on 7900HT fast real-time PCR system using commercial Taqman assays (Applied Biosystems) (see supplemental file, published as supplemental data on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>). SDS software 2.3 and RQ Manager 1.2 (Applied Biosystems) were used to analyze the results with the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): all data were expressed as an n-fold difference relative to the calibrator (a mixture of the SAT and VAT tissues was used as calibrator sample).

TABLE 1. Anthropometric and analytical characteristics according BMI classification

	Lean (n = 19)	Overweight (n = 36)	Obese (n = 18)
Age (yr)	51.68 \pm 15.96	58.94 \pm 14.25	59.22 \pm 12.45
Females/males (n)	6/13	16/20	8/10
BMI (kg/m ²)	23.11 \pm 1.59	27.39 \pm 1.26 ^a	32.55 \pm 2.42 ^a
Waist (cm)	83.76 \pm 7.90	94.64 \pm 10.77 ^a	107.59 \pm 11.64 ^{a,b}
Waist to hip ratio (cm)	0.90 \pm 0.06	0.94 \pm 0.11	0.93 \pm 0.11
SBP (mm Hg)	121.47 \pm 11.77	133.20 \pm 17.48	142.92 \pm 15.14 ^c
DBP (mm Hg)	68.47 \pm 9.90	73.32 \pm 9.69	80.00 \pm 13.48 ^c
Fasting glucose (mmol/liter)	5.06 \pm 0.57	6.16 \pm 1.91 ^c	5.97 \pm 1.18
Insulin (μ U/ml)	4.51 \pm 3.44	6.73 \pm 4.71 ^c	8.56 \pm 6.02 ^d
HOMA-IR	1.11 \pm 0.84	1.81 \pm 1.36	2.36 \pm 1.63 ^d
Triglycerides (mmol/liter)	0.95 (1.57)	1.22 (1.48)	1.03 (1.62)
Cholesterol (mmol/liter)	5.19 \pm 1.18	4.92 \pm 1.05	5.03 \pm 0.88
HDL cholesterol (mmol/liter)	1.46 \pm 0.51	1.31 \pm 0.37	1.36 \pm 0.27
NEFA (mM)	0.99 \pm 0.71	0.79 \pm 0.30	0.83 \pm 0.30
Glycerol (μ M)	146.74 (238.17)	156.05 (206.56)	128.93 (307.43)
sIL-6 (pg/ml)	1.33 (2.05)	1.35 (2.65)	2.66 (5.25) ^e
sTNFR2 (ng/ml)	4.39 (5.67)	3.94 (4.72)	3.83 (4.66)
Leptin (ng/ml)	1.02 (4.12)	9.9 (18.09)	27.59 (58.98) ^f
ZAG (mg/liter)	61.41 \pm 10.91	57.41 \pm 11.02	57.26 \pm 12.41

Value data are presented as mean \pm SD or median (75th percentile) for nonnormally distributed variables. All nonparametric values were log transformed for the statistical analysis. SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; sIL-6, serum IL-6; sTNFR2, soluble TNF receptor 2.

^a $P < 0.001$ compared to lean subjects; ^b $P < 0.001$ compared to overweight subjects; ^c $P < 0.05$ compared to lean subjects; ^d $P = 0.01$ compared to lean subjects; ^e $P = 0.004$ compared to overweight subjects.

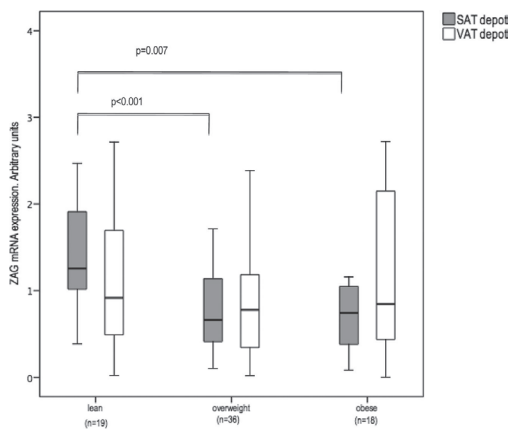


FIG. 1. ZAG mRNA in SAT depot was significantly increased in lean than overweight ($P < 0.001$) and obese ($P = 0.007$) subjects. Differences in VAT were not significant.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by using the SPSS/PC+ statistical package (version 16; SPSS, Chicago, IL). For clinical and anthropometrical variables, normal distributed data are expressed as mean values (\pm SD), and for variables with a non-Gaussian distribution, values are expressed as median (75th percentile). For statistical analysis of expression variables that did not have a Gaussian distribution, values were logarithmically transformed or analyzed by nonparametrical tests. Comparisons between groups were performed by one-way ANOVA with a *post hoc* Bonferroni correction or by a Kruskal-Wallis nonparametric test when appropriate. *Post hoc* calculation showed that the selected sample size had a 96% power for detecting a significant difference ($P < 0.05$) between ZAG mRNA expression levels according to BMI distribution.

Associations between quantitative variables were evaluated by Pearson correlation analysis or Spearman correlation for non-normally distributed variables. The independence of the associations was evaluated by linear regression analysis. Statistical significance occurred if a computed two-tailed $P < 0.05$.

Results

Circulating plasma levels of ZAG

Subjects were classified as lean, overweight, and obese by their BMI according to World Health Organization criteria (BMI < 25 kg/m² for lean; ≥ 25 to < 30 kg/m² for overweight, and ≥ 30 to < 40 kg/m² for obese) (14). Clinical and laboratory data of the study participants are summarized in Table 1. The obese subjects had higher mean (systolic and diastolic) blood pressure and mean

HOMA-IR index with a more proinflammatory profile evidenced by significantly higher levels of IL-6 compared with lean subjects. No differences in ZAG circulating levels were observed according to the obesity group classification or when the overweight and obese groups were gathered as a single group. ZAG plasma levels were similar in both genders (59.2 ± 13.68 mg/ml in women *vs.* 57.9 ± 9.53 mg/ml in men).

When the whole cohort was considered, ZAG plasma levels showed a negative correlation with insulin ($r = -0.39$; $P = 0.008$) and the HOMA-IR index ($r = -0.36$; $P = 0.016$).

No association between plasma circulating levels and sc or visceral mRNA ZAG expression levels was detected.

ZAG gene expression profile in adipose tissue

Results of ZAG expression in SAT and VAT depots

In the entire group, there were no differences in ZAG gene expression according to the origin of the adipose tissue depot. When SAT and VAT depots were analyzed gathering the cohorts according to World Health Organization classification, lean subjects showed a significantly higher ZAG expression in SAT than in VAT (1.67 ± 1.21 *vs.* 1.14 ± 0.87 ; $P = 0.017$, respectively). No gender dimorphism was detected for ZAG expression.

Results for ZAG expression according to obesity classification

ZAG expression in SAT was significantly reduced in overweight and obese individuals compared with lean subjects ($P < 0.001$ and $P = 0.007$, respectively) (Fig. 1). No differences were observed in VAT depot.

Correlations and multiple regression analysis for ZAG expression

The correlation analyses between ZAG mRNA expression with clinical and analytical variables, in both SAT and VAT, are shown in Table 2.

ZAG expression in SAT showed a strong positive correlation with sc PPAR γ ($r = 0.611$; $P = 0.0001$), ATGL ($r = 0.680$; $P = 0.001$), HSL ($r = 0.589$; $P = 0.0001$), and *adiponectin* gene expression ($r = 0.676$; $P = 0.0001$).

ZAG expression in VAT was highly correlated with visceral PPAR γ ($r = 0.770$; $P < 0.0001$), ATGL ($r =$

TABLE 2. Bivariate correlations between ZAG expression levels and clinical or analytical variables in the whole cohort

	SAT ZAG		VAT ZAG	
	R	P value	R	P value
Weight	-0.376	0.001	-0.335	0.004
BMI	-0.366	0.001	-0.054	0.652
Waist	-0.448	<0.001	-0.388	0.001
Waist to hip ratio	-0.370	0.003	-0.523	<0.0001
SBP	-0.401	0.003	-0.200	0.155
DBP	-0.259	0.063	-0.118	0.406
Triglycerides	-0.506	<0.001	-0.320	0.008
HDL cholesterol	0.289	0.016	0.022	0.857
NEFA	-0.017	-0.897	0.286	0.027
HOMA-IR	-0.457	0.001	-0.356	0.001
Adiponectin	0.404	0.001	0.337	0.007

R, Correlation coefficient; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure.

0.747; $P < 0.0001$), *adiponectin* ($r = 0.792$; $P < 0.0001$), and to a lesser extent with *omentin* ($r = 0.260$; $P = 0.027$).

Likewise, SAT and VAT depots of ZAG mRNA were highly correlated between them ($r = 0.488$; $P < 0.001$).

To strengthen the independence of these associations as predictors of ZAG expression, a multiple regression analysis model was constructed for each depot including the above-mentioned bivariate correlations, adjusting for age and gender. In the SAT model, BMI, plasma triglycerides, HDL cholesterol, adiponectin circulating levels, HOMA-IR index, systolic blood pressure, waist to hip ratio, and mRNA expression of sc marker genes for lipolysis (*ATGL* and *HSL*), *adiponectin*, and *PPAR γ* were selected as independent variables. The result showed that the model had a multiple correlation coefficient (R) of 0.811 and that SAT ZAG was mainly predicted by *adiponectin*

mRNA expression ($B = 0.993$; $P < 0.0001$) and triglyceride plasma levels ($B = -0.565$; $P = 0.006$) (Table 3).

In the VAT model, weight, waist to hip ratio, plasma triglycerides, free fatty acids, adiponectin circulating levels, HOMA-IR index, and visceral marker genes for lipolysis (*ATGL* and *HSL*), adipokines (*adiponectin* and *omentin*), and *PPAR γ* were included as independent variables. The result showed that the model had an $R = 0.899$ and that VAT ZAG was predicted by *adiponectin* expression ($B = 0.449$; $P < 0.0001$), and VAT *HSL* ($B = 0.180$; $P = 0.023$) (Table 4).

ZAG expression and plasma levels according to MetS classification

We examined the relationship between plasma ZAG levels and ZAG adipose tissue gene expression, depending on the presence of MetS in our study population. There

TABLE 3. Multiple regression analysis of ZAG mRNA expression with dependent variable of SAT ZAG mRNA expression

Variable	B coefficient	95% CI	P value
BMI	-0.156		0.248
Waist to hip ratio	-0.141		0.267
SBP	-0.165		0.212
Triglycerides	-0.565	-0.957 to 0.174	0.006
HDL cholesterol	0.072		0.546
Adiponectin (plasma)	0.205		0.081
HOMA-IR	-0.097		0.433
<i>Adiponectin</i> mRNA	0.993	0.678–1.308	<0.0001
<i>ATGL</i> mRNA	-0.170		0.936
<i>HSL</i> mRNA	0.245		0.186
<i>PPARγ</i> mRNA	0.274		0.136

R for the model: 0.811. Values in **bold** are computed two-tailed probability value less than 0.05. CI, Coefficient interval; SBP, systolic blood pressure.

TABLE 4. Multiple regression analysis of ZAG mRNA expression with dependent variable of VAT ZAG mRNA expression

Variable	B coefficient	95% CI	P value
Weight	-0.071		0.389
Waist to hip ratio	-0.148		0.109
Triglycerides	-0.078		0.384
FFAs	-0.033		0.716
Adiponectin (plasma)	0.057		0.540
HOMA-IR	0.003		0.974
<i>Adiponectin</i> mRNA	0.449	0.040 to 0.757	<0.0001
<i>ATGL</i> mRNA	0.035		0.814
<i>HSL</i> mRNA	0.180	0.027 to 0.332	0.023
<i>Omentin</i> mRNA	0.113		0.183
<i>PPARγ</i> mRNA	-0.066		0.661

R for the model: 0.899. Values in **bold** are computed two-tailed probability value less than 0.05. CI, Coefficient interval; FFA, free fatty acid.

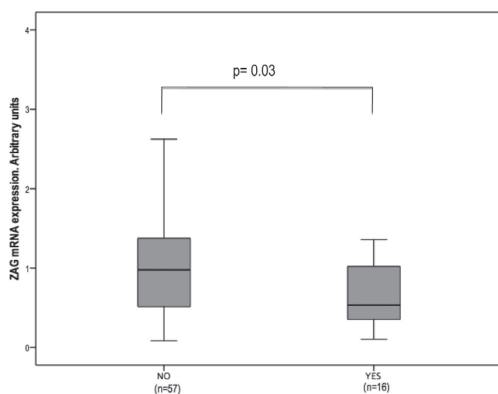
TABLE 5. Clinical and analytical variables according MetS classification

	Non-MetS (n = 57)	MetS (n = 16)	P value
Age (yr)	56.15 ± 14.91	63.38 ± 12.50	0.080
Gender (women, %)	38.50	56.20	0.254
BMI (kg/m ²)	26.76 ± 3.59	29.82 ± 3.58	0.006
Waist circumference (cm)	92.55 ± 13.39	102.80 ± 11.43	0.007
DBP (mm Hg)	71.22 ± 9.78	81.25 ± 13.87	0.035
SBP (mm Hg)	128.57 ± 15.56	145.83 ± 16.07	0.004
Triglycerides (mmol/liter) ^a	1.01 (1.46)	1.48 (2.07)	0.036
Glucose (mmol/liter)	5.29 ± 0.73	7.82 ± 3.71	0.016
Leptin (ng/ml)	7.48 (21.92)	27.79 (68.46)	0.050
ZAG (mg/liter)	58.75 ± 11.65	57.05 ± 11.24	0.845

Value data are presented as mean ± SD or median (75th percentile) for nonnormally distributed variables. Values in **bold** are computed two-tailed probability value less than 0.05. DBP, Diastolic blood pressure; SBP, systolic blood pressure.

^a Log transformed before analysis.

were 16 subjects who met the MetS criteria (Table 5). Circulating ZAG levels did not discriminate between subjects with or without MetS (58.75 ± 11.65 vs. 57.05 ± 11.24 mg/liter, respectively); however, ZAG expression levels in SAT were significantly lower in subjects classified as having MetS (Fig. 2). Likewise, ZAG expression levels were higher in SAT vs. VAT only in subjects without MetS ($P = 0.028$). No differences in the remaining genes studied were observed between MetS groups.

**FIG. 2.** ZAG mRNA in SAT depot was down-regulated in patients with MetS criteria ($P = 0.03$).

Discussion

In this study we have shown that high ZAG mRNA expression levels, both in SAT and VAT depots, are closely associated with a better clinical and metabolic profile related to cardiovascular risk factors. ZAG expression was strongly determined by *adiponectin* adipose tissue gene expression independent of lipolytic or adipokine gene markers. Furthermore, plasma levels of ZAG were negatively associated with the HOMA-IR and no relationship with ZAG adipose tissue expression was found.

Animal studies demonstrated a beneficial effect of ZAG protein administration on reducing body weight by decreasing fat content in mice, even though they maintained normal eating habits (7). Taking this lipolytic activity into consideration, studies have been performed exploring ZAG circulating levels as a marker of metabolic syndrome or obesity in humans. The preliminary data in Caucasian subjects do not support this hypothesis, and no relationship with insulin resistance index was found (10). Our findings are in accordance with these results, and no relationship with the main determinants of MetS were found for ZAG circulating levels. Only a negative association with the HOMA-IR index was found in the whole cohort, and no relationship with adipose tissue ZAG expression was observed. The multiple sources and different regulatory mechanisms that lead to plasma circulating ZAG protein would question the usefulness of circulating levels of this protein as a reflection of its lipolytic activity and the supposed beneficial effects on obesity and MetS markers,

as suggested by experimental data. Nevertheless, this does not discard a possible pharmacological effect of ZAG protein in obesity by modulating adipose tissue metabolism either directly or through downstream mechanisms.

In our population, we observed a down-regulation of ZAG gene expression with increasing body weight, with a significant inverse correlation both in SAT and VAT depots in both genders. Despite the association being present in both adipose tissue depots, differences in mRNA expression were observed only in SAT from overweight and obese subjects (Fig. 1). To date, very few data exist analyzing ZAG expression in human adipose tissue, with just one previous work performed in 18 male subjects indicating a down-regulation of this adipokine in obese patients (11).

In this sense, our findings would agree with this observation; however, it is worth mentioning that differences in ZAG expression levels between lean and obese people may be secondary to many other factors intervening in adipose tissue metabolism, such as adipokine and lipolytic genes. Thus, previous reports in animal models of type 2 diabetes suggested a role of ZAG as a modulator of adipocyte endocrine signaling at a local site. Likewise, a parallelism between ZAG and *adiponectin* mRNA levels in the 3T3-L1-mouse adipocytic cell line has been described (15). The positive association observed between ZAG expression and *adiponectin* mRNA in both SAT and VAT depots in conjunction with the above-mentioned experimental studies led us to speculate about the existence of a regulatory mechanism between both adipokines acting in a coordinated manner, with potential implications in obesity and type 2 diabetes. In our studied cohort, *adiponectin* gene expression was revealed as the most important determinant of ZAG expression. This is in accordance with experimental studies performed in a human adipocytic cell line Simpson-Golabi-Behmel syndrome in which treatment with rosiglitazone (a selective PPAR γ agonist) induced a marked increase in ZAG mRNA level, paralleling its effect on *adiponectin* mRNA (8). The strong positive correlation observed between ZAG and PPAR γ gene expression in our studied cohort adds new evidence in favor of this regulatory mechanism *in vivo*.

The biological activity of ZAG may be similar to that of the LMF protein. Much biochemical evidence suggests that both proteins induce lipolysis through interaction with a β 3-adrenoreceptor, despite the fact that no specific receptor for ZAG protein has yet been characterized (16). Previous studies demonstrated the antiobesity effects of β 3-adrenoreceptor stimulation, not only by promoting thermogenesis and/or lipolysis but also impairing adipogenesis in white adipose tissue (17). In turn, some authors suggested that ZAG gene expression might be mediated through the β 3-adrenoreceptor present in the ZAG gene (18). This activity is achieved by the induction of intracellular cAMP, which in turn may also be activated by many other lipolytic adipocytic genes. The mobilization of stored triglycerides from adipose tissue is mediated mainly by the activation of two genes: *HSL* and *ATGL* (19). Both acyl hydrolases are highly correlated as we confirmed in our cohort (data not shown), and a reduced expression has been associated with insulin resistance in obese subjects (20). In turn, the lipolytic function of *HSL* and *ATGL* genes is also impaired in obesity by affecting the actions of cAMP on adrenergic receptor signaling, G protein-coupled activation of adenylyl cyclase, or cAMP levels (21, 22). In this sense, the positive correlations ob-

erved between ZAG expression and both lipases support a possible common regulatory transcriptional mechanism.

ZAG adipose tissue expression in humans has been also associated with some circulating adipokines (positively with adiponectin and negatively with leptin). Likewise, a negative relationship with waist circumference was described, proposing this gene as a new target for MetS treatment (11). In our study we confirmed some such associations, including many other components of MetS, such as blood pressure, serum triglycerides, HDL cholesterol, and HOMA-IR index. Thus, subjects that fulfilled the MetS criteria showed a significantly lower expression of ZAG in SAT depot than non-MetS subjects. Likewise, a clear decrease in ZAG expression levels was observed when increasing the number of components of MetS (data not shown).

One of the main limitations of our study is its cross-sectional design, which does not permit to infer pathophysiological mechanisms with the observed results. In this sense, the finding of a down-regulation of ZAG in adipose tissue may be a consequence of the metabolic events that take place in patients with MetS, rather than a causative process. However, our findings are in agreement with previous experimental data in animal models and are in accordance with the described actions of the ZAG protein on lipid metabolism, adding new evidence of its participation in obesity-related disorders.

In conclusion, we have found evidence that supports a role of ZAG gene in adipose tissue metabolism, with a down-regulation of its expression in obese and MetS patients. The close relationship with *adiponectin* gene expression and some well-known lipolytic genes in human adipose tissue reinforce previous experimental data and warrant further mechanistic studies as a useful target in obesity and related disorders.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Joan Vendrell, Endocrinology and Nutrition Unit, University Hospital of Tarragona, Joan XXIII, Rovira i Virgili University, IISPV, C/ Dr. Mallafre Guasch, 4, 43007 Tarragona, Spain. E-mail: jvo@comt.es.

This work was supported by Grants FIS 07/1024, FIS 08/1195, and FIS 08/0733. Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III (CB07/08/0012) (to V.C.-M., X.E., J.M.G., M.M., M.R.C., L.G., and J.V.). M.R.C. is supported by a fellowship (CP06/00119) from the Fondo de Investigación Sanitaria. X.E. is supported by a fellowship from the Juan de la Cierva program and Grant JDCI20071020.

Disclosure Summary: All authors have nothing to declare.

References

- Bürgi W, Schmid K 1961 Preparation and properties of Zn- α 2-glycoprotein of normal human plasma. *J Biol Chem* 236:1066–1074
- Tada T, Ohkubo I, Niwa M, Sasaki M, Tateyama H, Eimoto T 1991 Immunohistochemical localization of Zn- α 2-glycoprotein in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 39:1221–1226
- Hassan MI, Waheed A, Yadav S, Singh TP, Ahmad F 2008 Zinc α 2-glycoprotein: a multidisciplinary protein. *Mol Cancer Res* 6:892–906
- Todorov PT, McDevitt TM, Meyer DJ, Ueyama H, Ohkubo I, Tisdale MJ 1998 Purification and characterisation of a tumor lipid-mobilising factor. *Cancer Res* 58:2353–2358
- Russell ST, Zimmerman TP, Domin BA, Tisdale MJ 2004 Induction of lipolysis *in vitro* and loss of body fat *in vivo* by zinc- α 2-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1636:59–68
- Bing C, Bao Y, Jenkins J, Sanders P, Manieri M, Cinti S, Tisdale MJ, Trayhurn P 2004 Zinc- α 2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2500–2505
- Hirai K, Husey HJ, Barber MD, Price SA, Tisdale MJ 1998 Biological evaluation of a lipid mobilizing factor isolated from the urine of cancer patients. *Cancer Res* 58:2359–2365
- Bao Y, Bing C, Hunter L, Jenkins JR, Wabitsch M, Trayhurn P 2005 Zinc- α 2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed and secreted by human (SGBS) adipocytes. *FEBS Lett* 579:41–47
- Rolli V, Radosavljevic M, Astier V, Maquin C, Castan-Laurell I, Visentin V, Guigné C, Carpené C, Valet P, Gillfillan S, Bahram S 2007 Lipolysis is altered in MHC class I zinc- α 2-glycoprotein deficient mice. *FEBS Lett* 581:394–400
- Stejskal D, Karpíšek M, Reutová H, Stejskal P, Kotolová H, Kollár P 2008 Determination of serum zinc- α 2-glycoprotein in patients with metabolic syndrome by a new ELISA. *Clin Biochem* 41:313–316
- Marrades MP, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ 2008 ZAG, a lipid mobilizing adipokine, is downregulated in human obesity. *J Physiol Biochem* 64:61–66
- 2001 Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285:2486–2497
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC 1985 Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412–419
- World Health Organization 2000 Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation Geneva. WHO Technical Report Series 894. 1st ed. Geneva: World Health Organization
- Gohda T, Makita Y, Shike T, Tanimoto M, Funabiki K, Horikoshi S, Tomino Y 2003 Identification of epistatic interaction involved in obesity using the KK/Ta mouse as a type 2 diabetes model: is Zn- α 2-glycoprotein-1 a candidate gene for obesity? *Diabetes* 52: 2175–2181
- Russell ST, Hirai K, Tisdale MJ 2002 Role of β 3-adrenergic receptors in the action of a tumour lipid mobilizing factor. *Br J Cancer* 86:424–428
- Margareto J, Larrarte E, Marti A, Martinez JA 2001 Up-regulation of a thermogenesis-related gene (UCP1) and down-regulation of PPAR γ and α 2 genes in adipose tissue: possible features of the antiobesity effects of a β 3-adrenergic agonist. *Biochem Pharmacol* 61:1471–1478
- López-Boado VS, Dier-Jrta I, Tolivia J, López-Otin C 1994 Glucocorticoids and androgens up-regulate the Zn- α 2-glycoprotein messenger RNA in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 29:247–258
- Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R 2004 Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306:1383–1386
- Jocken JW, Langin D, Smit E, Saris WH, Valle C, Hul GB, Holm C, Arner P, Blaak EE 2007 Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2292–2299
- Large V, Reynisdottir S, Langin D, Fredby K, Klannemark M, Holm C, Arner P 1999 Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects. *J Lipid Res* 40:2059–2066
- Martin LF, Klim CM, Vannucci SJ, Dixon LB, Landis JR, LaNoue KF 1990 Alterations in adipocyte adenylate cyclase activity in morbidly obese and formerly morbidly obese humans. *Surgery* 108: 228–234; discussion 234–235

Discussió

L'estudi del teixit adipós i, en particular, de la seva unitat funcional principal, l'adipòcit, és fonamental per la comprensió de les alteracions metabòliques associades amb el desenvolupament de l'obesitat i les seves comorbiditats com la resistència a la insulina (RI) i la diabetis *mellitus* tipus 2 (DM2).

Les funcions del teixit adipós es poden classificar en tres aspectes. En primer lloc està relacionat amb el metabolisme de lípids, incloent l'emmagatzematge de triglicèrids (TG). En segon lloc, catabolitza els TG per la sortida de glicerol i àcids grassos (AG) que participen en el metabolisme de la glucosa en el fetge i altres teixits. Per últim, els adipòcits sintetitzen i secreten proteïnes (adipoquines), incloent les hormones, citocines i altres proteïnes amb funcions biològiques específiques. Durant el procés de l'obesitat, el teixit adipós es torna "disfuncional", apareixen fenòmens d'hipertròfia de l'adipòcit, produint-se un desequilibri entre lipogènesi i lipòlisi. Aquest fet, sovint, porta associat un deteriorament de la regulació transcripcional dels principals factors que controlen l'adipogènesi, amb una manca de sensibilitat a determinades senyals externes, així com un fracàs en el procés de transducció de senyals. Per tant, els adipòcits "disfuncionals" contribueixen a la utilització anòmala dels AG, que causen lipotoxicitat en teixits no adiposos com el fetge, el pàncrees, el cor, entre d'altres.

Per entendre el metabolisme de l'adipòcit és necessari tenir una visió global del procés de desenvolupament de nous adipòcits, regulació

de l'adipogènesi, lipogènesi i lipòlisi; de la funció endocrina dels adipòcits i de les conseqüències metabòliques de la funcionalitat alterada [112].

Així doncs, per tal de millorar el coneixement dels processos que intervenen en el metabolisme del teixit adipós s'ha proposat analitzar diverses proteïnes que participen en el mecanisme de la lipòlisi. En la present tesi es recullen tres estudis, dos centrats en el paper de les aquaporines (AQPs) i un tercer dirigit a l'estudi de l'adipoquina glicoproteïna Zinc- α 2 (ZAG). Per tal d'observar els canvis que poden estar lligats a l'aparició d'obesitat i diabetis, s'inclouen pacients afectes d'ambdues patologies en tots els estudis.

AQP7 en el teixit adipós de pacients amb obesitat i DM2

En el primer treball l'objectiu és aprofundir en les implicacions que té el canal de glicerol aquaporina 7 (AQP7) en l'obesitat i en la DM2 en humans.

La majoria d'estudis, *in vivo* i *in vitro*, sobre el canal de glicerol de l'adipòcit s'han realitzat en ratolins, en els quals es suggereix que la modulació de l'expressió d'AQP7 pot jugar un paper en el desenvolupament de l'obesitat i de la RI. En les cèl·lules grasses, la glucosa és el substrat per la síntesi de dipòsits de greix en forma de TG, els quals poden ser mobilitzats com a glicerol i AG lliures. Si el gen d'AQP7 és suprimit, els adipòcits de ratolins mostren una acumulació de glicerol, el qual resulta en un increment de síntesi de TG, com a conseqüència d'un augment de l'activitat glicerol quinasa (GK), i un augment de la mida de la cèl·lula. A més a més, en ratolins, la falta d'AQP7 en els adipòcits afecta a les concentracions de diversos metabòlits i hormones en la sang, disminueixen els nivells de glicerol, d'adiponectina i augmenten els AG lliures, els nivells de leptina, de glucosa i d'insulina. Amb el temps, l'obesitat causada per la falta d'AQP7, porta a una alteració en la tolerància a la glucosa acompanyada d'una disminució dels efectes de la insulina en el teixit adipós, fetge i múscul, és a dir, a un estat de RI [57, 58]. Sota circumstàncies normals, la insulina reprimeix l'expressió del gen AQP7. En canvi, en condicions de RI, l'augment d'AQP7 porta a un augment de producció de glucosa en el fetge [46,47]. Així doncs, la per-

meabilitat de l'adipòcit al glicerol sembla un factor clau en la regulació de l'acumulació de greix [48, 57, 58].

Tot i aquests resultats, s'ha de tenir en compte la dificultat d'extrapol·lar els estudis de ratolins a humans, i que probablement no tot el que passa en humans pot ser explicat en models animals, per tant, es fan necessaris els estudis en humans per conèixer millor la veritable implicació d'aquest canal de glicerol en l'obesitat i la diabetis.

Pel que fa a l'estudi de l'obesitat, en humans només hi ha dos treballs anteriors a aquest, en poblacions molt petites (6 i 5 subjectes), en els quals es descriuen nivells baixos d'expressió d'AQP7 en obesitat severa [60,61]. El nostre estudi, realitzat en una població força més àmplia, confirma l'existència d'una reducció significativa dels nivells d'AQP7 en el teixit adipós subcutani (SAT) de pacients amb obesitat severa, si més no en dones, les quals endemés de tenir els nivells d'ARNm d'AQP7 inhibits, tenen els nivells de glicerol plasmàtic disminuïts. Malgrat tenir aquest comportament paral·lel, l'expressió gènica i els nivells de glicerol circulants no es correlacionen.

Respecte a l'anàlisi de teixit procedent de pacients amb DM2, no es mostren diferències quant als nivells d'expressió d'AQP7. Els nivells de glicerol circulants són similars entre els pacients amb DM2 i els subjectes sans. Com és d'esperar, els nivells circulants en aquesta població tampoc resulten associats a l'expressió del gen de l'AQP7 en el teixit adipós. Si bé aquestes dades no donen suport a una relació directe entre l'expressió d'aquest gen i la presència de DM2, no són elements suficients per descartar la participació d'aquesta AQP en la patogènesi de la RI. De fet, no s'ha d'oblidar que es tracta d'un estudi fonamentalment observacional, per la qual cosa es fa difícil inferir mecanismes patogènics, només amb les dades crues. D'altra banda, les dades d'associació inversa obtingudes entre el gen de l'AQP7 i gens clarament afavoridors de l'ambient inflamatori com són el gen de la proteïna quimiotàctica dels monòcits (*MCP-1*, de l'anglès *monocyte chemotactic protein-1*) i el factor de necrosi tumoral α (*TNF α*), fan que es pugui pensar en una relació potencial entre els mecanismes proinflamatoris, relacionats clarament amb la RI, i el gen canalitzador de glicerol a l'adipòcit. Aquests resultats concorden amb estudis *in vitro* amb adipòcits 3T3-L1 diferenciats, en què l'expressió d'AQP7 és suprimida per l'estimulació amb el *TNF α* ,

una citocina involucrada en la patogènesi de la RI [53]. No obstant això, la relació causal o casual cal definir-la en altres tipus d'estudis.

El fet d'observar diferències d'expressió d'*AQP7* amb l'obesitat i no trobar diferències amb la DM2, vincula els canvis a un efecte del grau d'obesitat més que no pas a la presència d'hiperglicèmia.

Pel que fa a la relació entre l'expressió d'*AQP7* al teixit adipós i els nivells circulants de glicerol al plasma, són aspectes del metabolisme lipídic que no sempre són fàcils de lligar. A diferència del que a priori semblava previsible, com ja s'ha mencionat, en cap dels dos estudis no s'observa una associació entre els nivells d'expressió gènica d'*AQP7* i els nivells detectats en sang perifèrica de glicerol. No obstant això, aquesta observació lliga força amb dades prèvies de la literatura en models murins deficitaris del canal *AQP7*. Així que, entre els diversos models *knockout* (KO) generats per diferents grups de recerca, només en un d'ells es van trobar els nivells de glicerol plasmàtics alterats. Els ratolins KO (eliminació del gen del genoma) tenien els nivells de glicerol disminuïts respecte els ratolins *wildtype* (WT), a més a més, els ratolins KO no s'adaptaven adequadament davant de situacions d'estimulació de lipòlisi. Així doncs, per exemple amb l'administració d'agonistes α -adrenèrgics o en situació de dejuni, en aquests ratolins no s'observava l'augment de glicerol plasmàtic que si tenien els ratolins WT, és a dir, el contingut de glicerol intracel·lular era més elevat i com a conseqüència d'aquest fet tenien un increment de l'activitat GK i per tant, una acumulació de TG en els adipòcits [48, 57]. En canvi, en l'altre model de ratolins deficitaris de la proteïna *AQP7* (interrupció del gen), els nivells circulants de glicerol eren estrictament normals, malgrat trobar, de la mateixa manera que en l'anterior model, alterada la permeabilitat al glicerol a nivell de l'adipòcit i una concentració més alta de glicerol dins l'adipòcit, suggerint que la permeabilitat de l'adipòcit al glicerol podria ser un nou regulador de l'acumulació de greix [58].

Una possible explicació, que ja ha estat suggerida per altres autors, als diferents resultats observats en aquests models de ratolins i a la falta de relació entre l'expressió gènica i els nivells de glicerol en el present estudi, és la hipotètica existència d'algun altre canal de glicerol en l'adipòcit. Això no obstant, no deixa de ser una especulació, doncs fins ara no ha estat demostrat de forma directa que pugui existir un nou canal o

mecanisme de difusió del glicerol fora de l'adipòcit diferent al ja descrit. Cal tenir en compte, a més a més, que el glicerol plasmàtic depèn de diversos factors, com són ara la taxa de lipòlisi, la concentració de glicerol dins de l'adipòcit i la permeabilitat de la membrana plasmàtica al glicerol [21, 47, 58]. Aquests fets poden modificar clarament els nivells circulants, justificant la manca de correlació entre la concentració plasmàtica circulant i l'expressió del seu principal canal de transport en l'adipòcit.

A més a més d'analitzar els nivells d'expressió d'AQP7 en el context de l'obesitat i la diabetis i estudiar la seva relació amb els nivells de glicerol, s'ha tingut en compte la informació genètica proporcionada per Kondo *et alii* [47], que descriu la seqüència del gen AQP7 humà, per tal de proporcionar quelcom més per ajudar a entendre la regulació fisiològica i el significat d'AQP7 en humans.

En l'estudi de Kondo *et alii* (2002) es demostrà la presència en el promotor del gen d'un lloc positivament regulat pel receptor gamma activat per proliferadors de peroxisomes (PPAR α) i d'un lloc regulat negativament per la insulina [47]. Nosaltres trobem que l'expressió d'AQP7 depèn positivament dels nivells d'ARNm de PPAR α , un gen clau per l'adipogènesi. Així doncs, aquests resultats reforcen la implicació de l'element de resposta per PPAR α , situat en el promotor del gen humà, com a element regulador de la transcripció del gen AQP7.

Per altra banda, en l'estudi de Kondo *et alii*, l'anàlisi de la seqüència humana del gen complet va revelar l'existència de tres mutacions de canvi de sentit (R12C, V59L i G264V) i dues mutacions silencioses (A103A i G250G). Les anàlisis funcionals varen posar de manifest que oòcits de *Xenopus* amb la proteïna alterada per la mutació G264V tenien la permeabilitat a l'aigua i al glicerol alterada, suggerint que aquesta mutació podria afectar la funcionalitat de la proteïna. En aquesta població japonesa de 160 subjectes, la distribució de les mutacions de canvi de sentit va ser menor al 10% en els 3 casos (1/160 R12C, 13/160 V59L i 6/160 G264V) i no es va trobar cap tipus d'associació amb l'obesitat i la diabetis [47].

S'ha de tenir en compte el fet que aquests autors van estudiar una població asiàtica i les diferències genotípiques entre races és un fet reconegut [113]. Per aquest motiu, varem considerar interessant analitzar la freqüència d'aquestes mutacions en una població caucàsica. La pre-

valença de la mutació G264V entre la cohort estudiada en el nostre treball arriba al 8%, xifra superior a la descrita per la raça oriental (3,75%). Tampoc no es troba associació entre els nivells de glicerol circulants i la presència de la mutació i l'anàlisi de l'únic subjecte homozigot per la mutació identificat mostra que té els nivells de glicerol plasmàtics dins del rang normal (de la mateixa manera que mostrava Kondo *et alii*). Tot plegat fa pensar que la regulació del glicerol plasmàtic no està afectada per la mutació, el que suggereix algun mecanisme de regulació alternatiu, hores d'ara no identificat. Tot i que el nostre treball no s'ha dissenyat per fer un estudi poblacional relacionat amb la mutació, s'observa que el 43% dels pacients que presenten la mutació són obesos o tenen DM2, si bé, aquesta no mostra associació amb cap de les dues patologies. Òbviament, es necessiten estudis d'àmbit més ampli, amb prou potència estadística, per descartar de forma fiable una possible associació entre la mutació i aquestes malalties, fet que queda pendent per propers estudis.

L'any 2007 es va publicar un estudi d'associacions en el qual el polimorfisme de nucleòtid únic (SNP) A-953G en el promotor d'*AQP7*, que està demostrat que clarament modula negativament l'expressió del gen, estava associat amb un alt risc de patir obesitat o DM2 en dones caucàsiques. De totes maneres, aquest treball no ha estat confirmat fins ara en cap altra cohort [61].

Coordinació d'aquaporines i diferències d'expressió segons l'origen del teixit adipós

El glicerol juntament amb els AG lliures resulten substrats molt importants per a la generació de glucosa en moments de manca de subministrament d'hidrats, com per exemple acostuma a succeir durant el dejuni. De fet, fins un 22% del total de la glucosa produïda pel cos humà esdevé de la utilització del glicerol que majoritàriament prové del teixit adipós [70, 114]. Davant d'aquestes dades, queda clar que un adequat metabolisme del glicerol per part del teixit adipós és clau en el manteniment d'una correcta homeòstasi de la glucosa. Entre alguns dels elements importants d'aquest intricat mecanisme que envolta el metabolisme de

la glucosa s'hi troba la família de les AQPs, que vincula el glicerol del teixit adipós amb el del teixit hepàtic, en aquest últim es procedeix a la transformació final del glicerol a glucosa en forma de gluconeogènesi. De fet, en estudis previs amb ratolins, es coneix que l'AQP específica del teixit adipós (AQP7) actua de manera coordinada amb l'AQP específica del fetge (AQP9). El glicerol que surt de l'adipòcit a través d'AQP7 entra al fetge mitjançant AQP9, on es converteix en glicerol-3-fosfat i aquest és utilitzat per la gluconeogènesi. El dejuni indueix la lipòlisi en els adipòcits i la gluconeogènesi en el fetge, fets que s'acompanyen d'una disminució dels nivells plasmàtics d'insulina circulant. Aquesta situació metabòlica comporta un augment dels nivells d'ARNm d'AQP7 i d'AQP9 per tal d'adaptar-se i mantenir un estat d'equilibri que permeti continuar aportant els nivells adequats de glucosa al torrent circulatori, per ser utilitzada per les cèl·lules de l'organisme. Aquest fet ja ha estat provat en estudis animals, observant que quan es dona de menjar als ratolins, es redueix l'expressió d'AQP7 i d'AQP9 al teixit adipós i al fetge respectivament. En models murins que desenvolupen una clara RI (ratolins *db/db*), la manca d'acció de la insulina sobre el teixit adipós per frenar la producció de glicerol provoca un augment de l'expressió tant de l'AQP7 en teixit adipós com de l'AQP9 en teixit hepàtic, provocant un efecte clarament hipergluceçant a causa de l'increment de la gluconeogènesi hepàtica [70]. Ara bé, els models KO d'AQP7, a priori deficitaris en la producció de glicerol per part del teixit adipós, a llarg termini, també evolucionen cap estats d'obesitat amb una greu RI. La hipertrofia d'aquests adipòcits mancats del seu canal de transport de glicerol ocasiona un estat d'obesitat acompanyat d'alteracions en el metabolisme de la glucosa. Sembla que la supressió d'AQP7 causi danys en la senyalització de la insulina, de manera que la insulina no exerceix l'efecte antilipolític en els adipòcits ni l'efecte inhibidor en la gluconeogènesi [57]. Així doncs, la manca d'activitat dels canals de glicerol, per una banda, i l'expressió excessiva amb una producció elevada de substrat hepàtic per la gluconeogènesi fan que tots dos extrems acabin produint una greu alteració del metabolisme dels glúcids, probablement mediat per la RI.

Un altre aspecte a tenir en compte a l'hora d'interpretar les dades d'expressió gènica del teixit adipós és el lloc anatòmic d'on pro-

vé el teixit estudiat. Tal com ja s'ha comentat més extensament durant la introducció, les diferències embrionàries del teixit adipós subcutani (SAT) i del visceral (VAT) fan que tinguin un comportament força diferent quant a la seva funcionalitat durant l'edat adulta. Aquest fet, evidentment, es tradueix en diferències d'expressió gènica i proteica amb patrons secretors força diferents. De fet, el risc cardiovascular està molt més associat a un increment de la massa del VAT que no pas del SAT. És clau doncs, per entendre millor la dinàmica del teixit adipós, estudiar sempre que sigui possible els dos compartiments tissulars. En aquest sentit, el segon treball presentat engloba l'anàlisi del canal de glicerol en ambdós dipòsits tissulars (subcutani i visceral) i el seu comportament en relació a l'expressió del seu homòleg hepàtic, l'AQP9. Així mateix, es mostra la relació entre el metabolisme dels glúcids i les dues AQPs en el context de l'obesitat i la diabetis.

Una de les primeres troballes destacables d'aquest estudi és la gran correlació obtinguda entre l'expressió d'AQP7 en SAT i VAT. Es podria tractar d'una dada interessant, sobretot per les diferències d'expressió entre els dos teixits que ja es coneixien en treballs previs. Si bé els estudis d'AQP7 en l'obesitat humana són escassos, els primers descobriments fets en SAT apuntaven a uns nivells d'ARNm d'AQP7 més baixos en els obesos severos [60, 61]; al contrari, en el teixit d'origen visceral, els obesos mostraven una tendència a tenir nivells d'expressió d'AQP7 augmentats en comparació amb la població no obesa [62]. Aquest increment de l'AQP7 en el VAT s'intenta explicar com un efecte compensatori, per reduir el volum de l'adipòcit i la massa de greix en el context de l'obesitat. En el nostre treball, realitzat en una població força més àmplia de subjectes amb mostres de teixit aparellades del mateix individu, es confirmen aquestes diferències d'expressió relacionades amb la localització anatòmica del teixit adipós. Clarament, els nivells d'AQP7 són més elevats en VAT que en SAT en subjectes amb obesitat severa, confirmant resultats similars que havien estat descrits prèviament en adipòcits aïllats [59]. Més enllà de la hipòtesi del mecanisme compensatori com a justificació de les diferències d'expressió observades per l'AQP7 en funció de l'origen del teixit adipós estudiat, cal recordar que el teixit visceral manté una activitat lipolítica clarament superior a la que presenta el teixit subcutani. De fet, avui en dia se sap que en l'obesitat els adipòcits

del VAT són més sensibles a la lipòlisi estimulada per catecolamines a causa d'una major presència de receptors α -adrenèrgics en la membrana plasmàtica i a més a més, són menys sensibles als efectes antilipolítics de la insulina [27, 28, 29].

Aquestes diferències d'expressió entre teixits estaven també provades en treballs previs, en els quals es demostrà que l'expressió de gens que intervenen directament en la lipòlisi es trobava clarament augmentada en el VAT de subjectes obesos. Per exemple, en el cas de la lipasa sensible a hormones (HSL) s'observà el mateix que en l'AQP7, els obesos tenien disminuïts els nivells d'ARNm en SAT, correlacionat amb un baix efecte lipolític de catecolamines [115], mentre que en VAT els nivells estaven augmentats [116]. A més a més, en un estudi més recent, l'any 2008 Berndt *et al.* demostrà que els obesos tenien els nivells d'expressió d'HSL més alts en VAT que en SAT [117]. Tanmateix, no tots els estudis coincideixen en aquestes troballes [118-121], tractant-se probablement de l'establiment d'un equilibri entre lipogènesi i lipòlisi, més que d'un efecte únic sobre aquests gens.

La introducció de la variable "diabetis" durant l'estudi d'expressió gènica en aquesta població mostra resultats força interessants. Així doncs, les diferències que s'observen en l'expressió d'AQP7 entre dipòsits tissulars desapareixen quan es comparen els pacients amb DM2, coincidint amb el que ja apuntaven alguns treballs preliminars previs [62]. L'anàlisi detallada del metabolisme de la glucosa en els pacients obesos severs del nostre estudi ens permet fer la classificació en tres subgrups d'acord amb la classificació proposada per l'*American Diabetes Association* (ADA) [122]; un grup de pacients normoglicèmics, un d'intolerants a la glucosa i finalment un últim grup de pacients que compleixen els criteris de diabetis. L'expressió d'AQP7 en els dos dipòsits de teixit adipós analitzats no mostra diferències en cap dels tres subgrups distribuïts segons el metabolisme glucídic. Evidentment, l'estudi presentat aquí no s'ha dissenyat per trobar mecanismes que puguin explicar aquestes troballes. Malgrat això, essent conscients de les limitacions que tenim, pensem que l'alt grau de RI que envolta als pacients que presenten obesitat mòrbida, com els que estan inclosos en aquest estudi, podrien estar al darrera d'aquests resultats.

D'altra banda, es coneixen gens que tot i la seva estreta regulació a través de la insulina no mostren diferències quan són analitzats a nivell d'expressió entre els dos dipòsits de greix, encara que es mantenen fortament relacionats amb la sensibilitat a la insulina amb independència del greix corporal i de la seva distribució. Com per exemple és el cas del gen lipolític de la lipasa adiposa de triglicèrids (*ATGL*), que catalitza el pas inicial de la hidròlisi de TG i té una forta regulació amb la insulina. Així doncs, en un estudi previ, tot i que els nivells d'ARNm d'*ATGL* estaven significativament disminuïts en els subjectes obesos amb RI i que els nivells d'expressió d'*ATGL* en VAT es correlacionaven amb la concentració d'insulina, la producció de glucosa i amb els nivells d'ARNm d'*HSL*, l'expressió d'*ATGL* no diferia entre SAT i VAT [117]. Quelcom semblant podria estar passant amb el gen de l'*AQP7*. Nogensmenys, no s'ha d'oblidar que és justament en els subjectes amb intolerància a la glucosa i amb DM2 en aquells que es troba la correlació més forta entre l'expressió d'*AQP7* a nivell subcutani i la d'*AQP9* a nivell hepàtic, reforçant el paper modulador del subministrament de glicerol al teixit hepàtic per la seva conversió a glucosa en aquesta població.

De forma complementària, no s'han detectat diferències d'expressió d'*AQP7* dependents del gènere. Així doncs, sabem que la distribució del greix del teixit adipós depèn de molts factors, un d'ells el sexe. Es coneix que els estrògens augmenten la mida i el nombre d'adipòcits subcutanis i atenuen la lipòlisi [123]. En un treball previ, en el qual s'analitzà l'expressió d'*AQP7* en SAT i en VAT en una cohort petita de subjectes amb obesitat severa, es mostrà un increment dels nivells d'expressió en dones [59], fet que no s'ha observat en cap de les cohorts estudiades (primer i segon treball presentats). S'entén que per estar segurs que no existeix una diferència de gènere en l'expressió de les AQPs, caldria conèixer els nivells d'estrògens de les pacients i comprovar si hi ha alguna mena de relació entre ells. O millor encara, provar en estudis *in vitro* si els estrògens són capaços de modular l'expressió d'*AQP7*, tant a nivell gènic com a nivell proteic. Malauradament, ara per ara, no es disposa d'aquest tipus d'estudis i les dades generals que s'han obtingut no fan pensar que existeixi un dimorfisme sexual. Tanmateix, davant les dades contradictòries en la literatura, toca ser prudents i ampliar els estudis

per aclarir si el sexe pot modular d'alguna manera l'expressió del canal de glicerol al teixit adipós.

La relació entre el teixit adipós, sobretot el teixit visceral, i el teixit hepàtic va molt més enllà d'una relació merament de "veïns anatòmics". Tots dos òrgans tenen un important paper en el metabolisme dels glúcids i dels lípids amb estrets mecanismes de col·laboració metabòlica. Sobretot ara que se sap que el teixit adipós no és exclusivament un òrgan de magatzem d'energia sinó que també es comporta com un veritable òrgan endocrí. Cal cercar però, les vies de col·laboració amb altres sistemes. Per tant, l'estudi del gen homòleg a l'AQP7 en el fetge resulta molt interessant per entendre millor el comportament dels canals de glicerol en el context dels pacients amb obesitat i diabetis. Per aquest motiu, en el segon estudi presentat s'ha volgut analitzar l'expressió d'AQP9 en el teixit hepàtic dels obesos mòrbids, alhora que es disposa de dades sobre l'expressió en SAT i VAT d'AQP7 del mateix subjecte.

Els estudis previs sobre l'AQP9 són molt limitats i només hi ha un estudi en humans, en el qual es mostra una inhibició del gen en biòpsies de fetge de pacients obesos amb diabetis [62]. Malauradament no es disposa de biòpsies hepàtiques de subjectes primis, encara que tampoc és l'objectiu principal de l'estudi comprovar el comportament d'expressió tissular de l'AQP9 al fetge en subjectes no obesos, s'entén que pot suposar una limitació. No hi ha dubte que hagués estat una dada molt interessant en cas d'haver disposat d'aquests pacients, però hores d'ara, no es pot saber si els efectes de l'obesitat per si mateixa poden alterar els nivells d'aquest canal en teixit hepàtic. Les dades observades en els pacients estudiats, classificats segons el metabolisme de la glucosa, mostren un efecte nul sobre el grau d'expressió de l'AQP9 en els obesos mòrbids. Així doncs, de la mateixa manera que en l'AQP7, l'expressió d'AQP9 no està influenciada per la distribució dels pacients d'acord amb la tolerància a la glucosa. Així com en el cas de l'AQP7, no es pot deslligar un efecte de l'alt grau de RI de tota la cohort estudiada sobre els efectes d'expressió d'AQP9 hepàtic, fet que estigui emmascarant una distribució de la seva expressió veritablement afectada pel metabolisme glucídic. Caldria analitzar una cohort d'obesos mòrbids amb i sense RI per tal de comprovar si existeixen diferències en l'expressió d'aquest canal a nivell hepàtic. Aquest fet no ha estat possible en aquesta cohort, tan-

mateix, el grup hi està treballant per tal de tenir aquests tipus de dades, com a mínim en teixit adipós, pivotant sobre la RI en un mateix context de grans obesos. Tot i amb això, el present treball recolza la idea del paper de les aquagliceroporines en el metabolisme de la glucosa, mostrant una robusta correlació entre l'expressió d'AQP7 en SAT i AQP9 en fetge, principalment en pacients amb un metabolisme de la glucosa alterat. És un xic sorprenent que l'associació observada sigui amb el SAT i no amb el VAT, ja que aquest té un flux més directe amb el fetge a través de la vena porta. No obstant aquest fet, la forta relació entre SAT i VAT, el 26% dels nivells d'expressió d'AQP7 en SAT depenen dels nivells d'AQP7 en VAT, podria ajudar a explicar aquesta associació.

En aquest estudi, de la mateixa manera que en el primer, no es troba correlació entre els nivells plasmàtics de glicerol i l'AQP7, en ambdós teixits adiposos, ni tampoc amb l'AQP9 en el fetge. Una possible explicació, ja mencionada anteriorment, és la presència d'algun altre canal de glicerol. Malgrat aquesta suposició, ninguna de les altres aquagliceroporines ha estat descrita en teixit adipós ni en fetge humà, a més a més, nosaltres tampoc hem detectat expressió d'AQP10 en teixit adipós humà. També podria ajudar a entendre la falta d'associació el fet que la determinació dels nivells de glicerol circulants està subestimada per l'entrada de glicerol al fetge a través de la vena porta [124]. Tot i això, els nivells d'ARNm d'AQP9 es correlacionen negativament amb els nivells plasmàtics de TG, revelant un paper indirecte d'AQP9 en el metabolisme del glicerol, en consonància amb resultats descrits en ratolins. Els ratolins AQP9 KO tenien els nivells plasmàtics de glicerol i TG augmentats. Els ratolins obesos, doblament KO, AQP9^{-/-} Lepr^{db}/Lepr^{db} (Lepr^{db} és una mutació en el receptor de la leptina, amb absència de la seva funció, que comporta obesitat severa i DM2), tenien un important increment dels nivells de glicerol en plasma comparats amb els obesos controls Lepr^{db}/Lepr^{db} AQP9^{+/-}, els quals tenien nivells de glicerol més alts que els ratolins controls no obesos. A més a més, els nivells de glucosa en sang, mesurats després de 3 hores de dejuni, eren moderadament més baixos en els ratolins Lepr^{db}/Lepr^{db} AQP9^{-/-} que en els Lepr^{db}/Lepr^{db} AQP9^{+/-}, defensant la idea que els ratolins doblament KO tenen una deficiència per generar glucosa en resposta al dejuni, per culpa de la falta d'AQP9 com a lloc d'entrada de glicerol per a la gluconeogènesi

hepàtica. Tots aquests resultats donen suport a la idea que l'AQP9 és important pel metabolisme del glicerol hepàtic i suggereixen un possible paper d'AQP9 en la DM [65].

Glicoproteïna Zinc-□ 2, una nova adipoquina amb funcions lipolítiques

Entre els mecanismes reguladors del metabolisme energètic es troben múltiples proteïnes produïdes pel propi teixit adipós (veure introducció) de les quals poc a poc es va coneixent millor el paper que juguen en aquest equilibri homeostàtic. Des de l'aparició de la leptina [125], han estat moltes les proteïnes que han anat apareixent en "l'escena científica", presentades moltes vegades com a proteïnes clau en el context de l'obesitat. Avui se sap que això no és tan simple, de fet, cada vegada es parla més d'un perfil o empremta general, tant a nivell d'expressió gènica com proteica, a l'hora d'interpretar el rol d'una proteïna determinada. Recentment ha estat implicada en el metabolisme de l'adipòcit una proteïna anomenada glicoproteïna Zinc-□ 2 (ZAG), actuant com a factor mobilitzador de lípids (LMF) i estimulants la lipòlisi en el teixit adipós. Per aquestes accions, ha estat proposada com a factor candidat en la regulació del pes corporal i sembla que pot estar implicada en el desenvolupament de la RI.

Per tal d'adequar millor el paper d'aquesta nova adipoquina s'ha analitzat la seva relació amb l'expressió d'altres adipoquines i de gens lipolítics d'acord amb la localització anatòmica del teixit adipós i lligant-ho amb la distribució fenotípica del pes corporal. Per aconseguir aquest objectiu s'ha reunit una cohort de subjectes amb diferents graus d'obesitat, amb mostres aparellades de teixit adipós procedent de la regió subcutània i visceral. Tal com ja s'ha comentat prèviament, es considera molt important tenir en compte l'origen del teixit, donat el diferent comportament i funcionalitat que tenen els adipòcits segons la localització anatòmica. Així mateix, l'anàlisi, en la mateixa mostra, dels gens més importants que participen en els mecanismes lipolítics, així com de les diverses adipoquines pròpies del teixit adipós, fa que es pugui tenir un dibuix, una mica més acurat, de l'escenari en el qual participen aquestes molècules.

ZAG és una proteïna que s'allibera al medi i que es troba a nivell circulant en concentracions del rang mg/l. Abans de començar aquest estudi se sabia que en models animals el tractament amb ZAG reduïa el pes corporal *in vivo* en ratolins *ob/ob* (ratolins portadors de la mutació en el gen *Ob*, deficients en leptina i que presenten un fenotip d'obesitat), causant una disminució del contingut de greix, i induïa lipòlisi *in vitro* [88, 97]. Això va portar a suggerir a alguns investigadors que ZAG podria ser utilitzada pel tractament de l'obesitat, però hores d'ara no està clar si els nivells circulants de ZAG estan associats amb l'obesitat o la síndrome metabòlica (SM) [97].

Resultats preliminars als aquí presents no recolzen la hipòtesi dels nivells circulants de ZAG com a marcador de la SM i de l'obesitat en humans [111]. De la mateixa manera, en el present estudi no es troba relació entre els nivells plasmàtics de ZAG i els principals determinants de la SM, com ara els nivells circulants de TG, l'índex de cintura i maluc (ICM), la pressió arterial diastòlica (PAD), la pressió arterial sistòlica (PAS), entre d'altres. En canvi, contràriament a aquests resultats preliminars, si que es troba una associació negativa dels nivells circulants de ZAG amb la insulina i amb l'índex de la sensibilitat a la insulina mesurada mitjançant el model d'homeòstasi de la resistència a la insulina (HOMA-IR), fet que defensa la hipòtesi que ZAG podria contribuir a millorar la sensibilitat a la insulina. Això estaria en concordança amb un treball recent (2009) realitzat amb ratolins *ob/ob*, en el qual es demostra el paper de ZAG com atenuador de la diabetis. L'administració de ZAG en aquests ratolins obesos fa disminuir els nivells plasmàtics d'insulina, associada a una retenció d'insulina al pàncrees, i millora la resposta al test de tolerància a la glucosa degut a un major ús de glucosa [126].

Pel que fa a l'obesitat, no s'observen diferències en els nivells circulants en agrupar la cohort d'acord amb l'IMC segons la classificació de l'OMS. No obstant això, recentment (2009), s'ha publicat un estudi fet en obesos mòrbids, entre els que es troben xifres més baixes de ZAG circulant en relació als subjectes primis utilitzats com a controls [127]. S'entén que són poblacions poc comparables entre si, doncs en el nostre estudi no s'ha inclòs pràcticament cap subjecte amb IMC superior a 40 Kg/m² i per tant, s'ha analitzat una franja de població clarament diferent a la de l'article previ. Tot i que els pacients amb obesitat mòrbida

presenten un comportament metabòlic força diferent al dels obesos no mòrbids, cal posar en quarantena la manca d'associació entre aquesta proteïna en plasma i el grau d'obesitat. Entenem que calen poblacions molt més àmplies que les analitzades en aquests treballs previs abans de definir la implicació real d'aquesta proteïna en el context de l'obesitat, sigui del grau que sigui. Un altre aspecte diferent entre ambdós estudis és la relació entre els nivells circulants i l'expressió en teixit adipós d'aquesta proteïna. Així doncs, en el nostre treball, fet en una àmplia població de subjectes, no es troba relació entre la seva expressió a nivell d'ARNm i els nivells circulants. En canvi, en el treball de Selva *et alii*, troben una relació negativa entre el ZAG circulant i la seva expressió, tant a nivell subcutani com visceral [127]. Es torna a pensar en les diferències de la població seleccionada per interpretar aquestes discrepàncies. D'altra banda, la presència de ZAG en diversos teixits i fluids corporals amb diferents mecanismes reguladors fa que sigui difícil atribuir només o bàsicament els nivells circulants d'aquesta proteïna a la seva producció per part del teixit adipós. Tanmateix, la relació entre els nivells circulants i l'activitat lipolítica cal mesurar-la amb cautela, ben bé fins que es disposi de més dades sobre com pot actuar aquesta proteïna *in vivo* en humans amb obesitat.

Ja fa uns anys que es coneix que els adipòcits humans secreten la proteïna ZAG [101], però no ha estat fins l'any 2009 que s'ha demostrat l'abundant secreció d'aquesta proteïna. S'ha demostrat en cèl·lules SGBS que la detecció d'aquesta proteïna en el medi augmenta durant la diferenciació a adipòcits i que els nivells són comparables als d'adiponectina (proteïna molt abundant del teixit adipós). Per tant, es podria considerar ZAG com a una important adipoquina, produïda abundantment pels adipòcits humans i així doncs, podria tenir un paper auto-crí/paracrí en la funció del teixit adipós. Aquest rol de ZAG ha estat demostrat clarament en models *in vitro* i en models murins mitjançant l'administració de ZAG [128,88,97], per tant, aquesta funció de ZAG cal tenir-la molt en compte a l'hora d'interpretar el seu valor en el teixit adipós humà. En aquest sentit, el paper de ZAG en la mobilització de lípids ha estat recentment reforçat en un estudi, en el qual ratolins deficientes en ZAG són més susceptibles a guanyar pes i aquest fenotip sembla que

pot estar correlacionat amb una disminució de la lipòlisi, pel contrari, la sobre expressió de ZAG porta a una pèrdua de pes [105].

Avui en dia s'han realitzat molts pocs estudis d'anàlisi de l'expressió de ZAG en teixit adipós humà, però tots apunten a una forta relació entre la seva expressió i diversos marcadors d'obesitat.

En la població estudiada es troba una forta associació inversa entre els nivells d'ARNm de ZAG i el pes corporal, en els dos dipòsits de greix, essent els subjectes amb sobrepès i obesitat els que presenten una major inhibició en el teixit subcutani. Aquests resultats concorden amb un treball previ amb 18 barons, indicant també una inhibició d'aquesta adipoquina en pacients obesos [107]. Seguint la mateixa línia de resultats, un treball recent en una població de 26 obesos mòrbids, demostra que els nivells d'ARNm de ZAG, tant en SAT com en VAT, es correlacionen de manera negativa amb l'IMC i amb la massa de greix total. A més a més, els nivells d'expressió no eren significativament diferents, tant a nivell de gen com a nivell de proteïna, en els dos dipòsits [128]. Resultats similars es demostren en el nostre estudi quan s'analitza tota la població, independentment del grau d'obesitat i de la presència de SM, en què no trobem diferències d'expressió segons l'origen del dipòsit de teixit adipós.

Així mateix, es considera rellevant l'alt grau d'associació inversa que es troba entre l'expressió de ZAG i diversos components de la SM, com ara la pressió sanguínia, els nivells circulants de TG, de lipoproteïna d'alta densitat (HDL) i l'índex HOMA-IR. Així que, quan es classifica la població analitzada segons la presència o absència de SM, s'observa que els pacients amb aquesta síndrome mostren nivells clarament disminuïts d'ARNm en SAT respecte als que no tenen SM, recolzant el paper de ZAG com a possible diana terapèutica pel tractament de la SM. També cal tenir en compte l'associació negativa trobada entre els nivells d'expressió i l'índex HOMA-IR, coincidint amb el treball recent (2009) de Mracek *et alii* [128]. A més a més, cal destacar la relació negativa amb els nivells de proteïna C reactiva (PCR), una proteïna de fase aguda, la qual augmenta en l'obesitat i prediu un augment del risc a patir DM2 [129]. Tots aquests fets suggereixen un paper protector de ZAG en el manteniment de la sensibilitat a la insulina. De fet, prèviament a aquests resultats, es va demostrar que el tractament amb ZAG estimulava la

utilització de glucosa i augmentava l'oxidació de lípids en diversos teixits de ratolí. Això va fer pensar que probablement l'efecte de ZAG en la DM2 és independent de la capacitat per mobilitzar el greix corporal i podria ser degut a l'efecte similar que té a la insulina sobre la utilització de la glucosa [126, 130]. No obstant això, aquestes dades queden pendents de comprovar.

Totes aquestes troballes fan pensar que les diferències observades entre prims i obesos podrien ser secundàries a molts altres factors que intervenen en el metabolisme de l'adipòcit, com ara altres adipoquines i gens lipolítics. De fet, un estudi amb models d'animals amb DM2 suggereix el paper de ZAG com a modulador de la senyalització del sistema endocrí en l'adipòcit a nivell local. En aquest estudi es descriu un paral·lisme entre els nivells d'ARNm de ZAG i d'adiponectina en adipòcits 3T3-L1 [131]. Més tard, l'any 2005, adipòcits humans també mostren un perfil similar d'expressió d'adiponectina i de ZAG [101]. Aquests resultats i els obtinguts en el present estudi en humans, en el qual es troba una associació positiva entre l'expressió de ZAG i d'adiponectina, porten a especular sobre l'existència d'un mecanisme regulador entre ambdós adipoquines actuant de manera coordinada, amb implicacions potents en l'obesitat i la DM2. Poc abans de la publicació del nostre treball, un estudi amb resultats similars, però amb una població més petita, mostra també una correlació positiva entre els nivells d'expressió de ZAG i els d'adiponectina, en ambdós teixits tissulars. Aquesta vinculació és reforçada per dades *in vitro* que demostren que l'administració de ZAG incrementa la sortida d'adiponectina durant la diferenciació d'adipòcits humans [128]. Això suggereix que ZAG podria regular positivament la secreció d'adiponectina i per tant, ser també important per modular els efectes d'aquesta adipoquina. En la nostra població, els nivells d'expressió de ZAG depenen majoritàriament dels nivells d'ARNm d'adiponectina i també es troba una forta correlació positiva amb l'expressió gènica del PPAR α . Avui en dia no es coneix ben bé la regulació de la producció de ZAG en el teixit adipós blanc (WAT), encara que es pensa que tant el TNF α com el PPAR α podrien ser importants en la modulació de la seva expressió. Tal com es demostra en adipòcits humans (SGBS), el tractament amb rosiglitazona (un agonsita del PPAR α que millora la sensibilitat a la insulina) incrementa els nivells d'ARNm de ZAG. Sabem que

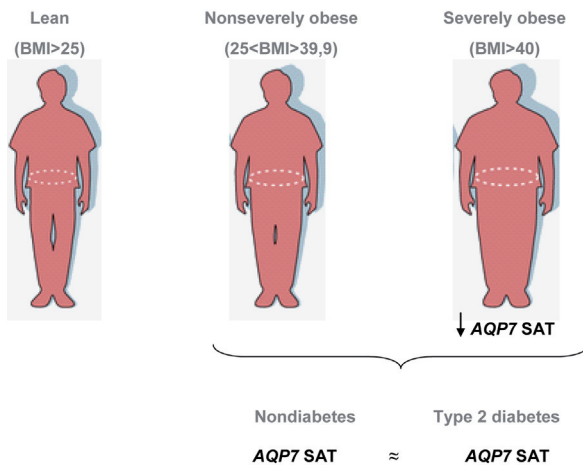
això no demostra un paper clar de ZAG en la sensibilitat a la insulina, però és altament suggerent. Endemés, s'observa un major efecte sobre la síntesi de ZAG (inhibició de l'expressió) amb la citocina proinflamatòria TNF α [101], que com coneixem, té un paper rellevant en la RI.

Se sap que l'administració de ZAG en ratolins indueix una reducció de greix corporal juntament amb un increment dels nivells d'AG lliures, els nivells de glicerol i una captació d'oxigen en el teixit adipós marró (BAT), proporcionant l'evidència d'un augment de lipòlisi i d'utilització i mobilització de lípids. D'altra banda sabem que ZAG actua com a LMF, induint la lipòlisi en el WAT per estimulació d'adenilat ciclase (AC), de manera dependent de GTP [88,130], de forma similar a les hormones lipolítiques (veure introducció). Per tot plegat s'ha considerat interessant analitzar la relació de ZAG amb gens lipolítics del teixit adipós. S'ha estudiat l'expressió dels gens *HSL* i *ATGL*, tenint en compte que la mobilització dels TG mantinguts en el teixit adipós es regula principalment per l'activació d'aquests dos gens [132]. Les correlacions positives observades entre l'expressió de ZAG i ambdós lipases dona suport a la idea d'un possible mecanisme de regulació transcripcional i a la hipòtesi, postulada per diversos autors, que la pèrdua de greix corporal és causada més per un increment en la lipòlisi que no pas per una disminució en la lipogènesi. Tot i això, un treball molt recent del 2009, mostra per primera vegada que l'acció de ZAG en reduir el pes i el greix corporal està relacionada tant amb la inhibició de la lipogènesi com amb l'estimulació de la lipòlisi [133]. Caldrà doncs, continuar investigant en aquest àmbit per tal d'aclarir el paper d'aquesta adipoquina en el metabolisme lipídic del teixit adipós.

Conclusions

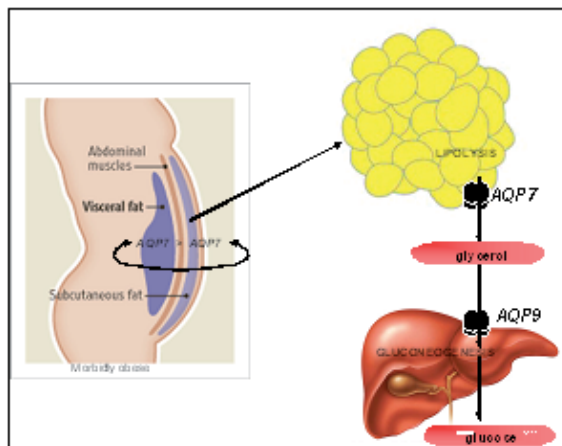
Les conclusions que s'obtenen de la tesi són les següents:

1. L'expressió del canal de glicerol *AQP7*, en teixit adipós, es troba disminuïda en pacients afectes d'obesitat mòrbida.
2. La DM2 no sembla afectar l'expressió d'aquesta aquagliceroprina en el teixit adipós.



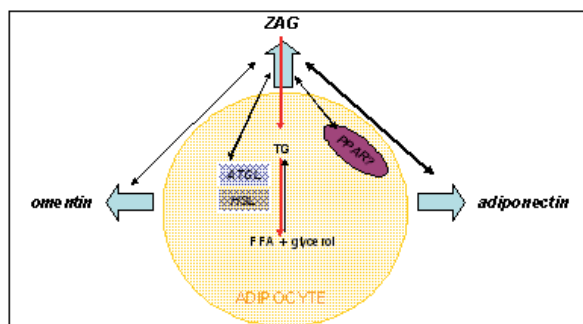
AQP7 en el teixit adipós de pacients amb obesitat i DM2

- Ambdues aquagliceroporines, *AQP7* (al teixit adipós) i *AQP9* (al teixit hepàtic) mantenen un estreta relació en pacients obesos mòrbids.



Coordinació d'aquaporines i diferències d'expressió segons l'origen del teixit adipós

- La glicoproteïna Zinc- \square 2 (*ZAG*) sembla tenir un paper rellevant en l'homeòstasi del teixit adipós amb un fort lligam amb altres adipoquines, especialment l'adiponectina.



Glicoproteïna Zinc- \square 2, una nova adipoquina amb funcions lipolítiques

Referències

1. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (2006) *Obesidad y sobrepeso*. Nota descriptiva N°311. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2003) *Obesity and overweight*.
3. PISCHON T, BOEING H, HOFFMANN K, *et alii* (2008) "General and abdominal adiposity and risk of death in Europe". *N Engl J Med*; 359:2105-20.
4. MUTCH DM, CLÉMENT K (2006) "Unraveling the Genetics of Human Obesity". *PLoS Genet* 2(12): e188.
5. HINNEY A, HEBEBRAND J (2008) "Polygenic Obesity in Humans". *Obesity Facts*; 1:35-42
6. BAUER F, ELBERS CC, ADAN RA, LOOS RJ, ONLAND-MORET NC, GROBBEE DE, VAN VLIET-OSTAPTCHOUK JV, WIJMENGA C, VAN DER SCHOUW YT (2009) "Obesity genes identified in genome-wide association studies are associated with adiposity measures and potentially with nutrient-specific food preference". *Am J Clin Nutr.*; 90(4):951-9.
7. BRAY G, BOUCHARD C, JAMES W (1998). *Handbook of obesity: etiology and pathophysiology* New York: Marcel Dekker.
8. SMITH SR, LOVEJOY JC, GREENWAY F, RYAN D, DEJONGE L, DE LA BRETONNE J, VOLAFOVA J, BRAY GA (2001) "Contributions of total body fat, abdominal subcutaneous adipose tissue compartments, and visceral adipose tissue to the metabolic complications of obesity". *Metabolism*;50(4):425-35.

9. VAGUE J (1947) "Sexual Differentiation. A Factor Affecting the Forms of Obesity". *Presse Med*; 30: 339-40.
10. KISSEBAH A, FREEDMAN, D, PEIRIS A (1989) "Health risks of obesity". *Medical Clinics of North America*, 73:111-138.
11. SCARSELLA C, DESPRÉS JP (2003) "[Treatment of obesity: the need to target attention on high-risk patients characterized by abdominal obesity]". *Cad Saude Publica*, 19 Suppl 1:S7-19. Review. Spanish.
12. NATIONAL DIABETES INFORMATION CLEARINGHOUSE (NDIC). *Insulin Resistance and Pre-diabetes*
13. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (2009) *Diabetes*. Nota descriptiva N°312
14. 2001 Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) "Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)". *JAMA* 285:2486-2497.
15. CINTI S (2005) *The adipose organ*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 73 9-15.
16. CINTI S (2006) "The role of brown adipose tissue in human obesity". *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 16(8):569-74.
17. MORENO MJ, MARTÍNEZ JA (2002) ["Adipose tissue: a storage and secretory organ"]. *An Sist Sanit Navar*. 25 Suppl 1:29-39.
18. HAJER GR, VAN HAEFTEN TW, VISSEREN FL (2008) "Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases". *Eur Heart J*. 29(24):2959-71.
19. FRÜHBECK G (2005) "Obesity: aquaporin enters the picture". *Nature* 438:436-437
20. HIBUSE T, MAEDA N, NAGASAWA A AND FUNAHASHI T (2006) "Aquaporins and glycerol metabolism". *Biochim Biophys Acta* 1758:1004-1011
21. LARGE V, PERONI O, LETEXIER D, RAY H AND BEYLOT M (2004) "Metabolism of lipids in human white adipocyte." *Diabetes Metab* 30:294-309
22. RESHEF L, OLSWANG Y, CASSUTO H, BLUM B, CRONIGER CM, KALHAN SC, TILGHMAN SM, HANSON RW (2003) "Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle". *J Biol Chem* 278:30413-30416

23. KISHIDA K, KURIYAMA H, FUNAHASHI T, *et alii* (2000) "Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes". *J Biol Chem.*;275: 20896-902.
24. STREMMEL W, LOTZ G, STROHMEYER G, BERK PD (1985) "Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes." *J Clin Invest.*;75(3):1068-76.
25. SCHAFFER JE, LODISH HF (1994) *Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein.* *Cell.*;79(3):427-36.
26. IBRAHIMI A, SFEIR Z, MAGHARAIE H, AMRI EZ, GRIMALDI P, ABUMRAD NA (1996) "Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport". *Proc Natl Acad Sci U S A*;93(7):2646-51.
27. LUNDGREN M, BURÉN J, RUGE T, MYRNÄS T, ERIKSSON JW (2004) "Glucocorticoids down-regulate glucose uptake capacity and insulin-signaling proteins in omental but not subcutaneous human adipocytes". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.*; 89(6):2989-2997
28. LARGE V, PERONI O, LETEXIER D, RAY H, BEYLOT M (2004) "Metabolism of lipids in human white adipocyte". *Diabetes Metab* 30:294-309
29. WANG S, SONI KG, SEMACHE M, CASAVANT S, FORTIER M, PAN L, MITCHELL GA (2008) "Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism". *Mol Genet Metab.* 95(3):117-26
30. JAWORSKI K, SARKADI-NAGY E, DUNCAN RE, AHMADIAN M, SUL HS (2007) "Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*;293(1):G1-4.
31. DUNCAN RE, AHMADIAN M, JAWORSKI K, SARKADI-NAGY E, SUL HS (2007) "Regulation of lipolysis in adipocytes". *Annu Rev Nutr.*;27:79-101.
32. AGRE P, KING LS, YASUI M, GUGGINO WB, OTTERSEN OP, FUJIYOSHI Y, ENGEL A, NIELSEN S (2002) "Aquaporin water channels-from atomic structure to clinical medicine". *J Physiol.*;542(Pt 1):3-16.

33. MATSUZAKI T, TAJIKA Y, TSERENTSOODOL N, SUZUKI T, AOKI T, HAGIWARA H, TAKATA K (2002) "Aquaporins: a water channel family". *Anat Sci Int* 77:85-93
34. NIELSEN S, FRØKIAER J, MARPLES D, KWON TH, AGRE P, KNEPPER MA (2002) "Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine". *Physiol Rev* 82:205-244
35. TAKATA K, MATSUZAKI T, TAJIKA Y (2004) "Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane". *Prog Histochem Cytochem* 39:1-83
36. ISHIBASHI K (2006) "Aquaporin subfamily with unusual NPA boxes". *Biochim Biophys Acta*. 2006 Aug;1758(8):989-93. Epub 2006 Mar 20.
37. ROJEK A, PRAETORIUS J, FRØKIAER J, NIELSEN S, FENTON RA (2008) "A current view of the mammalian aquaglyceroporins". *Annu Rev Physiol*.;70:301-27.
38. MORISHITA Y, SAKUBE Y, SASAKI S, ISHIBASHI K (2004) "Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: aquaporin superfamily (superaquaporins): expansion of aquaporins restricted to multicellular organisms". *J Pharmacol Sci* 96:276-279
39. AGRE P (2004) "Aquaporin water channels (Nobel Lecture)". *Angew Chem Int Ed Engl*.;43(33):4278-90.
40. KRUSE E, UEHLEIN N, KALDENHOFF R (2006) "The aquaporins". *Genome Biol*.;7(2):206.
41. CHEN YC, CADNAPAPHORNCHAI MA, SCHRIER RW (2005) "Clinical update on renal aquaporins". *Biol Cell*.;97(6):357-71.
42. ECHEVARRÍA M, ZARDOYA R (2006) "Acuaporinas: Los canales de aguacelulares". *Investigación i Ciencia*. Núm.363.2006.Pag.60-67
43. VERKMAN AS (2005) "More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins". *J Cell Sci*.;118(Pt 15):3225-32.
44. ISHIBASHI K, KUWAHARA M, GU Y, KAGEYAMA Y, TOHSAKA A, SUZUKI F, MARUMO F, SASAKI S (1997) "Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea". *J Biol Chem*.;272(33):20782-6.

45. KURIYAMA H, KAWAMOTO S, ISHIDA N, OHNO I, MITA S, MATSUZAWA Y, MATSUBARA K, OKUBO K (1997) "Molecular cloning and expression of a novel human aquaporin from adipose tissue with glycerol permeability". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 53-58.
46. KISHIDA K, SHIMOMURA I, KONDO H, KURIYAMA H, MAKINO Y, NISHIZAWA H, MAEDA N, MATSUDA M, OUCHI N, KIHARA S, KURACHI Y, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y (2001a) "Genomic structure and insulin-mediated repression of the aquaporin adipose (AQPap), adipose-specific glycerol channel". *J Biol Chem.* 276(39):36251-60.
47. KONDO H, SHIMOMURA I, KISHIDA K, KURIYAMA H, MAKINO Y, NISHIZAWA H, MATSUDA M, MAEDA N, NAGARETANI H, KIHARA S, KURACHI Y, NAKAMURA T, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y (2002) Human aquaporin adipose (AQPap) gene. "Genomic structure, promoter analysis and functional mutation". *Eur J Biochem* 269:1814-1826
48. MAEDA N, FUNAHASHI T, HIBUSE T, NAGASAWA A, KISHIDA K, KURIYAMA H, NAKAMURA T, KIHARA S, SHIMOMURA I, MATSUZAWA Y (2004) "Adaptation to fasting by glycerol transport through aquaporin 7 in adipose tissue". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 17801-17806
49. MURATA K, MITSUOKA K, HIRAI T, WALZ T, AGRE P, HEYMANN JB, ENGEL A, FUJIYOSHI Y (2000) "Structural determinants of water permeation through aquaporin-1". *Nature* 407, 599±605.
50. MATSUMURA K, CHANG BH, FUJIMIYA M, CHEN W, KULKARNI RN, EGUCHI Y, KIMURA H, KOJIMA H, CHAN L (2007) "Aquaporin 7 is a beta-cell protein and regulator of intracellular glycerol content and glycerol kinase activity, beta-cell mass, and insulin production and secretion". *Mol Cell Biol.*;27(17):6026-37.
51. KISHIDA K, SHIMOMURA I, NISHIZAWA H, MAEDA N, KURIYAMA H, KONDO H, MATSUDA M, NAGARETANI H, OUCHI N, HOTTA K, KIHARA S, KADOWAKI T, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y (2001b) "Enhancement of the aquaporin adipose gene expression by a peroxisome proliferator-activated receptor gamma." *J. Biol. Chem.* 276, 48572-48579.

52. LEE DH, PARK DB, LEE YK, AN CS, OH YS, KANG JS, KANG SH, CHUNG MY (2005) "The effects of thiazolidinedione treatment on the regulations of aquaglyceroporins and glycerol kinase in OLETF rats." *Metabolism* 54, 1282–1289.
53. FASSHAUER M, KLEIN J, LOSSNER U, KLIER M, KRALISCH S, PASCHKE R (2003) "Suppression of aquaporin adipose gene expression by isoproterenol, TNF α , and dexamethasone". *Horm. Metab. Res.* 35, 222–227.
54. RODRÍGUEZ A, CATALÁN V, GÓMEZ-AMBROSI J, FRÜHBECK G (2006) "Role of aquaporin-7 in the pathophysiological control of fat accumulation in mice". *FEBS Lett.*;580(20):4771-6.
55. LAFONTAN M, LANGIN D (2009) "Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue". *Prog Lipid Res.*;48(5):275-97.
56. FRÜHBECK G, CATALÁN V, GÓMEZ-AMBROSI J, RODRÍGUEZ A (2006) "Aquaporin-7 and glycerol permeability as novel obesity drug-target pathways". *Trends Pharmacol Sci.*;27(7):345-7.
57. HIBUSE T, MAEDA N, FUNAHASHI T, YAMAMOTO K, NAGASAWA A, MIZUNOYA W, KISHIDA K, INOUE K, KURIYAMA H, NAKAMURA T, FUSHIKI T, KIHARA S, SHIMOMURA I (2005) "Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 10993–10998.
58. HARA-CHIKUMA M, SOHARA E, RAI T, IKAWA M, OKABE M, SASAKI S, UCHIDA S, VERKMAN AS (2005) "Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7-deficient mice: adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation". *J. Biol. Chem.* 280, 15493–15496.
59. SJÖHOLM K, PALMING J, OLOFSSON LE, GUMMESSON A, SVENSSON PA, LYSTIG TC, JENNISCHE E, BRANDBERG J, TORGERSON JS, CARLSSON B, CARLSSON LM (2005) "A microarray search for genes predominantly expressed in human omental adipocytes: adipose tissue as a major production site of serum amyloid A". *J Clin Endocrinol Metab*;90: 2233-9.
60. MARRADES MP, MILAGRO FI, MARTÍNEZ JA, MORENO-ALIAGA MJ (2006) "Differential expression of aquaporin 7 in adipose tissue

- of lean and obese high fat consumers". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 785-789.
61. PRUDENTE S, FLEX E, MORINI E, TURCHI F, CAPPONI D, DE COSMO S, TASSI V, GUIDA V, AVOGARO A, FOLLI F, MAIANI F, FRITTTITA L, DALLAPICCOLA B, TRISCHITTA V (2007) "A functional variant of the adipocyte glycerol channel aquaporin 7 gene is associated with obesity and related metabolic abnormalities". *Diabetes.*;56(5):1468-74.
 62. CATALÁN V, GÓMEZ-AMBROSI J, PASTOR C, ROTELLAR F, SILVA C, RODRÍGUEZ A, GIL MJ, CIENFUEGOS JA, SALVADOR J, VENDRELL J, FRÜHBECK G (2008) "Influence of morbid obesity and insulin resistance on gene expression levels of AQP7 in visceral adipose tissue and AQP9 in liver". *Obes Surg.*;18(6):695-701.
 63. ISHIBASHI K, KUWAHARA M, GU Y, TANAKA Y, MARUMO F, SASAKI S (1998) "Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244: 268-274
 64. TSUKAGUCHI H, SHAYAKUL C, BERGER UV, MACKENZIE B, DEVIDAS S, GUGGINO WB, VAN HOEK AN, HEDIGER MA (1998) "Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel". *J. Biol. Chem.* 273: 24737-24743
 65. ROJEK AM, SKOWRONSKI MT, FÜCHTBAUER EM, FÜCHTBAUER AC, FENTON RA, AGRE P, FRØKIAER J, NIELSEN S (2007) "Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice". *Proc Natl Acad Sci U S A.*;104(9):3609-14.
 66. KO SB, UCHIDA S, NARUSE S, KUWAHARA M, ISHIBASHI K, MARUMO F, HAYAKAWA T, SASAKI S (1999) "Cloning and functional expression of rAQP9L a new member of aquaporin family from rat liver". *Biochem. Mol. Biol. Int.* 47: 309-318
 67. ELKJAER M, VAJDA Z, NEJSUM LN, KWON T, JENSEN UB, AMIRY-MOGHADDAM M, FRØKIAER J, NIELSEN S (2000) "Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276: 1118-1128

68. PORTINCASA P, PALASCIANO G, SVELTO M, CALAMITA G (2008) "Aquaporins in the hepatobiliary tract. Which, where and what they do in health and disease". *Eur J Clin Invest.*;38(1):1-10.
69. MAEDA N, FUNAHASHI T, SHIMOMURA I (2008) "Metabolic impact of adipose and hepatic glycerol channels aquaporin 7 and aquaporin 9". *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.*;4(11):627-34.
70. KURIYAMA H, SHIMOMURA I, KISHIDA K, KONDO H, FURUYAMA N, NISHIZAWA H, MAEDA N, MATSUDA M, NAGARETANI H, KIHARA S, NAKAMURA T, TOCHINO Y, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y (2002) "Coordinated regulation of fat-specific and liverspecific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9." *Diabetes*;51:2915-21.
71. CARBREY JM, GORELICK-FELDMAN DA, KOZONO D, PRAETORIUS J, NIELSEN S, AGRE P (2003) "Aquaglyceroporin AQP9: solute permeation and metabolic control of expression in liver". *Proc Natl Acad Sci U S A.*;100(5):2945-50.
72. LEE DH, PARK DB, LEE YK, AN CS, OH YS, KANG JS, KANG SH, CHUNG MY (2005) "The effects of thiazolidinedione treatment on the regulations of aquaglyceroporins and glycerol kinase in OLETF rats". *Metabolism*;54(10):1282-9.
73. TISDALE MJ (2009a) "Zinc-alpha2-glycoprotein in cachexia and obesity". *Curr Opin Support Palliat Care.*:288-93.
74. TISDALE MJ (2004) "Cachexia in cancer patients". *Nature Reviews Cancer* 2, 862-871doi:10.1038/nrc927.
75. FREIJE JP, FUEYO A, URÍA J, LOPEZ-OTÍN C (1991) "Human Zn-a2-glycoprotein cDNA cloning and expression analysis in benign and malignant breast tissues". *FEBS Lett*;290:247 - 9.
76. UHEYAMA H, NIWA M, TADA T, SASAKI M, OHKUBO I (1991) "Cloning and nucleotide sequence of a human Zn-a2-glycoprotein cDNA and chromosomal assignment of its gene". *Biochem Biophys Res Commun*;177:696 - 703.
77. FREIJE JP, FUEYO A, URÍA JA, VELASCO G, SÁNCHEZ LM, LÓPEZ-BOADO YS, LÓPEZ-OTÍN C (1993) "Human Zn-a2-glycoprotein: complete genomic sequence, identification of a related pseudogene and relationship to class I major histocompatibility complex genes". *Genomics*;18:575-87.

78. TADA T, OHKUBO I, NIWA M, SASAKI M, TATEYAMA H, EIMOTO T (1991) "Immunohistochemical localization of Zn-alpha 2-glycoprotein in normal human tissues". *J Histochem Cytochem.*;39(9):1221-6.
79. SÁNCHEZ LM, LÓPEZ-OTÍN C, BJORKMAN PJ (1997) "Biochemical characterization and crystalization of human Zn-alpha2-glycoprotein, a soluble class I major histocompatibility complex homolog". *Proc Natl Acad Sci U S A.*;94(9):4626-30.
80. ARAKI T, GEJYO F, TAKAGAKI K, HAUPT H, SCHWICK HG, BÜRGI W, MARTI T, SCHALLER J, RICKLI E, BROSSMER R, ATKINSON PH, PUTNAM FW, SCHMID K (1988) "Complete amino acid sequence of human plasma Zn-alpha 2-glycoprotein and its homology to histocompatibility antigens". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 679-683.
81. SANCHEZ LM, CHIRINO AJ, BJORKMAN P [1999] "Crystal structure of human ZAG, a fat-depleting factor related to MHC molecules". *Science*;283: 1914 - 9.
82. HASSAN MI, WAHEED A, YADAV S, SINGH TP, AHMAD F (2008) "Zinc alpha 2-glycoprotein: a multidisciplinary protein". *Mol Cancer Res.*;6(6):892-906.
83. BURGI W, SCHMID K (1961) "Preparation and properties of Zn-A2-glycoprotein of normal human plasma". *J Biol Chem*;236:1066 - 74.
84. OHKUBO I, NIWA M, TAKASHIMA A, NISHIKIMI N, GASA S, SASAKI M (1990) "Human seminal plasma Zn-a2- glycoprotein: its purification and properties as compared with human plasma Zna2-glycoprotein". *Biochim Biophys Acta*;1034:152 - 6.
85. GARCÍA-RAMÍREZ M, CANALS F, HERNÁNDEZ C, COLOMÉ N, FERRER C, CARRASCO E, GARCÍA-ARUMÍ J, SIMÓ R (2007) "Proteomic analysis of human vitreous fluid by fluorescence-based difference gel electrophoresis (DIGE): a new strategy for identifying potential candidates in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy". *Diabetologia*;50(6):1294-303.
86. HILL DM, KASLIWAL T, SCHWARZ E, HEBERT AM, CHEN T, GUBINA E, ZHANG L, KOZLOWSKI S (2003) "A dominant negative mutant beta 2-microglobulin blocks the extracellular folding of a

- major histocompatibility complex class I heavy chain". *J Biol Chem*;278(8):5630-8.
87. McDERMOTT LC, FREEL JA, WEST AP, BJORKMAN PJ, KENNEDY MW (2006) "Zn-alpha2-glycoprotein, an MHC class I-related glycoprotein regulator of adipose tissues: modification or abrogation of ligand binding by site-directed mutagenesis". *Biochemistry*;45(7):2035-41.
88. HIRAI K, HUSSEY HJ, BARBER MD, PRICE SA, TISDALE MJ (1998) "Biological evaluation of a lipid-mobilizing factor isolated from the urine of cancer patients". *Cancer Res*;58(11):2359-65.
89. DEUTSCHER MP (1993) "Ribonuclease multiplicity, diversity, and complexity". *J Biol Chem*;268:13011 - 4.
90. RAGHAVAN M, CHEN MY, GASTINEL LN, BJORKMAN PJ (1994) "Investigation of the interaction between the class I MHC-related Fc receptor and its immunoglobulin G ligand". *Immunity*;1:303-15.
91. MADDEN DR (1995) *The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. Annu Rev Immunol*;13:587 - 622.
92. LEI G, BRYSK H, ARANY I, TYRING SK, SRINIVASAN G, BRYSK MM (1999) "Characterization of zinc-a(2)-glycoprotein as a cell adhesion molecule that inhibits the proliferation of an oral tumor cell line". *J Cell Biochem*;75:160-9.
93. LEI G, ARANY I, TYRING SK, BRYSK H, BRYSK MM (1998) "Zinc-a2-glycoprotein has ribonuclease activity". *Arch Biochem Biophys*;355:160-4.
94. HE N, BRYSK H, TYRING SK, OHKUBO I, BRYSK MM (2001) "Zinc-a(2)-glycoprotein hinders cell proliferation and reduces cdc2 expression". *J Cell Biochem*;81:162-9.
95. ZORIN NA, ZORINA VN, ZORINA RM (2006a) "[Role of proteins of the macroglobulin family in regulation of tumor growth]". *Ontogenez*;37:12-9.
96. ZORIN NA, ZORINA VN, ZORINA RM [2006b] "[The role of macroglobulin family proteins in the regulation of inflammation]". *Biomed Khim*;52:229-38.

97. RUSSELL ST, ZIMMERMAN TP, DOMIN BA, TISDALE MJ (2004) "Induction of lipolysis in vitro and loss of body fat in vivo by zinc- α 2-glycoprotein". *Biochim Biophys Acta*;1636:59-68.
98. RUSSELL ST, TISDALE MJ (2005a) "Effect of eicosapentaenoic acid (EPA) on expression of a lipid mobilizing factor in adipose tissue in cancer cachexia". *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*;72:409-14.
99. TZANAVARI T, BING C, TRAYHURN P (2007) "Postnatal expression of zinc- α (2)-glycoprotein in rat white and brown adipose tissue". *Mol Cell Endocrinol*; 279:26-33.
100. BING C, BAO Y, JENKINS J, SANDERS P, MANIERI M, CINTI S, TISDALE MJ, TRAYHURN P (2004) "Zinc- α 2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia". *Proc Natl Acad Sci USA*.;101(8):2500-5.
101. BAO Y, BING C, HUNTER L, JENKINS JR, WABITSCH M, TRAYHURN P (2005) "Zinc- α 2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed and secreted by human (SGBS) adipocytes". *FEBS Lett*.;579(1):41-7.
102. RUSSELL ST, TISDALE MJ (2005b) "The role of glucocorticoids in the induction of zinc α - glycoprotein expression in adipose tissue in cancer cachexia". *Br J Cancer*;92:876-81.
103. TISDALE MJ (2009b) "Cancer cachexia". *Curr Opin Gastroenterol*. [Epub ahead of print]
104. BING C, RUSSELL S, BECKETT E, POPE M, TISDALE MJ, TRAYHURN P, JENKINS JR (2006) "Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice". *Br J Cancer*;95(8):1028-37.
105. ROLLI V, RADOSAVLJEVIC M, ASTIER V, MACQUIN C, CASTAN-LAURELL I, VISENTIN V, GUIGNÉ C, CARPÉNÉ C, VALET P, GILFILLAN S, BAHRAM S (2007) "Lipolysis is altered in MHC class I zinc- α (2)-glycoprotein deficient mice". *FEBS Lett*.;581(3):394-400.
106. BING C, RUSSELL ST, BECKETT EE, COLLINS P, TAYLOR S, BARRACLOUGH R, TISDALE MJ AND WILLIAMS G (2002) "Expression of uncoupling proteins-1, -2 and -3 mRNA is induced by an adenocarcinoma-derived lipid-mobilizing factor. *Br J Cancer*", 86, 612-618.

107. MARRADES MP, MARTÍNEZ JA, MORENO-ALIAGA MJ (2008) "ZAG, a lipid mobilizing adipokine, is downregulated in human obesity". *J Physiol Biochem.*;64(1):61-6.
108. TRUJILLO ME AND SCHERER PE (2005) "Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome". *J Intern Med*, 257, 167-175.07
109. KADOWAKI T, YAMAUCHI T, KUBOTA N, HARA K, UEKI K, TOBE K (2006) "Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome". *J Clin Invest*, 116, 1784-1792.
110. GUZIK TJ, MANGALAT D, KORBUS R (2006) "Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function?" *J Physiol Pharmacol*, 57, 505-528.
111. STEJSKAL D, KARPÍSEK M, REUTOVÁ H, STEJSKAL P, KOTOLOVÁ H, KOLLÁR P (2008) "Determination of serum zinc-alpha-2-glycoprotein in patients with metabolic syndrome by a new ELISA". *Clin Biochem.*;41(4-5):313-6.
112. VÁZQUEZ-VELA ME, TORRES N AND TOVAR AR (2008) "White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity". *Arch Med Res.*;39(8):715-28.
113. SHAAT N, EKELUND M, LERNMARK A, IVARSSON S, NILSSON A, PERFEKT R, BERNTORP K, GROOP L (2004) "Genotypic and phenotypic differences between Arabian and Scandinavian women with gestational diabetes mellitus". *Diabetologia*; 47(5):878-84.
114. BABA H, ZHANG XJ, WOLFE RR (1995) "Glycerol gluconeogenesis in fasting humans". *Nutrition*;11(2):149-53.
115. LARGE V, REYNISDOTTIR S, LANGIN D *et al* (1999) "Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects". *J Lipid Res* 40:2059-2066.
116. MAIRAL A, LANGIN D, ARNER P, HOFFSTEDT J (2006) "Human adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is not regulated by obesity and exhibits low in vitro triglyceride hydrolase activity". *Diabetologia*;49(7):1629-36.

117. BERNDT J, KRALISCH S, KLÖTING N, RUSCHKE K, KERN M, FASSHAUER M, *et alii* (2008) "Adipose triglyceride lipase gene expression in human visceralobesity". *Exp Clin Endocrinol Diabetes*;116:203-10.
118. REYNISDOTTIR S, DAUZATS M, THÖRNE A, LANGIN D (1997) "Comparison of hormone-sensitive lipase activity in visceral and subcutaneous human adipose tissue". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:4162-4166.
119. MONTAGUE CT, PRINS JB, SANDERS L, ZHANG J, SEWTER CP, DIGBY J, BYRNE CD, O'RAHILLY S (1998) "Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes". *Diabetes* 47:1383-1391.
120. LEFEBVRE AM, LAVILLE M, VEGAS N, RIOU JP, VAN GAAL L, AUWERX J, VIDAL H (1998) "Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects". *Diabetes* 47:98-103.
121. RAY H, PINTEUR C, FRERING V, BEYLOT M, LARGE V (2009) "Depot-specific differences in perilipin and hormone-sensitive lipase expression in lean and obese". *Lipids Health Dis.*18;8:58.
122. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. "Standards of medical care in diabetes". *Diabetes Care* 2007;30:S4-S41.
123. MATSSON C, OLSSON T (2007) "Estrogens and glucocorticoid hormones in adipose tissue metabolism". *Curr Med Chem*;14:2918-24.
124. COPPACK SW, CHINKES DL, MILES JM, PATTERSON BW, KLEIN SA (2005) "A multicompartamental model of in vivo adipose tissue glycerol kinetics and capillary permeability in lean and obese humans". *Diabetes*; 54:1934-41.
125. ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM (1994) "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue". *Nature*;372(6505):425-32.
126. RUSSELL ST, TISDALE MJ (2009) "Antidiabetic Properties of Zinc- $\{\alpha\}2$ -Glycoprotein in ob/ob Mice". *Endocrinology*. [Epub ahead of print]
127. SELVA DM, LECUBE A, HERNÁNDEZ C, BAENA JA, FORT JM, SIMÓ R (2009) "Lower zinc-alpha2-glycoprotein production by adipose tissue and liver in obese patients unrelated to insulin resistance". *J Clin Endocrinol Metab*:4499-507.

128. MRACEK T, DING Q, TZANAVARI T, KOS K, PINKNEY J, WILDING J, TRAYHURN P, BING C (2009) "The adipokine zinc-alpha2-glycoprotein is downregulated with fat mass expansion in obesity". *Clin Endocrinol (Oxf)*. [Epub ahead of print]
129. HU G, JOUSILAHTI P, TUOMILEHTO J, ANTIKAINEN R, SUNDVALL J, SALOMAA V (2009) "Association of Serum C-Reactive Protein Level with Sex-Specific Type 2 Diabetes Risk: A Prospective Finnish Study". *J Clin Endocrinol Metab.*;94(6):2099-105.
130. RUSSELL ST, HIRAI K, TISDALE MJ (2002) "Role of beta3-adrenergic receptors in the action of a tumour lipid mobilizing factor". *Br J Cancer.*;86(3):424-8.
131. GOHDA T, MAKITA Y, SHIKE T, TANIMOTO M, FUNABIKI K, HORIKOSHI S, TOMINO Y (2003) "Identification of epistatic interaction involved in obesity using the KK/Ta mouse as a Type 2 diabetes model: is Zn-alpha2 glycoprotein-1 a candidate gene for obesity?" *Diabetes*;52(8):2175-81.
132. ZIMMERMANN R, STRAUSS JG, HAEMMERLE G, SCHOISWOHL G, BIRNERGRUENBERGER R, RIEDERER M, LASS A, NEUBERGER G, EISENHABER F, HERMETTER A, ZECHNER R (2004) "Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase". *Science* 306:1383-1386.
133. GONG FY, ZHANG SJ, DENG JY, ZHU HJ, PAN H, LI NS, SHI YF (2009) "Zinc-alpha2-glycoprotein is involved in regulation of body weight through inhibition of lipogenic enzymes in adipose tissue". *Int J Obes*;33(9):1023-30.

Índex

PREFACI	7
AGRAÏMENTS	11
ABREVIATURES	15
INTRODUCCIÓ	19
1. Obesitat i sobrepès	21
1.1. Definició	21
1.2 Prevalença	22
1.3 Patogènesi	23
1.4 Importància clínica	25
2. Resistència a la insulina, prediabetis i diabetis	27
3. Síndrome metabòlica	29
4. El teixit adipós	31
4.1 Anatomia	31
4.2 El teixit adipós blanc com a òrgan secretor	32
4.3 El teixit adipós blanc com a magatzem d'energia	33
4.4 Regulació de la lipòlisi en l'adipòcit	34
5. Les Aquaporines	37
5.1 La Família	37
5.2 Estructura molecular	39
5.3 Aquaporina 7: AQP7 o AQPap	41
5.3.1 El gen	41
5.3.2 La proteïna	42

5.3.3 Mutacions gèniques i anàlisis funcionals	43
5.3.4 Distribució tissular	44
5.3.5 Localització del teixit adipós	45
5.3.6 Regulació	46
5.3.7 L'AQP7 en el context de l'obesitat i la RI	48
5.4 Aquaporina 9: AQP9	52
5.4.1 Distribució tissular i funcionalitat	53
5.4.2 Regulació	54
5.5 Regulació i coordinació del canal de glicerol del teixit adipós (AQP7) i del fetge (AQP9)	54
6. Factors mobilitzadors de lípids: LMFs	57
6.1 Glicoproteïna Zinc- α 2: ZAG o AZGP1	59
6.1.1 El gen	59
6.1.2 La proteïna	59
6.1.3 Funcionalitat	60
6.1.4 ZAG com a nova adipoquina	63
6.1.5 Regulació	64
6.1.6 ZAG en el context de l'obesitat, la SM i la RI	66
HIPÒTESI I OBJECTIUS	69
Hipòtesi	71
Objectius	75
RESULTATS	77
Estudi 1	79
Estudi 2	89
Estudi 3	101
DISCUSSIÓ	113
CONCLUSIONS	133
REFERÈNCIES	137

L'obesitat incrementa les possibilitats de patir altres malalties com la diabetis mellitus tipus 2 (DM2), la dislipèmia i la hipertensió, entre d'altres. Per poder avançar en noves dianes terapèutiques que millorin aquestes malalties, és necessari conèixer millor la biologia del teixit adipós i els seus components. El teixit adipós blanc, a més a més d'emmagatzemar la major part de les reserves energètiques, és capaç de tenir activitat metabòlica i endocrina. Cal tenir en compte que un metabolisme lipídic adequat en l'adipòcit també és clau per aconseguir un equilibri en l'homeòstasi del metabolisme glucídic en l'ésser humà. En aquest treball hem analitzat el paper de dues proteïnes implicades en la lipòlisi del teixit adipós: d'una banda, el canal de glicerol aquaporina 7 (AQP7), i per altra, l'adipoquina glicoproteïna Zinc- α 2 (ZAG), en el context de l'obesitat, la síndrome metabòlica i la DM2.