

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ANGPTL8  
EN TEJIDO ADIPOSO HUMANO  
Y SU POSIBLE IMPLICACIÓN EN OBESIDAD

**TESIS DOCTORAL**

LEONARDO ANDRÉS CATALANO INIESTA

2018



VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA



## Listado de abreviaturas

<b>AGL</b>	Ácidos grasos libres
<b>AMPK</b>	Proteína quinasa activada por AMP
<b>ANGPTL</b>	Familia de proteínas similares a angiopoyetina
<b>ATGL</b>	Lipasa de triglicéridos adiposa
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>DM1</b>	Diabetes mellitus tipo 1
<b>DM2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>EIA</b>	Inmunoensayo enzimático
<b>GLUT4</b>	Transportador de glucosa tipo 4
<b>GPIHBP1</b>	Proteína de unión a lipoproteínas de alta densidad ancladas a glicosilfosfatidilinositol tipo 1
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad
<b>HOMA</b>	<i>Homeostatic model assessment</i>
<b>HSL</b>	Lipasa hormonosensible
<b>IDL</b>	Lipoproteínas de densidad intermedia
<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento similar a la insulina 1
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>IRS</b>	Sustrato del receptor insulínico
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>LPL</b>	Lipoproteína lipasa
<b>MAG</b>	Monoacilglicerol
<b>MAPK</b>	Proteínas quinasas activada por mitógenos
<b>MGL</b>	Lipasa monoacilglicerol
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A
<b>PKB</b>	Proteína quinasa B
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Receptores gamma activados por proliferadores peroxisomales
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>SSC</b>	Tampón citrato sódico
<b>TBS</b>	Tampón trizma base salino
<b>TAG</b>	Triacilglicerol
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muy baja densidad



# Índice

---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
Tejido adiposo	3
<i>Tejido adiposo marrón o multilocular</i>	6
<i>Tejido adiposo blanco o unilocular</i>	7
<i>Metabolismo lipídico</i>	10
<i>Tejido adiposo como órgano endocrino</i>	13
<i>Leptina</i>	13
<i>Adiponectina</i>	15
<i>Resistina</i>	15
<i>Interleucina-6</i>	16
<i>Factor de necrosis tumoral alfa</i>	17
<i>Obesidad</i>	18
<i>Epidemiología</i>	18
<i>Patogenia</i>	20
<i>Lipólisis</i>	23
<i>Lipotoxicidad</i>	25
Diabetes	26
Síndrome metabólico	28
ANGPTL8	30
<i>Miembros de las ANGPTL</i>	31
<i>Estructura</i>	34
<i>Expresión</i>	35
<i>Localización celular</i>	39
<i>Concentración plasmática</i>	39
<i>Receptor</i>	40
<i>Metabolismo lipídico</i>	40
<i>Metabolismo glucídico</i>	44
<i>ANGPTL como dianas terapéuticas</i>	50
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	51
Justificación	53
Objetivos	54

---

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	55
Aspectos generales	57
Pacientes incluidos en el estudio	58
Clasificación de los pacientes	59
Muestras	61
Variables clínicas	62
<i>Variables obtenidas en el Hospital Universitario de Salamanca</i>	62
<i>Variables calculadas</i>	63
Inmunoensayo enzimático	64
Inmunohistoquímica	66
Hibridación in-situ	70
Western blot	75
Lipólisis	80
Cultivos de explantes	84
Análisis estadístico	86
<b>RESULTADOS</b>	89
Caracterización de los pacientes incluidos en el estudio	91
Concentración plasmática de ANGPTL8 en pacientes obesos	94
Expresión de ANGPTL8 en tejido adiposo humano	96
Implicación de ANGPTL8 en el control del perfil lipídico	112
Homeostasis glucídica y ANGPTL8	125
<b>DISCUSIÓN</b>	139
Consideraciones iniciales	141
Concentración plasmática de ANGPTL8 en pacientes obesos	144
Expresión de ANGPTL8 en tejido adiposo humano	151
Implicación de ANGPTL8 en el control del perfil lipídico	157
Homeostasis glucídica y ANGPTL8	162
Consideraciones futuras	170
<b>CONCLUSIONES</b>	173
<b>ANEXOS</b>	177
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	183









# INTRODUCCIÓN



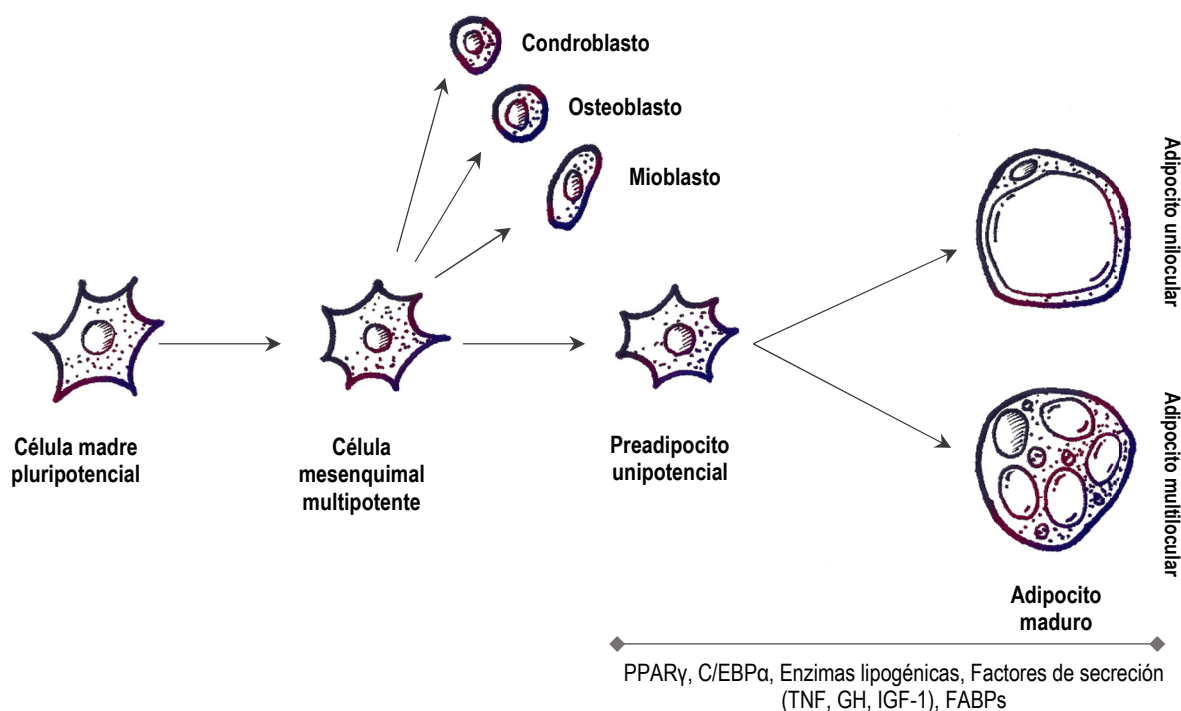
## 1. Tejido adiposo

El tejido adiposo es una forma de tejido conjuntivo, cuya función principal es el almacenamiento de energía. Está especializado en desempeñar labores de reserva energética tras la ingesta de alimentos en forma de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TAG). Por otro lado, en situaciones de ayuno o en ocasiones en la que el resto del organismo necesite energía, el tejido adiposo es capaz de liberar ácidos grasos y glicerol al torrente sanguíneo.

Su unidad fundamental es el adipocito. Su función principal ha determinado la estructura que este posee, el almacenamiento de lipoproteínas. La vacuola que contiene los lípidos forma la parte principal del citoplasma del adipocito.

Derivan de células precursoras fibroblásticas. Previo al estado de adipocito maduro, los fibroblastos pasan al estadio de preadipocito gracias a procesos de mitosis. En el camino de diferenciación, estas células se encuentran reguladas por numerosos genes que participan de este proceso. Entre ellos destacan el receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ) y la proteína alfa potenciadora de la unión a la secuencia citosina-citosina-adenosina-adenosina-timidina (C/EBP $\alpha$ ) (figura 1) (MacDougald y Lane, 1995; Soukas, Socci, Saatkamp, Novelli y Friedman, 2001). Los adipocitos maduros pierden la capacidad de división. Sin embargo, en ocasiones podemos encontrar preadipocitos en individuos adultos. La finalidad de este hecho es la posibilidad de recambio celular.

El número de adipocitos se mantiene estable en el adulto. Sin embargo, a lo largo de la vida del individuo, el tejido adiposo puede verse sometido a procesos de hiperplasia e hipertrofia. Los factores involucrados son tanto genéticos como los relacionados con la dieta, manteniendo una



**Figura 1.** Diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros, gracias a la actuación de diferentes factores que posibilitan su desarrollo. Entre ellos encontramos el receptor gamma activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ); la proteína alfa potenciadora de unión a CCAAT (C/EBP $\alpha$ ); enzimas lipogénicas; diferentes factores de secreción como el factor de necrosis tumoral (TNF), hormona de crecimiento (GH), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1); y las proteínas de unión a ácidos grasos libres (FABPs).

estrecha relación entre ambos. Estos procesos aparecen a lo largo del desarrollo normal del tejido, pero la pérdida de equilibrio de éstos en estadios maduros desencadena la aparición de obesidad (Jo et al., 2009). La hiperplasia tisular está relacionada principalmente con factores genéticos involucrados en el aumento del número de preadipocitos como también en el incremento de la diferenciación de preadipocito a adipocito maduro. Entre ellos se encuentran el factor de necrosis tumoral (TNF), la hormona de crecimiento (GH) y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) (Gregoire, Smas y Sul, 1998). El volumen del tejido adiposo como tal se ve modificado por la cantidad de TAG que almacenan sus adipocitos. Cuando el individuo está sometido a una ingesta abundante de alimentos,

el exceso de energía es almacenada en los adipocitos en forma de TAG provocando su hipertrofia (Drolet et al., 2008).

El correcto desarrollo del tejido adiposo depende del equilibrio entre la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos. En humanos, la aparición del tejido subcutáneo se centra entre las semanas 14 y 24 de gestación. Se observa un aumento del número de adipocitos (hiperplasia), los cuales se extienden desde la cabeza y cuello, hasta el tronco y las extremidades. En torno a la 28 semana de gestación son abundantes los procesos de hipertrofia de los adipocitos, aumentando así los depósitos lipídicos del feto (Poissonnet, Burdi y Garn, 1984). Tras el nacimiento, durante aproximadamente un año, la hiperplasia e hipertrofia son muy activas. Después de este periodo, el número de adipocitos se mantiene estable hasta la adolescencia, en donde se observa nuevamente una hiperplasia en adipocitos (Knittle, Timmers, Ginsberg-Fellner, Brown y Katz, 1979). En relación con el tejido adiposo visceral, no se tiene abundante información de su desarrollo, sin embargo, se sabe que normalmente comienza a proliferar después del nacimiento, y que durante la adolescencia sus depósitos aumentan (Siegel, Hildebolt, Bae, Hong y White, 2007).

A lo largo de la vida adulta del individuo existe cierta renovación celular que mantiene el correcto funcionamiento del tejido adiposo. Aproximadamente el 10% de adipocitos se renuevan por año, gracias a la presencia de células mesenquimales u otros precursores celulares, los cuales se diferenciarán para obtener preadipocitos (Spalding et al., 2008).

Desde hace unos años, el tejido adiposo es considerado como un elemento importante del sistema endocrino debido a la gran cantidad de hormonas y citocinas que produce, ya sea para secretarlas a la circulación provocando un efecto endocrino, como también para actuar sobre la propia

célula productora o sobre células circundantes, ejerciendo así efectos autocrinos y paracrinos, respectivamente.

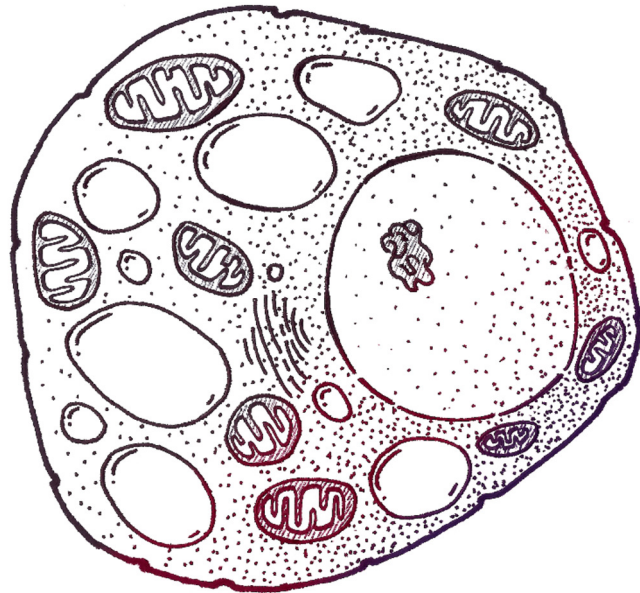
Los adipocitos son capaces de secretar factores de regulación a la circulación, y éstos a su vez, se ven afectados por diferentes proteínas provenientes del sistema nervioso y endocrino. Por un lado, proteínas como el glucagón, cortisol y adrenalina, actúan sobre el adipocito favoreciendo la degradación lipídica. Por otro lado, la insulina es capaz de disminuir la lipólisis. Las principales hormonas secretadas por los adipocitos son la leptina, adiponectina y resistina (Sethi y Vidal-Puig, 2007).

Podemos diferenciar dos tipos de tejido adiposo atendiendo a los adipocitos que lo forman, tejido adiposo marrón o multilocular y tejido adiposo blanco o unilocular.

## **1.1. Tejido adiposo marrón o multilocular**

Este tejido está caracterizado por células que poseen numerosas vacuolas lipídicas cuando son adipocitos maduros. Su núcleo no suele aparecer en el centro del citoplasma, pero tampoco se ubica muy cercano a la membrana plasmática, como en el caso de los adipocitos del tejido adiposo blanco. Las mitocondrias son numerosas y se disponen agrupadas en su citoplasma. El resto de organelas no están tan desarrolladas, e incluso su retículo endoplásmico rugoso prácticamente está ausente (figura 2). Estos adipocitos se agrupan formando lobulillos separados por tejido conjuntivo. El nombre de tejido adiposo marrón deriva de su color característico dado por las altas concentraciones de citocromos y por estar irrigado por abundantes vasos. La principal función de este tejido es la producción de calor gracias a la degradación de TAG y a la oxidación de ácidos grasos libres (AGL) (Saely, Geiger y Drexel, 2012). La presencia de este tipo de tejido en el ser humano tiene importancia sobre todo en las etapas de desarrollo, ya sea en estadios fetales como neonatales. Se

**Figura 2.** Adipocito pardo. Se caracteriza por presentar numerosas vacuolas de contenido lipídico, acompañadas de una gran cantidad de mitocondrias. La alta concentración de citocromos otorga a este tipo de células el nombre de adipocitos marrones o pardos.



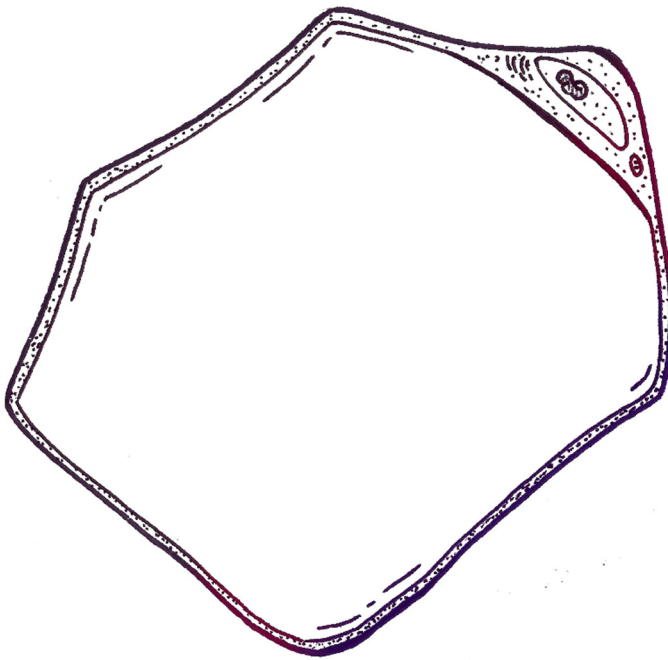
localiza en axilas, región cervical, perirrenal y periadrenal principalmente (Cannon y Nedergaard, 2004). El volumen del tejido adiposo marrón va disminuyendo a medida que el individuo crece, teniendo importancia en personas expuestas a climas con temperaturas muy bajas (Huttunen, Hirvonen y Kinnula, 1981) o en patologías como el feocromocitoma (English, Patel y Flanagan, 1973). Sin embargo, se han encontrados depósitos de tejido adiposo marrón en humanos adultos, detectándose como áreas de actividad metabólica (Nedergaard, Bengtsson y Cannon, 2007).

## 1.2. Tejido adiposo blanco o unilocular

La principal función del tejido adiposo blanco es la de almacenamiento energético en situación de ingesta alimenticia, y la de liberarla cuando aparezcan necesidades energéticas. En este tejido los adipocitos se agrupan tanto que a veces adquieren formas hexagonales. Esta estructura es mantenida por fibras de tejido conectivo. Es un tejido muy vascularizado, ya que cada adipocito está en contacto con al menos

un capilar. En el lado luminal del endotelio capilar se encuentra la lipoproteína lipasa (LPL) encargada de la hidrólisis de TAG.

Su unidad estructural es el adipocito unilocular que posee una vesícula lipídica que ocupa prácticamente la totalidad del citoplasma celular (figura 3) (Ohsaki et al., 2009). De ahí que sea considerado como tejido adiposo blanco. En ocasiones, tras una ingesta abundante de carotenoides, el tejido puede pasar a ser amarillo.



**Figura 3.** Adipocito blanco. La principal característica de este tipo de células es su gran vacuola lipídica, que ocupa prácticamente la totalidad del citoplasma.

El tamaño de los adipocitos varía dependiendo de la carga lipídica que posean, con un diámetro que va desde las 30 $\mu$ m hasta las 130 $\mu$ m (Skurk, Alberti-Huber, Herder y Hauner, 2007). Puede que esa vesícula se origine entre las membranas de las cisternas del retículo endoplasmático rugoso y que por estrangulamiento pase al citoplasma. Las mitocondrias y caveolas se localizan en la periferia citoplasmática, y desempeñan funciones de captación y excreción de los componentes de los triglicéridos. Uno de los responsables del mantenimiento de la disposición espacial de



los adipocitos es la presencia de fibras de colágeno tipo III en la superficie celular.

En mamíferos y aves, el tejido adiposo blanco se localiza dentro del abdomen o en el tejido subcutáneo. Podemos encontrarlo en otras regiones como el espacio retro orbital, en la cara, extremidades y en la médula ósea. Sin embargo, a medida que los individuos van envejeciendo, los depósitos de grasa se localizan a nivel intra abdominal por encima del resto de regiones (Gesta, Tseng y Kahn, 2007).

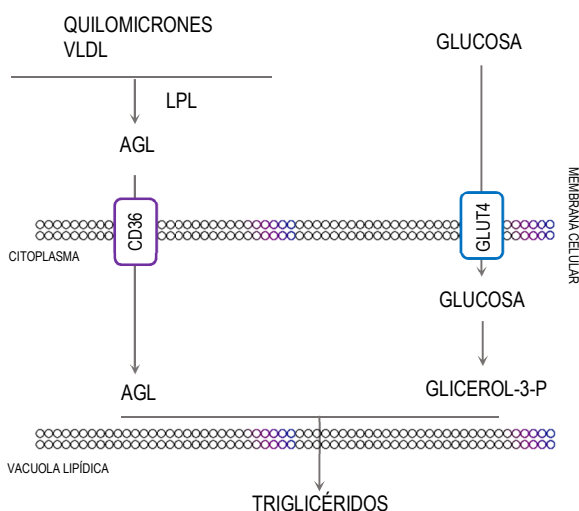
Se pueden identificar dos tipos de tejido adiposo blanco teniendo en cuenta su localización, el visceral y el subcutáneo. El tejido adiposo visceral está representado por los depósitos omentales en humanos, y perigonadales en roedores; mientras que el subcutáneo está caracterizado por depósitos en regiones abdominales, glúteas y femorales en humanos, y en roedores en zonas inguinales. El desequilibrio entre la distribución de los depósitos energéticos entre las diferentes regiones desencadena patologías metabólicas como la obesidad.

La distribución del almacenamiento de lípidos está relacionada con el sexo. En hombres observamos principalmente depósitos lipídicos a nivel del abdomen, o distribución central dando el fenotipo conocido como manzana o depósitos androides. El almacenamiento en mujeres es, sobre todo, en el tejido subcutáneo en regiones inferiores del cuerpo, dando el fenotipo de pera o depósitos ginoides (Demerath et al., 2007; White y Tchoukalova, 2014).

### 1.3. Metabolismo lipídico

El tejido adiposo blanco se ocupa de dos grandes procesos metabólicos relacionados con el almacenamiento y dispensación energética: lipogénesis y lipólisis. El equilibrio entre ellos está bajo la influencia de los sistemas nervioso y endocrino (Proenca et al., 2014).

La lipogénesis se encarga de procesos de síntesis de TAG y su almacenamiento en los adipocitos. Los AGL penetran en las células de la mucosa intestinal tras la ingesta de alimentos. La principal forma de almacenaje de estas moléculas es mediante la formación de TAG, miembros de la familia de los lípidos. La síntesis de TAG se produce principalmente a nivel del retículo endoplasmático en células del hígado y del tejido adiposo. Esencialmente, tres ácidos grasos se acoplan a una molécula de glicerol. Sus tres grupos hidroxilo son esterificados por estos ácidos grasos, que pueden ser del mismo tipo o ácidos grasos diferentes. Estas moléculas no son solubles en agua por lo que deben utilizar transportadores para llegar a diferentes tejidos del organismo, formando así macromoléculas conocidas como lipoproteínas (figura 4).



**Figura 4.** Lipogénesis. Proceso encargado de la obtención de triglicéridos a partir de ácidos grasos libre y glucosa. AGL: ácidos grasos libres; CD36: clúster de diferenciación 36, proteína de membrana que participa en la absorción de ácidos grasos; GLUT4: transportador de glucosa tipo 4; LPL: lipoproteína lipasa; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

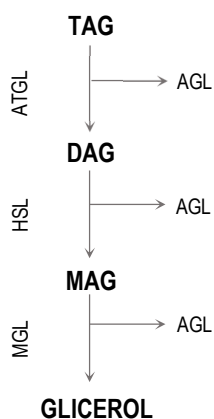
La lipogénesis aumenta en periodos prolongados de abundante ingesta calórica. Este hecho puede desencadenar procesos de hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo dando lugar a obesidad (Guyenet y Schwartz, 2012).

Las lipoproteínas son moléculas de gran tamaño, de forma esférica e hidrosolubles. Existen diferentes tipos de lipoproteínas que, atendiendo a la cantidad de lípidos y proteínas que la forman, se clasifican según su movilidad electroforética en: quilomicrones, transportan triglicéridos por el torrente sanguíneo desde el intestino delgado, son las de menor densidad y las de mayor tamaño; lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, "*very low-density lipoprotein*"), compuestas por triglicéridos, ésteres de colesterol y fosfolípidos, tienen una densidad mayor que los quilomicrones; lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, "*intermediate density lipoprotein*"), con semivida plasmática corta y concentraciones plasmáticas habitualmente bajas; lipoproteínas de baja densidad (LDL, "*low-density lipoprotein*"), cuyo principal contenido es el colesterol que transportan hacia otros tejidos; lipoproteínas de alta densidad (HDL, "*high-density lipoprotein*"), que se encargan de transportar el colesterol desde los diferentes tejidos hacia el hígado y son las lipoproteínas más pequeñas pero con mayor densidad electroforética.

La LPL es responsable de la obtención de TAG a partir de quilomicrones y VLDL. Se sintetiza sobre todo en músculo, tanto esquelético como cardíaco, y en el tejido adiposo. Después de su síntesis, esta enzima se dirigirá a la superficie luminal de las células endoteliales donde desempeñará su acción fisiológica (Goldberg y Merkel, 2001).

Al contrario que la lipogénesis, la lipólisis es un proceso encargado de poner a disposición de las células la energía reservada en los adipocitos en forma de TAG. En periodos de ayuno, de estrés o de ejercicio físico se

obtienen ácidos grasos a partir de TAG gracias a la presencia de diferentes enzimas ancladas en la capa endotelial de los capilares (figura 5) (Bolsoni-Lopes y Alonso-Vale, 2015).



**Figura 5.** Lipólisis. Proceso metabólico por el cual se forman ácidos grasos libres a partir de la hidrólisis de triglicéridos, actuando diferentes enzimas que, al final de la reacción, dan lugar a glicerol. AGL: ácidos grasos libres; DAG: diacilglicerol; ATGL: lipasa adiposa de triglicéridos; MGL: lipasa monoacilglicerol; HSL: lipasa hormono-sensible; MAG: monoacilglicerol; TAG: triacilglicerol.

Básicamente, la lipólisis consiste en la hidrólisis de TAG, para obtener moléculas de glicerol y tres ácidos grasos gracias a la presencia de tres enzimas responsables de dicha reacción: la lipasa de triglicéridos adiposa (ATGL, “*adipose triglyceride lipase*”), la lipasa hormono-sensible (HSL, “*hormone-sensitive lipase*”) y la lipasa monoacilglicerol (MGL, “*monoacylglycerol lipase*”). En un primer momento los TAG son hidrolizados a diacilglicéridos (DAG) y una molécula de ácido graso, bajo la acción de ATGL. Posteriormente, por acción de HSL se obtiene monoacilglicerol (MAG) y otra molécula de ácido graso a partir del DAG. Finalmente, la hidrólisis del MAG produce la tercera molécula de ácido graso y una molécula de glicerol por acción de MGL (Lafontan y Langin, 2009). En situaciones basales, ATGL se localiza en la superficie de la vacuola lipídica, mientras que HSL aparece principalmente en el citoplasma (Bezair y Langin, 2009).

Atendiendo al metabolismo lipídico, se pueden observar diferencias teniendo en cuenta la localización del tejido adiposo blanco (Wajchenberg, 2000). Las catecolaminas tienen un papel principalmente lipolítico y los

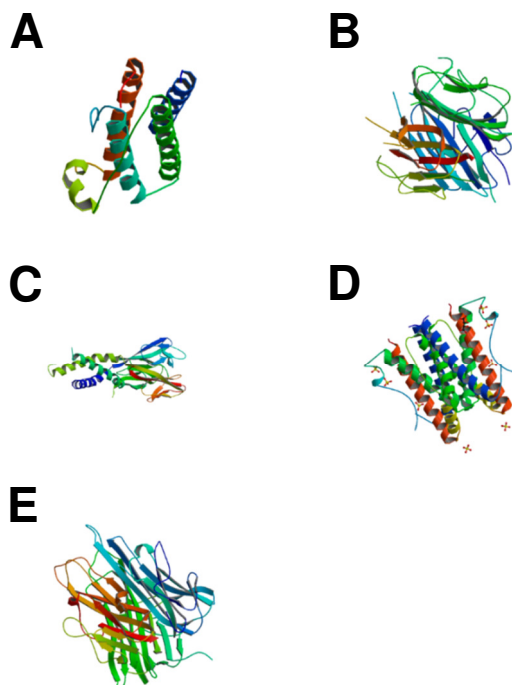
efectos inhibidores de la lipólisis de la insulina no son tan evidentes en esta región, entendiéndose que el tejido adiposo visceral desempeñará sobre todo actividades lipolíticas (Ibrahim, 2010).

## **1.4. Tejido adiposo como órgano endocrino**

Inicialmente, el tejido adiposo fue considerado como una estructura de almacenaje energético. Sin embargo, con la caracterización de la primera citoquina derivada del adipocito relacionada con la acumulación de lípidos en el tejido adiposo y con el peso, la leptina, esta idea cambió (Y. Zhang et al., 1994). Desde ese momento, se comenzaron a identificar otros elementos secretados por el tejido adiposo, péptidos agrupados en el concepto de adipoquinas. Este hecho marcó el punto de partida del estudio del tejido adiposo como un importante supervisor de la homeostasia energética del organismo (Rondinone, 2006). En la figura 6, y en los siguientes apartados, se muestran algunas de las principales adipoquinas sintetizadas por el tejido adiposo blanco.

### **1.4.1. Leptina**

Una de las principales hormonas polipeptídicas producidas por los adipocitos es la leptina (figura 6A). Esta hormona está formada por 167 aminoácidos, y su estructura terciaria consiste en cuatro alfa-hélices, conectadas por dos enlaces cruzados largos y un bucle corto, acompañadas de un pequeño fragmento helicoidal retorcido (F. Zhang, Chen, Heiman y Dimarchi, 2005). Participa en la regulación del apetito, actuando a través de la activación de la forma larga de su receptor a nivel del núcleo arcuato del hipotálamo. Su acción se centra en las neuronas que expresan proopiomelanocortina, proyectando a otras regiones, como el núcleo paraventricular hipotalámico (Munzberg, Flier y Bjorbaek, 2004). La proopiomelanocortina es considerada precursora de otras hormonas polipeptídicas relacionadas con el control de la ingesta (Elmqvist, Coppari,



**Figura 6.** Adipoquinas, proteínas secretadas específicamente por el tejido adiposo blanco con una gran variedad de funciones relacionadas con el control del metabolismo energético del organismo. En esta figura se representan las estructuras de algunas de estas proteínas, obtenidas a partir estudios cristalográficos. Las imágenes fueron obtenidas desde el banco de datos de proteínas RCSB (Berman et al., 2000). **A:** *Leptina*, PDB ID 1AX8 (F. Zhang et al., 1997); **B:** *Adiponectina*, PDB ID 1C28 (Shapiro y Scherer, 1998); **C:** *Resistina*, PDB ID 1RGX (S. D. Patel, Rajala, Rossetti, Scherer y Shapiro, 2004); **D:** *Interleucina 6*, PDB ID 1ALU (Somers, Stahl y Seehra, 1997); **E:** *Factor de necrosis tumoral alfa*, PDB ID 1TNF (Eck y Sprang, 1989).

Balthasar, Ichinose y Lowell, 2005; Morton, Cummings, Baskin, Barsh y Schwartz, 2006).

Es capaz de estimular la ingesta de alimentos en situaciones de necesidad energética, inhibir la sensación de hambre cuando la ingesta es abundante (Pelleymounter et al., 1995) y estimular la oxidación de ácidos grasos a nivel periférico (Minokoshi et al., 2002). En condiciones fisiológicas, los niveles séricos de leptina están relacionados con el tamaño de los adipocitos. Cuando los niveles aumentan, el contenido lipídico de los adipocitos lo hace también (Hube et al., 1996; Van Harmelen et al., 1998).

### 1.4.2. Adiponectina

Otra adipocina con gran importancia a nivel fisiológico es la adiponectina (figura 6B). Consta de una cadena de 244 aminoácidos. Actúa sobre dos receptores específicos, AdipoR1 y AdipoR2, los cuales estimulan la cascada de la proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK) (Berg, Combs y Scherer, 2002). Esta vía de señalización está relacionada con diferentes procesos asociados a la atenuación de la aparición de obesidad, aumentando la oxidación de ácidos grasos en el músculo (Fruebis et al., 2001; Yang et al., 2001) y, presumiblemente, evitaría el desarrollo de diabetes mellitus (DM) activando procesos anti-inflamatorios o reduciendo los niveles de AGL y TAG que afectan la sensibilidad a la insulina (Yamauchi et al., 2001). Además, existe evidencia de la importancia directa de la presencia de adiponectina en relación con la acción de insulina a través del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) (Abel et al., 2001).

Los receptores de adiponectina se localizan en regiones relevantes para desempeñar sus funciones metabólicas. AdipoR1 se expresa principalmente a nivel del músculo esquelético, así como también en las células endoteliales; mientras que AdipoR2 predomina en el hígado (Kadowaki et al., 2006).

### 1.4.3. Resistina

Resistina es una proteína rica en cisteína (figura 6C). Se expresa en tejido adiposo blanco de roedores, e inicialmente se le otorgó importancia en la etiología de obesidad y en la resistencia de insulina (Steppan et al, 2001). Sin embargo, la presencia de esta proteína en tejido adiposo humano es prácticamente nula. El rol principal de la resistina en el ser humano radica en su acción anti-inflamatoria debido a que se expresa sobre todo en macrófagos (L. Patel et al., 2003).

La expresión de resistina en roedores se modifica según la ingesta de alimentos. El ayuno provoca una caída en la expresión de esta proteína, mientras que aumenta tras la ingesta; y durante la obesidad, sus niveles plasmáticos están por encima de lo normal, acompañados de hiperglucemia y resistencia insulínica periférica (Steppan et al., 2001).

Tanto la obesidad como la DM están asociadas a procesos inflamatorios crónicos. La presencia de resistina en macrófagos, como la modificación de sus niveles plasmáticos en individuos con estas patologías, podría indicar que esta proteína podría estar implicada en la etiología o patogenia de estas enfermedades (Park y Ahima, 2013).

#### **1.4.4. Interleucina-6**

Interleucina-6 es una glucoproteína involucrada en la regulación de procesos inflamatorios, así como también en el metabolismo lipídico (figura 6D). Se expresa en muchos tipos celulares como células endoteliales, fibroblastos, osteoblastos, miocitos, adipocitos, células  $\beta$  pancreáticas, entre otros (Van Snick, 1990).

Una parte de la interleucina-6 plasmática es producida en los adipocitos, siendo mayor su producción en el tejido adiposo visceral que en el subcutáneo (Fried, Bunkin y Greenberg, 1998). La activación de su receptor desencadena la activación de dos vías de señalización con gran importancia biológica. Por un lado, la cascada de las janus quinasas y los transductores de señal y activadores de la transcripción (JAK/STAT); por otra parte, la vía de señalización de las proteínas quinasas activada por mitógenos (MAPK) (Heinrich et al., 2003).

Existe una estrecha relación entre los niveles plasmáticos de interleucina-6 y obesidad, por un lado, porque esta citoquina es capaz de producirse y secretarse al torrente sanguíneo desde el tejido adiposo (Fried et al., 1998). Pero, además, se han relacionado aumentos de producción



de interleucina-6 en este tejido en pacientes con obesidad, relacionándola con el control del metabolismo lipídico (Mohamed-Ali et al., 1997; Bastard et al., 2000). A parte de las funciones anteriores, parece que interleucina-6 actúa también a nivel del propio tejido adiposo de una forma paracrina, controlando así el desarrollo de los adipocitos y su tamaño (Sopasakis et al., 2004).

#### **1.4.5. Factor de necrosis tumoral alfa**

Dentro del grupo de adipoquinas podemos encontrar al factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (figura 6E). El tejido adiposo es capaz de producir esta proteína, tanto en tejido subcutáneo como visceral, siendo mayor la producción en el primero (Montague et al., 1998; Fain, Madan, Hiler, Cheema y Bahouth, 2004). La señalización intracelular del TNF $\alpha$  está mediada por dos de sus receptores, I y II, presentes en el tejido adiposo.

Se han estudiado sus efectos sobre el metabolismo energético. Uno de los papeles otorgados a esta proteína es el aumento de AGL en el plasma, indicando un aumento de la lipólisis (Feingold et al., 1989; Ruan et al., 2002) y un incremento de la lipogénesis hepática (Feingold y Grunfeld, 1987). Es probable que esta adipoquina esté involucrada en el desarrollo de resistencia a insulina y captación de glucosa durante la obesidad (Hotamisligil, Shargill y Spiegelman, 1993), tanto por fosforilar los residuos séricos de los sustratos del receptor de insulina, como por afectar a la expresión de GLUT4 (Hotamisligil, 2003).

Sin embargo, algunos autores defienden que el tejido adiposo subcutáneo humano no es capaz por si solo de liberar cantidades suficientes de TNF $\alpha$  como para afectar directamente a la sensibilidad de las células periféricas a la insulina (Mohamed-Ali, 1997).

## 1.5. Obesidad

### 1.5.1. Epidemiología

El primer punto que debemos tener en cuenta a la hora de entender la obesidad es que es una patología multifactorial. El individuo se encuentra influenciado, de manera externa como interna, por diferentes elementos que afectan al equilibrio energético. Además, generalmente se asocia con otras patologías metabólicas que empeoran la calidad de vida de la persona.

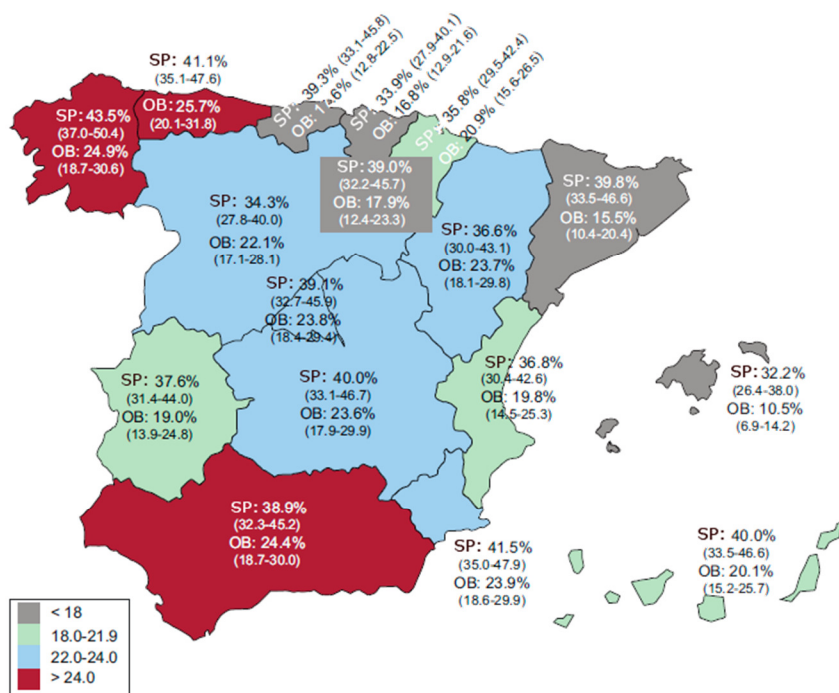
Un aumento de ingesta de alimentos, acompañado de un estilo de vida sedentario, propicia la aparición de obesidad. La alarma social que esto genera en los países desarrollados ha obligado al diseño de campañas dirigidas a la modificación de los estilos de vida, para mejorar la calidad de la alimentación y fomentar el ejercicio físico. Estas estrategias han sido desarrolladas debido a la necesidad que genera el hecho de que esta patología se ha convertido en una epidemia mundial que afecta alrededor de 500 millones de adultos y 40 millones de niños. La importancia de su control radica en la gravedad que supone su aparición, aumentando la probabilidad de mortalidad de los individuos obesos relacionada con afectaciones a nivel cardiovascular, endocrino e incluso con el aumento del índice de patologías oncológicas (Kitahara et al., 2014).

Alrededor de 2,8 millones de personas mueren como resultado de complicaciones relacionadas con el sobrepeso y la obesidad. Uno de los datos más preocupantes es que en la región oriental mediterránea de Europa y en América el 50% de las mujeres presentan sobrepeso, siendo la mitad de estas aproximadamente obesas. Alrededor del 5% de las muertes están relacionadas con el sobrepeso y la obesidad como factores de riesgo en estas zonas (WHO, 2011).

La obesidad está estrechamente relacionada con otras patologías con gran importancia a nivel mundial por la morbimortalidad que generan, como la hipertensión, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina y afecciones cardíacas. El riesgo de enfermedades cardíacas, de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y de episodios isquémicos aumenta de manera similar al aumento del índice de masa corporal (IMC) (WHO, 2002).

En las últimas décadas se comenzó a observar un aumento de la prevalencia de obesidad infantil. Los niños con sobrepeso y obesidad tienden a padecer desequilibrios metabólicos en edad adulta, aumentando el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y DM2 (Kelsey, Zaepfel, Bjornstad y Nadeau, 2014). Los últimos informes estiman que, en 2014, 41 millones de niños menores de 5 años tenían sobrepeso en todo el mundo centrándose sobre todo en países desarrollados. De mantenerse este aumento, se piensa que en 2025 la cifra ascenderá a 70 millones de lactantes y niños con sobrepeso (WHO, 2016).

En España, la prevalencia de obesidad no presenta modificaciones con respecto a la mundial. Alarmantemente, los casos de sobrepeso y obesidad están aumentando. Según el estudio ENPE, las comunidades autónomas con una mayor prevalencia de obesidad son el Principado de Asturias, Galicia y Andalucía, seguido de Murcia (figura 7). La prevalencia de obesidad es mayor en mujeres que en hombres, y aumenta con la edad (Aranceta-Bartrina, Serra-Majem, Foz-Sala, Moreno-Esteban y Grupo Colaborativo SEEDO, 2005; Aranceta-Bartrina, Perez-Rodrigo, Alberdi-Aresti, Ramos-Carrera y Lazaro-Masedo, 2016).



**Figura 7.** Prevalencia de obesidad en población adulta (entre 25 y 65 años) de España. El grado de obesidad se determina según IMC; entre paréntesis se expresa el intervalo de confianza del 95%. SP: sobrepeso; OB: obesidad. Imagen modificada de: *Prevalence of General Obesity and Abdominal Obesity in the Spanish Adult Population (Aged 25–64 Years) 2014–2015: The ENPE Study* (Aranceta-Bartrina et al., 2016).

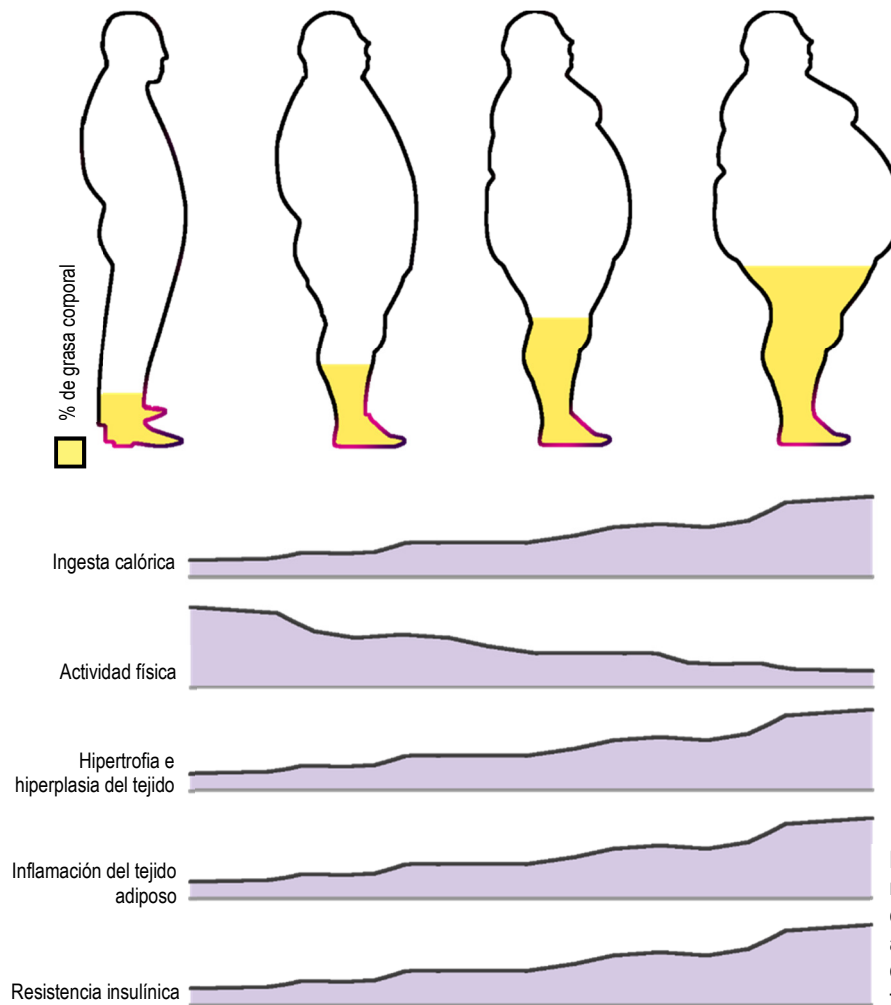
### 1.5.2. Patogenia

La etiología múltiple de la obesidad obliga a abordar esta patología desde todas las perspectivas posibles. El aumento de la ingesta de alimentos puede estar relacionado con un incremento de la predisposición de los individuos por alteraciones a nivel genético. Los cambios en el comportamiento asociados a estas modificaciones propician a adquirir malos hábitos alimenticios, los cuales desencadenarán procesos de hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo, apareciendo así trastornos a nivel del metabolismo energético (Farooqi y O’Rahilly, 2006). La expresión de ciertos genes involucrados en la adipogénesis se encuentra deteriorada en la obesidad, como es el caso de los genes implicados en la producción del receptor gamma activados por proliferadores de peroxisomas de tipo 2 (PPAR $\gamma$ 2), la proteína de anclaje de los ácidos grasos 4 (FABP4), la proteína unida al elemento regulador de estero 1c (SREBP1c), el receptor de muerte de la superficie celular Fas (FAS). Además, han sido implicados en la acumulación ectópica de lípidos, la resistencia a la insulina y en el desarrollo de DM2 (Dubois et al., 2006).

El sistema nervioso, más concretamente el hipotálamo, es el encargado del control del metabolismo energético. El consumo de dietas con alto contenido en grasas, así como también la infusión de lípidos en roedores, son capaces de activar vías de señalización inflamatorias en el hipocampo, que desencadenan un aumento de la ingesta de alimentos con la consiguiente acumulación de todo el exceso energético que no pueda ser metabolizado por el organismo (Thaler y Schwartz, 2010). En estos casos el aumento de AGL ocasiona un aumento tanto de la resistencia a la insulina como de la leptina a nivel del sistema nervioso central (figura 8) (X. Zhang et al., 2008).

El aumento de la masa del tejido adiposo subcutáneo y visceral determina el estado de obesidad. La expansión del tejido adiposo aparece como resultado de la superación de la capacidad de almacenamiento ante una ingesta abundante. Dentro de los procesos involucrados en el aumento del volumen de este tejido, el que tiene mayor importancia es el aumento del almacenamiento lipídico en los adipocitos o hipertrofia (Hirsch y Batchelor, 1976). El número de adipocitos se mantiene relativamente estable a lo largo de la vida adulta. Sin embargo, se pueden desencadenar procesos proliferativos tras el aumento de lípidos almacenados en el adipocito, que ocasionen un incremento del número de células (Spalding et al., 2008).

Los procesos inflamatorios son una respuesta biológica a episodios de daño tisular. El tejido adiposo posee macrófagos encargados del mantenimiento de la supervivencia celular, eliminando los desechos derivados de procesos apoptóticos, regulando la angiogénesis y remodelando la matriz extracelular que acompaña a los adipocitos (Chawla, Nguyen y Goh, 2011; Wernstedt Asterholm et al., 2014). El número de macrófagos en los depósitos de grasa visceral aumenta en ratones obesos, llegando a superar el 40-50% del total de células del estroma vascular en



**Figura 8.** Esquema representativo de los procesos que se desencadenan tras el aumento de la ingesta calórica y del descenso de la actividad física.

comparación a un 15% observado en los controles (Weisberg et al., 2003). El aumento del volumen del tejido adiposo subcutáneo, a consecuencia de procesos hipertróficos como hiperplásicos, está relacionado con un incremento de la fibrosis tisular, de la infiltración y activación de los macrófagos, y con una alteración de la producción y secreción de las adipoquinas.

Uno de los principales componentes de la inflamación en el tejido adiposo es el aumento de la expresión de TNF $\alpha$ . Esta adipoquina está relacionada con procesos de adipogénesis, actuando como una potente inhibidora de la diferenciación de los preadipocitos y como activadora de

las vías de señalización importantes para los procesos de diferenciación (Gustafson et al., 2009).

La activación de los mecanismos proinflamatorios desencadena una modificación de la expresión de adipoquinas (interleucina-6, interleucina-8, proteína quimioatrayente de monocitos 1, TNF $\alpha$ ), incrementando su producción a nivel local. Junto con el aumento del reclutamiento de macrófagos, este hecho promueve la inflamación crónica del tejido adiposo, el aumento de la lipólisis, la reducción de la expresión de adiponectina y un aumento de la resistencia a la insulina producido por una disminución de la expresión del sustrato del receptor insulínico (IRS) o de GLUT4 (Gustafson, Hammarstedt, Andersson y Smith, 2007).

### **1.5.3. Lipólisis**

Normalmente, la concentración plasmática de ácidos grasos no esterificados está aumentada en individuos obesos. Es probable que sea debido por alteraciones a nivel del control de la hidrólisis de TAG, o a problemas en la captación de estas moléculas por parte de los adipocitos para su almacenamiento (Lafontan y Langin, 2009).

El sistema nervioso simpático es el principal responsable de la movilización de lípidos en el tejido adiposo. Dentro de este sistema, las catecolaminas cumplen un papel importante en el control de la lipólisis, estimulándola a través de los adrenoceptores  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2, o inhibiéndola mediante los receptores adrenérgicos  $\alpha$ 2. Por otra parte, la insulina y la adenosina poseen un gran poder inhibitorio frente a la hidrólisis de TAG (Lafontan y Langin, 2009; Morigny, Houssier, Mouisel y Langin, 2016).

Toda la maquinaria responsable del control de la lipólisis se encuentra deteriorada en las personas obesas. Por un lado, la expresión de los receptores  $\beta$  adrenérgicos está reducida en el tejido adiposo subcutáneo, mientras que se incrementa el número de receptores  $\alpha$ 2

adrenérgicos. A lo largo del desarrollo de la obesidad, esta situación favorece a la resistencia a la acción adrenérgica promoviendo el mantenimiento de la situación de obesidad. Este descenso de la actividad lipolítica a nivel del tejido adiposo subcutáneo podría ser considerado como un mecanismo adaptativo al aumento de la lipólisis total mitigando los efectos del aumento de la lipotoxicidad. Al analizar la respuesta a las catecolaminas en el tejido adiposo visceral se observa lo contrario, un aumento en la expresión de receptores  $\beta$  y un descenso de los adrenoreceptores  $\alpha 2$  (Lafontan y Langin, 2009).

La expresión de una de las enzimas involucradas en la hidrólisis de TAG, HSL, se encuentra reducida en el tejido adiposo subcutáneo de individuos obesos e incluso en pacientes con DM2 (Berndt et al., 2008). Este hecho acompaña a los datos observados respecto al aumento de la acción antilipolítica de las catecolaminas en este tejido.

En conjunto, el fallo de la actividad lipolítica de las catecolaminas podría ser uno de los causantes del aumento de los depósitos lipídicos de individuos con sobrepeso y obesos. El aumento de la acumulación de TAG en los adipocitos provoca una mayor expresión y liberación del TNF $\alpha$ , acompañado de modificaciones de múltiples vías de señalización que activan las enzimas relacionadas con la hidrólisis de TAG, incrementando la lipólisis. Una mayor concentración plasmática de AGL interfiere en el correcto funcionamiento metabólico de las células musculares esqueléticas, provocando resistencia a la acción de la insulina (Arner y Langin, 2014).



#### 1.5.4. Lipotoxicidad

El deterioro metabólico que sufren los tejidos no es debido pura y exclusivamente a la acumulación de AGL, ésteres de colesterol o TAG, sino que también se tiene que tener en cuenta el tipo de componentes lipídicos que éste posee. Dichos compuestos son moléculas bioactivas como ceramidas y glucoesfingolípidos que, por diferentes razones, comienzan a acumularse de manera anormal en el hígado, músculo esquelético, corazón y tejido adiposo (Carobbio, Pellegrinelli y Vidal-Puig, 2017). En situaciones en las que se superan los límites de almacenaje de lípidos, el primer paso por parte de las células es activar estrategias para minimizar el impacto del estrés metabólico ocasionado por el exceso lipídico. Estos procedimientos están encaminados a incluir estos lípidos a las vesículas lipídicas de los adipocitos y la activación de procesos oxidativos en la mitocondria y peroxisomas (Carobbio, Rodriguez-Cuenca y Vidal-Puig, 2011).

El exceso de ceramidas y de sus metabolitos a nivel tisular ocasiona daños importantes en numerosas vías de señalización de gran importancia para la célula, afectando la captación de glucosa, activando cascadas apoptóticas y propiciando el mal funcionamiento mitocondrial (Aburasayn, Al Batran y Ussher, 2016).

## 2. Diabetes

Lo que caracteriza a la DM es una disfunción en el metabolismo de carbohidratos, ya sea por una deficiencia de insulina por parte del páncreas, por la aparición de una resistencia periférica a esta hormona o por ambas.

A grandes rasgos, podemos diferenciar dos grupos dentro de esta patología. La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) se caracteriza por ser una enfermedad autoinmune que afecta a las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos, con la consecuente deficiencia en la producción de insulina. En la DM2 el deterioro metabólico es más amplio, ya que incluye la disminución de la funcionalidad de las células  $\beta$  pancreáticas, resistencia periférica a la insulina y, en ocasiones, pérdida de las células encargadas de la producción de insulina (American Diabetes Association, 2014).

La obesidad es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de diferentes enfermedades metabólicas como la hipertensión, dislipemia, aterosclerosis y DM2, todas ellas asociadas a enfermedades cardiovasculares (Moller y Kaufman, 2005).

Existe un gran porcentaje de pacientes con DM2 que son obesos, y como hemos visto anteriormente, el estado de obesidad ocasiona un aumento de la resistencia periférica a la insulina, sobre todo por los altos niveles plasmáticos de AGL (X. Zhang et al., 2008). La respuesta inflamatoria que provoca la ingesta excesiva de alimentos por parte del tejido adiposo afecta a la acción insulínica a través de la modificación en la expresión de sus adipoquinas, como el TNF $\alpha$ , y la interleucina-6 (Huh, Park, Ham y Kim, 2014).

Otro punto a tener en cuenta es la relación entre la distribución de la masa grasa y la aparición de resistencia insulínica. Algunos autores asociaban el aumento del tejido adiposo subcutáneo como uno de los

principales responsables de la afectación metabólica a nivel periférico (Abate et al., 1996; Garg, 2004). Sin embargo, tras valorar la distribución visceral de los depósitos grasos mediante técnicas de imagen, se determinó que el aumento del volumen de tejido adiposo visceral en relación con el subcutáneo, sin aparecer signos de obesidad, está relacionado con un aumento de la resistencia periférica a la insulina, sobre todo por la susceptibilidad del tejido al control central por parte del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal y por estar bajo la influencia hepática gracias a la circulación portal (Despres, 2006).

El principal objetivo del tratamiento de la diabetes es el control de la glucemia, la insulinemia y la hemoglobina glucosilada. Una de las primeras estrategias a seguir en el tratamiento de la DM2 debe recaer en el control de la ingesta de alimentos y en el ejercicio físico. La resistencia a la acción de la insulina producida por el exceso de la ingesta calórica, en las primeras etapas, es reversible. La pérdida de peso supone un mejor control general, incidiendo en la reducción del riesgo cardiovascular (McCombie et al., 2017).

### 3. Síndrome metabólico

El síndrome metabólico es un desorden a nivel metabólico que está asociado con diferentes patologías como dislipemia, DM2 y enfermedades cardiovasculares (Povel et al., 2013). La incidencia de este síndrome aumenta año tras año, sobre todo en países desarrollados, en donde la ingesta calórica es excesiva, acompañada de un estilo de vida sedentario. De ahí que sean necesarias diferentes estrategias destinadas al control de estas patologías (Alberti et al., 2009; Moebus et al., 2006).

El Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH, "*National Institutes of Health*"), a través del Programa Nacional de Educación sobre el colesterol (Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults, 2001), definió que tres o más de los factores de riesgo cardiovascular presentados en la tabla 1 indicaban la presencia de síndrome metabólico.

Los componentes clave para el desarrollo del síndrome metabólico son la obesidad central y la resistencia insulínica, ambos afectando a la homeostasia de la glucosa. La resistencia a la insulina evoluciona a estados de hiperglucemia e hiperinsulinemia compensadora, aumentando la retención de sodio y la vasoconstricción periférica. Como consecuencia de la ingesta elevada de dietas hipercalóricas, la producción de lipoproteínas aumenta. La pérdida de equilibrio de la concentración lipídica produce un aumento de la probabilidad de aparición de episodios trombóticos. Además, el aumento de producción de adipocinas asociado a obesidad central incentiva el desarrollo de resistencia insulínica. Por todos estos motivos, el riesgo de patologías cardiovasculares es elevado en pacientes con síndrome metabólico (Mottillo et al., 2010).

**Tabla 1.** Factores de riesgo cardiovascular definidos por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos, a través del Programa Nacional de Educación sobre el colesterol, utilizados para el diagnóstico del síndrome metabólico (Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults, 2001). HDL: lipoproteína de alta densidad. TAG: triglicéridos.

<b>Factores de riesgo cardiovascular</b>
Obesidad central, perímetro abdominal mayor de 102cm en varones y mayor de 88cm en mujeres.
TAG elevados, cifras mayores o iguales a 150mg/dl.
Disminución de los niveles séricos de HDL, en varones por debajo de 40mg/dl y en mujeres de 50mg/dl.
Hipertensión sistémica, mayor o igual a 130/85mmHg.
Hiperglucemia en ayuno, con cifras mayores o iguales a 100mg/dl.
Pacientes que hayan estado en tratamiento farmacológico por dislipemia, hiperglucemia o hipertensión sistémica.

En los casos con un riesgo cardiovascular no es muy elevado, el cambio de conductas alimenticias y de ejercicio físico dirigidos a un estilo de vida saludable son suficientes para el manejo del síndrome metabólico. Al estar asociado a diferentes patologías, el mejor abordaje para el control de este síndrome es directamente sobre las causas que lo producen. En ocasiones, la modificación del estilo de vida no es suficiente para ello, por lo tanto se debe recurrir a tratamientos farmacológicos que controlen los factores de riesgo metabólicos asociados a la dislipemia, hipertensión e hiperglucemia (Eckel, Grundy y Zimmet, 2005).

## 4. ANGPTL8

Existe una proteína de 198 aminoácidos, que en humanos está codificada por el gen C19orf80 (Dong et al., 2004), mientras que en el ratón por el gen Gm6484 (Strausberg et al., 2002). Inicialmente fue llamada **EG624219** en ratón y proteína asociada al carcinoma hepatocelular **TD26** en humanos. Estos genes tienen 4 exones, y se encuentran dentro de otro gen, Dock6, en la cadena opuesta. Analizando la secuencia de ambos genes, se pudo observar que 144 de los 198 residuos son idénticos. Esto indicó que la proteína estaba conservada en diferentes especies (R. Zhang, 2012). Aparecía en todos los mamíferos, pero estaba ausente en los vertebrados no mamíferos y en los invertebrados (P. Yi, Park y Melton, 2013).

El interés por ANGPTL8 se incrementó tras publicarse la posible relación de esta proteína con el aumento de proliferación de las células  $\beta$  pancreáticas. Por ello, el grupo de Melton la definió como **betatrofina** (P. Yi et al., 2013). Este hecho marcó el punto de partida en el estudio de posibles dianas terapéuticas dirigidas al control de esta proteína para el tratamiento de la diabetes.

Ha recibido otros nombres, dependiendo de la función que desempeñaba. Tras estudios en ratón alimentados con una dieta rica en grasas, se observó que la expresión del gen Gm6484 aumentaba. Tras el uso de vectores víricos que aumentaban su expresión, se pudo observar que la actividad de LPL descendía, con lo que los niveles plasmáticos de TAG aumentaban. Por este motivo se optó por llamar a esta proteína como **lipasina** (inhibición de lipasa, "*lipase inhibition*") (R. Zhang, 2012). La falta del gen que la codificaba provocaba una reducción de los niveles de TAG plasmáticos (Tang et al., 2010) debido al aumento de la actividad de LPL

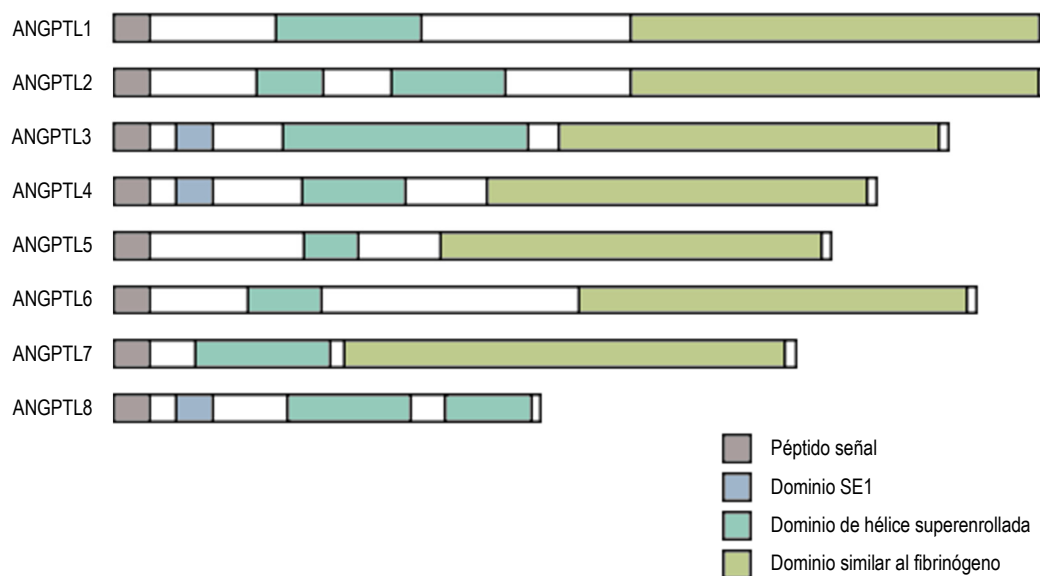
(Cox et al., 2015; Wang et al., 2013). Todo ello indicaba que esta proteína tenía un papel importante en el metabolismo lipídico.

Otra línea de investigación estuvo dirigida a estudiar la adipogénesis. En cultivos primarios celulares de adipocitos de roedores y humanos se observó que había una proteína que aumentaba su expresión de una manera importante durante la proliferación de adipocitos. La llamaron **RIFL** (realimentación inducida en grasa e hígado, “*re-feeding induced in fat and liver*”). Al deletar los genes que la codificaban, se redujeron los procesos de angiogénesis, apareciendo también una reducción de los niveles plasmáticos de TAG (Ren, Kim y Smas, 2012).

#### 4.1. Miembros de las ANGPTL

La familia de proteínas similares a angiopoyetina (ANGPTL, “*angiopoietin-like proteins*”) estaba formada inicialmente por 7 miembros, codificados por diferentes genes. Estas proteínas tienen una gran homología con respecto a la estructura de la angiopoyetina: presencia de un dominio N-terminal, un dominio similar al fibrinógeno y un péptido señal típico de las proteínas secretadas (figura 9). Lo que diferencia a esta familia de la propia angiopoyetina es que ésta posee dos receptores tirosín quinasa, TIE2 y TIE1, diferentes a los de la familia ANGPTL (Mattijssen y Kersten, 2012).

Sin embargo, con el tiempo se encontró una proteína que tenía unas propiedades similares a los miembros de esta familia pero que carecía del dominio similar al fibrinógeno, de sitios de glicosilación y de aminoácidos para formar puentes disulfuro (Fu, Yao, Abou-Samra y Zhang, 2013). Se le catalogó como un miembro de la familia ANGPTL, pero atípico. Esta proteína fue llamada **ANGPTL8** (Quagliarini et al., 2012). Es homóloga



**Figura 9.** Miembros de la familia de proteínas similares a angiopoyetina (ANGPTL), y sus correspondientes dominios. Cabe destacar que ANGPTL8 es considerada un miembro atípico debido a que, entre otras cosas, no posee el dominio similar al fibrinógeno presente en el resto de miembros.

al dominio N-terminal de ANGPTL3 y de ANGPTL4, inhibidoras de LPL (Koster et al., 2005; Peloso et al., 2014). Parece ser que esta región es la responsable de dicha inhibición (E. C. Lee et al., 2009; Ono et al., 2003), lo que podría sugerir que las tres tienen funciones similares (R. Zhang, 2012). Existen algunas diferencias entre estos dos miembros de la familia de las ANGPTL. Para ser más concretos, ANGPTL3 se expresa casi de manera exclusiva en hepatocitos, mientras que ANGPTL4, aparte de producirse en hepatocitos, también puede ser encontrada en adipocitos, miocitos y macrófagos.

Se ha observado que en ingestas abundantes y en alimentación después del ayuno, se eleva la expresión de ANGPTL3 pudiendo indicar un papel importante en el transporte de TAG hasta el tejido graso, donde serán almacenados (Ge et al., 2005). Además, actúa sobre la LPL endotelial, una de las principales enzimas encargadas del control de la actividad fosfolipasa y de la reducción de los niveles plasmáticos de HDL (Gusarova



et al., 2015; Shimamura et al., 2007). Se ha establecido también una relación positiva entre los niveles plasmáticos de LDL con la presencia de ANGPTL3 (Mehta et al., 2014; Robciuc et al., 2013; Wang, Gusarova, et al., 2015). Teniendo en cuenta estos datos, es probable que la función de ANGPTL3 sea la de recuperar los almacenes energéticos del tejido adiposo blanco tras la ingesta de alimentos después de periodos de ayuno, inhibiendo la captación de TAG circulantes por parte del corazón y del tejido adiposo marrón (Wang, McNutt et al., 2015).

Por otro lado, la expresión de ANGPTL4 se incrementa en situaciones de ayuno (Kersten et al., 2000), sobre todo para transportar los TAG hasta el tejido muscular, manteniendo el aporte energético ante la falta de ingesta de alimentos (Mattijssen y Kersten, 2012). Analizando ANGPTL4 desde otra perspectiva, el descenso de sus niveles plasmáticos está asociado con una disminución de la presencia de TAG en plasma. Unas concentraciones elevadas de TAG plasmáticos están relacionadas con un aumento del riesgo cardiovascular, por lo que ANGPTL4 podría formar parte de la maquinaria encargada del control de estas patologías (Dewey et al., 2016; Musunuru y Kathiresan, 2016; Stitzel et al., 2016). La principal función de ANGPTL4 es asegurar el aporte energético a los tejidos, evitando su almacenamiento en el tejido adiposo. Los resultados obtenidos con respecto a su papel sobre la lipasa hepática no son concluyentes.

A parte de esto, la expresión de ANGPTL3 y 4 puede verse modificada con la presencia de ciertos factores que estimulan o inhiben su producción. La expresión del ARN mensajero (ARNm) de ANGPTL3 se ve estimulada con el uso de agonistas del receptor nuclear LXR (receptor X hepático, "*liver X receptor*"); mientras que la activación de los receptores nucleares PPAR, la insulina, la leptina y la hormona tiroidea la inhiben. El aumento de AGL ya sea por una situación patológica, o por una restricción

prolongada de alimentos o por el ejercicio producen un incremento de la expresión del ARNm de ANGPTL4. Al igual que ANGPTL3, ANGPTL4 se reduce ante el aporte de insulina en cultivos celulares (Mattijssen y Kersten, 2012).

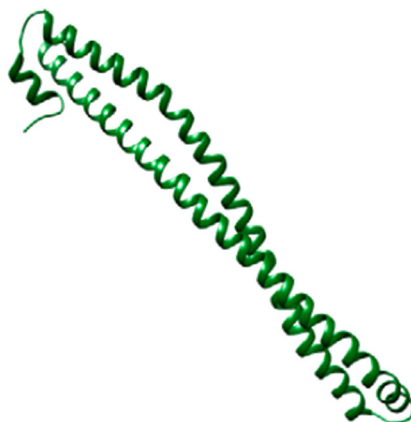
Gracias a la similitud, tanto en estructura como en función con la familia de ANGPTL, por consenso general finalmente se optó por denominar a betatrofina como **ANGPTL8** en humanos, mientras que cuando nos queremos referir a la proteína en roedores debemos etiquetarla en minúsculas (**Angptl8**). Para referirnos al gen que la codifica debemos utilizar ANGPTL8 (Gray, Yates, Seal, Wright y Bruford, 2015).

## 4.2. Estructura

ANGPTL8 es una proteína de 198 aminoácidos (figura 10) (UniProt, 2018). Posee un extremo N-terminal, al igual que otros dos miembros de su familia, ANGPTL3 y 4 (Siddiqa et al., 2016). Esta región posee un epítipo denominado SE1 (Epítipo específico 1, “*Specific Epitope 1*”) descrito con anterioridad como el responsable de la inhibición de LPL por parte de ANGPTL3 y 4 (E. C. Lee et al., 2009). Siguiendo su secuencia de aminoácidos y sabiendo que existen similitudes entre ANGPTL8 con sus otras dos compañeras de familia, parece que su estructura secundaria es en forma de dos hélices, una de ellas desde el aminoácido 33 hasta el 136, y la otra desde el 144 hasta el 193 (figura 11) (Siddiqa et al., 2016). Queda por determinarse mediante cristalografía su estructura definitiva, así como también su relación con otras moléculas.

```
MPVPALCLLWALAMVTRPASAAPMGGPELAQH  
EELTLFHHGTLQLGQALNGVYRTTEGRLTKARNSLGL  
YGRTELLGQEVSRGRDAAQELRASLLETQMEEDILQ  
LQAEATAEVLGEVAQAQKVL RDSVQRLEVQLRSAWL  
GPAYREFEVLKAHADKQSHILWALTGHVQRQRREMV  
AQQHRLRQIQERLHTAALPA
```

**Figura 10.** Secuencia de aminoácidos de la proteína ANGPTL8 de humano obtenida desde UniProt (UniProt, 2018).

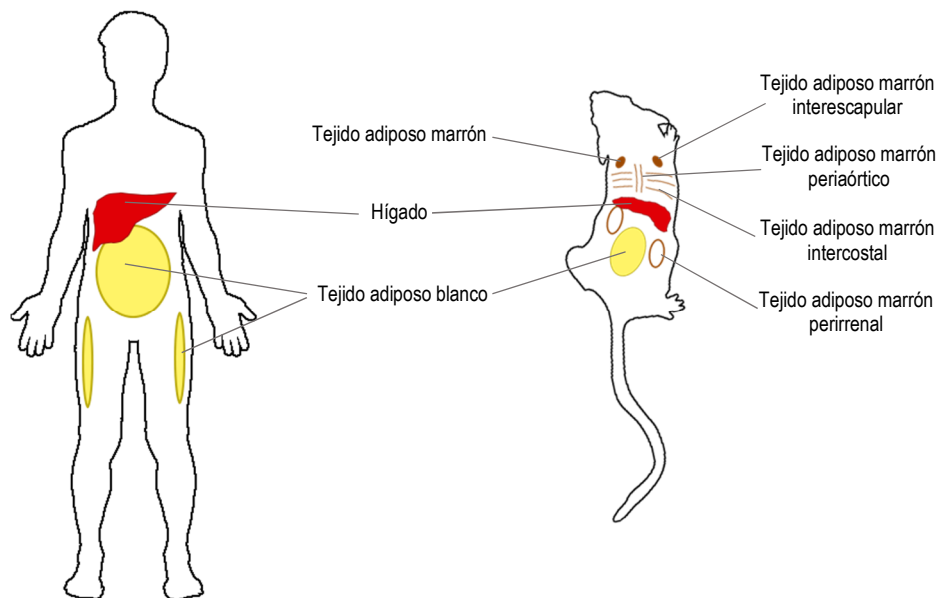


**Figura 11.** Predicción de la estructura terciaria de ANGPTL8 mediante I-TASSER, teniendo en cuenta su acción sobre LPL (Siddiqi et al., 2016).

### 4.3. Expresión

En ratón, esta proteína se expresa sobre todo en hígado y tejido adiposo marrón (Fu et al., 2013), aunque también puede ser localizada en otros tejidos, pero en menor cantidad, como es el caso del tejido adiposo subcutáneo y perigonadal, riñón e intestino delgado (P. Yi et al., 2013; R. Zhang, 2012). Otros estudios indican que el ARNm de Angptl8 se expresa sobre todo en tejido graso, tanto blanco como marrón, y en hígado, por encima del resto de tejidos (figura 12) (Ren et al., 2012).

En humanos, su ARNm se expresa sobre todo en hígado, observándose gran diferencia con el resto de tejidos analizados (Ren et al., 2012; P. Yi et al., 2013; R. Zhang, 2012). Sin embargo, otros estudios indican que, en humanos, ANGPTL8 es producida también en tejido adiposo blanco e incluso en el cerebro (figura 12) (Quagliarini et al., 2012).



**Figura 12.** Principales regiones productoras de ANGPTL8 en humanos y ratones. En ambos casos, la mayor concentración de ARNm de esta adipoquina se localiza a nivel hepático, siendo la principal estructura responsable de los niveles plasmáticos de ANGPTL8.

Estas diferencias son fáciles de entender si tenemos en cuenta que los niveles de ANGPTL8 son sensibles a cambios nutricionales. Las regiones donde se expresa, mayormente, son las principales zonas de metabolismo energético (R. Zhang y Abou-Samra, 2013).

La producción de ANGPTL8 puede verse modificada por diferentes procesos que acontecen de manera fisiológica, así como también por la presencia de otras moléculas que estimulan o inhiben la síntesis de su ARNm.

En cultivos primarios de adipocitos de ratón como de humanos, se observó que la insulina actuaba como un potenciador de la producción del ARNm de ANGPTL8 posiblemente a través de un aumento de la expresión de dos genes, CIDEA (“*cell death-inducing DFFA-like effector c*”) y PNPLA3 (“*patatin-like phospholipase domain-containing protein 3*”), y de la disminución de los niveles de transcripción de PNPLA2 (“*Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2*”). Además de esto, la

administración de glucosa por sí sola no producía alteraciones de los niveles de ANGPTL8, sino que era necesaria la presencia de insulina en los cultivos para desencadenar el incremento en su expresión. Se estudiaron también otros agentes, como dibutilil-cAMP, forskolina, isoprenalina y dexametasona, todos ellos estimuladores de la lipólisis mediada por la proteína quinasa A (PKA, "*protein kinase A*"), quienes suprimieron la expresión del ARNm. Esto podría indicar que ANGPTL8 participa en diferentes procesos de regulación en los adipocitos (Ren et al., 2012). Una situación similar se observó en una línea celular derivada de hepatocitos, donde la insulina y la glucosa aumentaban la expresión del ARNm de ANGPTL8. Además, la presencia de ANGPTL8 potenció la acción de la insulina sobre estas células, participando en la homeostasis de la glucosa al promover la síntesis de glucógeno e inhibir la gluconeogénesis, posiblemente mediante la activación de la proteína quinasa B (PKB, "*protein kinase B*") (Rong Guo et al., 2015).

Han sido atribuidas numerosas funciones a la hormona tiroidea, como mediadora del crecimiento y diferenciación celular, y la homeostasis, entre otras. Participa también en la homeostasia lipídica en el hígado, regulando la transcripción de diferentes genes relacionados con el metabolismo lipídico. Se ha demostrado que es capaz de modificar la expresión del ARNm de ANGPTL8 en cultivo de células hepáticas (Tseng et al., 2014).

El embarazo es otra situación desencadenante de un aumento de la expresión de *angptl8* (P. Yi et al., 2013). En roedores, en etapas tardías de embarazo, aumentaron los niveles plasmáticos de TAG y colesterol no asociado a HDL, mientras que las concentraciones de HDL se redujeron (Sweeney, Moser, Shigenaga, Grunfeld y Feingold, 2006). En humanos, también se han visto modificaciones, tanto del nivel de TAG, como de

colesterol total en diferentes etapas de gestación (Mazurkiewicz et al., 1994).

Es posible que la expresión de ANGPTL8 esté controlada por otra hormona de reciente descubrimiento, irisina, de origen muscular y capaz de transformar el tejido adiposo blanco en tejido adiposo marrón (Bostrom et al., 2012). Todo apunta a la activación de MAPK p38 por las especies reactivas de oxígeno desencadenan la acción de PGC-1 $\alpha$  ("peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  co-activator 1  $\alpha$ "), aumentando la producción de irisina, y estimulando la producción de ANGPTL8 (Y. Zhang et al., 2014).

La síntesis de ANGPTL8 depende de algunos factores. En cultivos de adipocitos, la administración de TNF $\alpha$  reduce los niveles de transcripción de esta proteína. Se piensa que esto se debe a una reducción de PPAR $\gamma$ , uno de los principales reguladores de la adipogénesis. Tras el bloqueo de la producción de PPAR $\gamma$  se observó un descenso significativo de angptl8, sin que se viera afectada la maduración de los adipocitos (Ren et al., 2012).

La expresión de angptl8 se puede modificar ante situaciones de estrés. La ausencia de histidina produjo un incremento significativamente la expresión de angptl8, de una manera dependiente del tiempo; a mayor tiempo de privación, mayor fue la expresión de angptl8. Esto se corroboró también con experimentos in vivo, en modelos murinos a los que se les sometía a situaciones de estrés, como la exposición al frío y una hiperglucemia inducida por estreptozocina. De igual manera que lo observado en los cultivos celulares, la expresión de angptl8 se incrementó tanto en hígado como en tejido adiposo (Y. Zhang et al., 2016).

También se ha observado que podría existir un mecanismo de retroalimentación del control de expresión de ANGPTL8. El aumento de la

producción de los genes que codificaban *angptl8* en ratones envejecidos produjo un descenso de la producción final de *angptl8* (Cox et al., 2015).

#### **4.4. Localización celular**

ANGPTL8 se localiza en forma de pequeñas vesículas distribuidas por el citoplasma celular. Estas estructuras suelen ser inferiores a 1  $\mu\text{m}$ , y las de mayor tamaño (1-2  $\mu\text{m}$ ) parecen no estar totalmente llenas de esta proteína. Generalmente éstas últimas están relacionadas con las vías de degradación lipídicas. Suelen estar asociadas a proteínas de membrana relacionadas a su vez con a lisosomas y perilipinas (Tseng et al., 2014).

#### **4.5. Concentración plasmática**

Después de su producción, ANGPTL8 puede desempeñar su acción local, o también puede ser drenada al torrente sanguíneo. Es posible que circule a través de él como parte de un complejo molecular de gran tamaño, junto con lipoproteínas del tipo LDL y HDL (Quagliarini et al., 2012). Existen discrepancias sobre la concentración de ANGPTL8 en plasma en situaciones normales. Diferentes estudios han demostrado que la concentración plasmática media en individuos normopeso y no diabéticos varía desde 0,2 ng/ml (Abu-Farha et al., 2016) hasta 45ng/ml (Gomez-Ambrosi et al., 2014).

Se han observados diferencias en los niveles plasmáticos de ANGPTL8 con respecto al sexo en humanos. La concentración sérica de ANGPTL8 en mujeres adultas es de  $34,1 \pm 20,1$  ng/ml, frente a los  $21,1 \pm 16,0$  ng/ml en varones adultos (Gomez-Ambrosi et al., 2014). En niños menores de 8 años, los niveles plasmáticos de ANGPTL8 fueron mayores en varones que en mujeres ( $0,37 \pm 0,03$  ng/ml vs.  $0,29 \pm 0,02$  ng/ml) (Wu et al., 2016).

## 4.6. Receptor

La familia de ANGPTL es considerada como un grupo de ligandos huérfanos ya que no se han descrito receptores específicos para sus miembros (Hato, Tabata y Oike, 2008).

Sí que existe evidencia de la afinidad de algunos de sus miembros a unirse a diferentes receptores. Los receptores tirosín quinasa de las células endoteliales son receptores transmembrana que se expresan predominantemente en las células del endotelio vascular y en algunas células hematopoyéticas. Su función principal es el control del intercambio de elementos a través de la membrana de los capilares. ANGPTL3 y 4 son capaces de fosforilar el receptor tirosín quinasa 2 de las células endoteliales (Kim et al., 1999).

Otra posible diana de las proteínas de la familia ANGPTL se encuentra en las células madre hematopoyéticas. El receptor similar a la inmunoglobulina de los leucocitos tipo B2 (LILRB2), localizado en células madre hematopoyéticas, tanto en humanos como en ratones, actúa como un potente inhibidor de la respuesta inmune funcionando como controladores de inflamación a través de su unión con las ANGPTL (Zheng et al., 2012).

## 4.7. Metabolismo lipídico

Todo indica que ANGPTL8 participa en el metabolismo lipídico, ya sea en situaciones fisiológicas como el ayuno o la ingesta, así como también es situaciones patológicas como es el caso de la presencia de obesidad.

En los experimentos iniciales con *angptl8*, se observó que la expresión de su ARNm se veía modificada en ratones con variaciones de la dieta, tanto a nivel hepático como del tejido adiposo blanco y marrón.



Tras someter a los animales a un aumento de la ingesta de grasas y de sacarosa, los niveles de angptl8 en estos tejidos aumentaron, siendo significativamente mayores en hígado y tejido adiposo marrón. El aumento observado en tejido adiposo blanco no fue significativo estadísticamente. Estas dos regiones donde se observaron aumentos en la expresión del mensajero de angptl8 son tejidos que, en situaciones normales, expresan la mayor cantidad de esta proteína (Fu et al., 2013; Ren et al., 2012; Wang et al., 2013; R. Zhang, 2012). En modelos animales genéticamente obesos, también se observó un aumento de la expresión de angptl8 en hígado y en tejido adiposo blanco (Ren et al., 2012). Estos datos sugieren que esta proteína podría tener un papel importante en el metabolismo de los ácidos grasos.

La presencia de ANGPTL8 en el tejido adiposo marrón ha sido observada por varios grupos, y la relación de este tejido con la termorregulación nos hace pensar que esta proteína podría estar relacionada en este proceso. De hecho, tras someter a bajas temperaturas a ratones, se pudo observar un aumento de la expresión del ARNm de angptl8 en el tejido adiposo marrón de estos animales (Fu et al., 2013). Analizando otros miembros de la familia de ANGPTL, el frío produjo un descenso en la producción de angptl4 en el tejido adiposo marrón, y un aumento en el tejido adiposo blanco. Este hecho indicaría que se está asegurando el aporte energético en el tejido adiposo marrón para la producción de calor (Dijk et al., 2015).

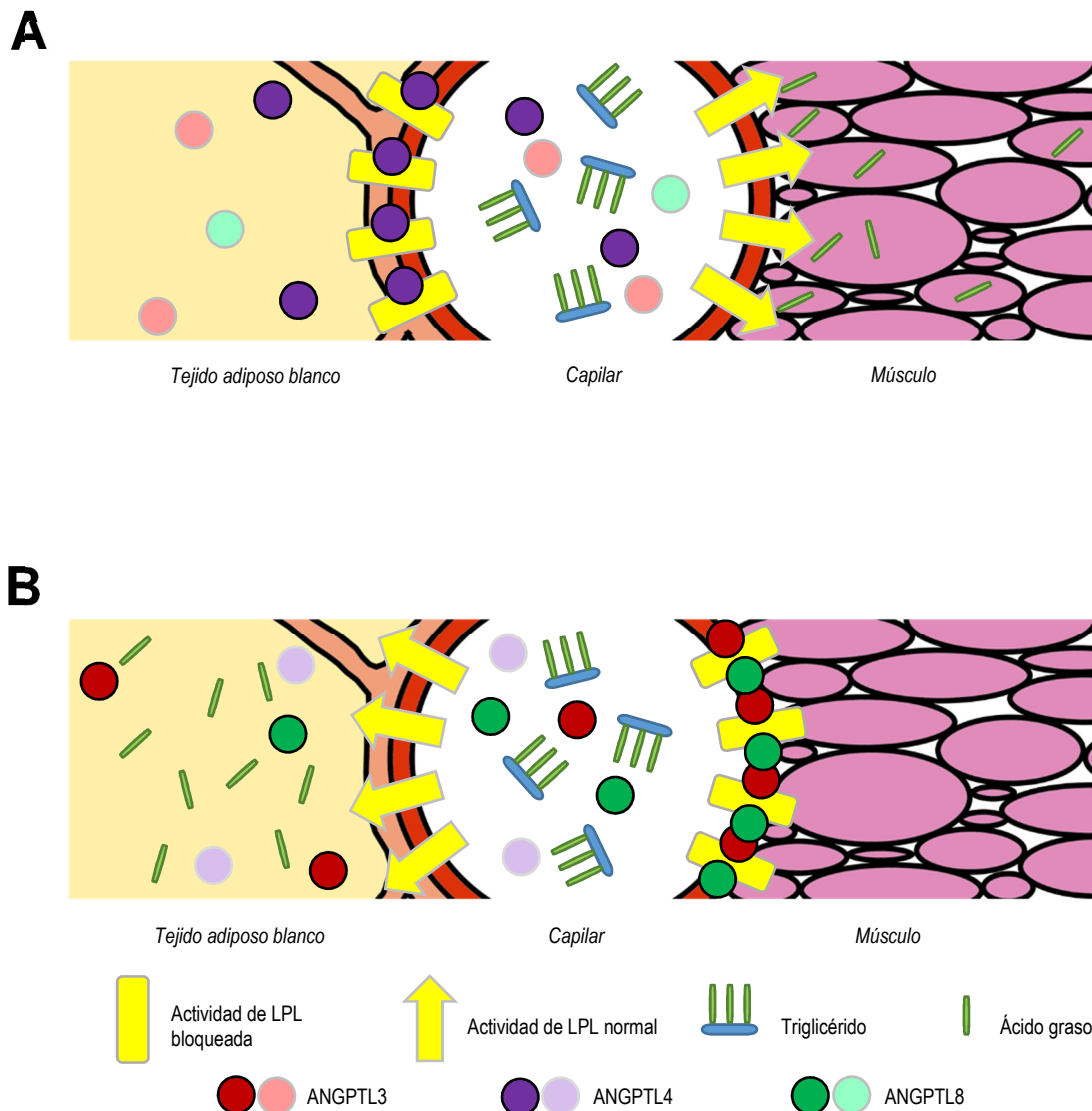
En ratones donde se produjo la delección del gen que codifica angptl8 se observaron modificaciones en cuanto a la ganancia de peso y en la masa grasa de estos animales a lo largo del desarrollo, sin que esto supusiese una alteración del desarrollo normal. A los ratones que no producían esta proteína les costó más ganar peso que a los controles, estando ambos bajo las mismas condiciones dietéticas. Este hecho fue

acompañado de una reducción en la acumulación de tejido adiposo, sobre todo a partir de la semana 20. Además, los niveles séricos de TAG fueron significativamente menores en los ratones con la delección en comparación con los controles. Ese descenso se debió, sobre todo, a la disminución de los niveles de VLDL, y no por el colesterol como en el caso de la delección de los genes codificantes de *angptl3* (Koishi et al., 2002; Wang et al., 2013).

En humanos se observó que la expresión de ANGPTL8 en plasma se modificaba en situaciones de ayuno y de alimentación. Tras 12 horas sin ingerir alimentos, la presencia de ANGPTL8 disminuyó volviendo a recuperarse tras 3 horas de ingesta (Quagliarini et al., 2012). Actualmente, toda la evidencia indica que el equilibrio del metabolismo lipídico controlado por las ANGPTL viene dado por el mantenimiento del balance de la expresión de ANGPTL3, 4 y 8 en estados de ayuno, de aporte de nutrientes, ejercicio físico y exposición a frío (figura 13) (R. Zhang, 2016).

Otro dato a tener en cuenta es que la sobreexpresión de *angptl8* ocasionó un aumento en el nivel de TAG en plasma, pero gracias a la presencia de *angptl3*. En ratones donde se eliminó la producción de *angptl3*, este incremento de TAG no ocurrió. Por tanto, en presencia de *angptl3*, se podría considerar que *angptl8* participa en la hidrólisis de TAG (Quagliarini et al., 2012).

En humanos, existe una gran discrepancia respecto a las posibles relaciones entre los niveles plasmáticos de ANGPTL8 con las variables destinadas al análisis del estado nutricional de los individuos. La gran mayoría de artículos defiende que esta proteína está relacionada de manera positiva con los niveles de TAG, y negativamente con HDL, determinando que ANGPTL8 aumenta a medida que empeora el perfil lipídico, asociado a obesidad (Calan et al., 2016; Chung et al., 2016; Fenzl et al., 2014; Y. H. Lee et al., 2016; von Loeffelholz et al., 2017). Dado que



**Figura 13.** Metabolismo lipídico mediado por tres de los miembros de la familia de las ANGPTL: ANGPTL3, 4 y 8. **A:** En situaciones de ayuno, ANGPTL4 toma el control. Bloquea la actividad de LPL a nivel del tejido adiposo, favoreciendo el aporte de ácidos grasos a los tejidos periféricos. **B:** Tras la ingesta, ANGPTL3 y 8 bloquean la actividad de LPL a nivel muscular sin afectar la actividad de esta enzima a nivel del tejido adiposo, permitiendo el almacenamiento de ácidos grasos en el interior del adipocito.

la función principal atribuida a esta proteína, como a otros miembros de su familia (ANGPTL3 y 4), es la inhibición de LPL (Koster et al., 2005; Peloso et al., 2014), es probable, que el aumento de ANGPTL8 a nivel sérico de los pacientes obesos esté relacionado con la inhibición de esta enzima, ya que esta patología está asociada a aumentos de la actividad de LPL a nivel del tejido adiposo (Ong y Kern, 1989).

Sin embargo, estas afirmaciones requieren de mayor estudio debido a las diferencias observadas por algunos autores que determinan

que esta relación entre ANGPTL8 plasmática y las variables indicadoras de empeoramiento del perfil lipídico es negativa, presentando los obesos un descenso en los niveles séricos de esta proteína (Barja-Fernandez et al., 2015; Ejarque et al., 2017; Gomez-Ambrosi et al., 2014; Pascual-Corrales et al., 2016).

#### **4.8. Metabolismo glucídico**

Se ha relacionado a angptl8 con el aumento de la proliferación de células  $\beta$  pancreáticas. Mediante PCR cuantitativa del ARNm que la codifica, en ratones se observó un aumento de dichas células tras la utilización de un agonista del receptor insulínico, presentando un aumento de la expresión de angptl8 en hígado y tejido adiposo blanco. De la misma manera, tras analizar un modelo animal de DM2, se observó un aumento de la expresión de esta proteína. Sin embargo, tras la depleción específica de las células  $\beta$  pancreáticas mediante el uso de toxinas de difteria, se pudo observar un aumento de la proliferación de las mismas sin que existieran modificaciones de la expresión del ARNm de angptl8. Todo ello parecía indicar que la expresión de angptl8 en hígado y en tejido adiposo contribuían a la proliferación de las células  $\beta$  en respuesta a cambios fisiológicos, y no por daño directo del tejido pancreático. Como la propia resistencia insulínica puede desencadenar un aumento en la proliferación de células  $\beta$ , cabría pensar que la acción de angptl8 se desencadenaría tras la aparición de dicha resistencia. Sin embargo, tras la estimulación de la proliferación después de la inyección de estimuladores de producción de angptl8, se comprobó que no es dependiente de la existencia de resistencia a la insulina (P. Yi et al., 2013).

Estudios posteriores observaron que la administración exógena en páncreas de rata, junto con el uso de un promotor modificado de insulina, ocasionaba un aumento de la proliferación de las células  $\beta$  pancreáticas sin

desencadenar hipertriacilglicerolemia. Esta proliferación fue disminuyendo con la edad como cabría esperar, debido a la pérdida de funcionalidad de estas células a lo largo del proceso de envejecimiento (J. Chen et al., 2015).

Posteriormente se utilizó un modelo de ratón que no expresaba los genes que codificaban *angptl8* para valorar si aparecía algún cambio en la homeostasia de la glucosa. Al contrario de lo que se podía esperar, no aparecieron modificaciones significativas en los niveles plasmáticos de glucosa e insulina. Los valores fueron similares a los observados en los controles. Además, el mantenimiento de una dieta rica en grasas durante 11 semanas incrementó la proporción insulina/glucosa de una manera significativa, pero tanto en el grupo control como en el que no expresaba *angptl8*. Esto indicaba que la presencia de *angptl8* durante el crecimiento del ratón no es esencial para el normal desarrollo de las células  $\beta$  pancreáticas ni para el mantenimiento de la homeostasia de la glucosa (Gusarova et al., 2014; Wang et al., 2013). Siguiendo esta línea, el grupo de Gusarova estudió el grado de proliferación en este modelo animal que no expresaba los genes que codifican *angptl8* usando S961, el mismo antagonista del receptor insulínico utilizado por Melton (P. Yi et al., 2013). La proliferación de las células  $\beta$  pancreáticas aumentó incluso con la delección de los genes de *angptl8*. Además, la administración de agentes que producían una sobre-expresión de dicha proteína no produjo cambios en la tolerancia a la glucosa, ni modificaciones del área de las células  $\beta$  pancreáticas (Gusarova et al., 2014).

En respuesta a esto, el grupo de Melton informó que en sus resultados existía una gran dispersión en los valores que indicaban la replicación de las células  $\beta$  pancreáticas, acompañada de un aumento de los niveles plasmáticos de *angptl8* (P. Yi, Park y Melton, 2014). Para hacer más consistente esta idea, la sobre-expresión de *angptl8* en ratón tampoco produjo modificaciones en los niveles de glucosa en comparación con

animales control (Cox et al., 2015). Otro estudio observó que la administración exógena de esta proteína directamente en el hígado de ratón no incrementaba la proliferación de las células  $\beta$  pancreáticas. Incluso, la administración de angptl8 a un cultivo de una línea celular de células  $\beta$  no mostró diferencias en cuanto a la proliferación con respecto a los controles (Y. Zhang et al., 2016).

Para valorar si este proceso ocurría en humanos, se trasplantaron islotes pancreáticos humanos bajo la cápsula de uno de los riñones de un modelo animal de ratón susceptible a este inductor. Posteriormente, utilizando el inductor de resistencia insulínica del grupo de Melton, se valoró si las células  $\beta$  de estos islotes pancreáticos estaban o no en proliferación, y en qué proporción. Se comprobó que existía hiperglucemia y un aumento de la expresión del ARNm de angptl8 en el riñón de estos animales, al igual que en los estudios iniciales. Sin embargo, no se observaron modificaciones significativas de la producción de esta proteína en tejido adiposo blanco ni en gónadas. En el grupo considerado control (aquel al cual a sus miembros no se les había trasplantado islotes humanos) se observó que existía un aumento significativo de la proliferación de las células  $\beta$  pancreáticas. Al contrario de lo que cabría esperar, esta gran proliferación no se observó en el grupo trasplantado. Esto mostraba que angptl8 no participaba en los procesos proliferativos de las células  $\beta$  pancreáticas de una manera directa, sino que podría estar activando otra vía que cumpliera tal función (Jiao, Le Lay, Yu, Naji y Kaestner, 2014). Siguiendo esta línea, la sobre-expresión de angptl8 en ratón, tampoco reveló un aumento de la proliferación de las células  $\beta$  pancreáticas, ni tampoco un incremento del área de las mismas, tanto en ratones jóvenes como envejecidos (Cox et al., 2015).

Se ha indicado que en pacientes con DM2, los niveles plasmáticos de ANGPTL8 aumentaban con respecto a un grupo no diabético, sin que existiesen diferencias significativas respecto al IMC (Abu-Farha, Abubaker, Al-Khairi et al., 2015; Chen, Susanto, Chuang, Liu y Wang, 2016; Gao et al., 2015; Ghasemi, Tavailani, Khodadadi, Saidijam y Karimi, 2015; Xie et al., 2015; M. Yi et al., 2015). En algunos casos, se pudo relacionar estadísticamente valores elevados de ANGPTL8 en plasma con signos de resistencia insulínica y de pérdida de masa de células  $\beta$  pancreáticas. Para ello se usaron diferentes indicadores de tales sucesos como los índices HOMA ("Homeostatic Model Assessment") (X. Chen et al., 2015; Espes, Martinell y Carlsson, 2014; Fu et al., 2014; Gao et al., 2015; Yamada et al., 2015).

En otros estudios, también se observó un aumento en los niveles de ANGPTL8 en pacientes diabéticos, aumentando con la edad de los sujetos, pero sin relacionarlo con una resistencia periférica a la insulina, IMC o niveles plasmáticos de TAG (Abu-Farha, Abubaker, Noronha et al., 2015). Este aumento sérico de ANGPTL8 también se hace presente en estadios tempranos del desarrollo de diabetes (Hu et al., 2014). Lo que todavía no está claro es la relación entre el aumento de ANGPTL8 en pacientes con DM2 con el aumento de la resistencia insulínica. En pacientes diabéticos tipo 2 a los que se les administró glucagón intravenoso con el objetivo de aumentar la producción de insulina, no se observó aumento de ANGPTL8 en plasma, sino que descendió proporcionalmente a la liberación de insulina, sin observarse modificaciones significativas con respecto al nivel de TAG en plasma (Tokumoto et al., 2015).

Otro indicador de un correcto funcionamiento de las células  $\beta$  pancreáticas en cuanto a la producción de insulina es el nivel plasmático del péptido C. Es un parámetro utilizado en pacientes diabéticos, en donde

también se analizó ANGPTL8, sin observarse relación alguna entre ellos (Abu-Farha, Abubaker, Noronha et al., 2015).

De las complicaciones de la DM2 destaca la nefropatía diabética. Precisamente, uno de los indicadores de avance de esta enfermedad, el cual nos informa sobre el estado nutricional del individuo, es la excreción de albúmina a través de la orina. Se ha observado que los niveles de ANGPTL8 plasmáticos podrían estar relacionados con los niveles de eliminación de albúmina. A mayor albuminuria, mayor es la presencia de ANGPTL8 en el plasma (Chen et al., 2016).

Sin embargo, otros grupos de investigación aseguraron que no se producían alteraciones significativas de los niveles plasmáticos de ANGPTL8 en pacientes obesos y diabéticos tipo 2 con respecto a individuos controles, pero sí que podría llegar a existir una posible relación entre metabolismo lipídico con niveles séricos de ANGPTL8 (Fenzl et al., 2014).

Estudios en poblaciones asiáticas no mostraron diferencias relacionadas con los niveles plasmáticos de ANGPTL8 en pacientes con DM2 ni en obesos. Sin embargo, las diferencias sí fueron significativas en los individuos con sobrepeso, presentando además una correlación entre ANGPTL8 con los parámetros indicadores resistencia insulínica. Contrariamente a lo que se podría esperar, esta relación no se mantuvo en los individuos obesos a pesar de presentar una mayor resistencia insulínica (Guo et al., 2015).

También se han observado modificaciones de los niveles plasmáticos de pacientes con DM1. La presencia de ANGPTL8 en plasma es significativamente mayor en estos pacientes que en un grupo control, sin observarse cambios de los niveles de TAG, LDL y HDL, ni del IMC (Espes, Lau y Carlsson, 2014; Yamada et al., 2015).



Para añadir más controversia a las diferencias observadas en cuanto a las variaciones de la expresión de ANGPTL8, otros autores aseguran que los niveles plasmáticos de esta proteína se reducen en patologías de obesidad y DM2 (Gokulakrishnan et al., 2015; Gomez-Ambrosi et al., 2014).

El grupo de Melton observó un aumento de los niveles plasmáticos de angptl8 de ratones hembra gestantes con respecto a un grupo control. El primer grupo presentaba cifras 20 veces mayores que las presentes en los controles (P. Yi et al., 2013). Además, los niveles de ANGPTL8 estaban aumentados en casos de mujeres con diabetes gestacional, siendo superior a los presentes en mujeres embarazadas normoglucémicas, sin que existiese correlación con los índices de resistencia insulínica ni con los valores de IMC. Con respecto a los valores de TAG y de colesterol total, sí que guardaron una correlación significativa con los niveles de ANGPTL8 plasmáticos como era de esperar (Trebotic et al., 2015; Wawrusiewicz-Kurylonek et al., 2015).


Se ha observado que, en pacientes con cirrosis, aparte de presentar una resistencia periférica a la insulina importante, se incrementaba la sensibilidad a la glucosa por parte de las células  $\beta$  pancreáticas. Siguiendo esta línea, se estudió el nivel plasmático de ANGPTL8 en estos pacientes en comparación con un grupo considerado control sin esta patología. La concentración de ANGPTL8 fue mayor en los pacientes cirróticos. No se estableció ninguna relación entre los niveles plasmáticos de ANGPTL8 con los indicadores de resistencia insulínica, ni tampoco con las variables de evaluación del metabolismo lipídico en estos pacientes. (Arias-Loste et al., 2015).

## 4.9. ANGPTL como dianas terapéuticas

La relación establecida entre los miembros de la familia de ANGPTL con el metabolismo de TAG establece una posible diana terapéutica para el control de patologías asociadas a su desequilibrio, tanto patologías coronarias como metabólicas. Los estudios realizados hasta el momento establecen las bases para el desarrollo de fármacos útiles para tal fin.

Las principales investigaciones hasta el momento tienen como objetivo el control o el bloqueo de las proteínas ANGPTL3 y 4. Sobre ANGPTL3 se están desarrollando anticuerpos que bloquean su acción. Como consecuencia de esto, se observaron descensos de los niveles plasmáticos de lípidos. Estos experimentos se han realizado tanto en modelos animales (ratones y monos) (Gusarova et al., 2015), como en humanos (Graham et al., 2017). Los resultados obtenidos en los experimentos que se realizaron sobre ANGPTL4 no fueron del todo concluyentes. Consiguieron reducir la concentración plasmática de TAG en ratones y monos, sin embargo, aparecieron en algunos casos complicaciones relacionadas con patologías como ascitis o caquexia (Dewey et al., 2016) observadas en ratones con delección de los genes que codifican ANGPTL4 (Lichtenstein et al., 2010).

La idea de desarrollar fármacos destinados al control de la expresión de ANGPTL8, así como también de moléculas que bloqueen o estimulen su acción, es todavía un poco prematura. Se debe hacer hincapié en comprender el proceso de producción de esta proteína, así como en su mecanismo de acción para poder determinar qué pasos son susceptibles de manipulación para el control, sobre todo, del metabolismo lipídico.



# JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



## 1. Justificación

Como hemos señalado en la Introducción, ANGPTL8 está involucrada en el metabolismo lipídico, principalmente por su papel en la inhibición de LPL. Sin embargo, las discrepancias relacionadas con las modificaciones que provocan patologías como obesidad y diabetes, ya sea a nivel plasmático como del tejido adiposo, exigen un análisis más profundo del papel de esta proteína en enfermedades metabólicas.

El verdadero interés por ANGPTL8 surgió tras otorgarle propiedades proliferativas sobre las células  $\beta$  pancreáticas en modelos animales, pensando que podría tener efectos beneficios para los individuos diabéticos (P. Yi et al., 2013). Tras diferentes investigaciones realizadas por otros grupos se consideró que dicha afirmación estaba sujeta a diferentes interpretaciones y que eran necesarias más evidencias para considerarla como un agente proliferador de las células  $\beta$  pancreáticas (Gusarova et al., 2014; Y. Wang et al., 2013).

A su vez, no existe un consenso en la determinación de los valores plasmáticos considerados basales de esta proteína, como tampoco en las modificaciones que se producen en presencia de obesidad (S. Li et al., 2016). Algunos autores afirman que esta patología está asociada con un aumento de la concentración plasmática de ANGPTL8 (Abu-Farha, Sriraman et al., 2016; Guo et al., 2016; von Loeffelholz et al., 2017), mientras otros defienden que se observa un descenso (Ejarque et al., 2017; Maurer et al., 2016).

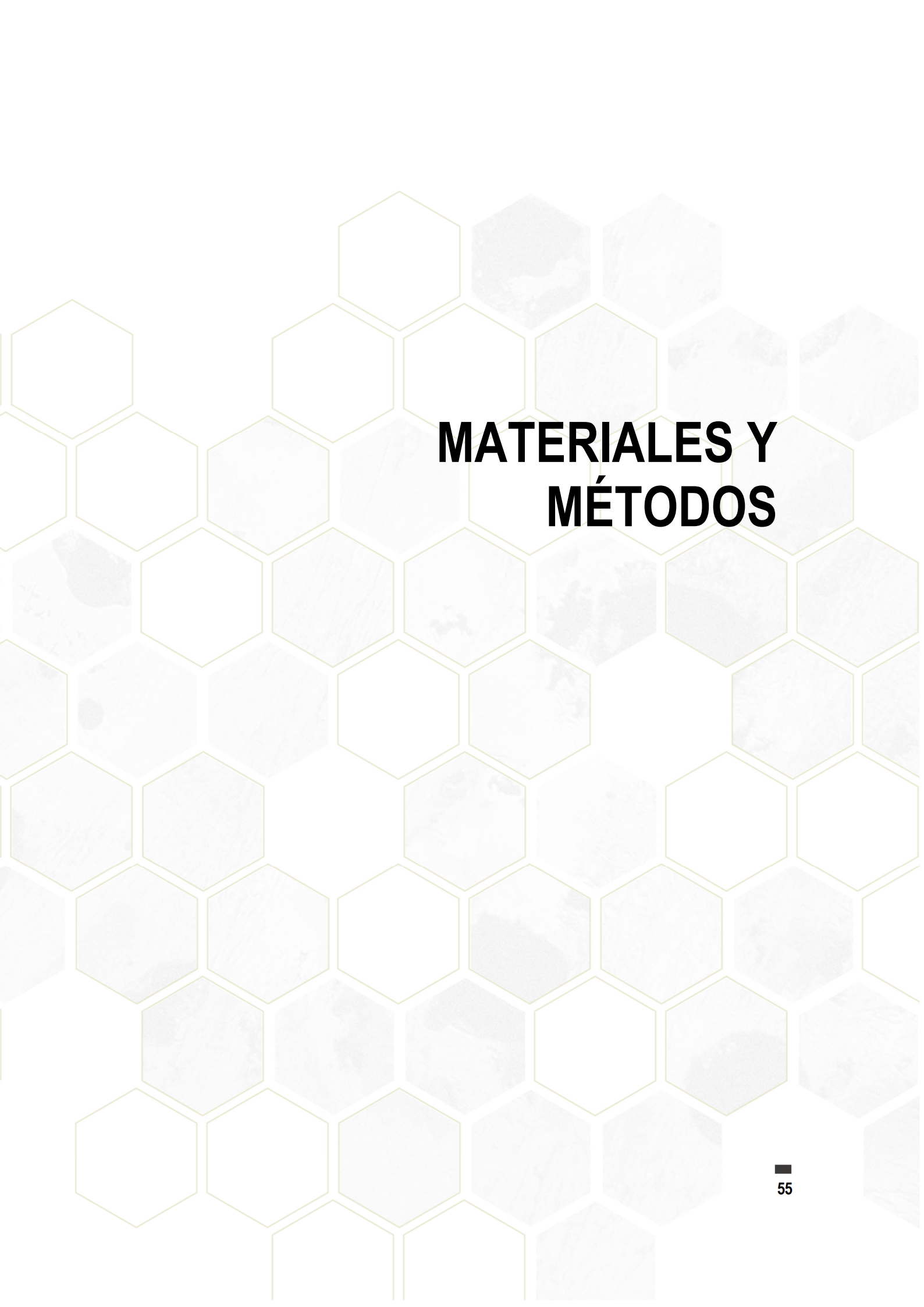
Para continuar con el desconcierto, los estudios destinados al análisis de esta proteína en pacientes diabéticos tampoco logran determinar unas conclusiones claras, existiendo trabajos que describen un aumento de la concentración plasmática de ANGPTL8 (Liu et al., 2016), un descenso (Gomez-Ambrosi et al., 2014), o incluso, que no se producen modificaciones en individuos con alteración del perfil glucémico (H. Wang et al., 2016).

## 2. Objetivos

Teniendo en cuenta lo anterior, el **objetivo general** de este trabajo fue investigar las posibles variaciones en la concentración plasmática de ANGPTL8, así como en su expresión en tejido adiposo visceral humano de pacientes obesos.

Para ello, se establecieron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Establecer si existen modificaciones en los niveles plasmáticos de ANGPTL8 en relación con el IMC en pacientes de ambos sexos.
2. Determinar en los grupos de estudio los cambios en la expresión y/o en la producción de ANGPTL8 a nivel del tejido adiposo visceral.
3. Valorar la relación de ANGPTL8 con el metabolismo lipídico, así como su efecto directo sobre adipocitos aislados.
4. Analizar la asociación de ANGPTL8 con la homeostasis glucídica y la influencia de metformina en su expresión a nivel del tejido adiposo visceral.

The background of the page is a repeating pattern of hexagons. Each hexagon contains a different microscopic image of a material, showing various textures and structures. The images are in grayscale and are arranged in a honeycomb-like grid. The text is centered over this pattern.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**





## 1. Aspectos generales

El diseño experimental aplicado a este trabajo fue minuciosamente revisado con la finalidad de obtener unos resultados fiables y, además, con el objetivo de posibilitar la reproducción de los protocolos utilizados, continuando así con la investigación sobre el papel de ANGPTL8 en el metabolismo lipídico, más allá de la consecución de esta tesis.

La realización de esta tesis está enmarcada dentro de varios proyectos, concretamente, *“Estudio de la hormona Betatrofina en pacientes diabéticos y obesos para su posible utilidad en un nuevo enfoque terapéutico en la Diabetes. (Referencia: BIO/SA49/14)”*, y *“Análisis de la autofagia en el tejido adiposo como base para nuevas aproximaciones terapéuticas a la diabetes mellitus tipo 2. (Referencia: BIO/SA70/13)”*, ambos financiados por la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León, así como el proyecto *“Identificación de la ANGPTL-8 (betatrofina) en el tejido adiposo humano y su participación en el metabolismo lipídico. Modulación farmacológica de sus efectos y posibles repercusiones en terapéutica. (Referencia: 2017/00103/001)”*, financiado por la Universidad de Salamanca.

## 2. Pacientes incluidos en el estudio

Las muestras humanas, tanto de tejido adiposo visceral como de sangre, fueron obtenidas por personal del Hospital Universitario de Salamanca. El diseño experimental para desarrollar esta tesis doctoral se realizó cumpliendo con la Declaración de Helsinki de la Asamblea Médica Mundial sobre Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, y sus posteriores enmiendas, así como también con la normativa europea (2010/63/EU) y la legislación española relacionada (RD 53/2013 y RD 1090/2015). Además, todos los protocolos fueron aprobados previamente por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL) (Anexo 1). Asimismo, los participantes en el estudio fueron informados previamente respecto al objetivo y los procedimientos del estudio, para obtener su preceptivo consentimiento, según el modelo de consentimiento informado indicado en el Anexo 2 aprobado por el CEIC, como requisito indispensable para llevar a cabo los procedimientos experimentales con pacientes.

Como **criterios de inclusión**, el paciente debía ser mayor de edad y, previamente, debía haber sido valorado por el servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitario de Salamanca, responsables de determinar si indicaba una intervención quirúrgica. Inicialmente, los individuos incluidos dentro del grupo obesidad fueron pacientes con indicación de cirugía bariátrica debido al deterioro del estado de salud comprometido relacionado con su grado de obesidad. Los pacientes incluidos en el grupo control fueron individuos que presentaron indicación de cirugía abdominal sin que ésta estuviese relacionada directamente con el control del peso como, por ejemplo, la necesidad de apendicectomía laparoscópica.

Los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, pero que tuvieron desórdenes psicológicos y/o cognitivos, con educación limitada y/o que no fueron capaces de comprender los procedimientos a realizar o el consentimiento informado, que fueron diagnosticados de enfermedades crónicas con proceso inflamatorio y/o cáncer, inmunodeprimidos, o en tratamiento de diálisis fueron eliminados del estudio.

De la misma manera, los pacientes que no tuvieron correctamente cumplimentado los documentos del consentimiento informado y/o que no estuvieron firmados, así como también los individuos que estaban participando o que, de manera programada, fueran a participar en ensayos clínicos durante el periodo de consecución de este proyecto, fueron excluidos del estudio.

### **3. Clasificación de los pacientes**

El primer criterio de clasificación que se tuvo en cuenta fue el sexo, debido a las diferencias derivadas a nivel del ambiente hormonal de los individuos. Como ya se ha descrito durante la introducción, la distribución del tejido adiposo, así como también el metabolismo lipídico presenta dimorfismo sexual, por lo que fue un hecho que se tuvo en consideración. Siguiendo los objetivos de este estudio, se clasificó a los pacientes atendiendo a su estado nutricional determinado por el IMC, según la fórmula aceptada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el diagnóstico y control de la obesidad (WHO, 2018). El IMC se obtiene dividiendo el peso del individuo en kilogramos entre el cuadrado de su altura en metros (tabla 2).

<b>Clasificación</b>	<b>IMC</b>
Bajo peso	<18,50
Delgadez severa	<16,00
Delgadez moderada	16,00 – 16,99
Delgadez leve	17,00 – 18,49
Normopeso	18,50 – 24,99
Sobrepeso	25,00 – 29,99
Obeso	≥30,00
Obesidad leve	30,00 – 34,99
Obesidad media	35,00 – 39,99
Obesidad mórbida	≥40,00

**Tabla 2.** Clasificación del estado nutricional de los individuos, atendiendo a su índice de masa corporal (IMC).

Debido al escaso número de pacientes controles que formaron parte del estudio fue necesaria una simplificación de la clasificación. En este sentido, se consideró miembro del grupo control a aquellos individuos que presentaron un IMC menor de 30,00; aquellos pacientes que presentaron cifras iguales o superiores a 30,00 formaron parte del grupo obesidad (tabla 3).

<b>Grupo</b>	<b>IMC</b>
Control	<30,00
Obesidad	≥30,00

**Tabla 3.** Clasificación de los pacientes incluidos en el estudio, atendiendo a su índice de masa corporal (IMC).

Otro parámetro registrado fue el perímetro abdominal, indicador de la acumulación de tejido adiposo a nivel abdominal. Siguiendo las recomendaciones de la OSM, se consideró como individuos sin riesgo a un perímetro abdominal en mujeres inferior a 88cm y en varones inferior a 102cm. A partir de estas cifras, el riesgo de patologías asociadas con la obesidad aumenta (WHO, 2008).

En ocasiones, fue conveniente incluir otros parámetros para una adecuada clasificación. Así, al valorar el perfil lipídico o glucídico de los pacientes fue preciso tener en consideración el tratamiento al que estaban sometidos. Para ello, se recogió el tratamiento de cada paciente en el momento de la intervención quirúrgica teniendo en cuenta los efectos de

los principios activos de los mismos. De esta manera, los pacientes fueron clasificados en base a si estaban o no bajo tratamiento modificador del perfil lipídico o modificador de la homeostasia de la glucosa.

## 4. Muestras

Los pacientes previamente seleccionados, siguiendo los criterios expuestos anteriormente, fueron sometidos a una intervención quirúrgica abdominal laparoscópica bajo anestesia espinal, en el Hospital Universitario de Salamanca. Durante la intervención, se escindió un trozo de tejido adiposo cercano al epiplón, conocido también como tejido adiposo omental, y se incluyó en una solución salina estéril (NaCl al 0,9%) en un recipiente de muestras biológicas humanas correctamente rotulado. Al mismo tiempo se obtuvo una muestra de sangre en un tubo sin anticoagulante.

Inmediatamente, ambas muestras fueron transportadas hasta el laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, para ser procesadas.

Respecto a la muestra de tejido adiposo, tras varios lavados en solución salina, generalmente se dividió en fragmentos para poder realizar diferentes experimentos, siempre teniendo en cuenta el volumen recibido del Hospital. Un pequeño trozo se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C con el fin de determinar a posteriori mediante Western blot la presencia de determinadas proteínas a caracterizar. Otro fragmento del tejido se fijó con formaldehído al 4%, para luego incluirlo en parafina y cortarlo para después destinarlo a estudios inmunohistoquímicos, así como a hibridación in situ (con el fin de valorar la presencia del ARNm de ANGPTL8). En algunas ocasiones, se reservó otro fragmento de tejido adiposo fresco para realizar cultivos de explantes; puntualmente, y dependiendo del volumen de tejido disponible, se aislaron los adipocitos

con la finalidad de valorar la actividad lipolítica de los mismos, utilizando diferentes sustancias, que detallaremos posteriormente.

La muestra sanguínea se centrifugó a 1500 *g*, durante 20 minutos a 4°C, con la finalidad de separar el plasma de la fase celular. Las muestras de plasma obtenidas fueron congeladas en nitrógeno líquido, para posteriormente almacenarlas a -80°C para análisis posteriores.

## 5. Variables clínicas

### 5.1. Variables obtenidas en el Hospital Universitario de Salamanca

Para desarrollar el estudio, se analizaron diferentes datos de los pacientes, tanto parámetros antropométricos, como variables procedentes de la última analítica que figuraba en la historia clínica del individuo, así como también su medicación habitual y diferentes parámetros que nos permitieron evaluar las diferentes condiciones asociadas con la obesidad.

Los variables antropométricas obtenidas fueron el peso, la talla (necesarias para el cálculo del IMC) y el perímetro abdominal, todas ellas registradas por personal sanitario del Hospital Universitario de Salamanca.

Para valorar el perfil lipídico, se recogieron las siguientes variables analíticas: *TAG* (mg/dl), *HDL* (mg/dl), *LDL calculado* (mg/dl), *colesterol total* (mg/dl) y *leptina* (ng/ml). Además, tras revisar la medicación habitual de los pacientes, se valoraron aquellos casos en los que el perfil lipídico basal del individuo estuviese afectado por fármacos destinados a tal fin. De este modo, se crearon dos grupos, el primero formado por pacientes sin tratamiento modificador del perfil lipídico, y el otro con individuos con tratamiento modificador del perfil lipídico. Éste último incluía pacientes en

tratamiento con estatinas (atorvastatina, simvastatina), o fármacos derivados del ácido fibríco (gemfibrozilo).

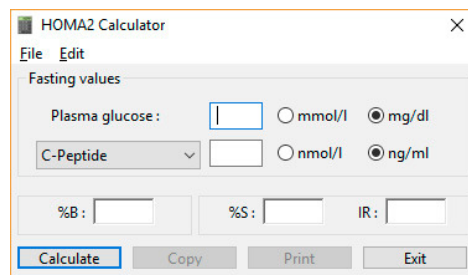
El estudio del perfil glucémico se realizó mediante el uso de los siguientes parámetros analíticos: *glucemia* (mg/dl), *insulinemia* ( $\mu$ UI/ml), *hemoglobina glucosilada* (%) y *péptido C* (ng/ml). Del mismo modo que en el párrafo anterior, se revisaron las historias clínicas de los pacientes incluidos en el estudio, y se consideraron aquellos fármacos que regulaban la glucemia, como las biguanidas (metformina), inhibidores de dipeptidil-peptidasa-4 (sitagliptina), sulfonilureas (glicazida), e insulina (incluyendo sus diferentes análogos). Teniendo en cuenta lo anterior, se crearon dos grupos de pacientes, atendiendo a si estaban o no en tratamiento antihiper glucemiante.

## 5.2. Variables calculadas

Para realizar un estudio más preciso del metabolismo glucídico, optamos por utilizar los índices HOMA. Este modelo matemático fue desarrollado en 1985 con el fin de obtener un método sencillo y rápido, para determinar el control de la homeostasis de la glucosa (Matthews et al., 1985). Mediante el uso de dos variables analíticas, glucemia e insulinemia, fue posible predecir el grado de afectación de las células beta pancreáticas (HOMA-%B), así como también determinar la sensibilidad periférica a la insulina (HOMA-%S) que presentaba el individuo. Se incluyó también otro parámetro, el nivel de resistencia a la insulina (HOMA-RI), calculado a partir de HOMA-%S.

A lo largo de los años, se fue perfeccionando el modelo (HOMA2), haciéndolo más preciso, permitiendo así una mejor monitorización del metabolismo glucídico. Una de las modificaciones incluidas fue la posibilidad del uso de los valores de péptido C para el cálculo de los diferentes índices (Levy, Matthews y Hermans, 1998).

Debido a la complejidad del cálculo de estos parámetros, en 2004 la Unidad de Ensayos de Diabetes de la Universidad de Oxford desarrolló una aplicación informática gratuita para facilitar la obtención de los índices HOMA2, siguiendo con las indicaciones de los trabajos anteriores (Diabetes Trials Unit, 2004) (figura 14).



**Figura 14.** Ventana principal de la aplicación HOMA2 Calculator, desarrollada por la Unidad de Ensayos de Diabetes de la Universidad de Oxford.

De esta manera, se calcularon los diferentes índices HOMA2, a partir de los valores de glucemia, insulinemia y péptido C plasmático de los pacientes incluidos en el estudio.

## 6. Inmunoensayo enzimático

Para determinar los niveles plasmáticos de ANGPTL8, se optó por realizar un inmunoensayo enzimático (EIA). Es una técnica que se basa en la unión de un anticuerpo a un antígeno específico. En este caso, se utilizó un Kit comercial para la detección del fragmento C-terminal de ANGPTL8 presente en el plasma (Betatrophin (139-198); Phoenix Pharmaceutical®).

El primer paso fue determinar qué muestras iban a ser valoradas, teniendo en cuenta que iban a colocarse por duplicado en la placa de pocillos.

Tras preparar el buffer de ensayo, junto con el estándar de ANGPTL8, el control positivo y el anticuerpo primario anti-ANGPTL8 incluidos en el kit, se dejaron a temperatura ambiente. Una vez atemperadas las soluciones, se crearon los cinco puntos de la curva estándar, reconstituyendo el estándar con 1 ml del buffer de ensayo.



Del mismo modo se reconstituyó el anticuerpo primario anti-ANGPTL8 con 5 ml del buffer de ensayo y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente. El control positivo también fue reconstituido con 200  $\mu$ l del buffer de ensayo.

Posteriormente se rellenaron los pocillos con su correspondiente contenido y se tapó con una inmunoplaaca selladora de acetato presente en el kit. Se incubó la placa durante 24 horas a 4°C.

Transcurrido este tiempo, se retiró el contenido líquido de la placa de pocillos volcándola sobre papel secante. Se realizaron 4 lavados con buffer de ensayo. Se procuró que tras el último lavado no quedasen restos líquidos dentro de los pocillos, ya que podrían afectar la lectura de la placa. Tras este paso, se añadieron 100  $\mu$ l a cada pocillo de la solución de estreptoavidina-HRP 1:1000, en buffer de ensayo. Se selló nuevamente la placa con un plástico de acetato, y se dejó incubar durante 1 hora en agitación constante orbital a temperatura ambiente.

Nuevamente se eliminó el contenido líquido de la placa sobre un papel secante y se realizaron 4 lavados con buffer de ensayo. En el último, se eliminaron los restos líquidos y se añadieron 100  $\mu$ l de solución sustrato de revelado 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) previamente atemperado a cada pocillo. Se volvió a sellar la placa, y se incubó durante 1 hora en agitación constante orbital a temperatura ambiente.

Al terminar esta incubación, se retiró la placa de acetato, y sin lavar, se añadieron 100  $\mu$ l de HCl 2N previamente atemperado a cada pocillo y se procedió a la lectura de las absorbancias de las muestras utilizando un espectrofotómetro tipo Asys UVM340 (Biochrom®) a 450 nm.

Finalmente, se procedió a calcular la concentración plasmática de ANGPTL8 utilizando como referencia la curva estándar.

## 7. Inmunohistoquímica

Es un procedimiento histológico mediante el cual es posible identificar antígenos concretos mediante el uso de anticuerpos específicos, utilizando métodos de detección directos o indirectos. Para realizar dicho experimento, es necesario que la muestra sea sometida a diferentes procedimientos con la finalidad de permitir la unión del anticuerpo al sustrato diana, y además que dicha unión sea óptima y valorable.

Una vez recibida la muestra de tejido adiposo, parte de la misma se trasladó hasta el laboratorio del departamento de Anatomía e Histología Humanas, donde se fijó en formaldehído al 4% durante, al menos, 24 horas. El siguiente paso fue reemplazar el agua que contenía el tejido por un medio líquido capaz de solidificarse, como la parafina, proporcionando así a la muestra la consistencia adecuada para poder obtener cortes lo suficientemente finos y sin fragmentarse, manteniendo la estructura de los distintos elementos.

Para ello, se deshidrató el tejido eliminando así el agua de la muestra para poder introducir el medio de inclusión, ya que éste no es hidrosoluble. Se sometió al tejido graso a sucesivos baños de etanol a diferentes concentraciones (30°, 50°, 70°, 90° y 100°). Como agente aclarante se utilizó Xilol. Este proceso consistió en sustituir el alcohol utilizado para la deshidratación por una sustancia líquida en la que el medio de inclusión pueda más tarde disolverse y, así penetrar de manera homogénea en el tejido.

Después se sumergieron las muestras en parafina líquida (Histoseck, Merk®) en estufa. La finalidad de este proceso fue rellenar completamente la muestra con el medio de inclusión elegido. Se trata con esto de ocupar con el medio tanto los espacios intra- como extra-celulares, donde se situaba en un principio el agua del tejido. Seguidamente, se

realizaron pasos sucesivos por distintas parafinas fundidas con distintos puntos de fusión (40°C, 50°C y 59°C) en una estufa de 59°C.

La última parafina sirvió para la confección del denominado bloque sólido. Se introdujo primero la parafina y seguidamente la pieza en la posición adecuada, lo que permitió conseguir bloques de fácil manejo para la realización de cortes de buena calidad.

Una vez formado el bloque, se obtuvieron muestras de entre 5-7 micras con un microtomo de rotación HM 325 (Microm®). Para la realización de los cortes fueron tallados los bloques de parafina, eliminando en la medida de lo posible el exceso de parafina existente alrededor de la pieza para que la cuchilla del microtomo encontrara la menor resistencia posible. Los cortes fueron depositados sobre portaobjetos tratados con gelatina de alumbre de cromo, sobre una placa a 37°C para proceder al estiramiento de los cortes obtenidos. Una vez secas, las muestras podían ser almacenadas para su posterior procesamiento.

Para continuar con el estudio se procedió con la desparafinación de las muestras con 3 baños de xilol al 100%. Posteriormente se continuó con la hidratación de las muestras con baños de etanol de concentraciones decrecientes (100°, 96° y 70°) y agua destilada. Para bloquear la peroxidasa endógena se utilizó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,2% en metanol, con la finalidad de eliminar falsos positivos que pudiesen aparecer tras el revelado. Posteriormente, se realizó un lavado en tampón TBS (Trizma base 0,5M; NaCl al 9%; en agua destilada, pH 7,4). El TBS es un tampón de lavado que empleamos a lo largo de todo el protocolo inmunohistoquímico. Estos lavados son necesarios para la eliminación de anticuerpos no unidos a antígenos y otras sustancias antes de realizar la siguiente incubación.

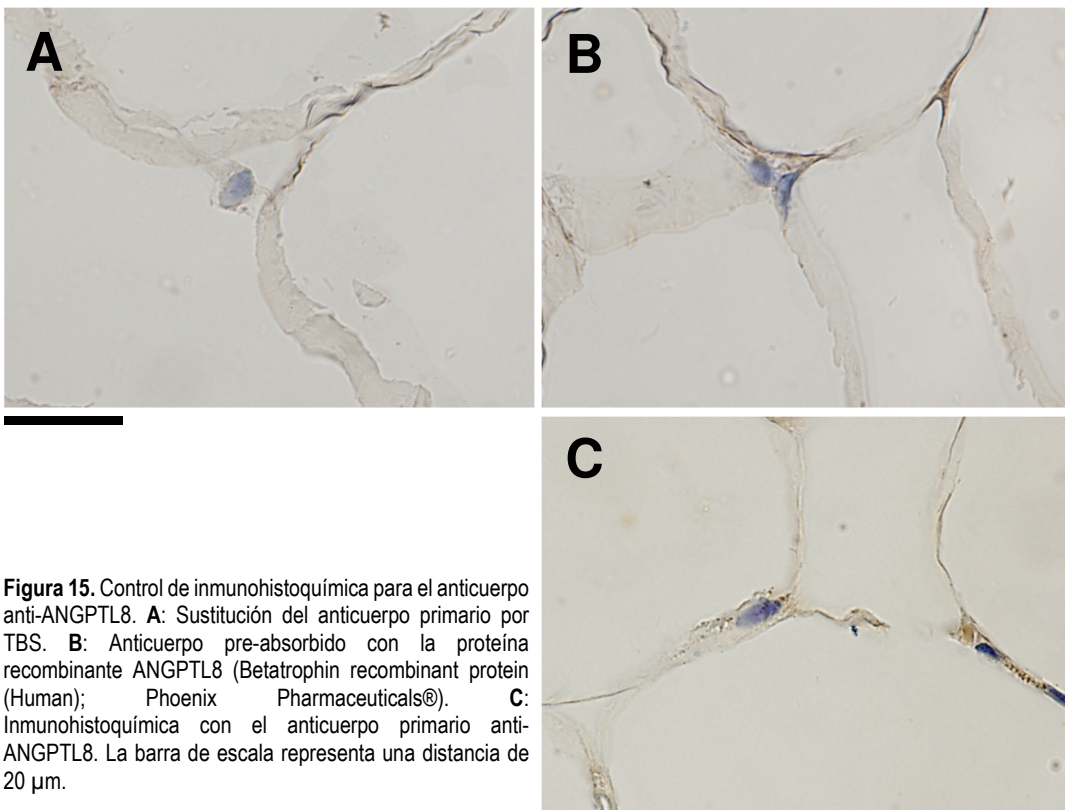
Para bloquear las inmunoglobulinas endógenas del tejido, las muestras se incubaron con suero de cerdo no inmune (1:30 en TBS)

durante 30 minutos. Como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo policlonal anti-ANGPTL8 obtenido en conejo (1:200 en TBS; Novus Biologicals®). Las muestras se incubaron durante 24 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo, y después de dos lavados con TBS, se aplicó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo biotinado (1:100 en TBS; Dako®) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron otros dos lavados con TBS.

El siguiente paso fue incubar las muestras con estreptavidina-peroxidasa (1:100 en TBS; Abcam®) durante 30 minutos. La finalidad de este proceso fue formar el complejo biotina-avidina-peroxidasa necesario para el revelado. Tras el periodo de incubación, se realizaron dos lavados con TBS, para proceder con el revelado enzimático con DAB (3,3'-diaminobencidina 1,4mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,005%; Trizma base 0,05M; en agua destilada, pH 7,4). Como resultado, se produjo la inmunotinción característica de color pardo. Para frenar la reacción, se eliminaron los restos de DAB y se añadió agua destilada. Después de 5 minutos, se utilizó hematoxilina de Mayer para poder visualizar los núcleos. Por último, se montaron los porta-objetos con un medio de montaje acuoso (Aquatex®).

Los portaobjetos con las muestras fueron fotografiados con un microscopio de luz transmitida Axiopot (Zeiss®), que incorpora una cámara digital Olympus® DP70. El programa informático utilizado para la obtención de imágenes fue Olympus DP Controller (v1.1.1.65), específico de la cámara utilizada. De esta manera se obtuvieron aproximadamente 20 fotografías de cada porta, dando un total de 40 imágenes de cada muestra de tejido adiposo.

Se realizaron dos controles de la técnica de inmunohistoquímica. Por un lado, una muestra fue incubada sin el anticuerpo primario anti-ANGPTL8, sólo con TBS; y por otro, se utilizó un anticuerpo primario previamente incubado con la proteína recombinante de ANGPTL8 (Betatrophin recombinant protein (Human); Phoenix Pharmaceuticals®) durante 24 horas a 4°C (figura 15).



Aparte de determinar la inmunorreactividad de ANGPTL8, se optó por valorar el tamaño de las vacuolas lipídicas. Para ello, mediante el programa ImageJ (National Institutes of Health®, v1.50b) previamente calibrado, se midieron las áreas de los espacios “blancos” ubicados en el interior de los adipocitos (figura 16). Estas áreas se corresponden con la vacuola lipídica. Debido a los diferentes procesos a los que la muestra es sometida, estos espacios quedan vacíos, pero a pesar de ello, nos informan

acerca de la capacidad de almacenamiento de lípidos de esos adipocitos. Una vez medidas todas las áreas de las vacuolas de cada muestra, se ordenaron de manera ascendente creando cuatro grupos según el periodo de frecuencia que presentaban. El último de ellos determinaría el tamaño medio de la vacuola lipídica de grupo correspondiente. De esta manera pudimos asegurarnos de que estábamos midiendo el área mayor de las vacuolas. Los resultados se expresaron como media del área en  $\mu\text{m}^2$  acompañada del error estándar de la media (EEM), lo que nos permitió establecer las distintas comparaciones entre los diferentes grupos de estudio.

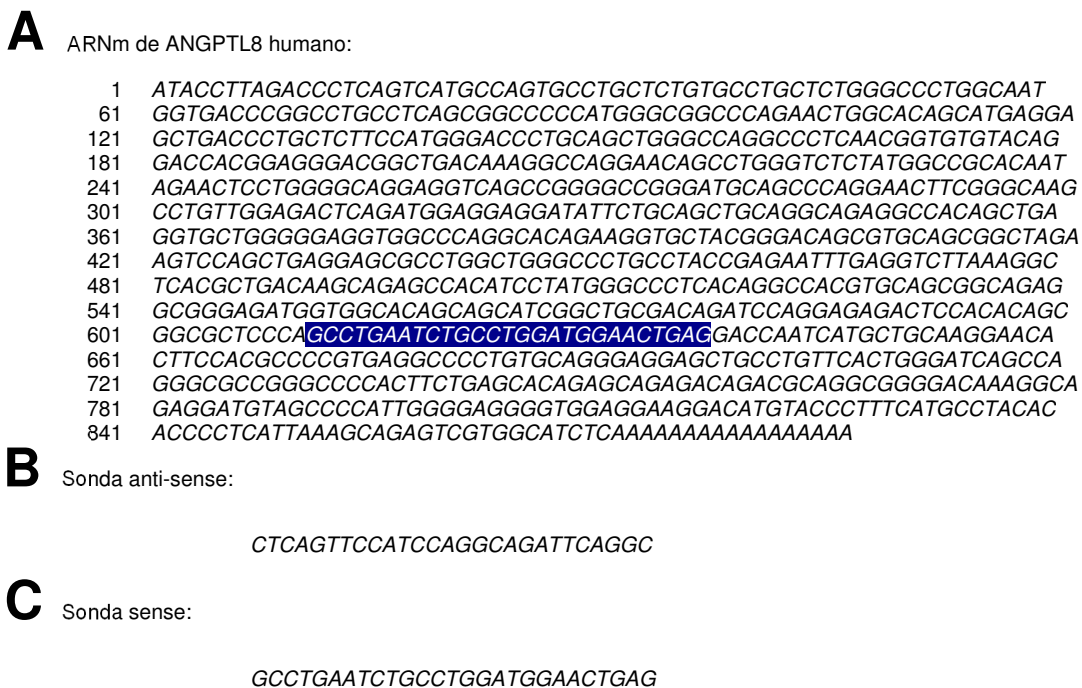


**Figura 13.** Área de la vacuola lipídica de un adipocito, seleccionada mediante el programa ImageJ.

## 8. Hibridación in-situ

Para determinar la diferencia en la producción de ANGPTL8 a nivel local del tejido adiposo se optó por realizar hibridación in situ de su ARN mensajero. Este experimento consiste en localizar el ARN mensajero que codifica la proteína ANGPTL8 mediante el uso de una sonda específica marcada con biotina. A su vez, la unión de diferentes anticuerpos a la biotina de la sonda posibilitará su revelado.

El primer paso fue el diseño de la cadena sencilla de nucleótidos específica denominada sonda, complementaria al ARN mensajero que codifica ANGPTL8 (figura 17A). Para el diseño del oligonucleótido sonda (sonda anti-sense) (figura 17B) se tuvo en cuenta la cadena de ribonucleótidos del ARN mensajero, y se realizó un screening utilizando la aplicación en línea BLAST® (Altschul et al., 1997) para evitar que la sonda se uniese a alguna otra cadena con la misma secuencia que no sea objeto de estudio. Como control negativo, también se diseñó la cadena complementaria (sonda sense) (figura 17C). Las sondas fueron suministradas por Sigma®.



**Figura 17.** Sondas necesarias para el experimento de hibridación in situ, suministradas por los laboratorios de Sigma®. **A:** Bases que forman el ARNm de ANGPTL8 de humano. En azul está marcado el fragmento seleccionado para diseñar las sondas necesarias para la hibridación in situ. **B:** Cadena de bases de la sonda anti-sense. **C:** Cadena de bases de la sonda sense, utilizada como control. Las letras en mayúsculas representan las cuatro bases que forman los ácidos nucleicos (Adenina, A; Citosina, C; Guanina, G; Timina, T).

Después de desparafinar y rehidratar las muestras siguiendo el protocolo de la inmunohistoquímica, para evitar enlaces no específicos de la sonda con grupos amino cargados positivamente, las muestras fueron tratadas con tampón acetilado (trietanolamina 75mM; anhídrido acético 25mM; DEPC 70 $\mu$ M; NaCl 0,9%; en agua destilada, pH 7,5) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras varios lavados con tampón fosfato salino (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,5mM; DEPC 70 $\mu$ M; NaCl 0,9%; en agua destilada, pH 7,5) para eliminar restos de tampón acetilado, las muestras se dejaron secar en estufa a 37°C durante aproximadamente 1 hora, teniendo en cuenta que la humedad en el tejido debía desaparecer por completo.

Para comenzar la hibridación, previamente se incubaron las muestras en buffer de hibridación (OmniBuff; WAK-Chemie®) durante 1 hora en estufa, a 37°C. Transcurrido este tiempo, se añadió la sonda anti-sense teniendo en cuenta una concentración final de 25 ng/ $\mu$ l de buffer de hibridación. Las muestras se hibridaron con la sonda en un termociclador Hybaid OmniSlide Thermal Cycler System (Fisher®) durante 24 horas a 55°C.

Posteriormente se realizaron los lavados astringentes para remover los restos de sondas inespecíficas, así como también lavados con ribonucleasas para degradar las cadenas sencillas, manteniendo los híbridos de doble cadena. Primero se realizó un lavado con tampón citrato sódico (SSC) 4x (NaCl 0,6M; Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 0,07M; DEPC 1,5mM; en agua destilada, pH 7) durante 10 minutos a 30°C. Seguidamente, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente en SSC de concentraciones decrecientes (2x; 1x y 0,5x, respectivamente). El siguiente paso fue realizar un lavado con tampón TrisEDTA salino con ribonucleasas (NaCl 0,5M; Trizma base 15,5mM; EDTA 1mM; RNasa A al 2% (Roche®); en agua destilada, pH 8) durante 30 minutos a 37°C.



Una vez concluidos los lavados, se realizaron dos lavados con tampón TBS de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente. A partir de este punto, el protocolo fue similar al de la inmunohitoquímica. Se bloquearon las inmunoglobulinas endógenas del tejido con suero de cerdo no inmune (1:30 en TBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras eliminar el suero de cerdo, las muestras se incubaron con anticuerpo primario anti-biotina obtenido en ratón (1:350 en TBS, Dako®) durante 24 horas a 4°C. Después de los lavados correspondientes con TBS, se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón biotinado (1:150 en TBS; Dako®) y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente.

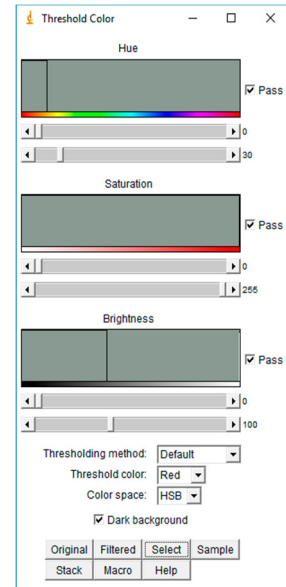
El siguiente paso fue incubar las muestras con estreptavidina-peroxidasa (1:100 en TBS; Dako®) durante 30 minutos. Tras el periodo de incubación, se realizaron dos lavados con TBS, para proceder con el revelado enzimático con DAB (3,3'-diaminobencidina 1,4mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,005%; Trizma base 0,5M; en agua destilada, pH 7,4). Se eliminaron los restos de DAB y se añadió agua destilada. Después de 5 minutos, se utilizó hematoxilina de Mayer para poder visualizar los núcleos. Por último, se montaron los porta-objetos con un medio de montaje acuoso (Aquatex®).

Al igual que con las muestras sometidas a inmunohistoquímica, los portas fueron fotografiados, obteniéndose aproximadamente 25 fotografías de cada porta, dando un total de 50 imágenes de cada muestra de tejido adiposo. Las imágenes finalmente fueron procesadas con los programas Photoshop CS6 (Adobe® v13.0) e ImageJ (National Institutes of Health®, v1.50b).

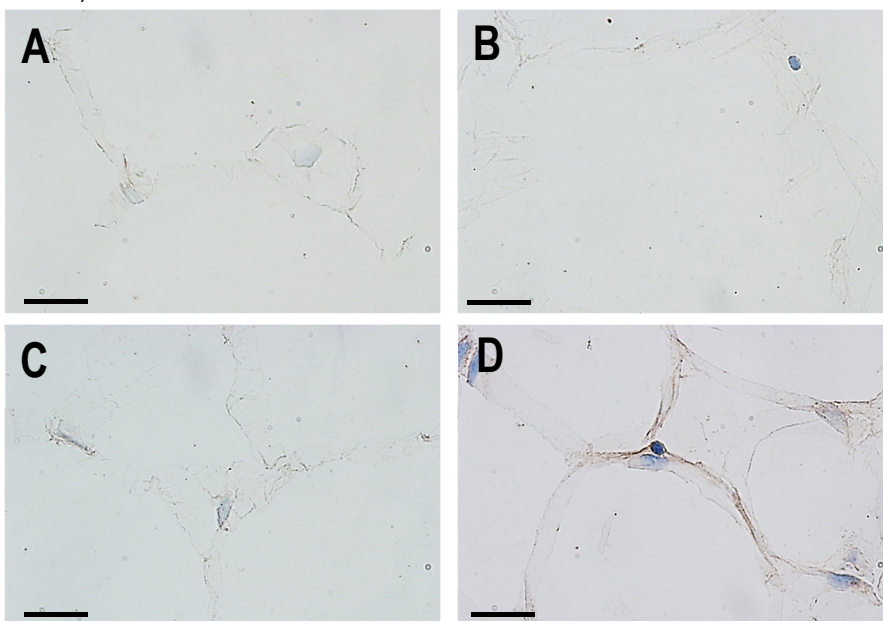
En este punto, se determinó el grado de intensidad de reacción con el programa ImageJ. El primer paso fue definir los parámetros base que se aplicarían a todas las imágenes para seleccionar las zonas consideradas reactivas. Teniendo en cuenta el método de revelado utilizado, a través de

la herramienta Threshold Color especificamos la región positiva mediante tres parámetros: Hue (tono de color) entre 0 y 30, Saturation (saturación) entre 0 y 255, y Brightness (brillo) entre 0 y 100 (figura 18). De esta manera, sólo se seleccionaban las zonas marcadas de color pardo, indicando la región considerada positiva. Siguiendo este protocolo, se analizó el resto de las imágenes, midiendo el área reactiva ( $\mu\text{m}^2$ ) y el gris medio (escala entre 0, representando el blanco absoluto, y 255, indicando el negro absoluto), para después comparar los diferentes grupos del estudio.

Se realizaron tres controles de la técnica de hibridación in-situ (figura 19). Por un lado, antes de realizar la hibridación con la sonda anti-sense, una muestra fue tratada previamente con SSC 2x con RNasa A al 1% (Roche®), dejándola incubar durante 5 horas a 37°C. Posteriormente se siguió con el resto del protocolo, dejándola secar en estufa a 37°C durante 1 hora (figura 19A). El siguiente control fue seleccionar otra muestra de tejido adiposo a la que se substituyó la sonda anti-sense por buffer de hibridación, continuando el protocolo (figura 19B). Por último, en otra muestra, se utilizó la sonda sense en lugar de la anti-sense (figura 19C).



**Figura 18.** Ventana de selección de los parámetros indicadores de áreas reactivas, utilizando el programa informático ImageJ.



**Figura 19.** Controles de la técnica de hibridación in situ para la localización del ARNm de ANGPTL8. **A:** Muestra tratada previamente con RNasa. **B:** Sustitución de la sonda anti-sense por buffer de hibridación. **C:** Sustitución de la sonda anti-sense por la sonda sense. **D:** Hibridación realizada con la sonda anti-sense. La barra de escala representa una distancia de 20  $\mu\text{m}$ .

## 9. Western blot

Como técnica complementaria, se decidió realizar Western blot para detectar ANGPTL8 en el tejido adiposo. Antes de realizar este experimento, fue necesario determinar la concentración de proteínas de las muestras de las que disponíamos. Para ello se utilizó como referencia el método de Lowry (Lowry, Rosebrough, Farr y Randall, 1951). Básicamente, tras homogenar las muestras de tejido adiposo, se calculó la cantidad de proteínas por unidad de volumen con la ayuda de la determinación previa de una curva estándar de proteínas utilizando BSA (Albúmina de suero bovino fracción V; Roche®).

Para la obtención del lisado tanto del tejido como de los explantes de tejido cultivado, se utilizó un tampón RIPA ("Radioimmunoprecipitation assay buffer": Nonidet P-40 1%; deoxicolato de sodio 0,5%; SDS 0,1%; cóctel de inhibidores de proteasas (P8340, Sigma®); 1% en PBS pH 7,4). Una vez obtenido una consistencia homogénea de la muestra, se procedió a su centrifugación a 16000g durante 30 minutos a 4°C.

Tras la centrifugación, se observó que aparecían 3 capas fácilmente distinguibles. La superior, formada por los lípidos contenidos en los adipocitos, se encontraba solidificada, por lo que facilitó su manipulación. Una fase inferior, denominado pellet, formada por restos de tejidos. Y, por último, una capa intermedia, la cual contenía las proteínas a estudio. Este homogenado se almacenó a -80°C, a excepción de una muestra utilizada para determinar su concentración proteica.

Después de preparar la curva estándar de BSA con concentraciones ascendentes, se añadieron los reactivos necesarios para la medición de las absorbancias. Para ello, se prepararon dos reactivos. El primero fue denominado reactivo A ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2M; NaOH 0,1M;  $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  7mM; SDS 35mM; en agua destilada), y el segundo

reactivo B ( $\text{CuSO}_4$  250mM; en agua destilada). Con estos reactivos se preparó un tercero, denominado reactivo C (100 partes del reactivo A por 1 parte del reactivo B). Se añadió este último tanto a las muestras como a la curva estándar de BSA, y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se agregó el reactivo Folin (reactivo de fenol Folin & Ciocalteu (Merck®) y agua destilada; 1:1), y se dejaron incubar las muestras en oscuridad durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Tras la incubación con los diferentes reactivos, con la ayuda de un espectrofotómetro tipo Asys UVM340 (Biochrom®) a una longitud de onda de 660 nm, se midió la absorbancia de las muestras y de los puntos de la curva estándar de BSA. Mediante el uso de una plantilla patrón, se obtuvo la concentración proteica de las muestras.

Una vez obtenido el homogenado de proteínas, y habiendo determinado su concentración, se procedió a separar las proteínas de las muestras en un gel denominado SDS-PAGE (*“discontinuous sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis”*, gel para electroforesis de poliacrilamida y dodecilsulfato sódico). Las diferentes concentraciones de los componentes del gel determinan el tamaño de los poros del mismo, modificando así la velocidad a la que las proteínas discurren por él. Debido a que ANGPTL 8 tiene un peso molecular alrededor de los 22 kDa, se optó por un gel de separación de acrilamida al 12% (acrilamida 12%; bisacrilamida 0,32%; “Resolving Gel Buffer” (Tris-HCl 1,5M; pH 8,8 (Bio-Rad®)) 0,375M; SDS 0,1%; persulfato de amonio 0,1%; TEMED 2,2mM; en agua destilada). Para la localización de AMPK y p-AMPK se utilizó el gel de separación de acrilamida al 10% (acrilamida 10%; bisacrilamida 0,27%; “Resolving Gel Buffer” (Tris-HCl 1,5M; pH 8,8 (Bio-Rad®)) 0,375M; SDS 0,1%; persulfato de amonio 0,1%; TEMED 2,2mM; en agua destilada).

Para formar las diferentes calles, así como también para concentrar las muestras antes de pasar al gel separador, preparamos el gel concentrador de acrilamida al 4%, donde colocaremos las muestras (acrilamida 4%; bisacrilamida 0,11%; "Stacking Gel Buffer" (Tris-HCl 0,5M; pH 6,8 (Bio-Rad®)) 0,125M; SDS 0,1%; persulfato de amonio 0,1%; TEMED 6,6mM; en agua destilada).

Durante la polimerización de los geles, se prepararon las muestras. Una vez seleccionadas, se mezclaron 10µg de proteínas con agentes reductores. Para ello se añadieron a cada muestra 1µl de β-mercaptoetanol (AppliChem, Panreac®) y 7,5 µl de tampón de carga Laemmli 4x ("Stacking Gel Buffer" (Tris-HCl 0,5M; pH 6,8 (Bio-Rad®)) 0,25M; glicerol 1,37M; SDS 0,32M; azul de bromofenol 12mM; en agua destilada). Posteriormente, se hirvieron las muestras durante 1 minuto, para luego colocarlas en hielo picado.

Tras la polimerización de los geles, se cargaron las calles con las muestras correspondientes y se procedió con la fase de electroforesis. Para ello fue necesario la preparación de un buffer específico denominado buffer de electroforesis (Trizma base 0,025M; glicina 0,2M; SDS 3,5M; en agua destilada). Se rellenó la cubeta de electroforesis con este buffer, y se conectó a una fuente eléctrica a 30 mA hasta que el frente, indicado por la línea azul (color dado por el azul de bromofenol que contiene), corriera a través de todo el gel separador. En este momento se detuvo la fuente y se pasó a la fase de transferencia.

Tras separar los cristales, se colocó el gel encima de una membrana de nitrocelulosa previamente humedecida con buffer de transferencia (Trizma base 0,025M; glicina 0,2M; SDS 3,5M; metanol 5M; en agua destilada). Se montaron los denominados sándwiches, colocando el gel y la membrana entre papeles Whatman y esponjas, depositándolos

luego dentro de la cubeta de transferencia, junto con un imán y un bloque de hielo para impedir la degradación proteica debida al aumento de la temperatura. Se colocó la cubeta sobre un agitador magnético y se conectó a una fuente de energía a 250 mA durante 120 minutos. La finalidad de esta fase es el paso de las proteínas desde los geles a la membrana de nitrocelulosa.

Antes de empezar con la fase de incubación con los anticuerpos, se comprobó si las proteínas se alojaban en la membrana utilizando rojo Ponceau (rojo de Ponceau al 0,1%; en ácido acético al 5%). Después de eliminar los restos del colorante con agua destilada, se bloquearon las membranas con leche (Applichem®) al 5% en PBS-Tw (Tween 20 al 0,2%; en PBS) durante 30 minutos en agitación constante de balanceo. Tras el bloqueo se procedió a la incubación con el anticuerpo primario. En nuestro caso, los anticuerpos primarios utilizados fueron anticuerpo anti-ANGPTL8 obtenido en conejo (1:1000 en leche al 1% en PBS-Tw; Novus Biologicals®), anti-AMPK alfa1 obtenido en conejo (1:500 en leche al 1% en PBS-Tw; Bioss Antibodies®), anti-pAMPK (Thr183/Thr172) obtenido en conejo (1:500 en leche al 1% en PBS-Tw; Bioss Antibodies®) y anticuerpo anti- $\beta$  actina obtenido en ratón (1:5000 en leche al 1% en PBS-Tw, Sigma®). Se incubaron las membranas con estos anticuerpos durante 24 hora en agitación constante de balanceo a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con PBS-Tw para eliminar los restos del anticuerpo no unido al antígeno.

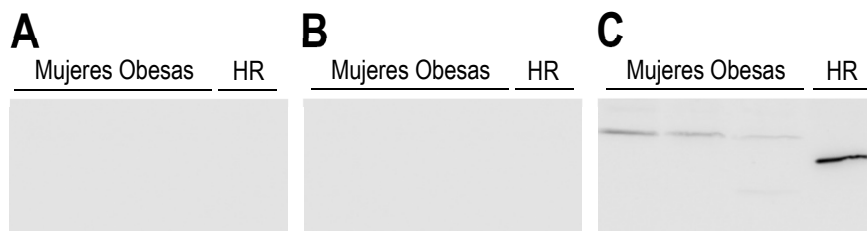
Para detectar los anticuerpos primarios, utilizamos los siguientes anticuerpos secundarios: anticuerpo anti-conejo HRP (1:5000 en leche al 5% en PBS-Tw, Jackson ImmnuoResearch®) y anticuerpo anti-ratón HRP (1:5000 en leche al 5% en PBS-Tw, Jackson ImmnuoResearch ®). Las muestras se incubaron con estos anticuerpos durante 1 hora en agitación

constante de balanceo. Tras este tiempo se realizaron 3 lavados con PBS-Tw.

El último paso fue el revelado de las membranas mediante un método de quimioluminiscencia, utilizando reactivos comerciales (ECL Blotting Reagents, Sigma®). Este reactivo se colocó sobre las membranas y se procedió a detectar la quimioluminiscencia con un analizador de luminiscencia (LAS-4000 Luminiscence Image Analyzer; Fujifilm®), procesando las imágenes con su programa específico (Image Reader LAS-4000; Fujifilm®). Al finalizar se realizaron un par de lavados con PBS-Tw, y se almacenaron a 4°C.

Las imágenes obtenidas tras el revelado fueron procesadas con el programa Multi Gauge (Fujifilm®, v 3.0), donde se igualaron los niveles de grises para una correcta interpretación. Posteriormente, mediante el programa ImageJ (National Institutes of Health®, v1.50b) se midió la intensidad de las bandas mediante una escala de grises, ajustando estas variables a su respectivo control de carga (actina). Esta escala de grises toma valores desde el 0 (indicador de ausencia de reacción) hasta 255 (negro absoluto, máximo nivel de reacción).

Como controles del Western blot de ANGPTL8, por un lado, se incubaron unas muestras sin el anticuerpo primario anti-ANGPTL8, y por otro, se utilizó un anticuerpo primario anti-ANGPTL8 el cual fue previamente incubado con la proteína recombinante de ANGPTL8 (Betatrophin recombinant protein (Human); Phoenix Pharmaceuticals®) durante 24 horas a 4°C. Como control positivo de ANGPTL8 utilizamos hígado de rata. Se ha descrito anteriormente la elevada presencia de esta proteína a nivel de este tejido (R. Zhang, 2012; P. Yi et al., 2013) (figura 20).



**Figura 20.** Controles de Western Blot. **A:** Muestras incubadas sin el anticuerpo primario anti-ANGPTL8. **B:** Muestras incubadas con el anticuerpo preabsorbido con la proteína recombinante de ANGPTL8. **C:** Muestras incubadas con el anticuerpo primario. Las siglas HR corresponden a hígado de rata.

## 10. Lipólisis

Como se ha explicado en apartados anteriores, la actividad lipolítica es un proceso metabólico en el que se generan AGL y glicerol a partir de la hidrólisis de TAG. El glicerol es poco metabolizado por las células adiposas, ya que éstas poseen una actividad gliceroquinasa muy reducida. Sin embargo, los AGL que se producen en este proceso pueden ser re-esterificados por los adipocitos en los procesos espontáneos de lipogénesis y de síntesis de TAG. Por ello, la cantidad de AGL en el medio de incubación en un momento dado es la resultante de dos procesos metabólicos opuestos, lipólisis y lipogénesis, por lo que la determinación de los AGL constituye un índice de lipólisis poco fiable. Así, la liberación de glicerol al medio extracelular reflejó fielmente la actividad lipolítica (Carpene, 2001).

Para valorar los efectos de ANGPTL8, en su presencia se midió el glicerol liberado por adipocitos humanos aislados, comparándolo con los efectos de otros fármacos como isoprenalina e insulina.

El tejido adiposo visceral extraído de la región omental del paciente mediante cirugía laparoscópica se troceó en pequeños fragmentos y se depositó en frascos con solución del buffer Krebs Ringer Bicarbonato-albúmina (KRBA: NaCl 154mM; KCl 154mM; CaCl<sub>2</sub> 146mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 154mM; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 154mM; NaHCO<sub>3</sub> 166mM; glucosa 6mM; HEPES 10mM; albúmina 3,5%; en agua destilada). Los adipocitos fueron aislados por digestión enzimática de la trama proteica, tras añadir colagenasa



(Collagenase A; Roche®) a una concentración de 1mg/ml de tejido adiposo y realizar la digestión enzimática mediante agitación suave durante 30 - 45 minutos en baño a 37°C. Después, para separar las células adiposas del estroma conectivo, se filtró todo con la ayuda de una malla de nylon, quedando los adipocitos en la fase superior de la solución filtrada. Para eliminar la colagenasa, se realizaron tres lavados con KRBA a 37°C. Tras cada lavado se agitó suavemente al tubo para después dejarlo reposar durante 5 min en el baño hasta que se estabilizaran nuevamente las fases. Tras eliminar la fase inferior por aspiración, los adipocitos aislados fueron re-suspendidos en KRBA, a una relación de 1 ml de adipocitos por 9 ml de KRBA. Para bloquear las acciones antilipolíticas de la adenosina liberada por los propios adipocitos, utilizamos 20µl de ADA (Roche®). De esta manera aumentamos la lipólisis basal y la estimulada.

La lipólisis se analizó tomando como criterio la cantidad de glicerol liberado en el medio por los adipocitos, en el curso de la incubación con el fármaco a estudiar, en una proporción fármaco-suspensión de adipocitos de 1:100. Como se indicó anteriormente, además de ANGPTL8, los fármacos ensayados fueron isoprenalina 0,1µM (Sigma®), concentración que estimula la lipólisis y permite alcanzar una liberación máxima de glicerol, e insulina 0,1µM (Sigma®), para inhibir la lipólisis (Iglesias-Osma et al., 2005). La dosis elegida de ANGPTL8 fue de 20nM (Betatrophin recombinant protein, Human; Phoenix Pharmaceuticals®), tomando como referencia estudios previos (Y. Zhang et al., 2016).

Una vez añadidos los diferentes fármacos a la suspensión de adipocitos, se incubaron durante 90 minutos en baño a 37°C en agitación constante. Transcurrido este tiempo, el proceso se detuvo disminuyendo la temperatura de las muestras mediante su colocación en hielo durante 20 minutos.

Además, con concentraciones crecientes de glicerol, se elaboró una curva patrón que permitió extrapolar el glicerol liberado por las muestras.

Seguidamente, se midió el glicerol liberado al medio durante la incubación de los adipocitos en presencia de las diversas sustancias. Los reactivos empleados en este proceso consiguen que el glicerol liberado en la muestra pase a dihidroxiacetonafofato, obteniéndose en el paso NADH y un protón ( $H^+$ ), cuyas concentraciones son directamente proporcionales a la concentración de glicerol de la muestra. Para esto, tras preparar tampón hidracina ( $N_2H_5OH$  1M; glicina 2M;  $Cl_2Mg$  2mM; pH 9,8), se obtuvo el reactivo enzimático (ATP 0,15M; NAD 0,05M; GPDH 0,5%; glicerolquinasa 0,1%; en tampón hidracina).

También se determinaron los lípidos celulares presentes en nuestra suspensión de adipocitos. Para ello se utilizó el método de Dole y Meinertz (Dole y Meinertz, 1960). Inicialmente se pesaron dos tubos de cristal. Después se añadieron 500 $\mu$ l de la suspensión de adipocitos en sendos tubos de polipropileno. Seguidamente, a estos últimos se añadieron 2ml de solución de Dole (n-heptano; isopropanol;  $H_2SO_4$  1N; en proporción 1:4:0,1). Se realizó agitación rápida y se dejaron reposar 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 2ml de n-heptano, se agitaron los tubos y se dejaron reposar otros 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se distinguían claramente dos fases: una fase inferior acuosa, y una fase superior orgánica con los lípidos celulares. De esta última se aspiraron 2ml de cada tubo, pasándolos a los tubos de cristal previamente pesados. Se mantuvieron durante 48 horas en estufa a 40°C, para así pesarlos nuevamente.

Así pues, aplicando la fórmula de la figura 21, se calculó el valor promedio del peso seco (en mg) de la cantidad de lípidos presentes en la suspensión de adipocitos.

$$\begin{aligned} & \text{mg de lípidos en } 500\mu\text{l de suspensión de adipocitos} \\ & = (\text{peso final} - \text{peso inicial}) * \frac{2,4\text{ml}}{2\text{ml}} * 1000 \end{aligned}$$

---

**Figura 21.** Fórmula utilizada para el cálculo de la cantidad de lípidos en la suspensión de adipocitos. Los 2,4ml se corresponden con el volumen de n-heptano total, mientras que los 2ml se corresponden con el volumen aspirado de la fase orgánica.

Una vez añadida a cada una de las muestras la solución del reactivo enzimático recién preparado, se incubaron durante 40 minutos a temperatura ambiente, para finalmente medir la absorbancia de dichas muestras con un espectrofotómetro tipo Asys UVM340 (Biochrom®), a una longitud de onda de 340nm. Obtenidos todos los valores de absorbancia, se calculó el glicerol liberado por cada muestra, utilizando la fórmula de la figura 22.

$$Q = \frac{(DO_{\text{ensayo}} - DO_{\text{testigo}})}{DO_{\text{estandar}}} * Q_{\text{estandar}}$$

---

**Figura 22.** Cálculo del glicerol liberado por las muestras.  $DO_{\text{ensayo}}$ : absorbancia de la muestra analizada.  $DO_{\text{testigo}}$ : absorbancia del KRBA.  $DO_{\text{estandar}}$ : absorbancia de un punto de la curva patrón de glicerol.  $Q_{\text{estandar}}$ :  $\mu$ moles de glicerol del punto elegido de la curva patrón de glicerol. Q:  $\mu$ moles de glicerol liberado por la muestra estudiada.

Finalmente, los resultados de la actividad lipolítica de las muestras se expresaron en  $\mu$ moles de glicerol liberados en el medio por 100 mg de lípidos celulares tras 90 minutos de incubación.

## 11. Cultivos de explantes

Este grupo de experimentos se llevó a cabo con fragmentos de tejido adiposo procedente de los pacientes como se ha descrito en apartados anteriores. El cultivo de explantes, referido a fragmentos intactos de tejido adiposo se realiza mediante el uso de un medio de cultivo denominado completo, que contiene nutrientes, electrolitos (glucosa, aminoácidos, vitaminas, minerales) y, en ocasiones, suero, a un pH considerado fisiológico (pH 7,4) (Fried y Moustaid-Moussa, 2001).

El cultivo de explantes de tejido adiposo logra una buena conservación de la expresión génica y de la funcionalidad de los adipocitos hasta un máximo de 2 semanas, acompañado de un mantenimiento de la sensibilidad a los efectos hormonales agudos después del cultivo, permitiendo estudios mecanicistas sobre ellos. Otra de las ventajas de esta técnica es conservar, a parte de los adipocitos del tejido, otros tipos celulares como células endoteliales, preadipocitos, y fibroblastos preservando las interacciones paracrinas entre células que pueden influir en el metabolismo (Fried y Moustaid-Moussa, 2001). Aunque se puede argumentar que la delimitación de las interacciones paracrinas es fundamental para la comprensión de la fisiología del tejido adiposo, es importante la comprensión mecanicista del sistema a pesar de su complejidad en relación con el estudio de adipocitos aislados.

La metodología experimental utilizada para la preparación de los explantes de tejido adiposo se basó en el protocolo descrito por Carswell y colaboradores (Carswell, Lee y Fried, 2012). Todos los pasos requeridos para la preparación de la muestra, así como la preparación de los medios de cultivo se realizaron bajo condiciones de esterilidad en una habitación de cultivo, utilizando una campana de flujo laminar.

Una vez recibida la muestra de tejido, se realizaron lavados con PBS estéril suplementado con albúmina al 1% (Sigma®) y se eliminaron restos macroscópicos de vasos y de zonas quemadas por el bisturí eléctrico durante la intervención quirúrgica.

Previamente, se prepararon los diferentes medios de cultivo necesarios para el mantenimiento y conservación de las muestras. El medio de cultivo de elección para este experimento fue M199 (Sigma®) que contiene glucosa 5,5mM, suplementado con suero de ternera al 5%, glutamina 200mM y penicilina/estreptomicina al 1% (todos los reactivos fueron suministrados por Sigma®). Este medio fue denominado medio 1 (también llamado “incompleto”). Para la preparación del medio 2 (o medio “completo”) se utilizó como base el medio 1 suplementado con insulina 0,07mM (Sigma®) y dexametasona 0,77µM (Merck®).

El siguiente paso fue colocar el tejido sobre el medio denominado medio 1 en un tubo Falcon y dividirlo con unas tijeras estériles hasta obtener unos fragmentos de alrededor de 5 mg. Posteriormente se filtró el tejido obtenido a través de una malla de Nylon estéril, eliminando el medio y lavando los fragmentos del tejido adiposo 4 veces con PBS con albúmina 1%. Teniendo en cuenta que se iban a utilizar placas Petri de 35mm Ø, una vez recogida toda la muestra, se sembraron aproximadamente 200mg de explantes de tejido adiposo en 2,5ml de medio 2 en cada placa, dejándolas en el incubador a 37°C bajo atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 24 horas. Esta primera incubación estaba destinada a la recuperación de los explantes del estrés producidos por la intervención quirúrgica y por los procesos de fragmentación del tejido.

Transcurrido este tiempo, se cambió el medio de cultivo de los explantes por otro de la misma composición que además contenía diferentes concentraciones de metformina (metformina 1mM o 20mM; en

medio completo) y se dejó en el incubador a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% durante 3, 12 ó 24 horas. De cada uno de los tiempos descritos se separaron sus respectivos controles sin fármaco para utilizarlos como referencia.

Después de la incubación, se retiró el medio y se lavaron los explantes con PBS 4 veces. Parte de los explantes fueron fijados en formaldehído al 4% para posteriores experimentos de inmunohistoquímica, mientras que otra parte se congeló en Nitrogeno líquido y se almacenó a -80°C, para después extraer las proteínas que contenía y analizarlas mediante Western blot.

## 12. Análisis estadístico

El programa utilizado para el análisis estadístico fue SPSS (IBM®, v19.0.0); sin embargo, en ocasiones y gracias a la facilidad de su interfaz, se empleó el programa Excel (Microsoft Office®, v2016) para la recogida de datos.

Para determinar diferencias entre los diferentes grupos comparados, se utilizaron dos pruebas paramétricas dependiendo de las categorías que podían tomar las variables. Si las variables tomaban solamente dos categorías, la prueba utilizada fue t de Student, mientras que, si la variable categórica tomaba tres o más categorías, la prueba usada fue el análisis de la varianza (ANOVA). Se consideró que las variables de los grupos eran diferentes significativamente siempre y cuando el p valor obtenido fuese menor a 0,05.

En los casos en los que existieron diferencias significativas mediante ANOVA fue necesario realizar una comparación múltiple entre las diferentes categorías de las variables para determinar cuáles de esas categorías presentaban diferencias. Para ello, se utilizó el test de Bonferroni.

Para valorar la relación entre las variables de estudio, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman, mediante el cual se pudo observar la fuerza de la correlación mediante el grado de significación bilateral (p valor) y el tipo de relación entre las variables mediante el coeficiente de correlación  $\rho$  (r). Mediante el signo del coeficiente de correlación se pudo determinar si existía relación positiva entre las variables (indicando que mientras una de ellas aumenta, la otra lo hace también, o viceversa), o bien, era negativa (cuando una variable aumenta mientras la otra disminuye, o viceversa).







# RESULTADOS



## 1. Caracterización de los pacientes incluidos en el estudio

En este estudio participaron un total de 63 pacientes. La media de edad de las mujeres fue de  $49,33 \pm 2,04$  años ( $N = 48$ ), mientras que la de los varones fue de  $51,93 \pm 4,26$  años ( $N = 15$ ). Para analizar los mecanismos que subyacen el control del perfil lipídico, y siguiendo los criterios de selección indicados anteriormente, los pacientes fueron clasificados en dos grupos, control y obesidad, en función de su IMC; además, se optó por diferenciar las variables entre varones y mujeres. Los resultados obtenidos se expresan en la tabla 4.

Grupo	Sexo	N	Edad (años)	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Perímetro abdominal (cm)
Control	Mujer	4	$57,75 \pm 14,38$	$21,67 \pm 1,91$	$88,75 \pm 9,10$
	Varón	7	$57,86 \pm 8,15$	$27,30 \pm 1,07$	$77,50 \pm 29,5$
Obesidad	Mujer	44	$48,39 \pm 1,92$	$45,56 \pm 1,33$	$131,41 \pm 2,86$
	Varón	8	$46,75 \pm 3,14$	$47,22 \pm 3,02$	$137,00 \pm 6,24$

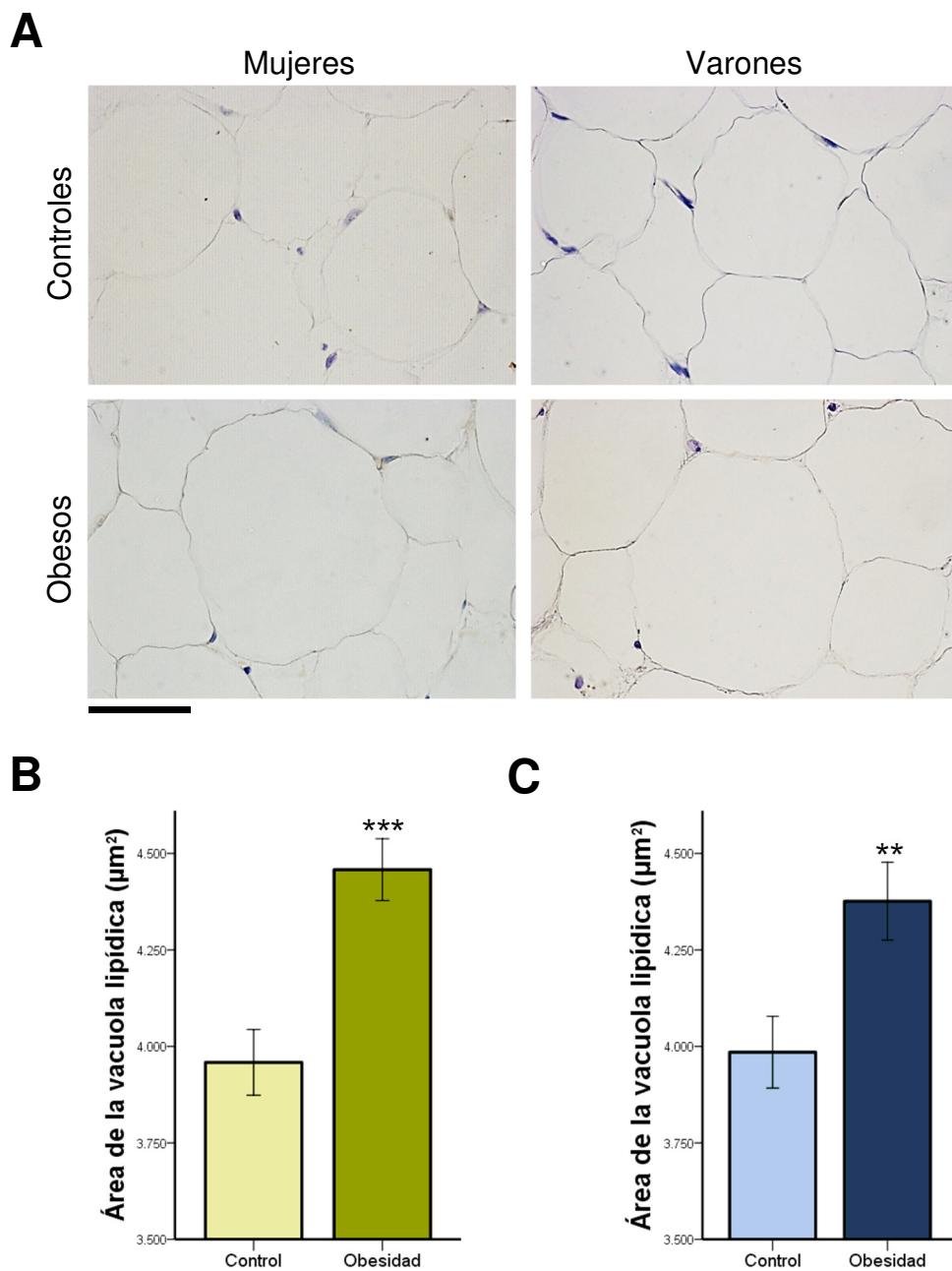
**Tabla 4.** Pacientes incluidos en el estudio (N=63). En la tabla se indica el IMC y el perímetro abdominal como marcadores de estado nutricional. Se optó por formar dos grupos atendiendo al IMC (grupos control y obesidad), además de clasificarlos por el sexo. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM.

Histológicamente comprobamos si la clasificación realizada conforme al IMC y el perímetro abdominal estaba asociada a variaciones en el tejido adiposo visceral. Para ello, medimos el área de las vacuolas lipídicas determinando de manera indirecta el tamaño del adipocito (tabla 5).

Grupo	Sexo	N	Área de la vacuola lipídica ( $\mu\text{m}^2$ )
Control	Mujer	472	3958,63 $\pm$ 85,24
	Varón	245	3984,92 $\pm$ 93,03
Obesidad	Mujer	578	4458,08 $\pm$ 80,20
	Varón	354	4376,14 $\pm$ 100,86

**Tabla 5.** Diferencias del área de la vacuola lipídica ( $\mu\text{m}^2$ ) de adipocitos de tejido adiposo blanco, entre pacientes control y obesos incluidos en el estudio. Todos los valores están expresados como la media de área  $\pm$  EEM.

Las mujeres obesas presentaron una vacuola lipídica significativamente mayor que las incluidas dentro del grupo control (4458,08  $\pm$  80,20  $\mu\text{m}^2$  vs. 3958,63  $\pm$  85,24  $\mu\text{m}^2$ ;  $p < 0,0001$ ). De la misma manera, las vacuolas lipídicas de los adipocitos de los varones con obesidad fueron mayores que las de los pacientes control (4376,14  $\pm$  100,86  $\mu\text{m}^2$  vs. 3984,92  $\pm$  93,03  $\mu\text{m}^2$ ;  $p = 0,007$ ). No se apreciaron diferencias significativas de un sexo u otro, dentro del mismo grupo (figura 23).



**Figura 23.** Variaciones del tamaño de la vacuola lipídica de adipocitos del tejido adiposo blanco relacionadas con el estado de obesidad. **A:** El tamaño de las vacuolas se midió en imágenes de inmunohistoquímica para ANGPTL8. La barra de escala representa una distancia de 50 µm. Para realizar la comparación se calculó la media del área de las vacuolas en µm<sup>2</sup>, en las mujeres (**B**) y los varones (**C**) incluidos en el estudio. Las barras representan la media ± EEM. El nivel de significación estadística entre grupos control y obesidad se expresó en forma de \* (\*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001).

## 2. Concentración plasmática de ANGPTL8 en pacientes obesos

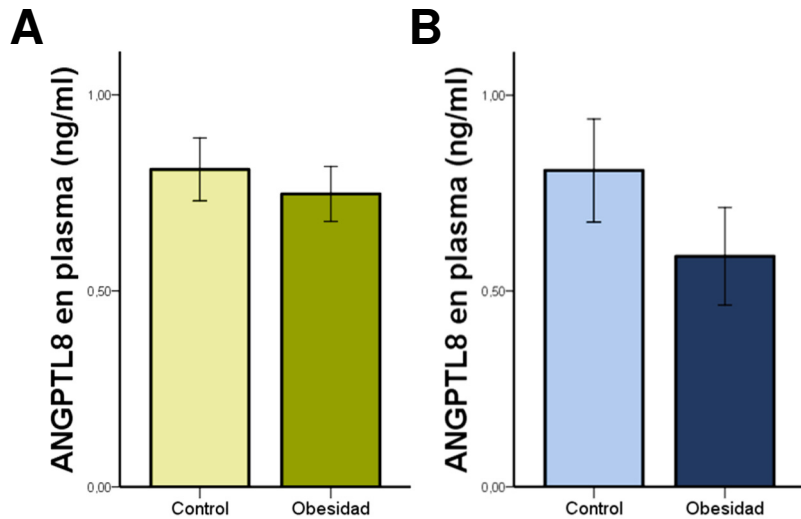
A partir de las muestras sanguíneas obtenidas en el momento de la intervención quirúrgica de cada paciente, y siguiendo el protocolo de EIA descrito anteriormente, se determinó la concentración plasmática de ANGPTL8 con el objetivo de valorar posibles diferencias entre los grupos de estudio (tabla 6).

Grupo	Sexo	N	ANGPTL8 (ng/ml)
Control	Mujer	4	0,81 ± 0,08
	Varón	7	0,81 ± 0,13
Obesidad	Mujer	44	0,75 ± 0,07
	Varón	8	0,59 ± 0,12

**Tabla 6.** Concentración plasmática de ANGPTL8 (ng/ml) en los pacientes incluidos en el estudio. Los valores están expresados como la media ± EEM.

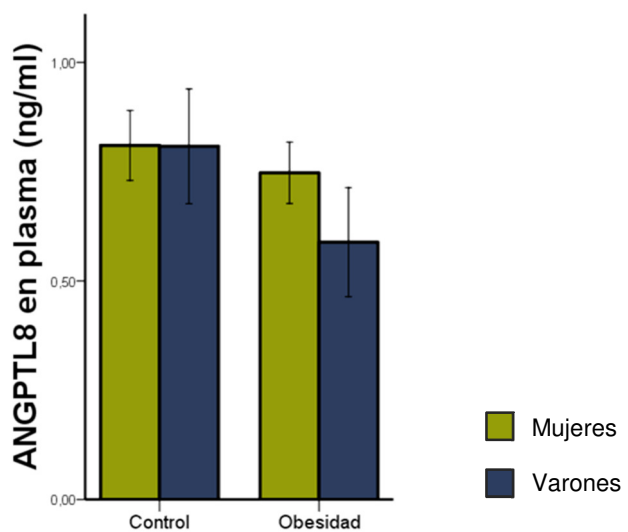
Representando gráficamente los datos de la tabla anterior, y tras analizar los resultados obtenidos de la concentración plasmática de ANGPTL8 (figura 24), se observaron ciertas diferencias entre los pacientes controles y obesos. Las mujeres del grupo obesidad ( $0,75 \pm 0,07$  ng/ml) presentaron unos niveles plasmáticos ligeramente inferiores que las del grupo control ( $0,81 \pm 0,08$  ng/ml) (figura 24A). En varones se observó algo similar, pues los niveles de ANGPTL8 de los varones obesos ( $0,59 \pm 0,12$  ng/ml) también fueron inferiores a los de su correspondiente grupo control ( $0,81 \pm 0,13$  ng/ml) (figura 24B). Aunque se apreciaron diferencias entre los grupos, no llegaron a ser estadísticamente significativas.

**Figura 24.** Concentración plasmática de ANGPTL8 (ng/ml) en los pacientes incluidos en el estudio obtenida mediante EIA. **A:** ANGPTL8 en plasma de mujeres. **B:** ANGPTL8 en plasma de varones. Los valores se expresaron como la media  $\pm$  EEM.



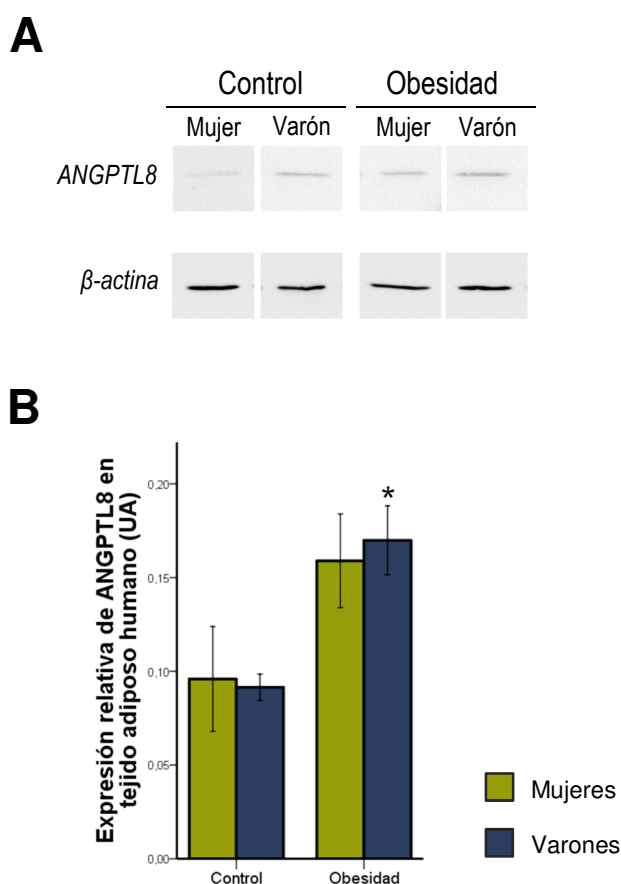
Al comparar entre ambos sexos, tampoco se observaron diferencias significativas entre mujeres y varones con relación a los niveles plasmáticos de ANGPTL8; aunque los varones obesos ( $0,59 \pm 0,12$  ng/ml) presentaron una concentración plasmática de ANGPTL8 inferior que las mujeres del mismo grupo ( $0,75 \pm 0,07$  ng/ml) (figura 25).

**Figura 25.** Concentración plasmática de ANGPTL8 (ng/ml) en los pacientes del estudio, teniendo en cuenta su sexo. Los valores indican la media  $\pm$  EEM.



### 3. Expresión de ANGPTL8 en tejido adiposo humano

Después de analizar las muestras mediante Western blot (figura 26A), la inmunorreacción a ANGPTL8 expresada en unidades arbitrarias (UA) fue superior en las mujeres obesas ( $0,16 \pm 0,02$  UA) que en las del grupo control ( $0,09 \pm 0,03$  UA), sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los varones obesos ( $0,17 \pm 0,02$  UA) presentaron una mayor expresión de la proteína en el tejido adiposo que en los varones del grupo control ( $0,09 \pm 0,01$  UA) ( $p = 0,048$ ). No se observaron diferencias relacionadas con el sexo (figura 26B).



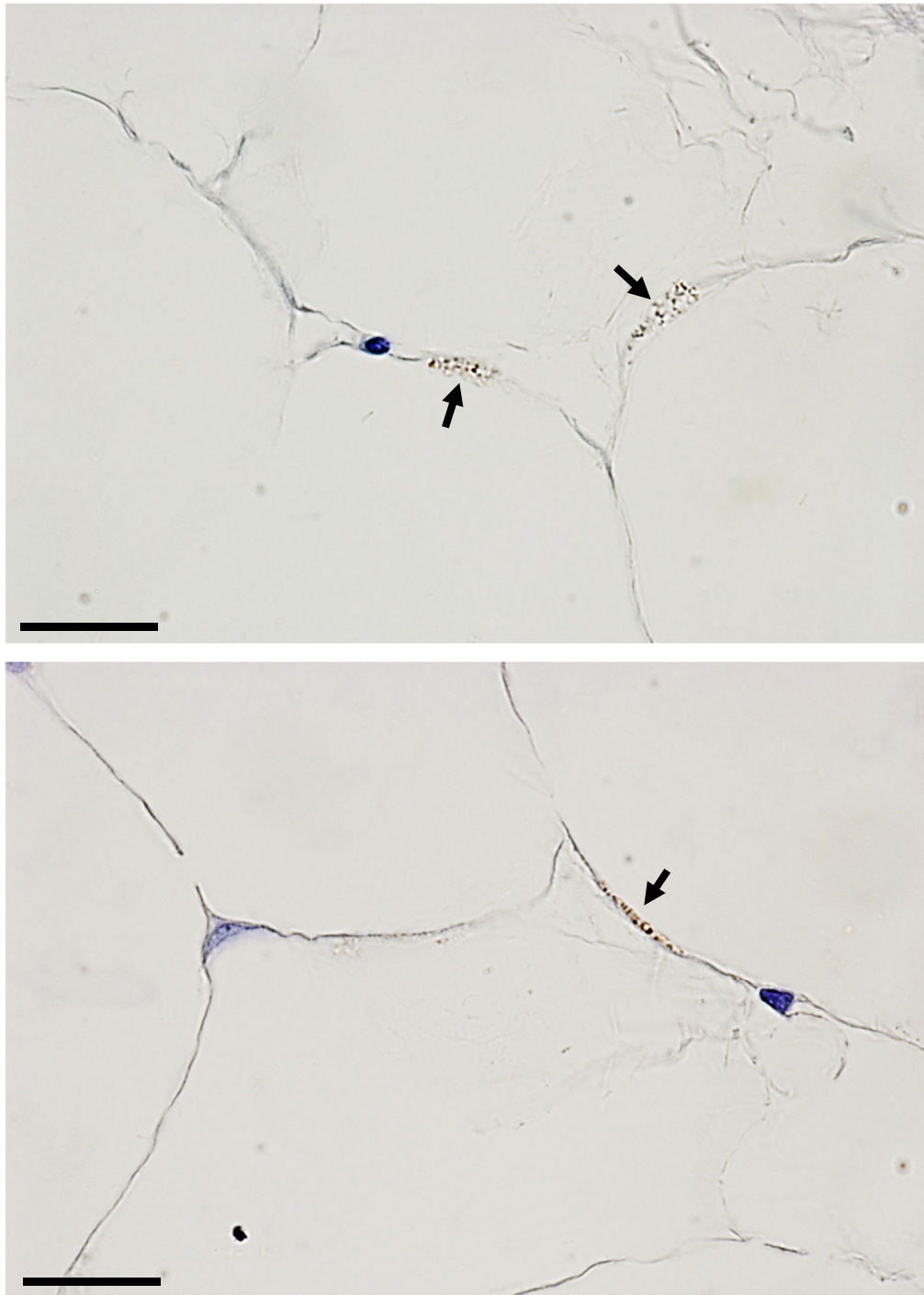
**Figura 26.** Expresión de ANGPTL8 en tejido adiposo humano fresco. **A:** Western blot del lisado de proteínas del tejido fresco de los pacientes incluidos en el estudio. Como patrón para confirmar la carga proteica se utilizó la expresión de  $\beta$ -actina. **B:** Estudio densitométrico de las bandas obtenidas mediante Western blot, considerando la expresión de actina. Los resultados, representados en unidades arbitrarias (UA), expresan la media  $\pm$  EEM. El nivel de significación estadística entre grupos control y obesidad se indica en forma de \* (\*,  $p < 0,05$ ).



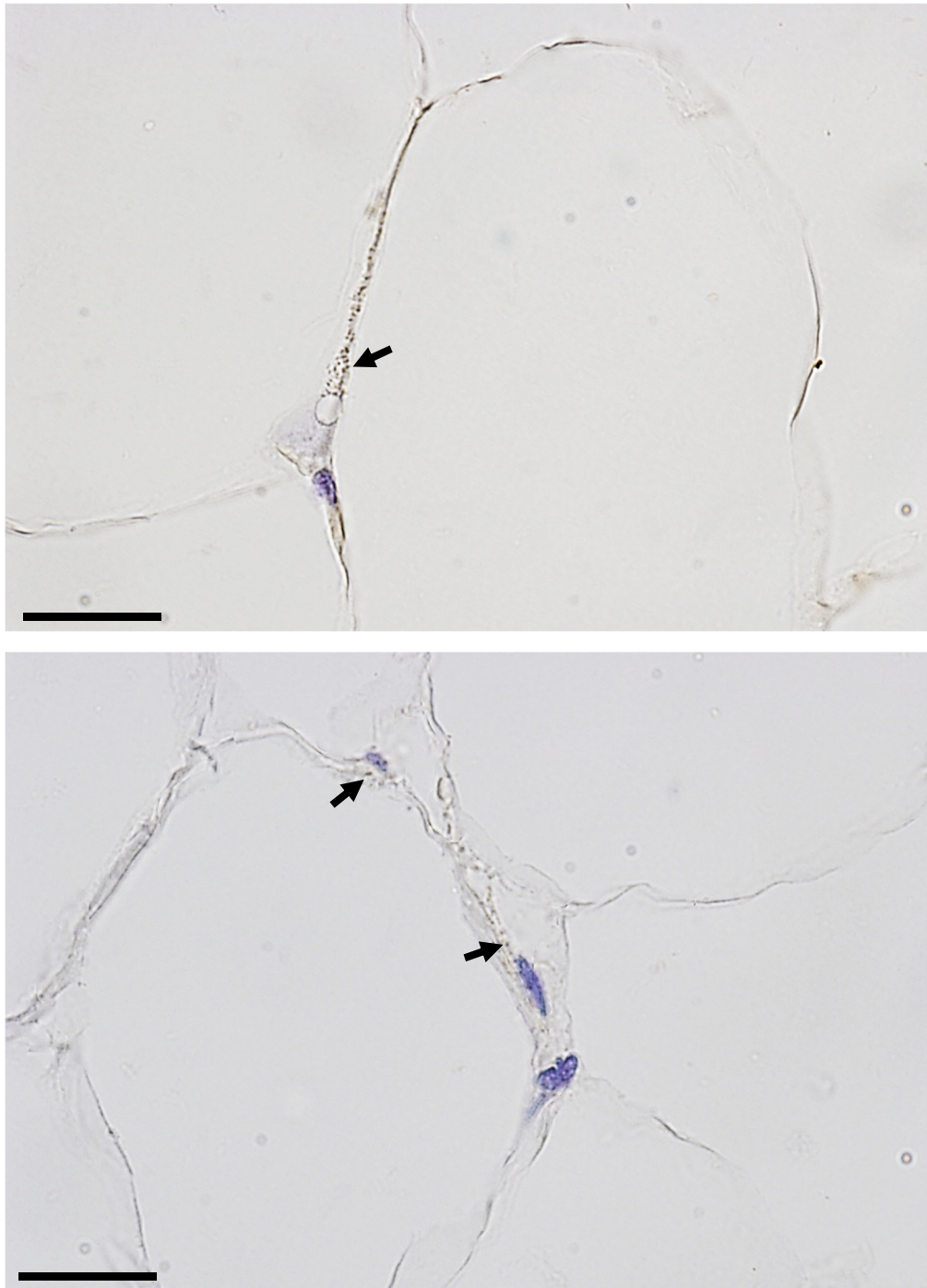
Mediante inmunohistoquímica, se analizó la presencia de ANGPTL8 en el tejido adiposo visceral, observando que la reacción no fue abundante en el citoplasma de los adipocitos.

La inmunorreactividad presentó un patrón granular distribuido por el citoplasma, tanto en mujeres del grupo control (figura 27) como en obesas (figura 28). La reacción afectó solamente a los adipocitos y no se observó inmunorreactividad en las células endoteliales de los vasos del tejido adiposo estudiado (figura 29).

Tras el análisis histológico de las muestras de los pacientes varones, se apreció que la disposición de la inmunorreactividad a ANGPTL8 en el tejido adiposo de estos pacientes era similar a la detectada en mujeres, tanto en los varones control (figura 30) como en obesos (figura 31). Las células endoteliales tampoco mostraron reactividad a ANGPTL8 en estos grupos (figura 32).

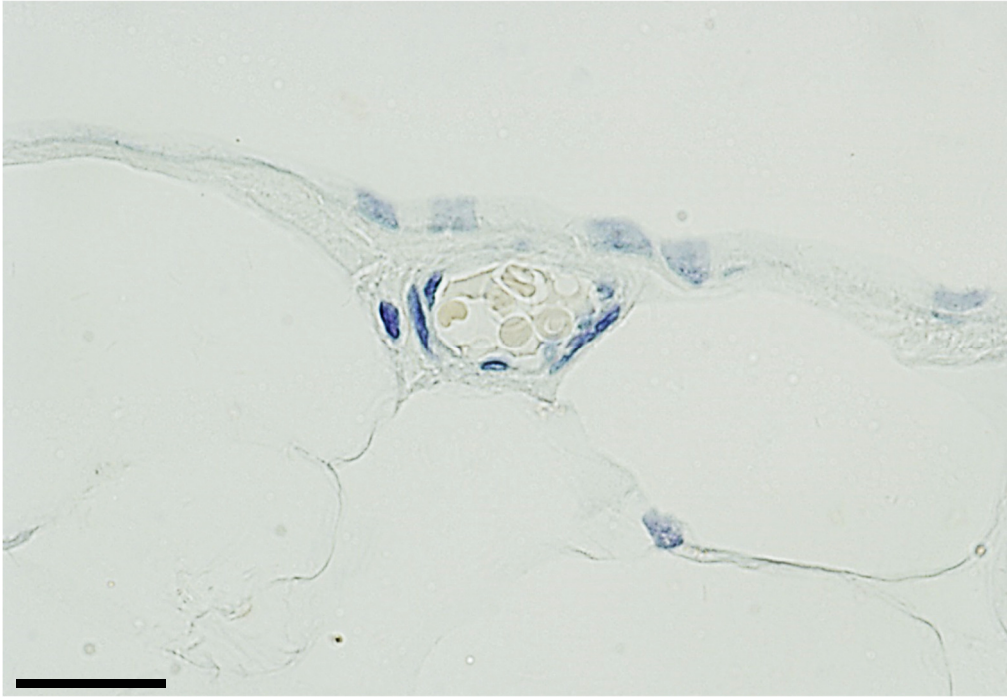


**Figura 27.** ANGPTL8 en adipocitos de pacientes mujeres control incluidas en el estudio. La reacción en los adipocitos se presentó con un patrón granular (flechas), localizándose en regiones del citoplasma, sin adquirir una tinción homogénea. La barra de escala representa una distancia de 20  $\mu\text{m}$ .

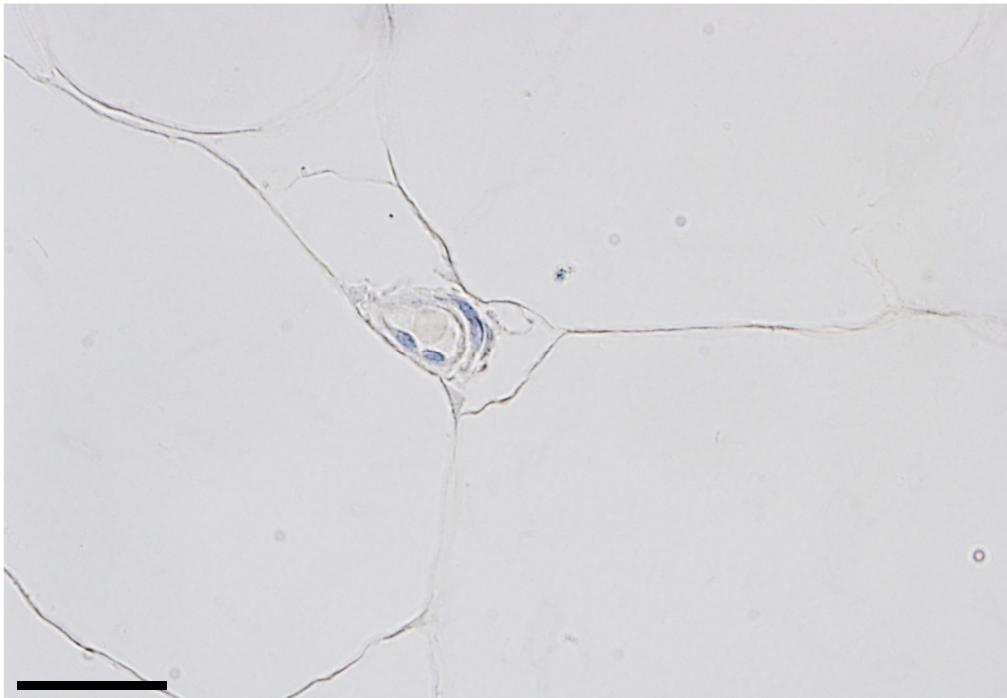


**Figura 28.** ANGPTL8 en adipocitos de pacientes mujeres obesas incluidas en el estudio. Al igual que en las mujeres del grupo control, la reacción se presentó de forma granular (flechas). La barra de escala representa una distancia de 20  $\mu\text{m}$ .

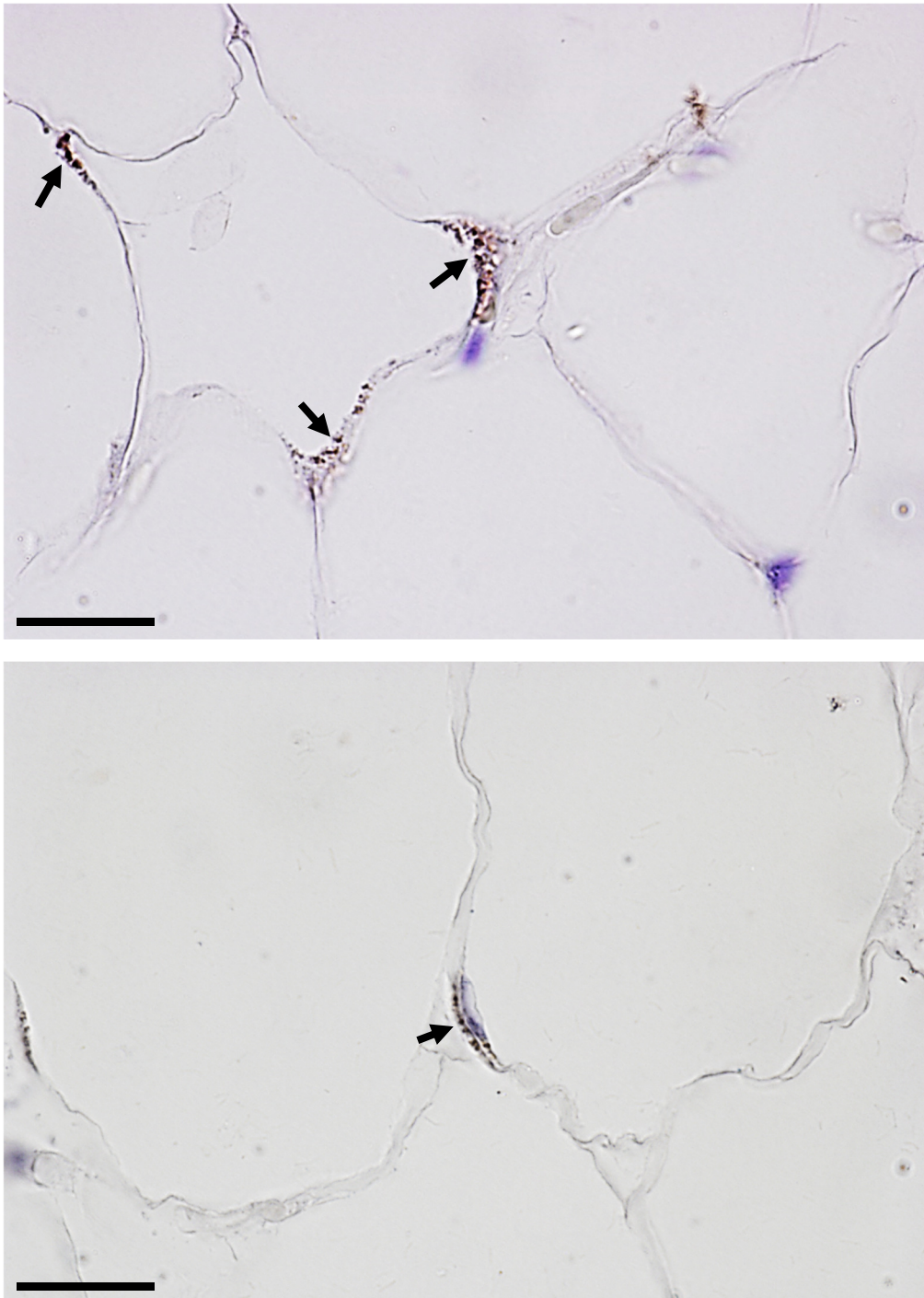
**A**



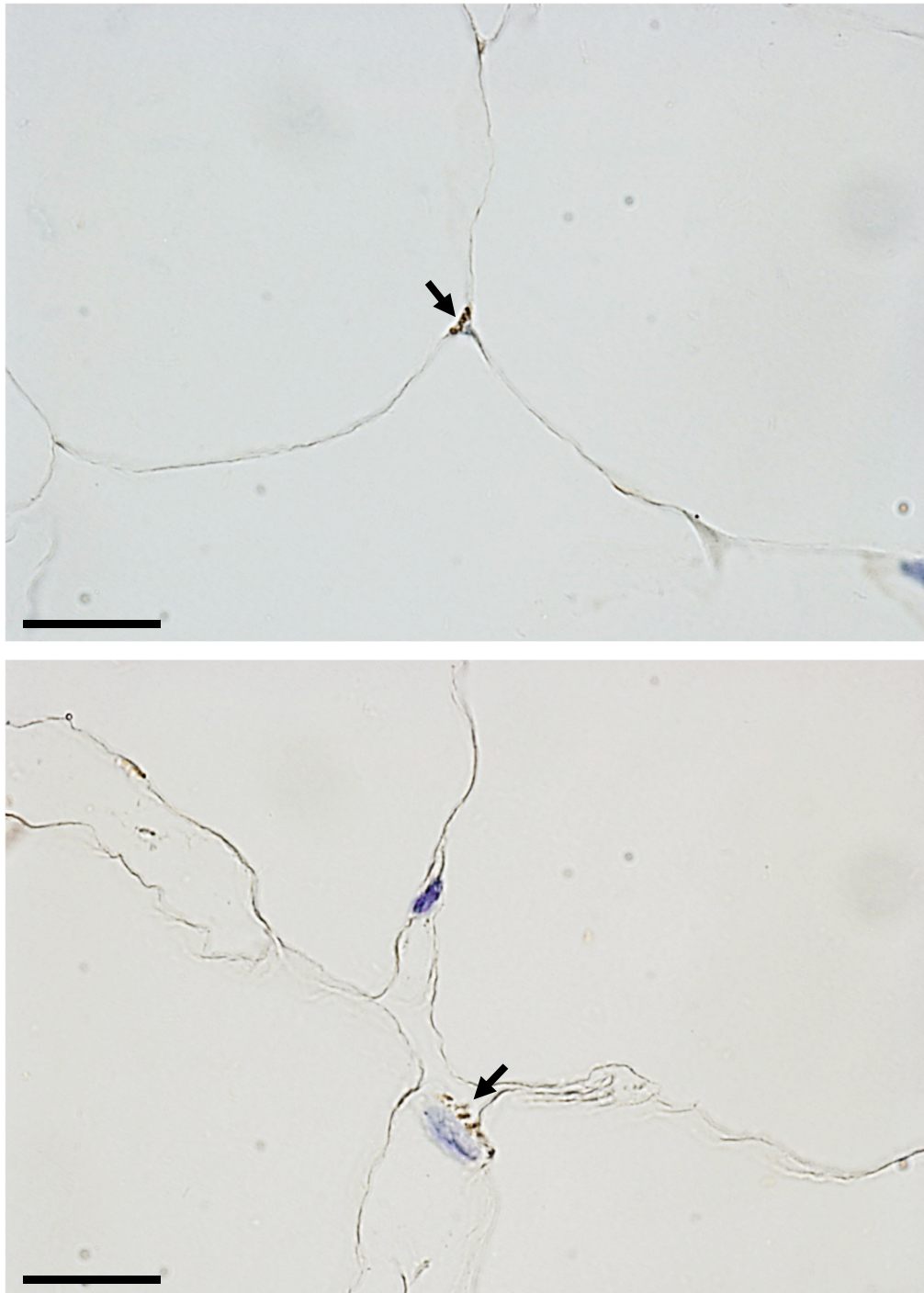
**B**



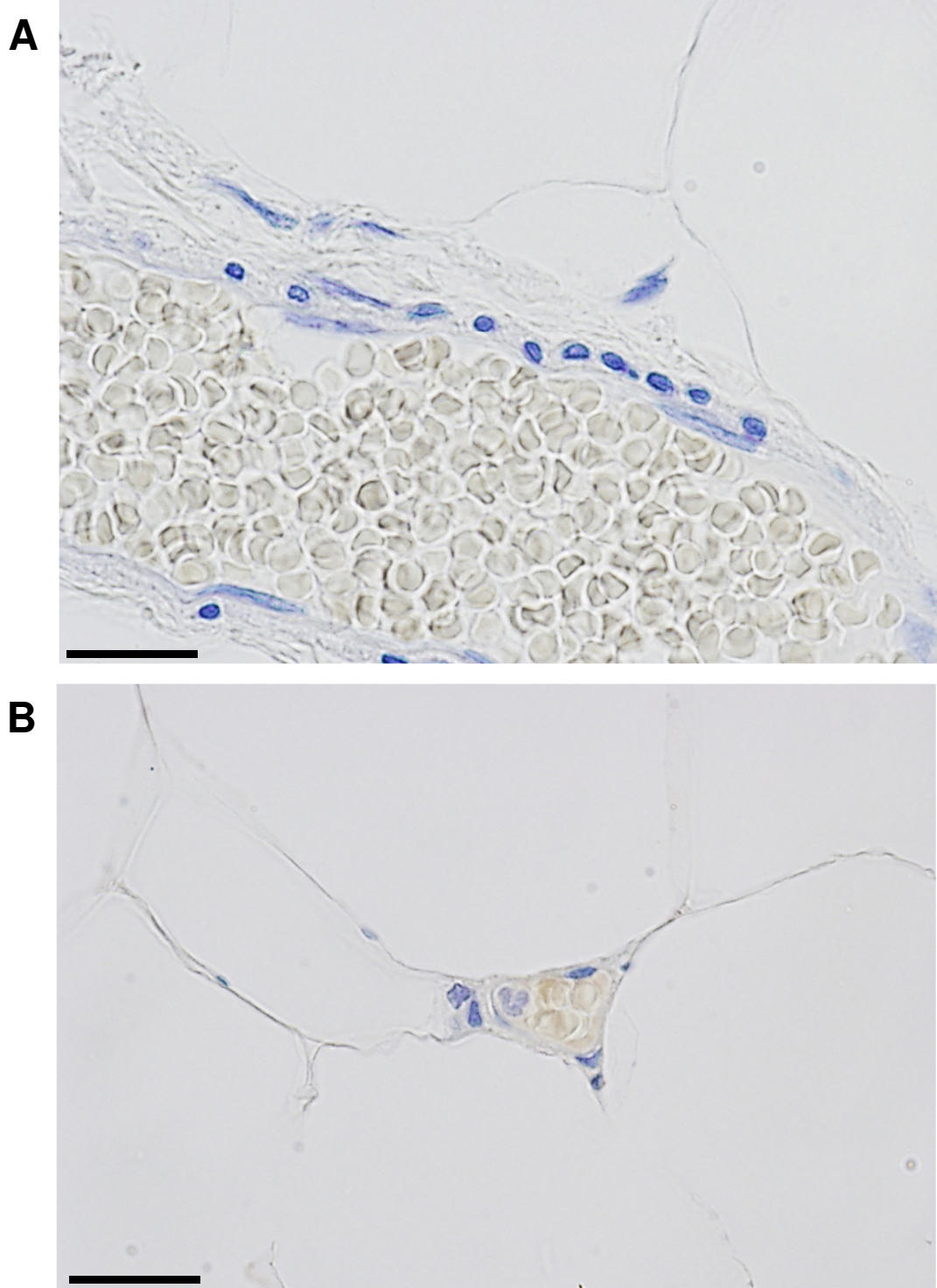
**Figura 29.** Imágenes demostrativas de la ausencia de reacción inmunohistoquímica a ANGPTL8 en las células endoteliales del tejido adiposo de las mujeres control (**A**) y obesas (**B**) incluidas en el estudio. La barra de escala representa una distancia de 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 30.** ANGPTL8 en adipocitos de pacientes varones control. La reacción se encontraba formando granos (flechas) en algunas regiones del citoplasma del adipocito. La barra de escala representa una distancia de 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 31.** ANGPTL8 en adipocitos de pacientes varones obesos. La reacción seguía el patrón granular típico (flechas) descrito en los demás grupos, dentro del citoplasma del adipocito. La barra de escala representa una distancia de 20  $\mu$ m.



**Figura 32.** Ausencia de reacción para ANGPTL8 en células endoteliales del tejido adiposo de varones control (A) y obesos (B). La barra de escala representa una distancia de 20 µm.

Mediante hibridación in situ, y con las sondas específicas descritas en la sección de Metodología, se localizó el ARNm de ANGPTL8 en tejido adiposo fresco. Para cuantificar la reacción se midió el porcentaje de área reactiva y, mediante el software ImageJ, se calculó el gris medio reactivo (tabla 7).

Grupo	Sexo	N	Porcentaje de área reactiva (%)	Gris medio reactivo (UA)
Control	Mujer	74	0,07 ± 0,01	193,63 ± 2,28
	Varón	50	0,08 ± 0,01	194,59 ± 2,25
Obesidad	Mujer	183	0,16 ± 0,02	201,36 ± 1,33
	Varón	89	0,03 ± 0,01	181,57 ± 2,24

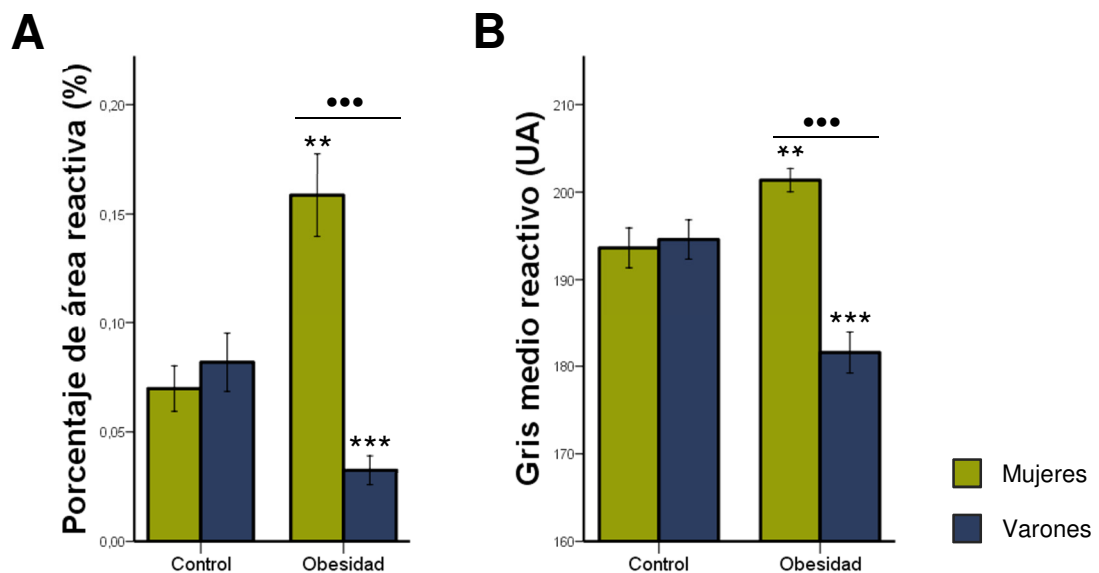
**Tabla 7.** Análisis del ARNm de ANGPTL8 en tejido adiposo humano. Datos obtenidos a partir de hibridación in situ, donde se calculó el porcentaje de área reactiva (%) y la intensidad de reacción mediante la obtención del gris medio del área reactiva (UA). Todos los valores están expresados como la media ± EEM.

En relación con el porcentaje de área reactiva (figura 33A), en las mujeres obesas fue mayor ( $0,16 \pm 0,02$  %) en comparación con las mujeres control ( $0,07 \pm 0,01$  %) de manera estadísticamente significativa ( $p = 0,004$ ). En los varones obesos sucedió lo contrario, pues el porcentaje de área reactiva fue menor ( $0,03 \pm 0,01$  %) frente los controles ( $0,08 \pm 0,01$  %) siendo estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ).

Con respecto a la intensidad de reacción (figura 33B), se observó algo similar que con el porcentaje de área reactiva. El nivel de intensidad de reacción en mujeres obesas ( $201,36 \pm 1,33$  UA) fue mayor que en las del grupo control ( $193,63 \pm 2,28$  UA), siendo la diferencia significativa ( $p = 0,003$ ); sin embargo, los pacientes varones obesos presentaron una intensidad menor ( $181,57 \pm 2,34$ ) que la observada en su grupo control ( $194,59 \pm 2,25$ ) de manera significativa ( $p < 0,001$ ).



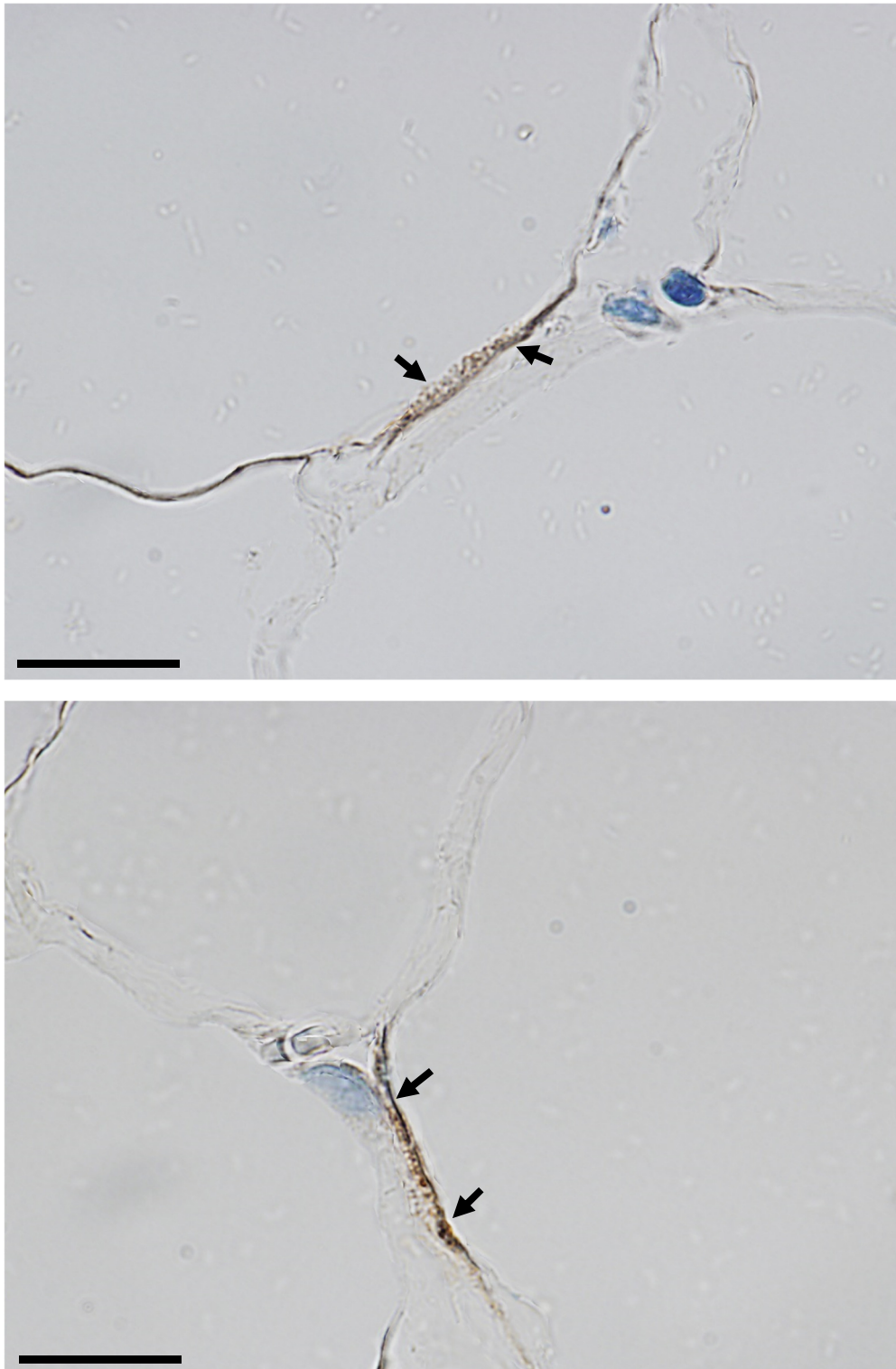
Al comparar entre ambos sexos, y exclusivamente los grupos control, no se observaron diferencias significativas entre mujeres y varones. Sin embargo, en el grupo obesidad estas diferencias fueron significativas. Concretamente, al comparar el porcentaje de área reactiva (figura 33A), en las mujeres obesas fue mayor ( $0,16 \pm 0,02$  %) respecto al observado en los varones obesos ( $0,03\% \pm 0,01$ ) siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ). De la misma manera, la intensidad de reacción (figura 33B), mediante el gris medio, fue mayor ( $p < 0,001$ ) en las mujeres ( $201,36 \pm 1,33$  UA) respecto a la observada en varones ( $181,57 \pm 2,34$  UA).



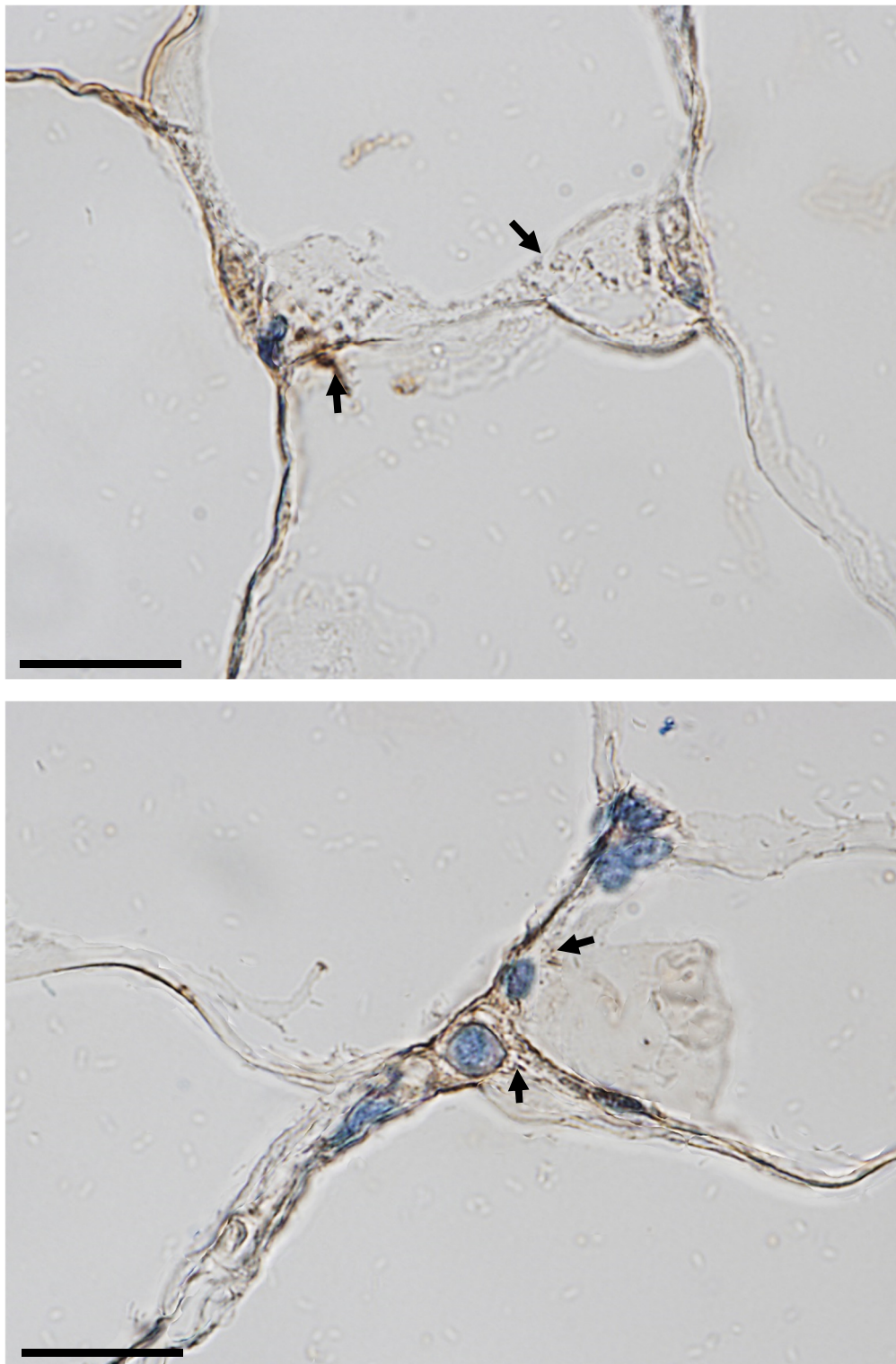
**Figura 33.** Análisis de las imágenes obtenidas tras realizar hibridación in situ del ARNm de ANGPTL8 en tejido adiposo blanco visceral. **A:** Porcentaje de área reactiva (%) con respecto al área total de la imagen. **B:** Intensidad de reacción medida por la determinación del gris medio (UA) del área considerada como reactiva. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM. El nivel de significación estadística se expresó en forma de \* (\*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ), mientras que la comparación entre sexos se expresó en forma de • (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).

En todos los grupos, tanto en mujeres como en varones, la reacción se presentó de forma granular, en pequeñas partículas distribuidas a lo largo del citoplasma del adipocito, sobre todo en las regiones cercanas al núcleo (figuras 34,35,37,38).

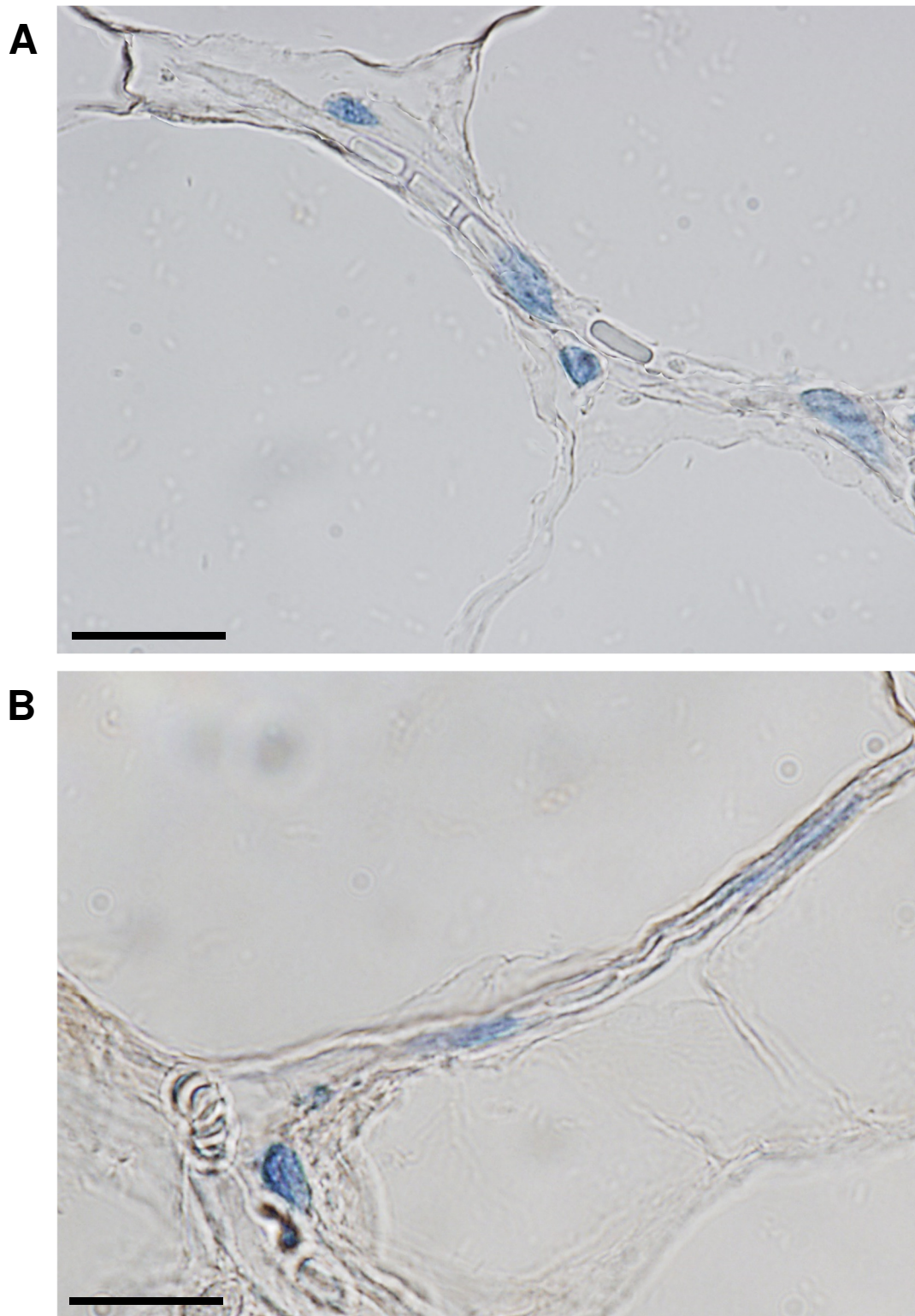
En ningún caso se encontró positividad en las células endoteliales del tejido adiposo en las células endoteliales del tejido adiposo (figuras 36 y 39).



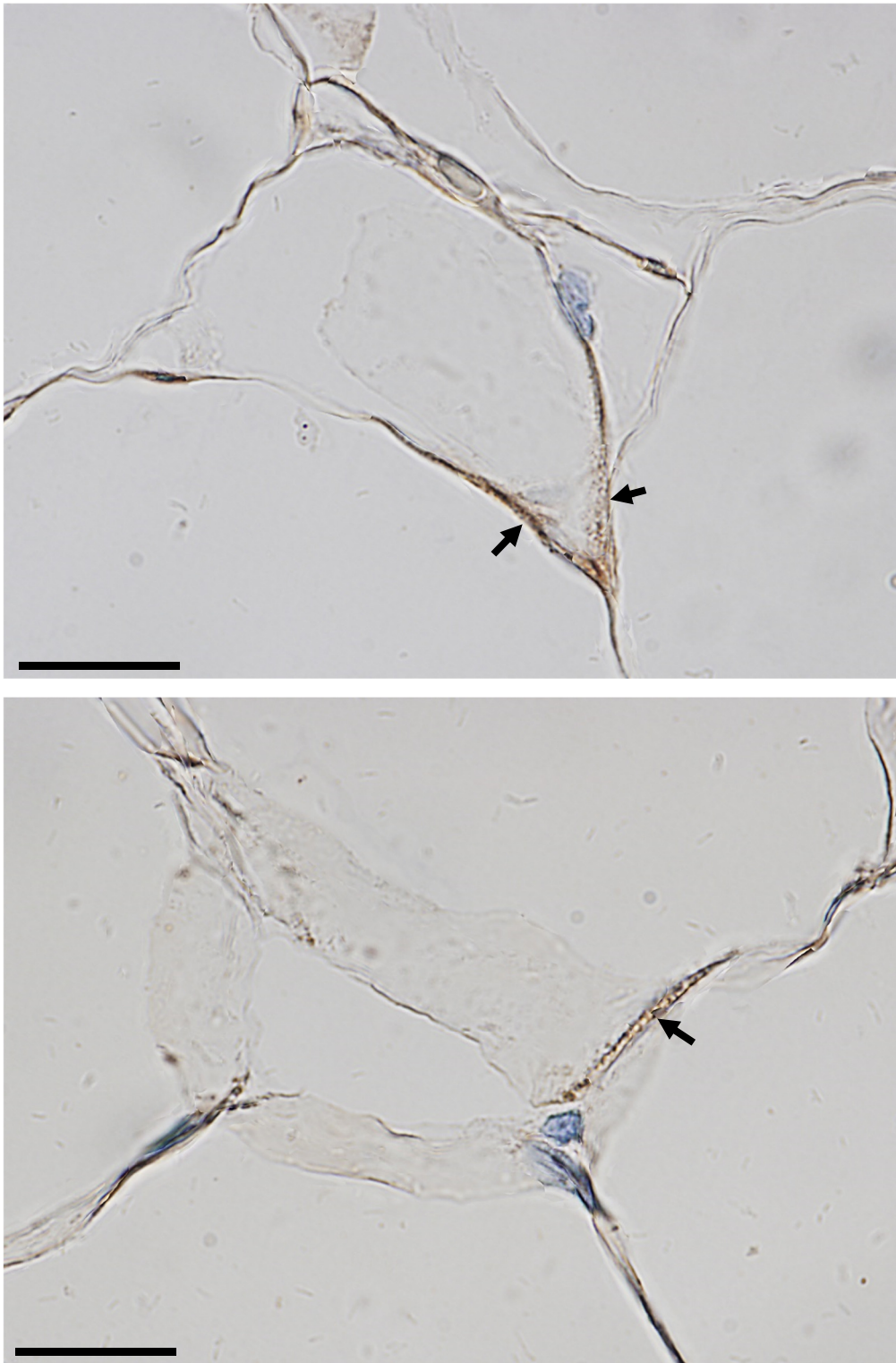
**Figura 34.** Presencia del ARNm de ANGPTL8 en adipocitos de mujeres del grupo control. Las flechas indican zonas reactivas, gránulos de reacción dados por la técnica de hibridación in situ. La barra de escala representa una distancia de 20  $\mu$ m.



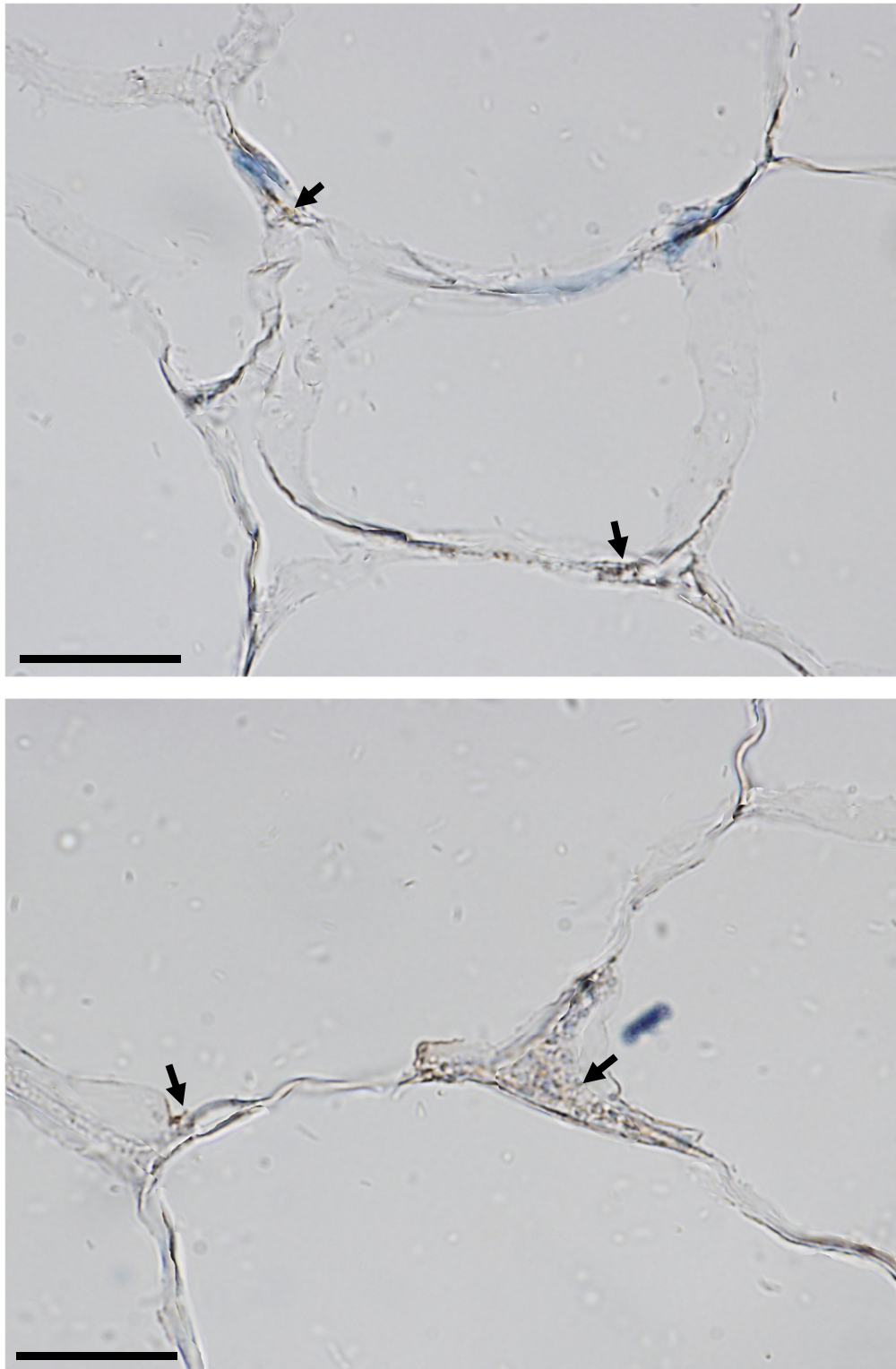
**Figura 35.** Presencia del ARNm de ANGPTL8 en adipocitos de mujeres del grupo obesidad. Las flechas indican zonas reactivas, gránulos de reacción dados por la técnica de hibridación in situ. La barra de escala representa una distancia de 20  $\mu$ m.



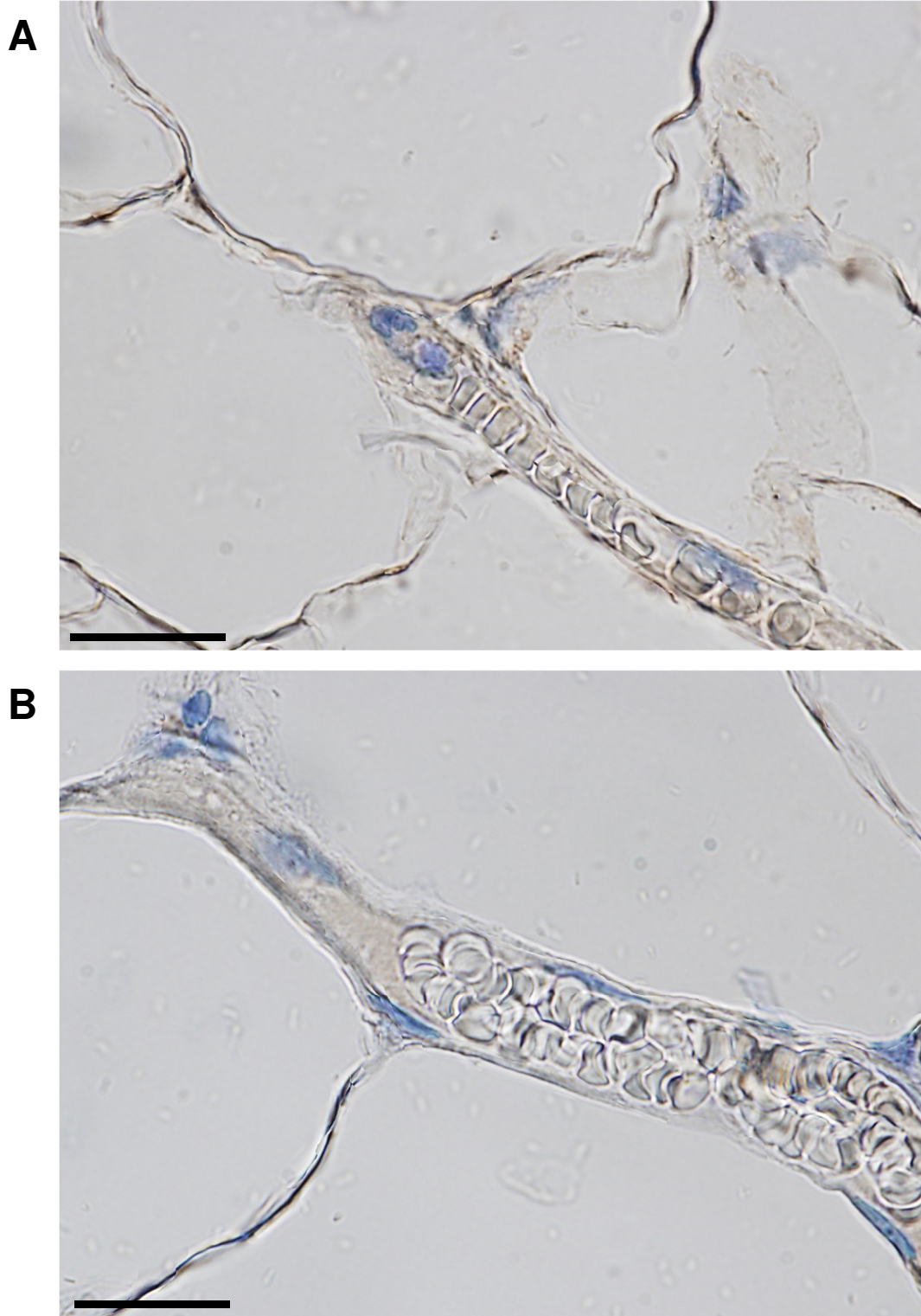
**Figura 36.** Ausencia del ARNm de ANGPTL8 en células endoteliales que forman los vasos sanguíneos del tejido adiposo de mujeres control (A) y obesas (B). La barra de escala representa una distancia de 20 µm.



**Figura 37.** Presencia del ARNm de ANGPTL8 en adipocitos de varones del grupo control. Las flechas indican zonas reactivas, gránulos de reacción dados por la técnica de hibridación in situ. La barra de escala representa una distancia de 20  $\mu$ m.



**Figura 38.** Presencia del ARNm de ANGPTL8 en adipocitos de varones obesos. Las flechas indican zonas reactivas, gránulos de reacción dados por la técnica de hibridación in situ. La barra de escala representa una distancia de 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 39.** Ausencia del ARNm de ANGPTL8 en células endoteliales que forman los vasos sanguíneos del tejido adiposo de varones control (A) y obesos (B). La barra de escala representa una distancia de 20  $\mu\text{m}$ .

## 4. Implicación de ANGPTL8 en el control del perfil lipídico

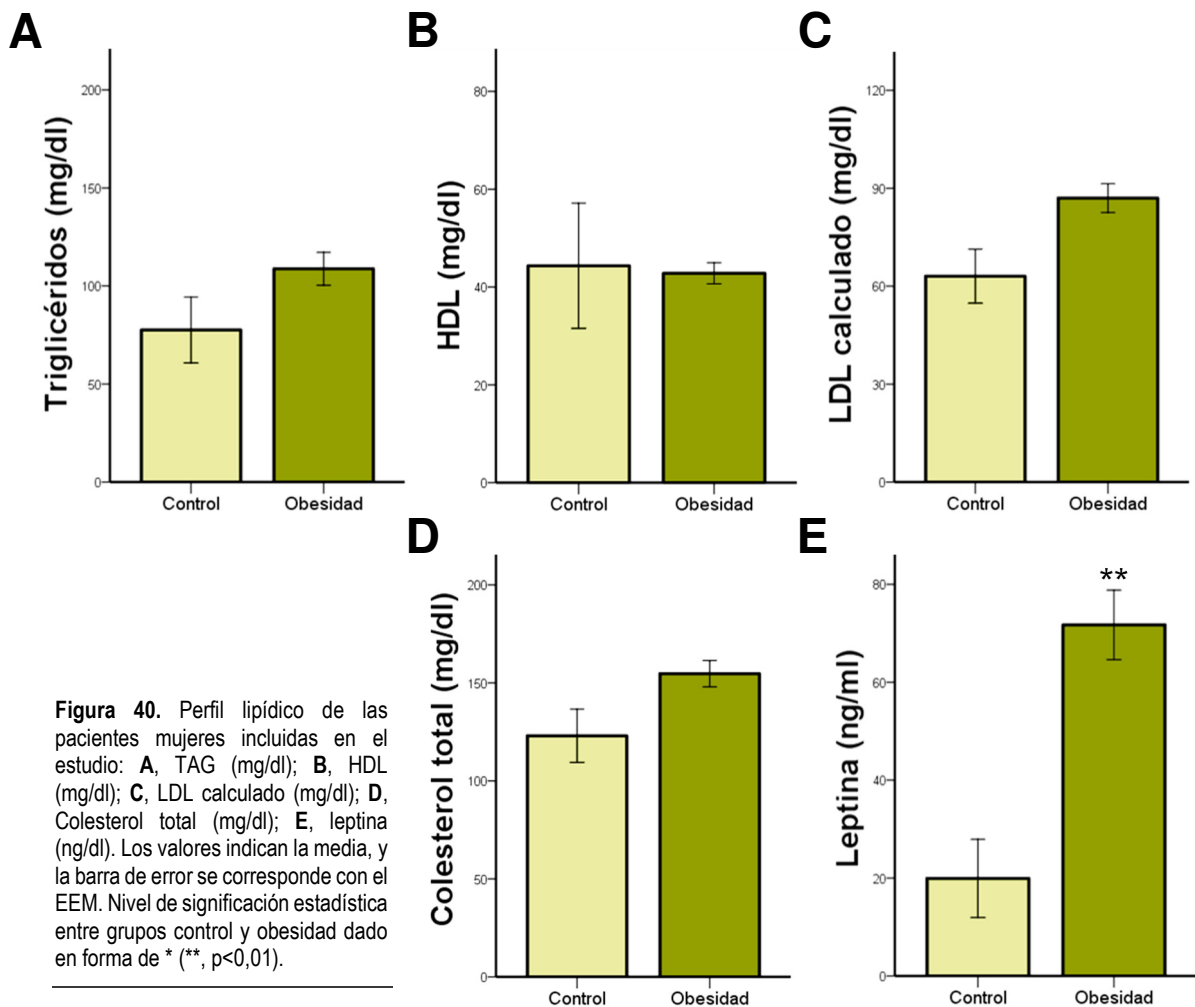
Se valoraron los niveles plasmáticos de TAG, HDL, LDL calculado, colesterol total y leptina, en todos los grupos de pacientes estudiados (tabla 8).

Grupo	Sexo	N	TAG (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL calculado (mg/dl)	Colesterol total (mg/dl)	Leptina (ng/ml)
Control	Mujer	4	77,60 ± 16,78	44,35 ± 12,80	63,08 ± 8,25	123,00 ± 13,61	19,94 ± 7,98
	Varón	7	129,00 ± 34,36	55,67 ± 12,17	94,33 ± 19,65	162,50 ± 30,96	6,80 ± 0,20
Obesidad	Mujer	44	108,78 ± 8,40	42,81 ± 2,16	86,98 ± 4,40	154,71 ± 6,74	71,71 ± 7,10
	Varón	8	163,00 ± 17,48	34,62 ± 3,71	95,00 ± 7,57	158,37 ± 11,32	28,06 ± 6,78

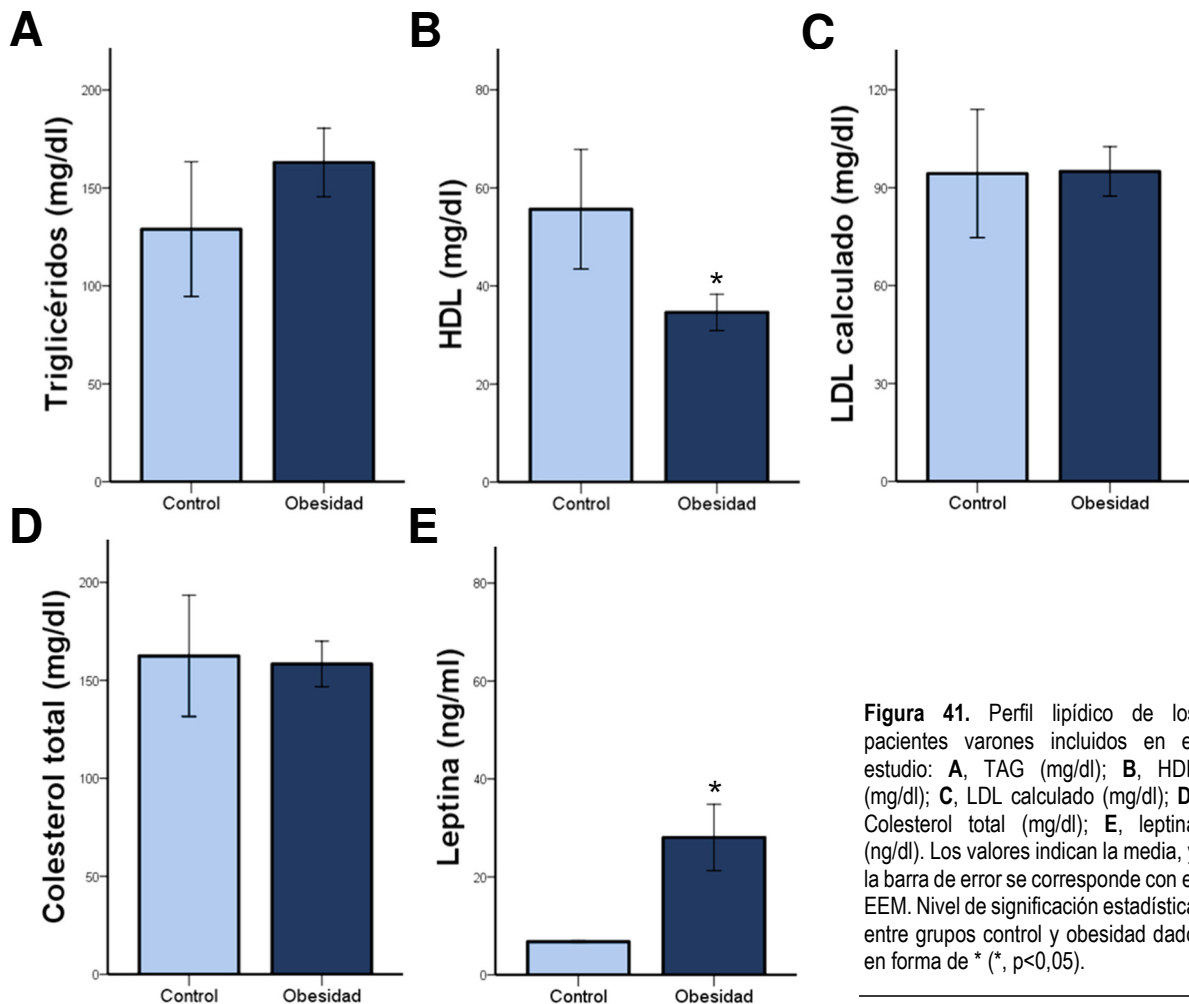
**Tabla 8.** Variables relacionadas con el perfil lipídico de los pacientes incluidos en el estudio: TAG (mg/dl), HDL (mg/dl), LDL calculado (mg/dl), Colesterol total (mg/dl) y leptina (ng/dl). Los valores están expresados como la media ± EEM.



Al analizar el perfil lipídico de las mujeres (figura 40), no se observaron grandes diferencias con respecto a las variables estudiadas, salvo en los niveles de leptina. Las mujeres obesas ( $71,71 \pm 7,10$  ng/ml) presentaron un aumento significativo ( $p = 0,001$ ) de leptina en comparación con las del grupo control ( $19,94 \pm 7,98$  ng/ml) (figura 40E). Los valores de TAG (figura 40A), LDL calculado (figura 40C) y colesterol total (figura 40D) fueron mayores en el grupo obesidad; sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

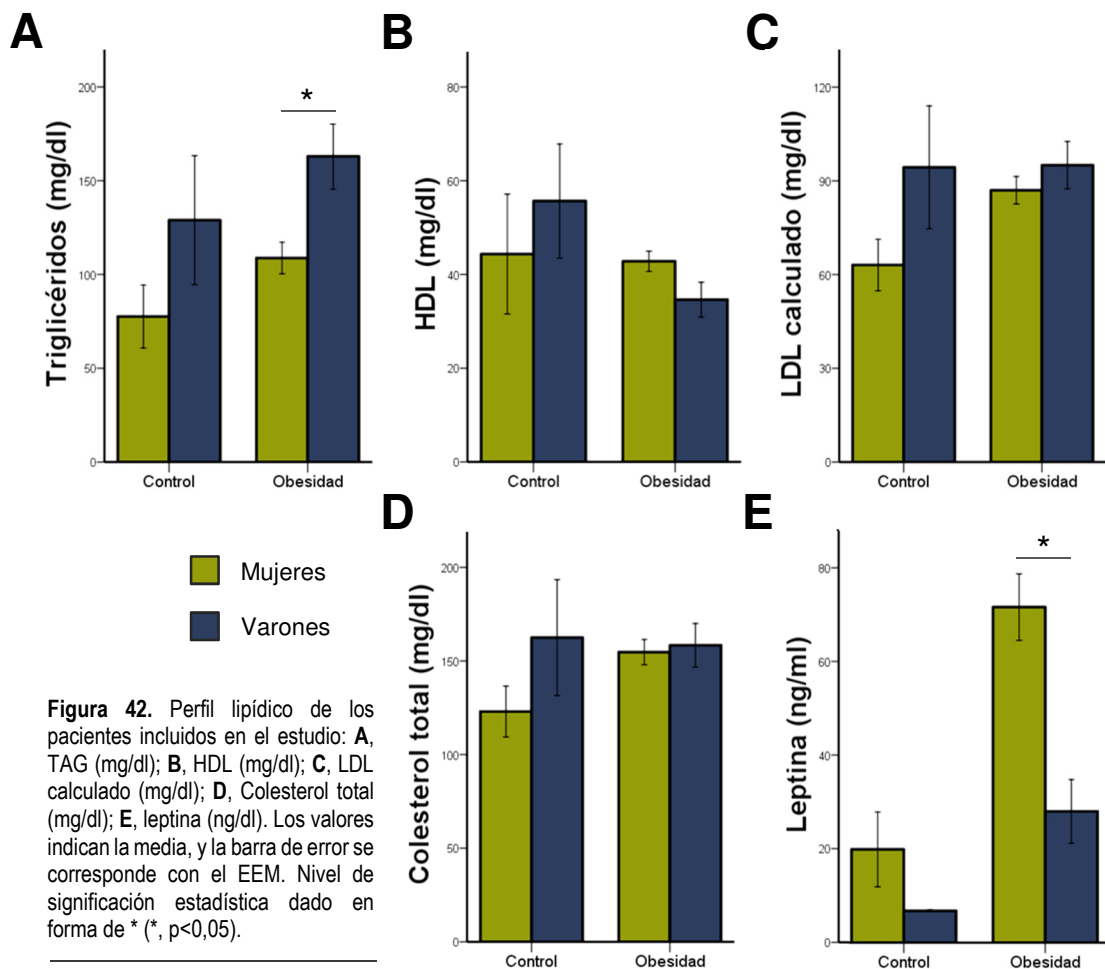


Entre los varones (figura 41), los niveles de HDL fueron menores ( $p = 0,04$ ) en los pacientes varones obesos ( $34,62 \pm 3,71$  mg/dl) con respecto a los del grupo control ( $55,67 \pm 12,17$  mg/dl) (figura 41B). Por otro lado, los niveles plasmáticos de leptina fueron mayores ( $p = 0,03$ ) en los obesos ( $28,06 \pm 6,78$  ng/ml) en comparación con los varones controles ( $6,80 \pm 0,20$  ng/ml) (figura 41E). Los varones obesos presentaron concentraciones plasmáticas de TAG superiores respecto a los controles (figura 41A), aunque estas diferencias no fueron significativas.



**Figura 41.** Perfil lipídico de los pacientes varones incluidos en el estudio: **A**, TAG (mg/dl); **B**, HDL (mg/dl); **C**, LDL calculado (mg/dl); **D**, Colesterol total (mg/dl); **E**, leptina (ng/dl). Los valores indican la media, y la barra de error se corresponde con el EEM. Nivel de significación estadística entre grupos control y obesidad dado en forma de \* (\*,  $p < 0,05$ ).

Al comparar las concentraciones plasmáticas de las variables relacionadas con el perfil lipídico de los individuos de los grupos control, no se observaron diferencias al analizar ambos sexos (figura 42). Sin embargo, en los pacientes con obesidad, algunas de las variables mostraron cierto grado de dimorfismo sexual. En este sentido, los niveles plasmáticos de TAG fueron mayores ( $p = 0,02$ ) en los pacientes varones obesos ( $163,00 \pm 17,48$  mg/dl) en comparación con las mujeres del mismo grupo ( $108,78 \pm 8,40$  mg/dl) (figura 42A). Por otra parte, las mujeres obesas presentaron una mayor concentración plasmática de leptina ( $71,71 \pm 7,10$  ng/ml) en comparación con los varones del mismo grupo ( $28,06 \pm 6,78$  ng/ml) siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0,02$ ) (figura 42E).



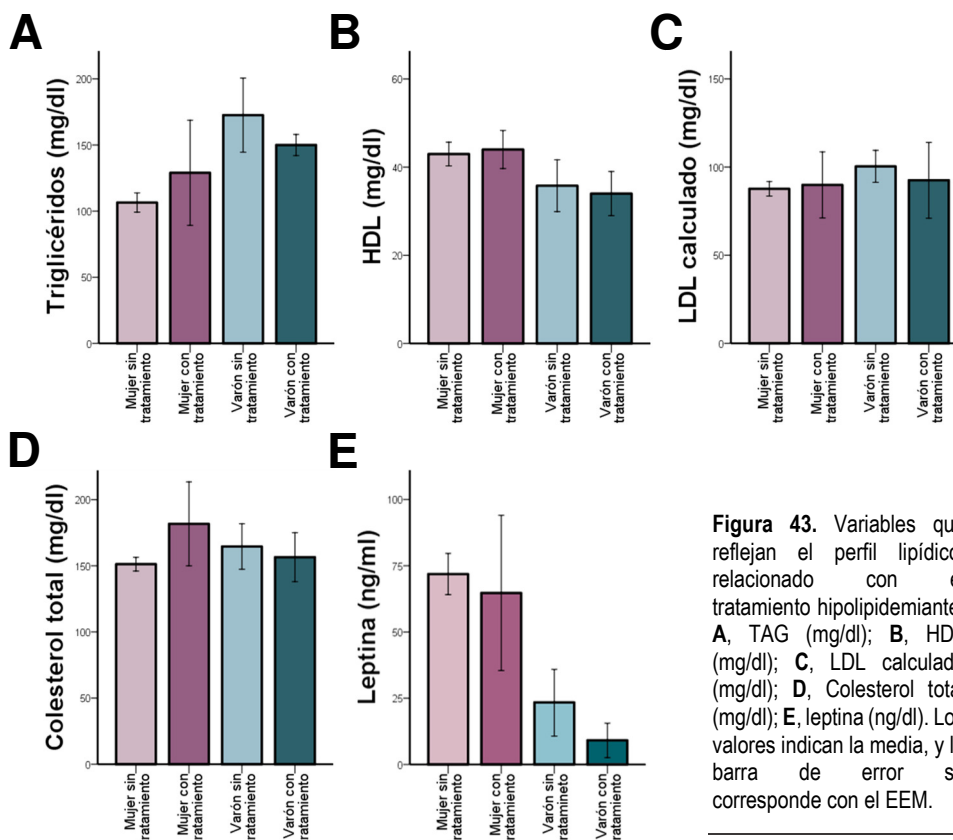
Posteriormente se comprobó si existía algún tipo de correlación entre ANGPTL8 y las diferentes variables analíticas asociadas al perfil lipídico, y los resultados se muestran en la tabla 9. No se observó correlación estadísticamente significativa entre las variables estudiadas, salvo por los niveles de HDL en varones ( $r = 0,77$ ;  $p = 0,01$ ).

Variable	Sexo	Media $\pm$ EEM	Coefficiente de correlación $r$	Significación bilateral ( $p$ valor)
TAG (mg/dl)	M	108,87 $\pm$ 8,20	-0,07	0,71
	V	144,14 $\pm$ 16,63	-0,54	0,07
HDL (mg/dl)	M	43,05 $\pm$ 2,16	-0,21	0,24
	V	40,92 $\pm$ 4,49	0,77	<b>0,01*</b>
LDL calculado (mg/dl)	M	87,22 $\pm$ 4,71	0,10	0,57
	V	93,83 $\pm$ 6,55	-0,43	0,22
Colesterol total (mg/dl)	M	154,89 $\pm$ 6,90	0,03	0,87
	V	158,54 $\pm$ 11,13	-0,07	0,83
Leptina (ng/ml)	M	66,26 $\pm$ 6,90	0,06	0,75
	V	20,55 $\pm$ 5,48	-0,11	0,82

**Tabla 9.** Correlación entre la concentración plasmática de ANGPTL8 con las variables destinadas a la valoración del perfil lipídico mediante la determinación del coeficiente de correlación de Spearman. M: Mujer. V: Varón. Nivel de significación estadística dado en forma de \* (\*,  $p < 0,05$ ).

Considerando que los pacientes podían estar en tratamiento farmacológico, valoramos si la administración de fármacos que modificasen el perfil lipídico implicaba alguna diferencia en las variables estudiadas. En las historias clínicas se observó que, en mujeres, sólo recibían tratamiento hipolipidemiante siete pacientes del grupo obesidad. En los varones, recibían este tipo de tratamiento dos pacientes del grupo control y dos del grupo obesidad.

Al analizar la posible influencia del tratamiento hipolipidemiante sobre los parámetros estudiados del perfil lipídico en los pacientes obesos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (figura 43).



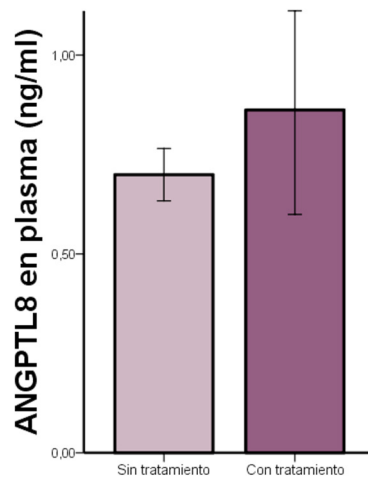
**Figura 43.** Variables que reflejan el perfil lipídico, relacionado con el tratamiento hipolipidemiante: **A**, TAG (mg/dl); **B**, HDL (mg/dl); **C**, LDL calculado (mg/dl); **D**, Colesterol total (mg/dl); **E**, leptina (ng/dl). Los valores indican la media, y la barra de error se corresponde con el EEM.

Además, se estudiaron las posibles variaciones en la concentración plasmática de ANGPTL8 en los pacientes obesos con tratamiento para el control del perfil lipídico (tabla 10).

**Tabla 10.** Concentración plasmática de ANGPTL8 (ng/ml) en los pacientes obesos incluidos en el estudio, teniendo en cuenta si estaban o no con tratamiento hipolipidemiante. Todos los valores están expresados como la media  $\pm$  EEM.

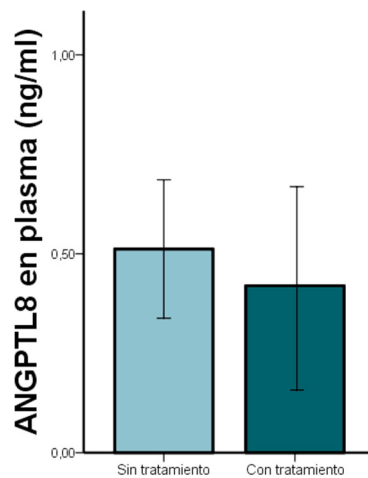
Grupo	Sexo	Tratamiento control perfil lipídico	N	ANGPTL8 (ng/ml)
Obesidad	Mujer	Sin tratamiento	37	0,70 $\pm$ 0,06
		Con tratamiento	7	0,86 $\pm$ 0,26
	Varón	Sin tratamiento	6	0,51 $\pm$ 0,17
		Con tratamiento	2	0,42 $\pm$ 0,27

Las pacientes obesas con tratamiento hipolipidemiante presentaron unos niveles plasmáticos de ANGPTL8 ( $0,86 \pm 0,26$  ng/ml) mayores a los presentes en las obesas sin tratamiento ( $0,70 \pm 0,06$  ng/ml), sin ser éstos estadísticamente significativos (figura 44).



**Figura 44.** Concentración plasmática de ANGPTL8 (ng/ml) en mujeres obesas, teniendo en cuenta si estaban en tratamiento hipolipidemiante. Los valores indican la media  $\pm$  EEM.

Los pacientes varones obesos en tratamiento hipolipidemiante ( $0,42 \pm 0,27$  ng/ml) presentaron una concentración plasmática de ANGPTL8 inferior a los presentes a los pacientes sin tratamiento ( $0,51 \pm 0,17$  ng/ml) (figura 45).



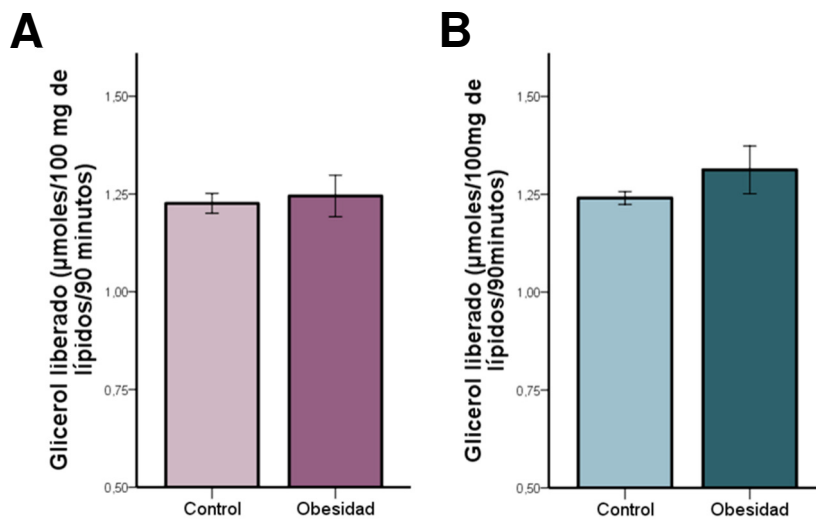
**Figura 45.** Concentración plasmática de ANGPTL8 (ng/ml) en varones obesos, teniendo en cuenta si estaban en tratamiento hipolipidemiante. Los valores indican la media  $\pm$  EEM.

Para valorar la influencia de ANGPTL8 en el metabolismo lipídico de las células del tejido adiposo visceral humano, analizamos la actividad lipolítica de adipocitos aislados de dicho tejido. Así pues, cuantificamos el glicerol liberado por estas células tras 90 minutos de incubación, tanto en situación basal, como en presencia de la proteína recombinante de ANGPTL8 (20nM); además, observamos los posibles cambios en la actividad lipolítica por la ausencia o presencia de fármacos capaces de estimular la liberación de glicerol (isoprenalina 0,1  $\mu$ M), o bien, de causar su inhibición (insulina 0,1  $\mu$ M) (tabla 11).

Lipólisis en adipocitos aislados ( $\mu$ moles glicerol/100 mg de lípidos/90 minutos)								
Grupo	Sexo	N	Basal	ANGPTL8 (20nM)	Isoprenalina (0,1 $\mu$ M)	Isoprenalina (0,1 $\mu$ M) + ANGPTL8 (20nM)	Insulina (0,1 $\mu$ M)	Insulina (0,1 $\mu$ M) + ANGPTL8 (20nM)
Control	Mujer	4	1,22 $\pm$ 0,03	1,19 $\pm$ 0,05	1,76 $\pm$ 0,15	1,44 $\pm$ 0,02	1,19 $\pm$ 0,02	1,30 $\pm$ 0,14
	Varón	4	1,24 $\pm$ 0,02	1,20 $\pm$ 0,07	1,78 $\pm$ 0,15	1,06 $\pm$ 0,10	1,23 $\pm$ 0,02	1,34 $\pm$ 0,13
Obesidad	Mujer	20	1,24 $\pm$ 0,06	1,20 $\pm$ 0,04	1,81 $\pm$ 0,11	1,76 $\pm$ 0,13	1,21 $\pm$ 0,04	1,23 $\pm$ 0,05
	Varón	4	1,31 $\pm$ 0,06	1,30 $\pm$ 0,04	1,86 $\pm$ 0,05	1,83 $\pm$ 0,04	1,27 $\pm$ 0,02	1,41 $\pm$ 0,02

**Tabla 11.** Actividad lipolítica en adipocitos aislados del tejido adiposo omental de los pacientes incluidos en el estudio, en valores absolutos de liberación de glicerol al medio ( $\mu$ moles/100 mg de lípidos/90 minutos). Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM.

La lipólisis basal de las mujeres obesas ( $1,24 \pm 0,06$   $\mu$ moles glicerol/100 mg de lípidos/90 minutos) fue mayor que la observada en las del grupo control ( $1,22 \pm 0,02$   $\mu$ moles glicerol/100 mg de lípidos/90 minutos). De la misma manera, la actividad lipolítica de los pacientes varones obesos ( $1,31 \pm 0,06$   $\mu$ moles glicerol/100 mg de lípidos/90 minutos) fue mayor que la de los varones control ( $1,24 \pm 0,02$   $\mu$ moles glicerol/100 mg de lípidos/90 minutos). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En relación con el sexo, no aparecieron diferencias significativas entre los grupos (figura 46).



**Figura 46.** Actividad lipolítica, en valores absolutos de liberación de glicerol ( $\mu$ moles/100 mg de lípidos/90 minutos), de los adipocitos aislados de los pacientes incluidos en el estudio, separados en mujeres (A) y varones (B). Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM.

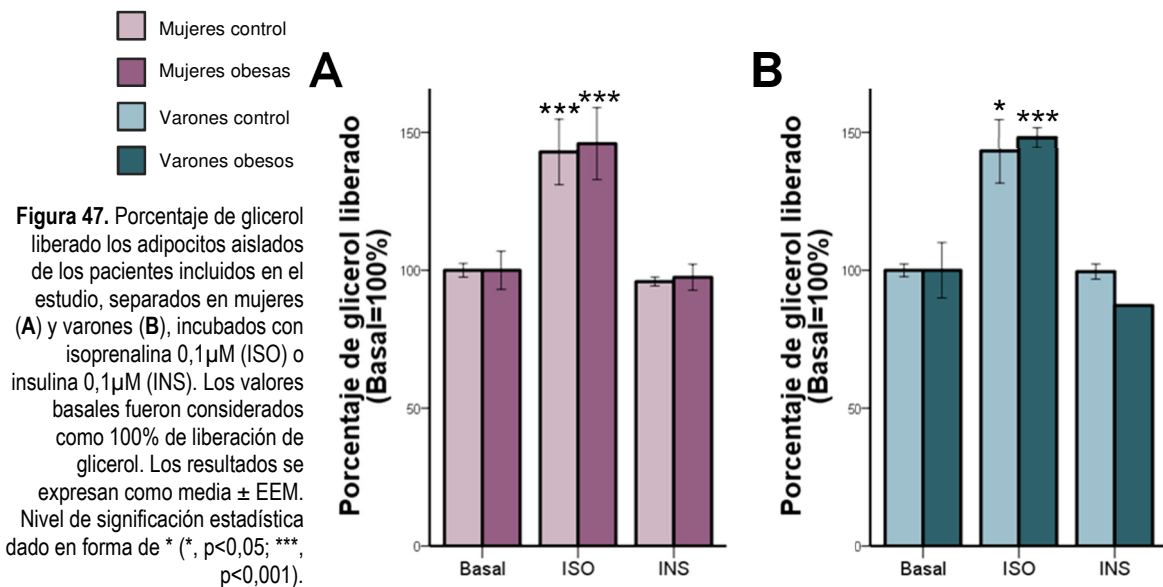
Igualmente, analizamos el porcentaje de lipólisis con el fin de unificar las comparaciones relacionadas con los efectos de las sustancias utilizadas para evaluar la actividad lipolítica, minimizando así la variabilidad inherente a las condiciones experimentales concretas. Para ello, los correspondientes valores basales obtenidos fueron considerados como 100% de liberación de glicerol al medio de incubación.

En relación con isoprenalina, en mujeres tanto del grupo control ( $142,92 \pm 11,89\%$ ) como del grupo obesidad ( $145,94 \pm 8,99\%$ ), el fármaco produjo un aumento de la liberación de glicerol respecto a los valores

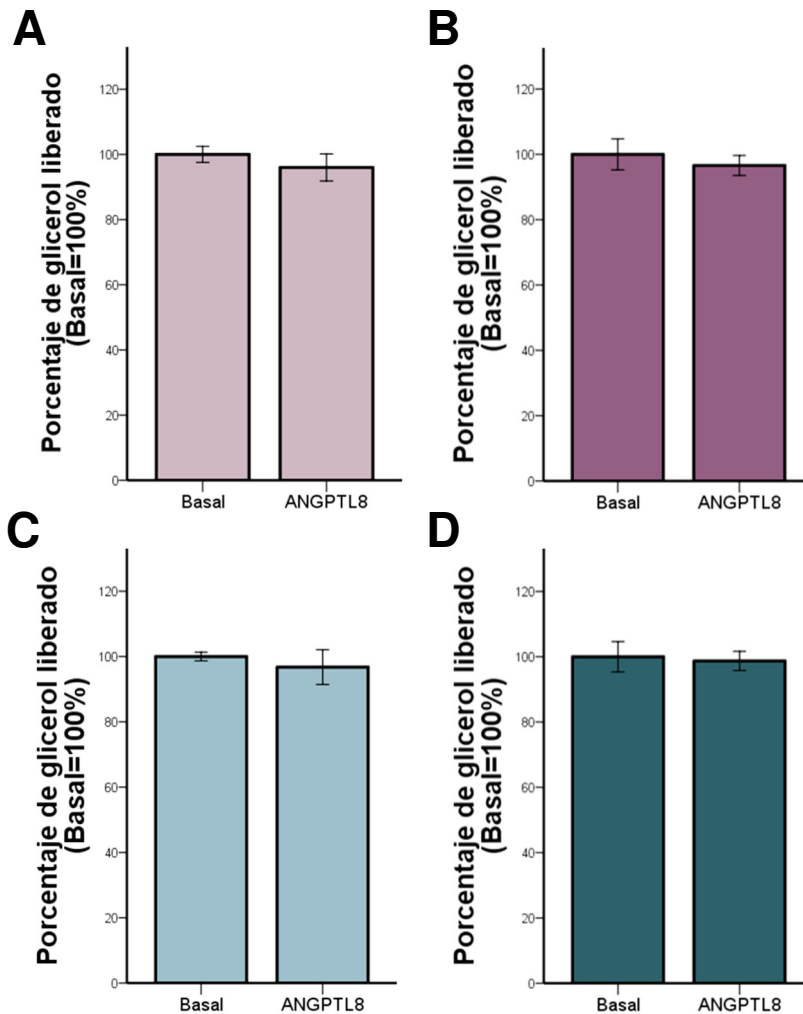


basales, siendo significativo en ambos casos ( $p = <0,001$ ) (figura 47A). Asimismo, en varones, isoprenalina también provocó un incremento de la lipólisis, tanto en el grupo control ( $143,29 \pm 12,50\%$ ) como en el de obesos ( $148,52 \pm 3,11\%$ ) de manera significativa ( $p = 0,01$ ;  $p = <0,001$ ; respectivamente) (figura 47B).

La disminución de la liberación de glicerol tras la incubación de los adipocitos en presencia de insulina, en comparación con los valores basales, se presentó en todos los grupos, sin embargo, en ninguno de los casos esta diferencia llegó a ser significativa estadísticamente (figura 47).



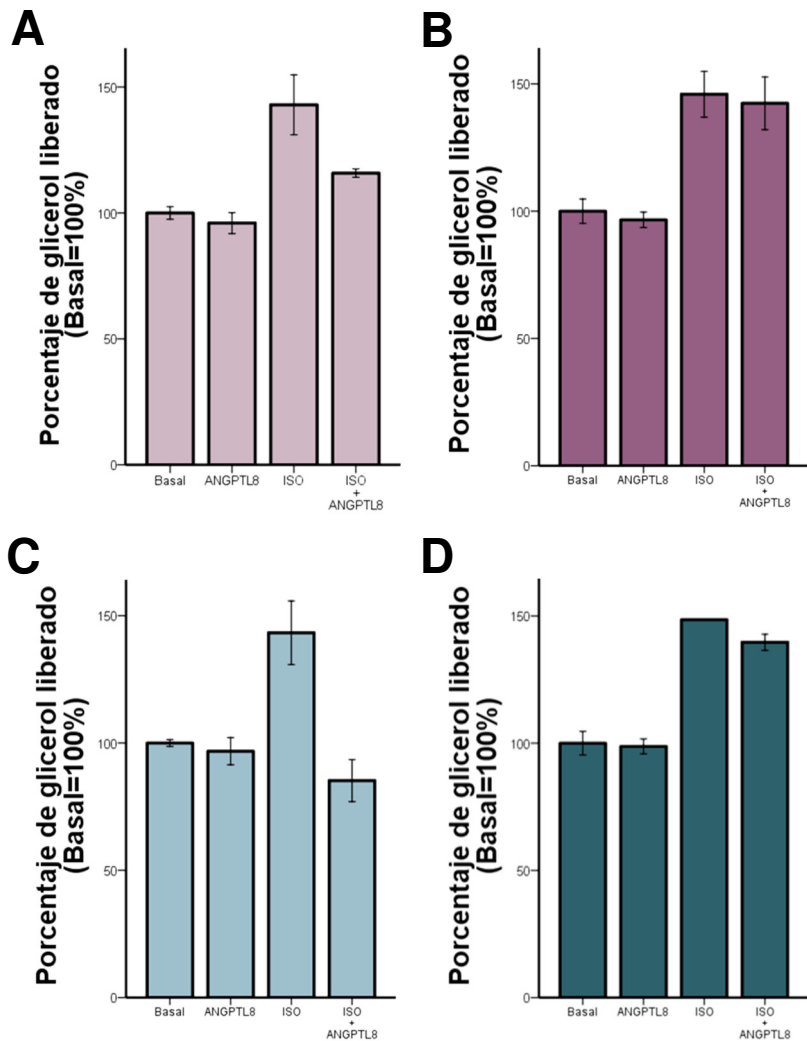
Respecto al efecto de ANGPTL8 sobre el porcentaje de liberación de glicerol de los adipocitos aislados de los sujetos a estudio, se observó un ligero descenso del porcentaje, tanto en mujeres controles ( $95,98 \pm 4,15\%$ ) como en obesas ( $96,60 \pm 3,06\%$ ), sin que estas diferencias sean estadísticamente significativas. De manera similar, en varones también se presentó un ligero descenso del porcentaje de liberación de glicerol en ambos grupos, control ( $96,77 \pm 5,33\%$ ) y obesos ( $98,73 \pm 2,92\%$ ). Al igual que en mujeres, la disminución no fue significativa (figura 48).



**Figura 48.** Efectos de ANGPTL8 20nM en el porcentaje de liberación de glicerol de los adipocitos aislados de los pacientes incluidos en el estudio respecto al valor basal (considerado como el 100% de liberación de glicerol). En la gráfica se representan los datos de mujeres controles (A) y obesas (B), y de los varones control (C) y obesos (D). Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM.

En mujeres, los valores del porcentaje de liberación de glicerol en presencia de isoprenalina fueron ligeramente superiores, sin ser significativos, a los casos en los que durante la incubación de los adipocitos se combinó este fármaco con ANGPTL8, tanto en mujeres del grupo control ( $142,92 \pm 11,89$  % vs.  $115,82 \pm 1,67$  %), como en las obesas ( $145,99 \pm 8,99$  % vs.  $142,39 \pm 10,35$  %). El efecto de isoprenalina sobre el porcentaje de liberación de glicerol fue superior al observado en la incubación del fármaco junto a ANGPTL8, tanto en los pacientes varones control ( $143,29$

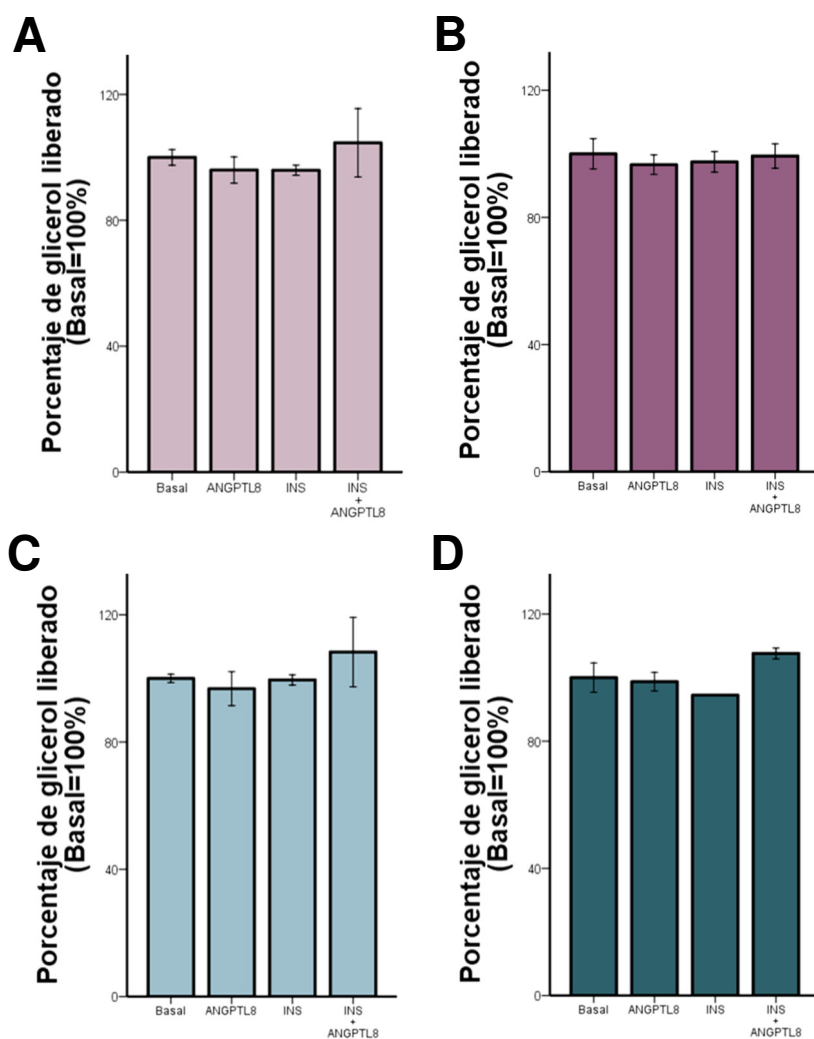
$\pm 12,50 \%$  vs.  $82,24 \pm 8,25 \%$ ) y obesos ( $148,52 \pm 8,99 \%$  vs.  $139,66 \pm 3,17 \%$ ) sin ser estas diferencias significativas (figura 49).



**Figura 49.** Efectos de ANGPTL8 20nM en el porcentaje de liberación de glicerol de los adipocitos aislados de los pacientes incluidos en el estudio, en relación con los efectos producidos por isoprenalina 0,1 $\mu$ M. En la gráfica se representan los datos de mujeres controles (A) y obesas (B), y de los varones control (C) y obesos (D). Los valores basales fueron considerados como el 100% de liberación de glicerol. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM.

Con relación a las diferencias del porcentaje de liberación de glicerol entre insulina y ANGPTL8, en mujeres fue ligeramente inferior el producido por insulina en comparación al observado en la incubación de insulina y ANGPTL8, tanto en mujeres control ( $95,91 \pm 1,59 \%$  vs.  $104,63 \pm 10,86 \%$ ) como en obesas ( $97,46 \pm 3,23 \%$  vs.  $99,29 \pm 3,83 \%$ ), sin ser estadísticamente significativas estas diferencias. En varones, ocurrió un efecto similar, el porcentaje de liberación de glicerol resultante de la

incubación con insulina fue inferior al observado tras la incubación de insulina y ANGPTL8, en varones controles ( $99,52 \pm 1,60 \%$  vs.  $108,28 \pm 10,91 \%$ ) y obesos ( $94,51 \pm 3,23 \%$  vs.  $107,60 \pm 1,70 \%$ ). Al igual que en mujeres, estas diferencias no fueron significativas en los varones (figura 50).



**Figura 50.** Efectos de ANGPTL8 20nM en el porcentaje de liberación de glicerol de los adipocitos aislados de los pacientes incluidos en el estudio, con relación a los efectos producidos por insulina  $0,1\mu\text{M}$ . En la gráfica se representan los datos de mujeres control (A) y obesas (B), y de los varones control (C) y obesos (D). Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM.

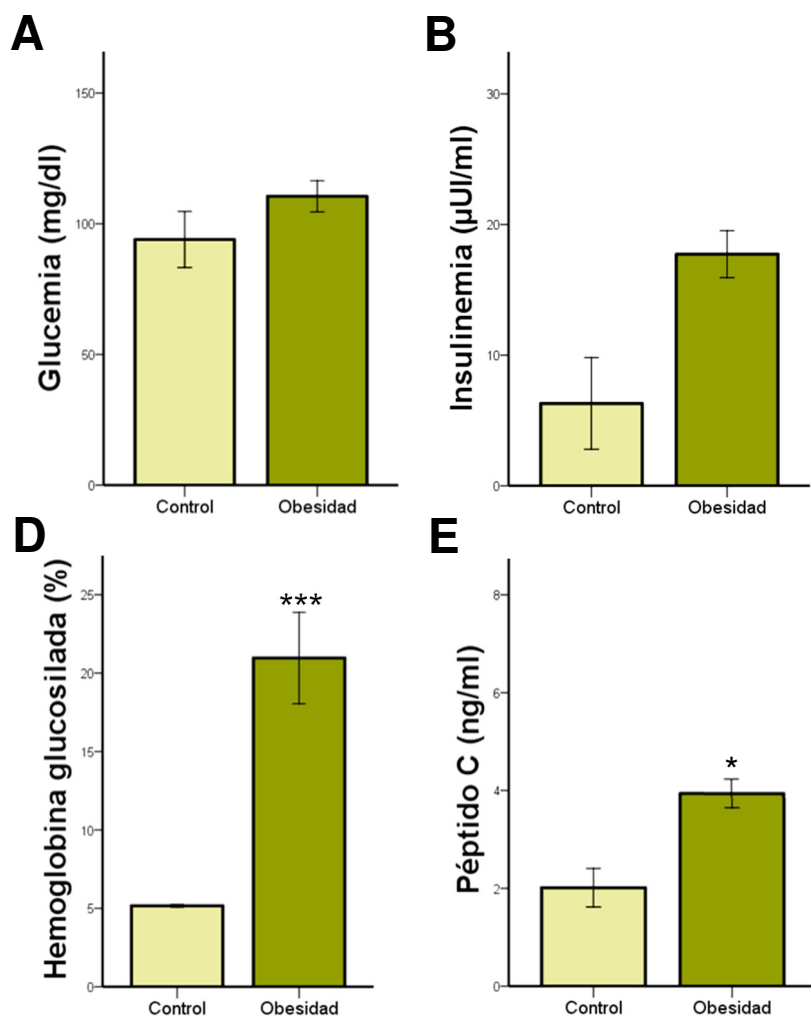
## 5. Homeostasis glucídica y ANGPTL8

Debido a la estrecha relación entre obesidad y diabetes expuesta anteriormente, se valoró el perfil glucídico que presentaban los pacientes, comparando diferentes parámetros de la analítica previa a la intervención. Las variables analizadas fueron glucemia (mg/dl), insulinemia ( $\mu$ UI/ml), hemoglobina glucosilada (%) y péptido C (ng/dl) (tabla 12).

Grupo	Sexo	N	Glucemia (mg/dl)	Insulinemia ( $\mu$ UI/ml)	Hemoglobina glucosilada (%)	Péptido C (ng/dl)
Control	Mujer	4	94,00 $\pm$ 10,73	6,30 $\pm$ 3,51	5,17 $\pm$ 0,09	2,01 $\pm$ 0,39
	Varón	7	99,83 $\pm$ 6,17	5,86 $\pm$ 1,93	5,80 $\pm$ 0,71	2,19 $\pm$ 0,41
Obesidad	Mujer	44	110,52 $\pm$ 5,98	17,73 $\pm$ 1,80	20,96 $\pm$ 2,91	3,94 $\pm$ 0,29
	Varón	8	112,62 $\pm$ 8,69	26,54 $\pm$ 5,68	13,39 $\pm$ 4,69	5,80 $\pm$ 0,77

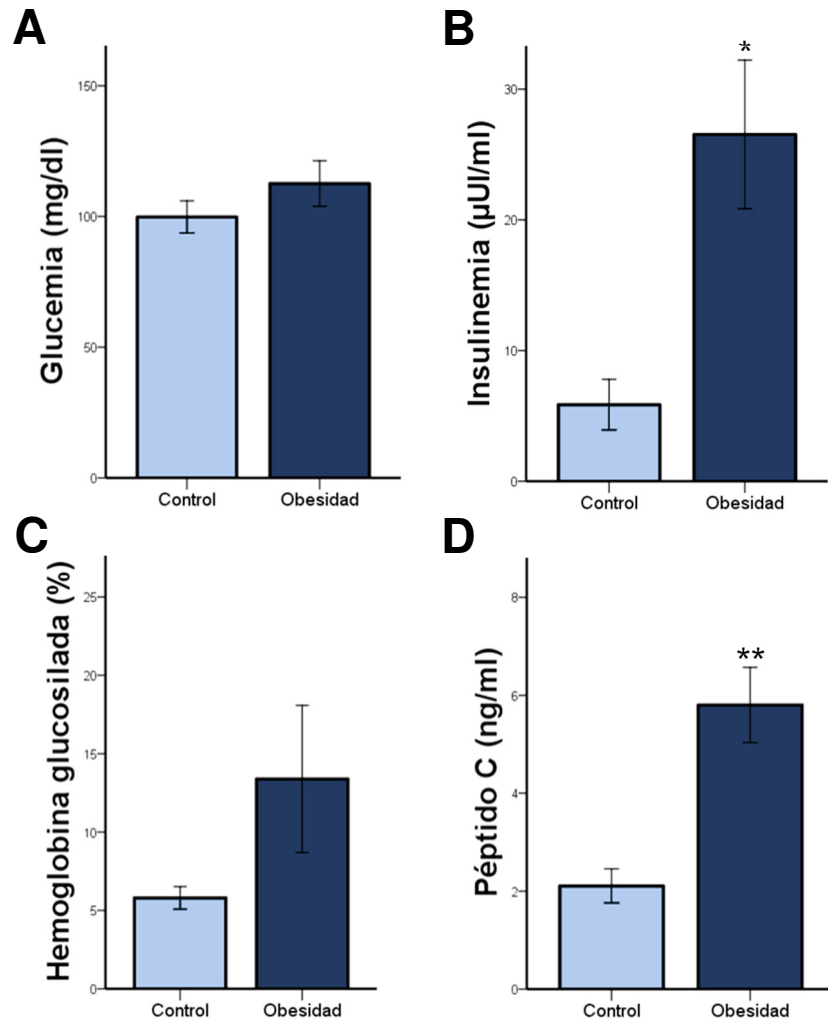
**Tabla 12.** Variables relacionadas con el metabolismo glucídico de los pacientes incluidos en el estudio: glucemia (mg/dl), insulinemia ( $\mu$ UI/ml), hemoglobina glucosilada (%) y péptido C (ng/dl). Todos los valores están expresados como la media  $\pm$  EEM.

En relación con el perfil glucémico en las mujeres, las pacientes obesas presentaron valores de hemoglobina glucosilada significativamente superiores al grupo control (respectivamente, 20,96  $\pm$  2,91 % vs. 5,17  $\pm$  0,09 %;  $p < 0,001$ ). Asimismo, la concentración plasmática de péptido C fue mayor en las mujeres obesas (3,94  $\pm$  0,29 ng/ml) en comparación con las del grupo control (2,01  $\pm$  0,39 ng/ml) de manera estadísticamente significativa ( $p = 0,01$ ). Con respecto a la glucemia e insulinemia, las obesas presentaron niveles ligeramente mayores que las incluidas en el grupo control, pero sin ser significativos (figura 51).



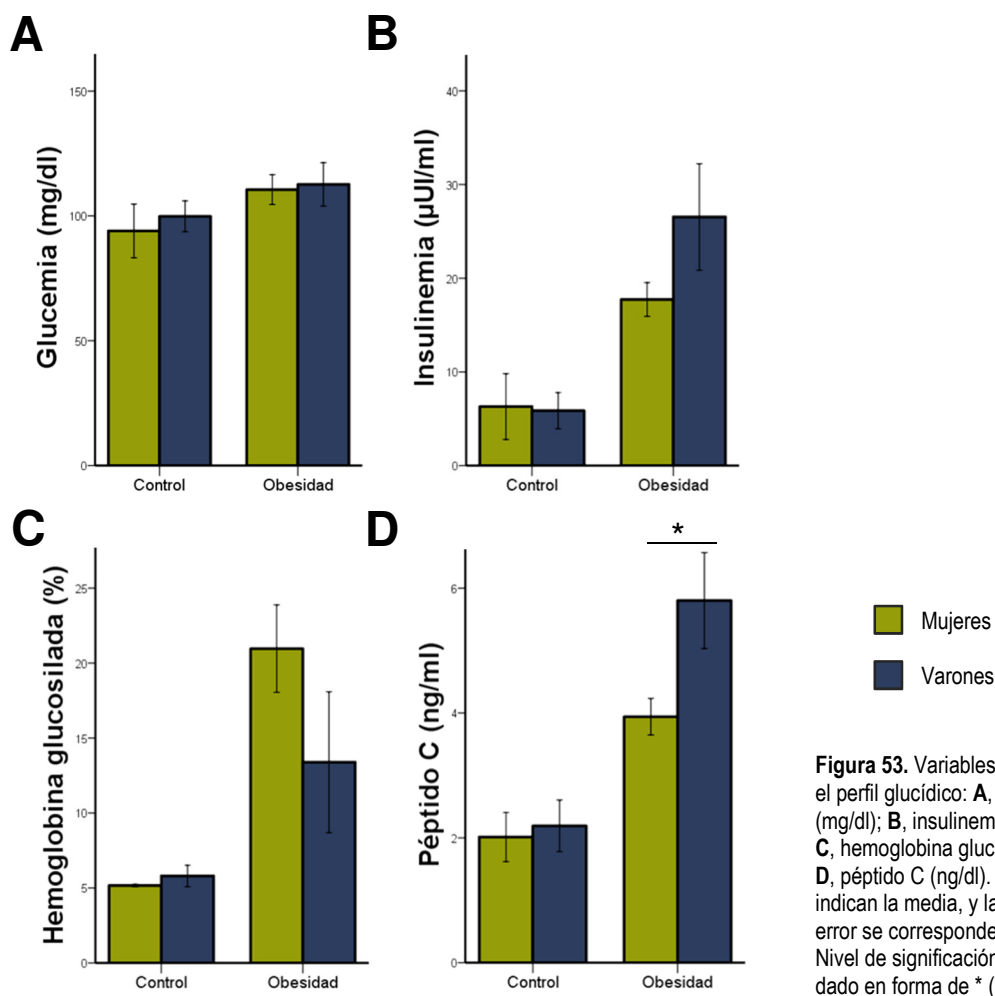
**Figura 51.** Variables que reflejan el perfil glucídico de las mujeres incluidas en el estudio: **A**, glucemia (mg/dl); **B**, insulinemia (µUI/ml); **C**, hemoglobina glucosilada (%); **D**, péptido C (ng/dl). Los valores indican la media, y la barra de error se corresponde con el EEM. Nivel de significación estadística dado en forma de \* (\*, p<0,05; (\*\*\*, p<0,001).

No se observaron diferencias significativas de la glucemia entre los varones del grupo control y obesidad. Respecto a la hemoglobina glucosilada, los obesos presentaron un mayor porcentaje, pero si ser estadísticamente significativo. La insulinemia de los pacientes varones con obesidad ( $26,54 \pm 5,68 \mu\text{UI/ml}$ ) fue significativamente superior ( $p = 0,02$ ) que la de los controles ( $5,86 \pm 1,93 \mu\text{UI/ml}$ ). Al igual que lo observado en mujeres, los varones obesos presentaron niveles de péptido C ( $5,80 \pm 0,77 \text{ ng/ml}$ ) incrementados respecto a los varones controles ( $2,19 \pm 0,41 \text{ ng/ml}$ ) de manera significativa ( $p = 0,004$ ) (figura 52).



**Figura 52.** Variables que reflejan el perfil glucídico de los varones incluidos en el estudio: **A**, glucemia (mg/dl); **B**, insulinemia (µU/ml); **C**, hemoglobina glucosilada (%); **D**, péptido C (ng/dl). Los valores indican la media, y la barra de error se corresponde con el EEM. Nivel de significación estadística dado en forma de \* (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

Además, se analizaron las variables del perfil glucémico en relación a las posibles diferencias con respecto al sexo. Los varones obesos presentaron mayores niveles de péptido C ( $5,80 \pm 0,77$  ng/ml) en comparación con las mujeres obesas ( $3,94 \pm 0,29$  ng/ml) de manera significativa ( $p = 0,02$ ). Estos datos se acompañaron de mayor insulinemia y con descenso de la hemoglobina glucosilada en varones obesos, sin ser estos estadísticamente significativos (figura 53).



**Figura 53.** Variables que reflejan el perfil glucídico: **A**, glucemia (mg/dl); **B**, insulinemia (µU/ml); **C**, hemoglobina glucosilada (%); **D**, péptido C (ng/dl). Los valores indican la media, y la barra de error se corresponde con el EEM. Nivel de significación estadística dado en forma de \* (\*, p<0,05).

No se observó ninguna relación estadísticamente significativa entre la concentración plasmática de ANGPTL8 con las variables destinadas al estudio del perfil glucídico (tabla 13).

Igualmente, se valoró si los pacientes estaban con tratamiento para controlar el perfil glucídico, y de los fármacos antihiper glucemiantes destacaba la administración de metformina, como monofármaco o asociada a insulina. Respecto a las mujeres, una paciente del grupo control recibía hipoglucemiantes orales y nueve del grupo obesidad. Ningún varón del grupo control estaba con este tipo de medicación, mientras que dos

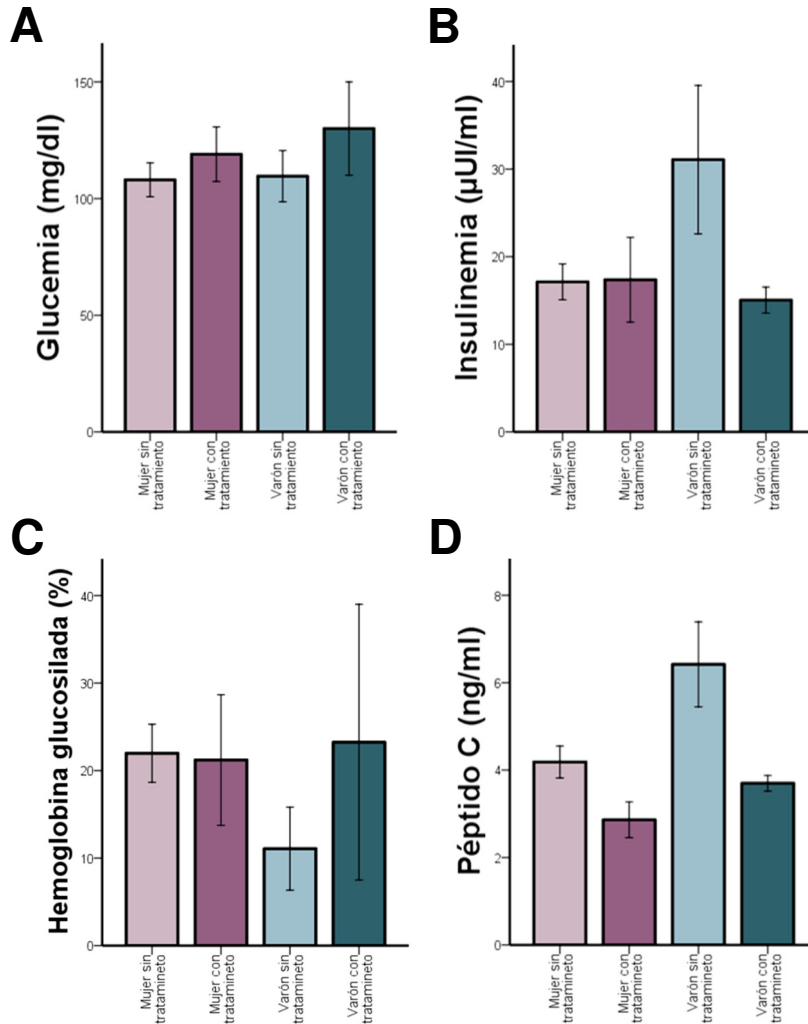


Variable	Sexo	Media $\pm$ EEM	Coefficiente de correlación $r$	Significación bilateral ( $p$ valor)
Glucemia (mg/dl)	M	109,63 $\pm$ 5,48	-0,25	0,14
	V	117,67 $\pm$ 11,79	-0,04	0,90
Insulinemia (UI/ml)	M	17,06 $\pm$ 1,70	-0,12	0,52
	V	17,95 $\pm$ 4,24	-0,01	0,97
Hemoglobina glucosilada (%)	M	19,52 $\pm$ 2,73	-0,22	0,24
	V	16,01 $\pm$ 6,04	-0,35	0,29
Péptido C (ng/ml)	M	3,79 $\pm$ 0,28	-0,05	0,81
	V	4,10 $\pm$ 0,68	-0,21	0,54

**Tabla 13.** Correlación entre niveles plasmáticos de ANGPTL8 con las variables destinadas a la valoración del perfil glucídico mediante la determinación del coeficiente de correlación de Spearman. **M:** Mujer. **V:** Varón.

pacientes del grupo obesidad sí recibían hipoglucemiantes orales. En el grupo de pacientes con obesidad, tan solo una mujer y un varón estaban tratados con hipoglucemiantes orales e insulina de manera conjunta.

Se valoró también si la medicación antihiper glucemiante modificaba las variables relacionadas con el perfil glucídico en los pacientes obesos. Los resultados indicaron que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos estudiados. En relación con el péptido C, los pacientes obesos de ambos sexos tratados con hipoglucemiantes orales mostraron concentraciones inferiores respecto a las observadas en los pacientes obesos sin tratamiento (figura 54).



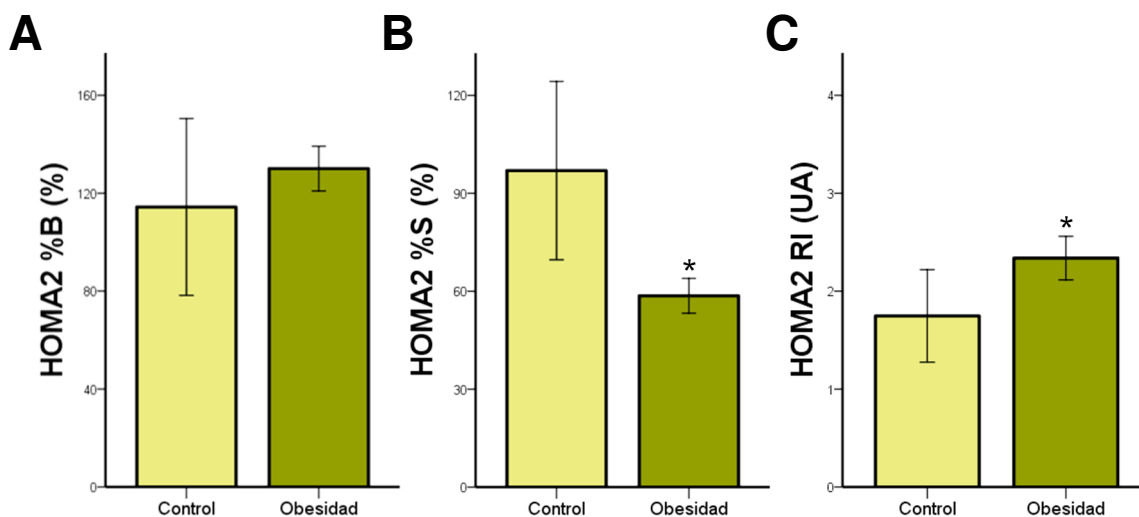
**Figura 54.** Variables que reflejan el perfil glucídico, en relación con el tratamiento hipoglucemiante: **A**, glucemia (mg/dl); **B**, insulinemia (µUI/ml); **C**, hemoglobina glucosilada (%); **D**, péptido C (ng/dl). Los valores indican la media, y la barra de error se corresponde con el EEM.

Por otra parte, en el estudio del perfil glucídico se analizaron los diferentes índices HOMA2 para valorar tanto la resistencia (HOMA2-RI) como la sensibilidad a la insulina (HOMA2-%S) y el porcentaje estimado de células β pancreáticas (HOMA2-%B) que presentaban los pacientes (tabla 14).

**Tabla 14.** Índices HOMA2 utilizados para valorar el estado del perfil glucídico de los pacientes incluidos en el estudio: HOMA2 %B (%), HOMA2 %S (%) y HOMA2 RI (UA). Todos los valores están expresados como la media  $\pm$  EEM.

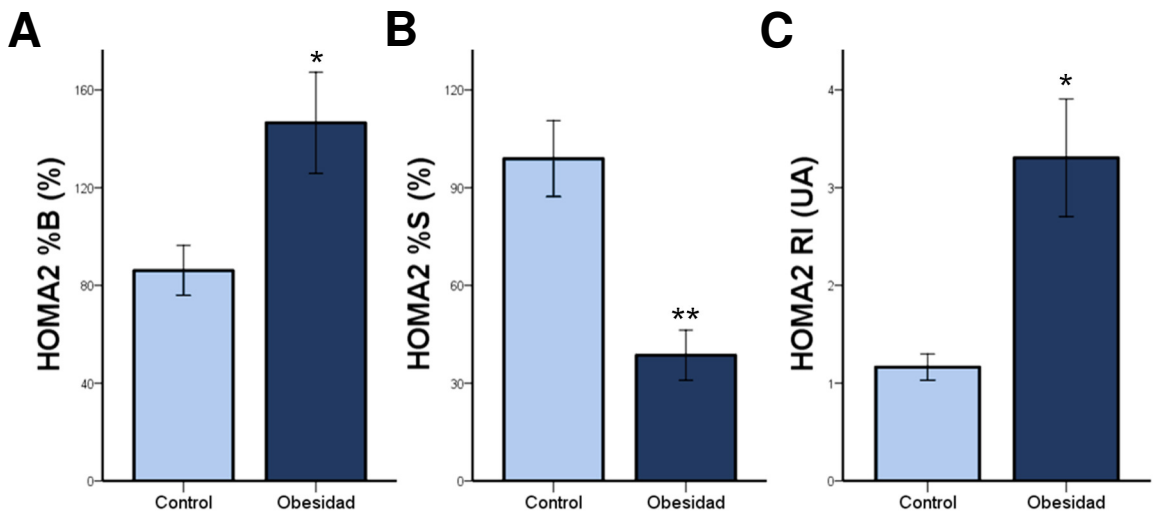
Grupo	Sexo	N	HOMA2-%B (%)	HOMA2-%S (%)	HOMA2-RI (UA)
Control	Mujer	4	114,35 $\pm$ 36,14	96,95 $\pm$ 27,31	1,27 $\pm$ 0,29
	Varón	7	86,14 $\pm$ 10,25	98,94 $\pm$ 11,64	1,06 $\pm$ 0,11
Obesidad	Mujer	44	130,05 $\pm$ 9,13	58,61 $\pm$ 5,34	2,34 $\pm$ 0,22
	Varón	8	146,55 $\pm$ 20,72	38,59 $\pm$ 7,69	3,30 $\pm$ 0,60

En mujeres obesas, se observó una disminución de la sensibilidad a la insulina (58,61  $\pm$  5,34 %), en comparación con el grupo de mujeres control (96,95  $\pm$  27,31 %) de manera significativa ( $p = 0,048$ ). Como era de esperar, la resistencia a esta hormona fue mayor en las mujeres obesas (2,34  $\pm$  0,22 UA) que en las del grupo control (1,27  $\pm$  0,29 UA), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0,02$ ). No se observaron cambios en relación con el porcentaje estimado de células  $\beta$  pancreáticas (figura 55).



**Figura 55.** Índices HOMA2 de las mujeres incluidas en el estudio. A: HOMA2 %B (%). B: HOMA2 %S (%). C: HOMA2 RI (UA). Los valores indican la media, y la barra de error se corresponde con el EEM. Nivel de significación estadística dado en forma de \* (\*,  $p < 0,05$ ).

Tras valorar el perfil glucídico mediante los índices HOMA2 en los varones incluidos en el estudio, observamos que el porcentaje estimado de células  $\beta$  pancreáticas fue mayor en los pacientes obesos ( $146,55 \pm 20,72$  %) que en los controles ( $86,14 \pm 10,25$  %) de manera significativa ( $p = 0,02$ ). Los varones obesos presentaron una disminución de la sensibilidad a la insulina ( $38,59 \pm 7,69$  %) en comparación con los varones controles ( $98,94 \pm 11,64$  %) de forma significativa ( $p = 0,001$ ). Igualmente, los varones obesos presentaron aumento de la resistencia a la insulina ( $3,30 \pm 0,60$  UA) con respecto a los varones del grupo control ( $1,06 \pm 0,11$  UA) también de manera significativa ( $p = 0,015$ ) (figura 56).



**Figura 56.** Índices HOMA2 de los varones incluidos en el estudio. **A:** HOMA2 %B (%). **B:** HOMA2 %S (%). **C:** HOMA2 RI (UA). Los valores indican la media, y la barra de error se corresponde con el EEM. Nivel de significación estadística entre grupos control y obesidad dado en forma de \* (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

En relación con el sexo, los varones controles presentaron menor porcentaje estimado de células  $\beta$  pancreáticas en comparación con las mujeres del grupo control. Asimismo, los varones obesos mostraron mayor resistencia a la insulina que las mujeres obesas. Sin embargo, estas diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas (figura 57).

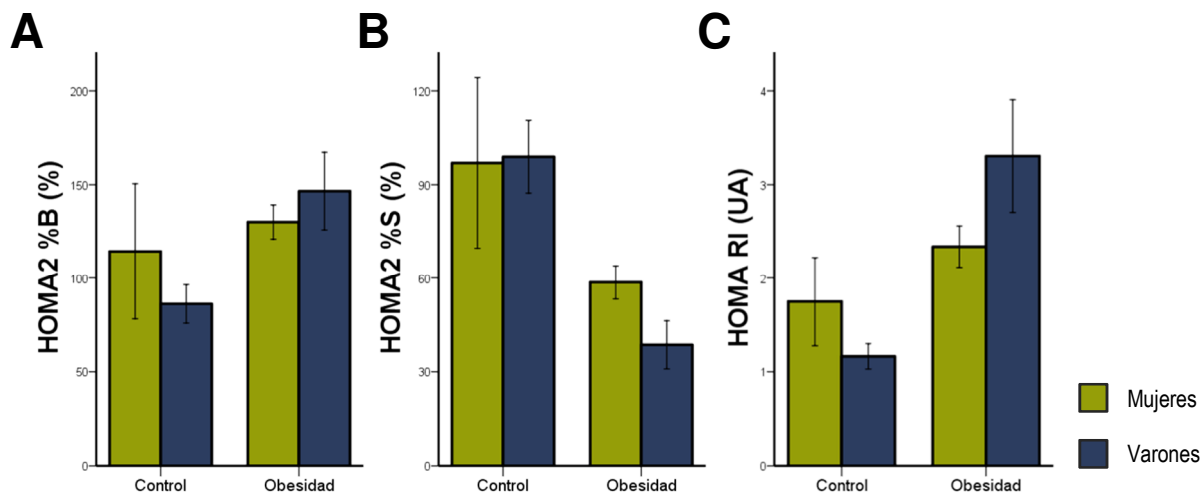


Figura 57. Índices HOMA2 de los pacientes incluidos en el estudio. A: HOMA2-%B (%). B: HOMA2-%S (%). C: HOMA2-RI (UA). Los valores indican la media, y la barra de error se corresponde con el EEM.

No apareció ninguna correlación entre los índices HOMA2 con los niveles plasmáticos de ANGPTL8, teniendo en cuenta el sexo de los pacientes estudiados (tabla 15).

Variable	Sexo	Media ± EEM	Coefficiente de correlación ro (r)	Significación bilateral (p valor)
HOMA2 %B (%)	M	130,14 ± 8,65	0,02	0,91
	V	115,64 ± 16,25	0,08	0,81
HOMA2 %S (%)	M	60,53 ± 5,51	0,19	0,30
	V	61,68 ± 9,73	0,01	0,97
HOMA2 RI (UA)	M	2,28 ± 0,21	-0,19	0,30
	V	2,39 ± 0,45	-0,01	0,97

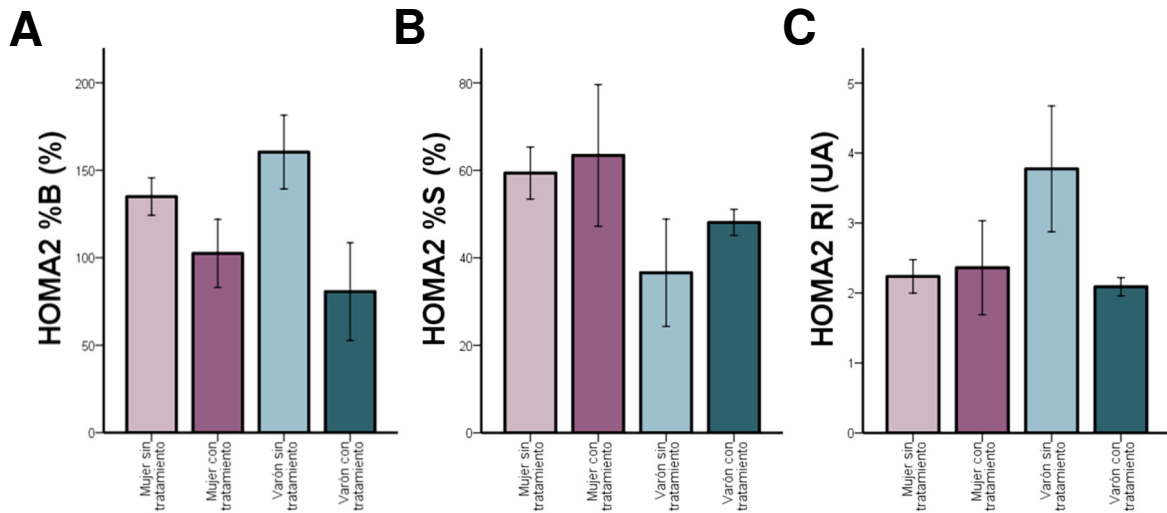
**Tabla 15.** Correlación entre concentración plasmática de ANGPTL8 con los índices HOMA2, mediante la determinación del coeficiente de correlación de Spearman. M: Mujer. V: Varón.

Respecto a los índices HOMA2, también analizamos si existían diferencias relacionadas con la influencia de la medicación antihiper glucemiante, tanto en los controles como en los obesos, y para ambos sexos (tabla 16).

Sexo	Tratamiento hipoglucemiante	N	HOMA2 %B (%)	HOMA2 %S (%)	HOMA2 RI (UA)
Mujer	No	41	134,96 ± 10,69	59,39 ± 5,95	2,24 ± 0,24
	Sí	7	102,50 ± 19,50	63,43 ± 16,19	2,36 ± 0,67
Varón	No	13	160,40 ± 21,11	36,60 ± 12,26	3,77 ± 0,90
	Sí	2	80,65 ± 27,95	48,10 ± 3,00	2,09 ± 0,13

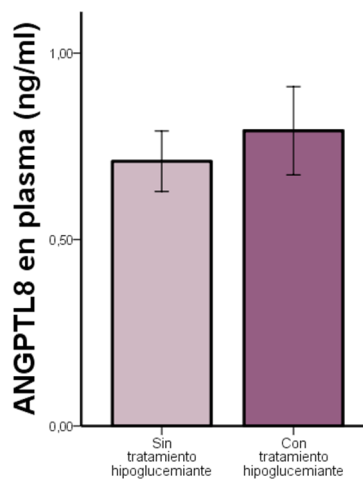
**Tabla 16.** Influencia del tratamiento hipoglucemiante en los índices HOMA2 utilizados para valorar el perfil glucémico de los pacientes incluidos en el estudio: HOMA2 %B (%), HOMA2 %S (%) y HOMA2 RI (UA). Los valores están expresados como la media ± EEM.

En las mujeres obesas, el índice HOMA2 %B descendió en las pacientes que estaban en tratamiento antihiperoglucemiante (102,50 ± 19,50 %) en comparación con las que no estaban en tratamiento (134,96 ± 10,69 %). El resto de índices no se vieron alterados en relación con el tratamiento. En los varones obesos, se observó un descenso del índice HOMA2 %B en los pacientes con tratamiento (80,65 ± 27,95 %) en comparación con los varones obesos sin tratamiento (160,40 ± 21,11 %). También se observó un incremento del índice HOMA2 %S en los pacientes varones obesos que estaban en tratamiento (48,10 ± 3,00 %) en relación con el de los individuos sin tratamiento (36,60 ± 12,26 %). El índice HOMA2 RI descendió en el grupo de varones obesos en tratamiento hipoglucemiante (2,09 ± 0,13 UA) si lo comparamos con los obesos sin tratamiento (3,77 ± 0,90 UA). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (figura 57).



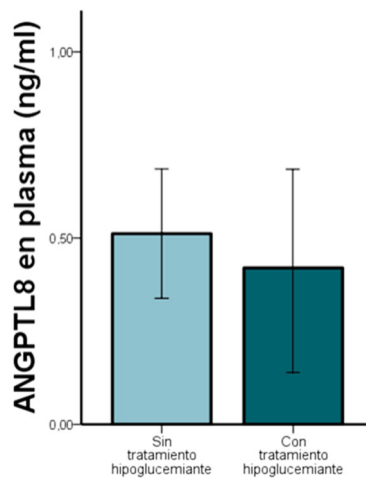
**Figura 57.** Índices HOMA2 de los pacientes incluidos en el estudio, teniendo en cuenta si estaban en tratamiento antihiper glucemiante. **A.** HOMA2-%B (%). **B.** HOMA2-%S (%). **C.** HOMA2-RI (UA). Los valores indican la media, y la barra de error se corresponde con el EEM.

Igualmente, se ha evaluado si la administración de hipoglucemiantes orales podría dar lugar a variaciones en las concentraciones plasmáticas de ANGPTL8 en los pacientes del estudio. Las mujeres obesas que recibían tratamiento presentaron unos valores plasmáticos de ANGPTL8 ( $0,79 \pm 0,12$  ng/ml) ligeramente superiores a las obesas sin tratamiento ( $0,71 \pm 0,08$  ng/ml), aunque sin observar significación estadística (figura 58).



**Figura 58.** Concentración plasmática de ANGPTL8 (ng/ml) en mujeres obesas, teniendo en cuenta si estaban en tratamiento con hipoglucemiante. Los valores indican la media, y la barra de error se corresponde con el EEM.

En relación con los varones obesos, se pudo apreciar un descenso en los niveles plasmáticos de ANGPTL8 relacionado con el tratamiento con hipoglucemiantes orales ( $0,42 \pm 0,21$  ng/ml) en comparación con los individuos sin este tipo de tratamientos ( $0,51 \pm 0,17$  ng/ml) (figura 59).



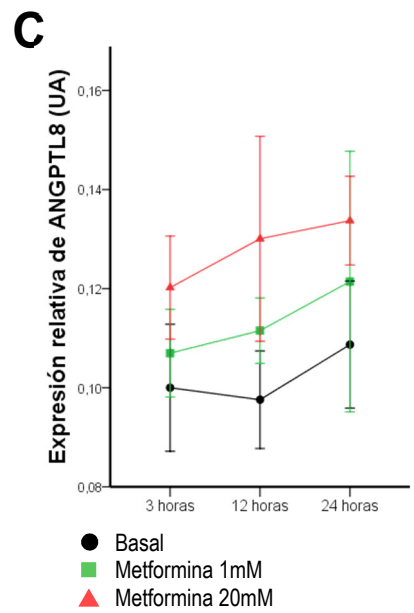
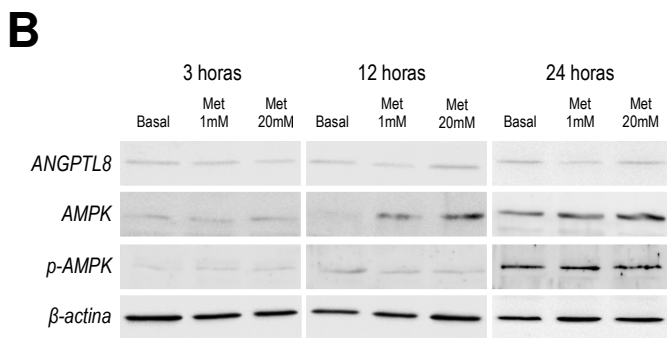
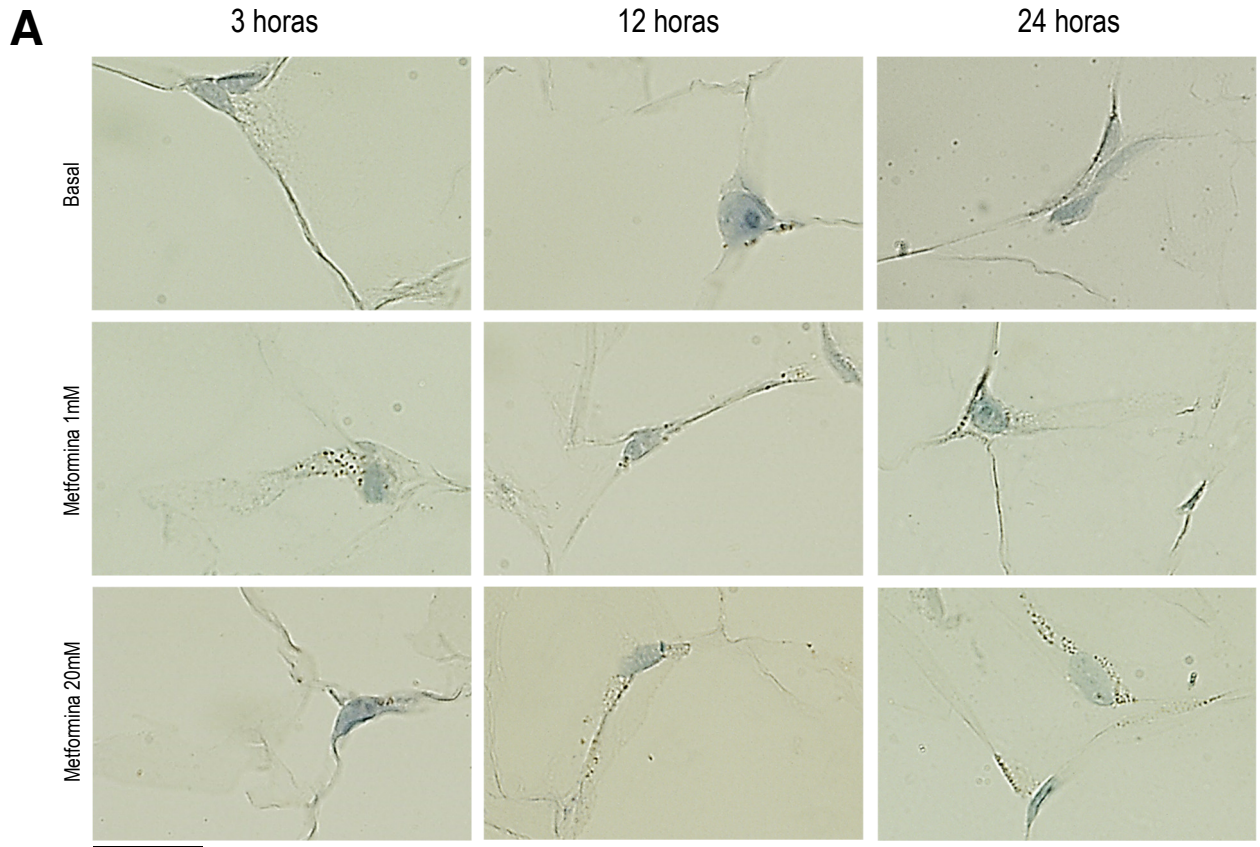
**Figura 59.** Concentración plasmática de ANGPTL8 (ng/ml) en varones obesos, teniendo en cuenta si estaban en tratamiento con hipoglucemiantes. Los valores indican la media, y la barra de error se corresponde con el EEM.

Valoramos in vitro la influencia de metformina sobre la expresión de ANGPTL8 en explantes de tejido adiposo blanco procedentes de mujeres obesas, como se muestra a continuación.

Tras las diferentes incubaciones con metformina, mediante inmunohistoquímica y Western blot, se observó que el aumento de la dosis de este fármaco se acompañó de un incremento de la expresión relativa de ANGPTL8 en los explantes de tejido adiposo.

La inmunorreacción se presentó en forma de pequeñas vesículas en todos los intervalos de incubación, y con las diferentes concentraciones de metformina (figura 60A). La expresión relativa de ANGPTL8 aumentó de manera dosis-dependiente, y en los distintos tiempos de incubación, siendo mayor a las 24 horas y con concentraciones de metformina 20mM (figura 60B-C). Este hecho se repitió a la hora de valorar la expresión relativa a AMPK, así como también su fracción fosforilada, p-AMPK (figura 60B).





**Figura 60.** Modificaciones en la expresión de ANGPTL8, AMPK y p-AMPK en explantes de tejido adiposo humano de mujeres obesas, tras incubaciones con metformina en el medio de cultivo, a diferentes dosis (1mM y 20mM) y en diferentes intervalos de tiempo de incubación (3, 12 y 24 horas). **A:** Inmunohistoquímica para detectar la presencia de ANGPTL8, en función de la dosis y el tiempo de incubación. Barra de escala: 20µm. **B:** Western blot para valorar expresión de ANGPTL8, AMPK y p-AMPK. Como control de carga se utilizó β-actina. **C:** Expresión relativa de ANGPTL8 obtenida del estudio densitométrico de las bandas del Western blot. Los resultados se corresponden con la media (UA) y las barras de error con el EEM.





# DISCUSIÓN



## 1. Consideraciones iniciales

Trabajar con muestras humanas ha supuesto siempre un reto para los investigadores, y sobre todo cuando se analizan muchos aspectos relacionados con el metabolismo energético. El estudio de las variables asociadas al perfil lipídico y glucídico puede verse afectado tanto por factores intrínsecos de los individuos, como también por su entorno, hecho que dificulta de manera sustancial la interpretación de los resultados obtenidos.

Los individuos que acuden a un hospital raramente presentan un estado de salud excepcional, sin ningún tipo de tratamiento y con un estilo de vida completamente controlado. En este punto surge la primera disyuntiva, definir las características que deben cumplir los pacientes para ser considerados controles. El hecho de obtener una muestra de tejido adiposo supone que el paciente debía ser sometido a una intervención quirúrgica, por lo que, de manera ética, es imposible obtenerla de un ser humano totalmente sano.

La finalidad de esta tesis consistía en valorar las posibles modificaciones de la proteína ANGPTL8 relacionadas con estadios de obesidad, ya sea a nivel plasmático como del tejido adiposo visceral puesto que por el momento no está del todo clara su función y sus alteraciones con respecto a patologías metabólicas. Para ello, la correcta clasificación de los pacientes es fundamental.

Como se explicó en apartados anteriores, se crearon dos grupos atendiendo al IMC. Con el fin de analizar la expresión de ANGPTL8 en tejido adiposo humano, así como también las modificaciones en su concentración plasmática en pacientes obesos, se estableció que los individuos que presentaran un IMC superior o igual a 30 kg/m<sup>2</sup> formarían parte del grupo obesidad, mientras que aquellos pacientes con un IMC inferior a 30 kg/m<sup>2</sup>

fuesen incluidos dentro del grupo control. Los individuos varones del grupo control presentaron un elevado IMC, indicando sobrepeso. Dentro del rango de obesidad, la media del IMC, tanto en mujeres como en varones, fue superior a 40,00 kg/m<sup>2</sup>, indicando que los pacientes de este grupo padecían obesidad mórbida.

Se registró el perímetro abdominal de los pacientes para, según la OMS, valorar el riesgo de padecer patologías asociadas a la obesidad. Los pacientes control no presentaron alto riesgo indicado por la acumulación de tejido adiposo a nivel abdominal, aunque en mujeres, la media del perímetro abdominal indicó que se encontraban en el límite indicado por la OMS. Sin embargo, los pacientes incluidos dentro del grupo obesidad presentaron un perímetro abdominal catalogado como de riesgo (WHO, 2008).

Pudimos comprobar, además, los efectos del aumento del almacenamiento lipídico de los pacientes obesos. Como se indicó anteriormente, el proceso de hipertrofia es uno de los mecanismos responsables del aumento del volumen del tejido adiposo. Tanto en mujeres como en varones se observó un aumento del tamaño de la vacuola lipídica de aproximadamente un 10% en relación con adipocitos de los grupos control. Existe evidencia de la relación entre el incremento del tamaño del adipocito del tejido adiposo visceral con un aumento del índice HOMA-RI. Estos procesos también podrían estar asociados con los indicadores de inflamación celular en pacientes obesos (Verboven et al., 2018).

A la hora de analizar las posibles variables que podrían estar influyendo en los resultados, se optó por valorar los tratamientos farmacológicos de los pacientes incluidos en el estudio. De esta manera, pudimos comprobar que el tratamiento con hipolipidemiantes en los grupos de obesos, tanto en mujeres como en varones, no fue habitual. Entre ellos, los fármacos más utilizados fueron estatinas, utilizados para reducir el

incremento en la concentración plasmática de LDL y TAG, evitando además la formación de placas de ateromas, disminuyendo así el riesgo de aparición de enfermedades cardiovasculares (Taylor et al., 2013).

En los pacientes obesos incluidos en el estudio, el tratamiento con fármacos hipolipemiantes no modificó sustancialmente las variables destinadas a la valoración del perfil lipídico.

El tratamiento hipoglucemiante también fue objeto de valoración en los pacientes obesos. Al igual que con los fármacos hipolipemiantes, pocos pacientes obesos estuvieron en tratamiento antihiperoglucemiante. Dentro de estos pacientes, tan solo una mujer y un varón del grupo obesidad necesitaban el aporte de insulina además de hipoglucemiantes orales. No se observaron diferencias significativas de las variables destinadas a la valoración del perfil glucídico de los pacientes obesos al tener en cuenta su tratamiento antihiperoglucemiante.

## 2. Concentración plasmática de ANGPTL8 en pacientes obesos

Existen discrepancias relacionadas con la determinación de los niveles plasmáticos de ANGPTL8 debido, sobre todo, a los métodos empleados para su medición. El más utilizado para ello ha sido la técnica de EIA y, a pesar de utilizar procedimientos similares para su detección, se han descrito diferencias relacionadas con el fragmento proteico a detectar.

Según la bibliografía consultada, se han utilizado dos tipos de kits para llevar a cabo el enzimoimmunoensayo. El primer grupo, y más habitual, es aquel que es capaz de detectar la longitud total de la proteína. Está dirigido a la localización del extremo N-terminal, pasando por alto la presencia de los fragmentos resultantes de la degradación de la proteína (SEW803Hu, Wuhan USCN Business®; SK00528-02, Aviscera Bioscience®; CSB-EL028107HU, Cusabio Biotech ®; E11644h, EIAab®). El otro grupo está dirigido a la detección del extremo C-terminal, localizando no solo la longitud total de la proteína, sino también los fragmentos que se producen tras su degradación (EK-051-55, Phoenix Pharmaceuticals®) (Fu, Abou-Samra et al., 2014).

Existe evidencia del papel de ANGPTL8 en la inhibición de LPL. Esta función la desempeña gracias a la presencia del epítipo SE1 presente en el extremo N-terminal (E. C. Lee et al., 2009). Teniendo esto en cuenta, la detección de este fragmento determinaría la proteína capaz de inhibir la LPL. Sin embargo, es posible que los fragmentos C-terminales resultantes de la degradación proteica desempeñen alguna función biológica de importancia (Fu, Abou-Samra et al., 2014).

El planteamiento de nuestro grupo fue detectar la totalidad de ANGPTL8 en plasma, considerando tanto la proteína completa como sus



fragmentos. Por este motivo, se utilizó un método de detección del extremo C-terminal mediante EIA con el kit descrito en el apartado de materiales y métodos (EK-051-55, Phoenix Pharmaceuticals®).

Los niveles plasmáticos obtenidos tras su medición se encontraban entre 0,28 y 1,90 ng/ml, parámetros dentro del rango lineal establecido por laboratorio fabricante del kit teniendo en cuenta que las muestras no fueron diluidas al medirlas. Ninguno de los resultados fue superior al límite superior indicado por el fabricante.

Al analizar la concentración plasmática en los individuos control de ambos sexos, no se descubrieron diferencias entre ellos. Esto podría estar indicando que ANGPTL8 a nivel plasmático no se ve influenciada por el ambiente hormonal, a diferencia de otras adipoquinas, tales como leptina o adiponectina, que presentan un claro dimorfismo sexual.

Surgieron discrepancias al comparar estos datos con los obtenidos por otros autores. En algunos casos, los valores de concentración plasmática de ANGPTL8 que obtuvimos para los grupos control se encontraron por debajo de los descritos en otros estudios que utilizaron el mismo kit de EIA para detectar el extremo C-terminal (C. C. Chen et al., 2016; Fu, Abou-Samra et al., 2014; Fu, Berhane et al., 2014). Otros grupos han descrito cifras similares a las obtenidas por nuestro equipo (Ebert et al., 2014; Y. H. Lee et al., 2016), e incluso en uno de los casos las cifras fueron menores (Abu-Farha, Sriraman et al., 2016). En la tabla 17 se pueden observar estos datos, en donde además figura la proporción de mujeres y varones, edad e IMC de los sujetos considerados como control, teniendo en cuenta que los individuos no tenían patologías metabólicas.

Artículo	Grupo control	Sexo (Mujeres / Varones)	Edad (años)	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Concentración plasmática de ANGPTL8 (ng/ml)
<i>EK-051-55, Phoenix Pharmaceuticals®</i>					
(Ebert et al., 2014)	N = 30	19 / 11	63(19)*	28,2(5,6)*	1,06(0,49)*
(Fu, Abou-Samra y Zhang, 2014)	-**	- / -**	-**	<25**	2,36 ± 0,25
(Fu, Berhane et al., 2014)	N = 15	9 / 6	46,1 ± 2,5	26,2 ± 1,2	2,19 ± 0,24
(Abu-Farha, Sriraman et al., 2016)	N = 82	- / -**	40,44 ± 1,31	24,66 ± 0,31	0,20 ± 0,01
(C. C. Chen et al., 2016)	N = 32	- / -**	50,8 ± 1,2	22,7 ± 0,9	2**
(Y. H. Lee et al., 2016)	N = 38	20 / 18	56,3 ± 1,69	23,4 ± 0,53	0,9 ± 0,09
<b>Nuestros resultados</b>	<b>N = 11</b>	<b>4 / 7</b>	<b>59,31 ± 5,90</b>	<b>24,39 ± 1,67</b>	<b>0,81 ± 0,09</b>

**Tabla 17.** Comparación de los pacientes considerados control (no obesos y no diabéticos) de los artículos que analizaron las concentraciones plasmáticas de ANGPTL8 mediante EIA utilizando el kit EK-051-55 de Phoenix Pharmaceuticals®. Los resultados están expuestos como media ± EEM.

\* Los datos están expuestos como mediana (rango intercuartílico).

\*\* Los datos no se especifican en el artículo.

El desacuerdo continúa al establecer los valores de concentración plasmática de ANGPTL8 considerados controles al utilizar el resto kits de EIA que determinan la longitud total de proteína a través de la localización del extremo N-terminal. Por este motivo, consideramos interesante mostrar los resultados de los diferentes estudios que poseen un grupo control de estas características en la tabla 18 y 19.

Sin embargo, es posible que no existan diferencias directas entre los dos tipos de kits de EIA utilizados por los diferentes grupos de investigación. Un metaanálisis realizado en 2016 analizó 9 de estos artículos, llegando a la conclusión que las diferencias observadas entre los kits podrían estar relacionadas principalmente con las características de las muestras analizadas, influyendo otros factores propios de los individuos estudiados por encima de los anticuerpos utilizados para la localización de ANGPTL8 (S. Li et al., 2016).

Artículo	Grupo control	Sexo (Mujeres / Varones)	Edad (años)	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Concentración plasmática de ANGPTL8 (ng/ml)
<i>SEW803Hu, Wuhan USCN Business®</i>					
(Liu et al., 2016)	N = 36	18 / 18	50,68 ± 2,34	23,01 ± 0,57	0,77 ± 0,07
<i>SK00528-02, Aviscera Bioscience®</i>					
(Arias-Loste et al., 2015)	N = 15	1 / 14	55(30-74)*	**	3,5(3-5,1)*
(Ghasemi et al., 2015)	N = 35	19 / 16	59,8 ± 1,36	27,7 ± 0,32	2,79 ± 0,19
(Guo et al., 2015)	N = 17	8 / 9	46,4 ± 2,00	22,35 ± 0,36	21,01 ± 4,48
<i>CSB-EL028107HU, Cusabio Biotech®</i>					
(Gomez-Ambrosi et al., 2014)	N = 33	19 / 14	46,9 ± 1,91	23,6 ± 0,21	45,1 ± 4,25
(Barja-Fernandez et al., 2015)	N = 50	50 / 0	28,9 ± 0,88	21,6 ± 0,21	17,3
(Calan et al., 2016; Gruzdeva et al., 2017)	N = 164	164 / 0	26,82 ± 0,26	26,84 ± 0,29	0,29 ± 0,05

**Tabla 18.** Comparación de los pacientes considerados control (no obesos y no diabéticos) de los artículos que analizaron las concentraciones plasmáticas de ANGPTL8 mediante EIA utilizando los kits SEW803Hu, Wuhan USCN Business®; SK00528-02, Aviscera Bioscience® y CSB-EL028107HU, Cusabio Biotech®. Los resultados están expuestos como media ± EEM.

\* Los datos están expuestos como mediana (rango intercuartílico).

\*\* Los datos no se especifican en el artículo.

Por tanto, al observar los valores plasmáticos obtenidos con los kits destinados a localizar el extremo N-terminal de ANGPTL8, pudimos apreciar que nuestros resultados fueron muy similares a los obtenidos por el resto de estudios, salvo en algunos casos en los que las concentraciones plasmáticas determinadas fueron mucho mayores que las obtenidas en nuestro laboratorio.

Al analizar los niveles plasmáticos de ANGPTL8 en los pacientes obesos no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, dentro de este grupo, las mujeres presentaron una concentración plasmática de esta proteína mayor que en varones, sin que esta diferencia fuera estadísticamente significativa.

Artículo	Grupo control	Sexo (Mujeres / Varones)	Edad (años)	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Concentración plasmática de ANGPTL8 (ng/ml)
<i>E11644h, EIAab®</i>					
(Espes, Lau y Carlsson, 2014)	N = 24	14 / 10	25,0 ± 0,8	23,1 ± 0,51	0,3**
(Espes, Martinell y Carlsson, 2014)	N = 18	9 / 9	65,4 ± 1,6	29,0 ± 1,3	0,64 ± 0,06
(Fenzl et al., 2014)	N = 20	13 / 7	45,5 ± 2,4	24,6 ± 0,6	1,20 ± 0,12
(Fu, Abou-Samra et al., 2014)	-**	- / -**	-**	<25**	0,55 ± 0,03
(Hu et al., 2014)	N = 83	29 / 54	47,96 ± 1,10	25,25 ± 0,40	0,30(0,20-0,51)*
(Abu-Farha et al., 2015)	N = 1047	450 / 597	42,50 ± 3,18	29,31 ± 0,19	0,73(0,06-10,62)*
(X. Chen et al., 2015)	N = 137	75 / 62	60,2 ± 0,7	23,0 ± 0,2	0,70 ± 0,03
(Gao et al., 2015)	N = 50	- / -**	52,44 ± 0,83	24,48 ± 0,28	0,3**
(Gokulakrishnan et al., 2015)	N = 50	22 / 28	21,0 ± 0,6	22,1 ± 0,9	1,10**
(Trebotic et al., 2015)	N = 10	10 / 0	32,40 ± 1,68	21,78 ± 0,63	0,42 ± 0,12
(Xie et al., 2015)	N = 50	29 / 21	Mujeres: 55(49,5-58)* Varones: 53(46,5-57,5)*	Mujeres: 23,81 ± 0,40 Varones: 25,33 ± 0,29	Mujeres: 0,24(0,07-0,32)* Varones: 0,30(0,15-0,44)*
(Yamada et al., 2015)	N = 12	5 / 7	55,6 ± 1,33	22,7 ± 0,87	0,3 ± 0,07
(M. Yi et al., 2015)	N = 89	58 / 31	39,43 ± 1,28	26,80 ± 0,45	0,40(0,17-0,53)*
(Abu-Farha, Abubaker et al., 2016)	N = 724	- / -**	41,1 ± 3,25	27,6 ± 1,63	0,71(0,06-11,6)*
(Abu-Farha, Al-Khairi et al., 2016)	N = 144	- / -**	41,76 ± 0,98	29,06 ± 0,49	0,94 ± 0,01
(Abu-Farha, Sriraman et al., 2016)	N = 82	- / -**	40,44 ± 1,31	24,66 ± 0,31	0,77 ± 0,05
(C. C. Chen et al., 2016)	N = 32	- / -**	50,8 ± 1,2	22,7 ± 0,9	0,6**
(Huang et al., 2016)	N = 31	31 / 0	30,8 ± 1,38	21,0 ± 0,57	0,28(0,18-0,30)*
(Maurer et al., 2016)	N = 12	6 / 6	45,5 ± 2,05	22,9 ± 0,49	0,76 ± 0,06
(H. Wang et al., 2016)	N = 125	77 / 48	Mujeres: 51,6 ± 0,68 Varones: 51,1 ± 1,14	Mujeres: 23,1 ± 0,28 Varones: 23,4 ± 0,37	Mujeres: 25,46(17,96-32,17)* Varones: 22,9+3(14,46-30,23)*
(H. Wang et al., 2016; L. Wang et al., 2016)	N = 20	10 / 10	54,4 ± 2,9	26,0 ± 0,5	0,29 ± 0,04
(Wu et al., 2016)	N = 27	13 / 14	10,3 ± 0,33	16,87 ± 0,34	0,27 ± 0,03
(Ejarque et al., 2017; H. Wang et al., 2016)	N = 20	7 / 13	49,5(12,1)*	22,2(2,5)*	0,89 ± 0,12

**Tabla 19.** Comparación de los pacientes considerados control (no obesos y no diabéticos) de los artículos que analizaron las concentraciones plasmáticas de ANGPTL8 mediante EIA utilizando el kit E11644h, EIAab®. Los resultados están expuestos como media ± EEM.

\* Los datos están expuestos como mediana (rango intercuartílico).

\*\* Los datos no se especifican en el artículo.

Solamente pudimos encontrar un artículo que comparó los niveles plasmáticos entre obesos y pacientes normopeso midiendo la concentración plasmática de ANGPTL8 mediante el uso del kit de EIA suministrado por Phoenix Pharmaceuticals®. En este caso, los pacientes obesos presentaron unos niveles plasmáticos de ANGPTL8 mayores que los no obesos, y, después de entrenamiento físico, estas cifras descendieron. Estos datos fueron reforzados con la utilización de otro kit de EIA destinado a identificar el extremo N-terminal (Abu-Farha, Sriraman et al., 2016). En relación con este trabajo, cabe mencionar que las concentraciones descritas son las más bajas en comparación con el resto de estudios.

Varios artículos en los que determinó concentración plasmática de ANGPTL8 en individuos con características similares a los de nuestro estudio, han descrito que los niveles de esta proteína resultan inferiores en pacientes obesos (Barja-Fernandez et al., 2015; Ejarque et al., 2017; Fenzl et al., 2014; Gomez-Ambrosi et al., 2014; Maurer et al., 2016; H. Wang et al., 2016). El seguimiento de pacientes obesos intervenidos quirúrgicamente como tratamiento (banda gástrica o bypass gástrico) demostró que los niveles plasmáticos de ANGPTL8 se incrementaron significativamente en comparación con los del momento de la intervención (Pascual-Corrales et al., 2016).

Dos de los estudios mostraron valores muy similares a los obtenidos en nuestro laboratorio a pesar de haber realizado la medición con el kit suministrado por EIAab®. Maurer y colaboradores describieron que los individuos obesos presentaron una concentración plasmática de ANGPTL8 inferior a los considerados controles, observándose un 20% menos de esta proteína en plasma en estos pacientes en comparación con el grupo control, realizadas las mediciones en ayunas, valores que tendieron a aumentar después de instaurarse modificaciones en su estilo

de vida destinadas a la pérdida de peso (Maurer et al., 2016). El estudio más reciente que relaciona niveles plasmáticos de ANGPTL8 en este tipo de pacientes fue llevado a cabo por Ejarque y colaboradores. En él, se describió que los pacientes obesos presentaron una menor concentración plasmática de esta proteína en comparación con pacientes normopeso. Además, se analizó a un tercer grupo formado por diabéticos tipo 2 obesos que presentaron unas cifras incluso menores que los obesos no diabéticos (Ejarque et al., 2017).

Sin embargo, algunos artículos determinaron que la obesidad está asociada a un aumento de la concentración plasmática de ANGPTL8, indicando incluso que esta cifra es mayor en pacientes con sobrepeso (Guo et al., 2015). De hecho, en procedimientos de actuación sobre pacientes obesos mediante intervención quirúrgica como el bypass gástrico (Guo et al., 2016), o con modificaciones de la dieta (von Loeffelholz et al., 2017), los niveles plasmáticos disminuyeron significativamente tras la pérdida de peso. En estos trabajos describen concentraciones plasmáticas de ANGPTL8 más de veinte veces superiores a las obtenidas en nuestro laboratorio y a las descritas por la mayoría de estudios (Guo et al., 2015; Guo et al., 2016), o por el contrario concentraciones inferiores a 0,30ng/ml (von Loeffelholz et al., 2017).

### 3. Expresión de ANGPTL8 en tejido adiposo humano

La principal función descrita para ANGPTL8 es la inhibición de LPL, a nivel de las células musculares periféricas, formando parte de un modelo más complejo que incluye a otros dos miembros de ANGPTL, la 3 y 4. El equilibrio entre la actividad de cada una de ellas en estados de ayuno como de ingesta determina un adecuado metabolismo de TAG, tanto a nivel del tejido adiposo visceral, como del muscular. Este modelo propone que, cuando el individuo se encuentra en ayuno, ANGPTL4 inhibe la LPL del tejido adiposo, impidiendo el almacenamiento lipídico, mientras que a nivel muscular se produce la hidrólisis de TAG con la finalidad de obtener una fuente de energía. Tras el aporte de alimentos, ANGPTL3 y 8 actuarían en el tejido muscular para inhibir LPL impidiendo el metabolismo lipídico a este nivel, mientras que en el tejido adiposo la enzima mantiene su actividad para favorecer el almacenamiento energético en los adipocitos del tejido (R. Zhang, 2016).

Sin embargo, las limitaciones de este modelo son claras. Uno de los puntos a tener en cuenta es la nula referencia al papel que desempeña ANGPTL8 en el propio tejido adiposo visceral. Existe evidencia de la existencia de ARNm de esta proteína a nivel de este tejido, más allá del aporte hepático mediante la circulación sistémica (Quagliarini et al., 2012). Este hecho sugiere que ANGPTL8 desempeña alguna función, ya sea de manera paracrina y/o autocrina en el propio tejido.

Después de realizar estudios inmunohistoquímicos, observamos reactividad a ANGPTL8 en el tejido adiposo de los pacientes incluidos dentro del estudio siguiendo un patrón granular, como había sido descrito anteriormente, en forma de pequeñas vesículas en el citoplasma del

adipocito (Tseng et al., 2014). Debido a la estructura y distribución de estas células en el tejido, la mayor densidad de dichos gránulos se apreciaba alrededor del núcleo, aunque también fue posible observarlos distribuidos por todo el citoplasma.

Con relación a los grupos control, no observamos diferencias entre mujeres y varones en la expresión de ANGPTL8 en tejido adiposo fresco. Al comparar estos valores con los grupos obesos, la expresión relativa de ANGPTL8, dada por el estudio densitométrico de los experimentos de Western blot, fue menor en los pacientes controles, en ambos sexos, aunque la diferencia fue estadísticamente significativa entre varones.

En las células endoteliales del tejido no se observó reacción inmunohistoquímica a ANGPTL8 y en la literatura no se ha mostrado claramente su presencia en estas células, así como tampoco del mensajero que la codifica. En estudios iniciales de otros miembros de la familia de las ANGPTL se observó su mensajero en regiones como la aorta mediante hibridación in situ. La existencia además de cierta analogía estructural con los receptores tirosín quinasa 2 de las células endoteliales con los miembros de ANGPTL, podría hacer pensar que estas proteínas podrían desencadenar la activación de vías intracelulares tras la activación de dichos receptores (Kim et al., 1999). Sin embargo, no existen evidencias certeras que permitan considerar estos hechos.

Debido a que las diferencias entre pacientes obesos y no obesos ya habían sido descritas con anterioridad por otros autores, decidimos utilizar la técnica de hibridación in-situ para valorar si los adipocitos eran los únicos elementos del tejido adiposo visceral productores de ANGPTL8. Debemos destacar que este trabajo es el primero en analizar la expresión del ARNm de ANGPTL8 mediante la técnica de hibridación in-situ en tejido adiposo visceral humano. En este sentido, el método utilizado por la



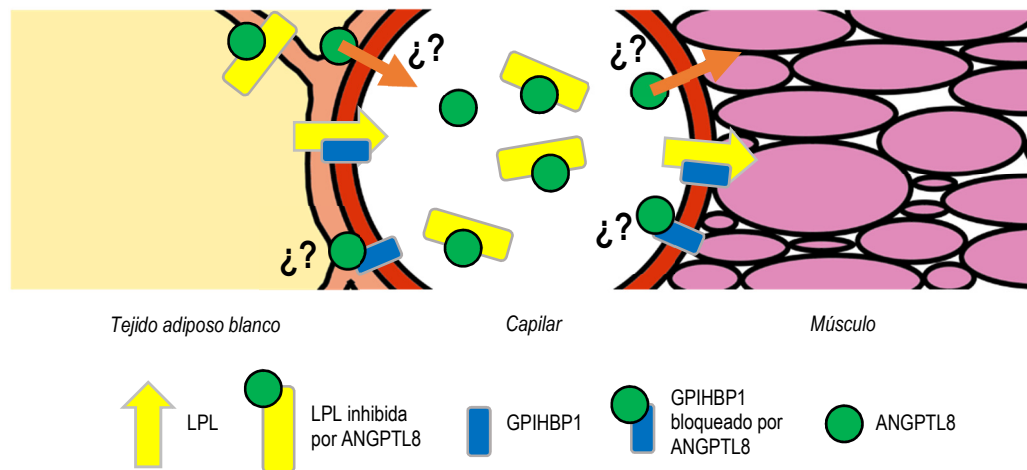
mayoría de grupos que valoraron la expresión de este mensajero es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (RT-PCR).

Existen diferencias entre hibridación in-situ y RT-PCR, si bien ambas técnicas están destinadas a la detección de un ARNm específico. La ventaja de la RT-PCR sobre la hibridación in-situ es que la primera es mucho más precisa a la hora de cuantificar la expresión del mensajero. Los resultados de la cuantificación de la hibridación in-situ son indirectos debido a que el grado de expresión se determina mediante la medición del área considerada reactiva y del grado de intensidad dado por una escala de grises.

Sin embargo, a la hora de trabajar con tejido fresco, en este caso tejido adiposo visceral obtenido tras cirugía laparoscópica, es importante tener en cuenta que el tejido no solo está formado por adipocitos, sino que también por tejido conectivo y endotelial. Por ello, las determinaciones de la expresión génica mediante PCR no diferencia el lugar de síntesis, mientras que mediante hibridación in-situ es posible la observación directa de la estructura productora del ARNm específico.

Gracias a esto pudimos determinar que las células endoteliales del tejido adiposo no presentan ARNm que codifica ANGPTL8 indicando que no se produce la proteína en esta región, a diferencia de los adipocitos, en los que la inmunorreactividad indica su presencia. Teniendo en cuenta esto, podríamos pensar que el efecto sobre LPL podría ser, por un lado, en el torrente sanguíneo inhibiendo su función biológica, pero además podría estar inhibiéndola a nivel de los adipocitos, o incluso actuando sobre su transportador. Existe evidencia de la interacción de ANGPTL4 con la proteína de unión a lipoproteína de alta densidad anclada a glicosilfosfatidilinositol tipo 1 (GPIHBP1, "*glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1*") relacionada con el

transporte de LPL a través de las células endoteliales (Chi et al., 2015), por lo que ANGPTL8 también podría estar actuando a este nivel, hecho que todavía no ha sido corroborado. Por otra parte, tampoco se conoce si existe algún mecanismo por el cual ANGPTL8 sea capaz de traspasar las células endoteliales, para así llegar al torrente sanguíneo, o si, por el contrario, podría ser transportada desde la luz del vaso hasta los tejidos irrigados por éste (figura 61).



**Figura 61.** Actuación de ANGPTL8 a nivel vascular y del tejido adiposo blanco, en relación con la inhibición de LPL. El transportador de LPL a través de las células endoteliales, GPIHBP1, podría verse afectado por la presencia de ANGPTL8, bloqueando su acción. Tampoco se podría descartar la existencia de algún mecanismo capaz de transportar ANGPTL8 dentro del vaso o hacia los tejidos circundantes.

Cuando analizamos la expresión del ARNm que codifica esta proteína mediante hibridación in-situ, no observamos diferencias entre mujeres y varones del grupo control. Al comparar estos valores con el grupo obesidad, las mujeres obesas presentaron una mayor expresión del mensajero en relación con las del grupo control. Esta situación fue inversa al estudiar los grupos de varones, pues la expresión del mensajero fue menor en los pacientes obesos. A pesar de estos resultados, la expresión relativa de ANGPTL8 en el tejido adiposo de los varones obesos fue superior a la observada en los pacientes control.

Esta diferencia relacionada con el sexo de los pacientes podría deberse a las diferencias del ambiente hormonal de los individuos a nivel sistémico, así como también de las modificaciones de la producción local de estrógenos. Existe evidencia de los cambios de la expresión de aromatasa, enzima encargada de la obtención de estrógenos a partir de andrógenos, en el propio tejido adiposo con relación al sexo (Jones et al., 2001).

La gran mayoría de estudios relacionados con ANGPTL8 se centraron en los niveles plasmáticos, determinando diferencias entre grupos relacionados con obesidad y diabetes. Pocos estudios se orientaron a la producción a nivel hepático y del tejido adiposo, tanto en modelos murinos (Jiao et al., 2014; E. Li et al., 2016; Ren et al., 2012; R. Zhang, 2012; Y. Zhang et al., 2016) como en humanos (Abu-Farha, Al-Khairi, et al., 2016; Abu-Farha et al., 2018; Ejarque et al., 2017; Franck et al., 2011; Mysore, Ortega, et al., 2017; Nidhina Haridas et al., 2015; von Loeffelholz et al., 2017) o incluso en líneas celulares (Maurer et al., 2016; Y. Zhang et al., 2016).

En ratones macho, se ha descrito que el uso de dietas ricas en grasas e hidratos de carbono mantenidos en el tiempo promueve el aumento de la expresión del ARNm de *angptl8* en tejido adiposo blanco (E. Li et al., 2016; Ren et al., 2012; R. Zhang, 2012).

Asimismo, los estudios realizados con tejido adiposo humano mostraron algunas discrepancias. En uno de ellos no se observaron diferencias entre la expresión del mensajero de ANGPTL8 entre mujeres obesas antes y después de la cirugía bariátrica, aunque la calidad de vida y su situación endocrinológica inicial mejoró tras la intervención (Mysore, Ortega, et al., 2017). Sin embargo, otros dos estudios determinaron que, tanto la elevada ingesta calórica (Franck et al., 2011), como la situación de

obesidad establecida (Ejarque et al., 2017), se relacionan con aumento de la expresión del ARNm que codifica ANGPTL8 en tejido adiposo humano, al igual que lo observado en modelos animales. En estos casos no se especificó si existían diferencias entre mujeres y varones.

El aumento de expresión del mensajero de ANGPTL8 en mujeres obesas observado en nuestro estudio coincide con otros autores. Sin embargo, en nuestro caso, los varones obesos presentaron un descenso en la producción de esta proteína. Es difícil corroborar estos datos con los de otros grupos, pues en la mayoría de los casos no se clasificaban los pacientes en relación con su sexo, o la muestra estaba formada sólo por mujeres.

La importancia de estos resultados radica en que es la primera evidencia de la posible influencia de los estrógenos sobre la producción de ANGPTL8 en los adipocitos del tejido adiposo visceral de individuos obesos.

## 4. Implicación de ANGPTL8 en el control del perfil lipídico

Al analizar el perfil lipídico de los pacientes pudimos observar que el grupo de obesos, tanto mujeres como varones, presentó desajustes asociados a su patología metabólica, siendo los pacientes varones obesos los que peor controlaban su perfil lipídico, independientemente de si estaban o no en tratamiento hipolipemiante.

El parámetro que se vio alterado con mayor frecuencia fue la concentración plasmática de leptina. Esta variable es una de las más utilizadas a nivel clínico para la vigilancia de este tipo de patologías. En relación con la leptina, se observó una mayor concentración plasmática en mujeres que en varones, en ambos grupos de clasificación, datos que concuerdan con estudios previos (Havel, Kasim-Karakas, Dubuc, Mueller y Phinney, 1996).

Nuestros hallazgos confirman que existe una correlación positiva entre HDL y ANGPTL8 en los varones. En relación con el resto de variables, la concentración plasmática de ANGPTL8 tendía a descender a medida que se deterioraba el perfil lipídico de los varones (aumento de TAG, LDL y leptina), apoyado por un descenso en los niveles plasmáticos de ANGPTL8 en los pacientes varones obesos. Sin embargo, debería aumentarse el tamaño muestral para corroborar esta tendencia. En mujeres, no se observó ninguna correlación significativa entre ANGPTL8 y el resto de variables utilizadas para el control del perfil lipídico.

El estudio de correlación entre ANGPTL8 y las diferentes variables analíticas es común entre los artículos relacionados con esta proteína. En algunos casos, no se observó relación significativa entre estos datos. Sin embargo, hay que subrayar que el diseño inicial de dichos estudios

tampoco pretendía evaluar en los grupos de individuos seleccionados las modificaciones de ANGPTL8 asociado a obesidad, pues comparaban datos entre pacientes no obesos, sin abarcar un amplio rango de IMC, o sin presentar grandes modificaciones del perfil lipídico. Generalmente, en estas publicaciones, los grupos de estudio estaban formados por individuos diabéticos (Al-Rawashdeh et al., 2017; Espes, Lau, et al., 2014; Espes, Martinell, et al., 2014; Gokulakrishnan et al., 2015; Hu et al., 2014; Tokumoto et al., 2015; L. Wang et al., 2016; Xie et al., 2015), o incluso, gestantes con el fin de evaluar la presencia de diabetes gestacional (Zielinska et al., 2016).

Otros artículos destinados a estudiar las posibles variaciones y relaciones de ANGPTL8 con las variables involucradas en el control del perfil lipídico en obesidad, tampoco observaron correlaciones (Fu, Berhane, et al., 2014; Guo et al., 2015; Guo et al., 2016; Maurer et al., 2016; Wu et al., 2016). Es preciso reseñar que ninguno de estos artículos estudió la posible variación de leptina en los individuos obesos, uno de los principales indicadores utilizado en la valoración clínica de obesidad.

En la bibliografía revisada, muchos autores han descrito correlaciones entre estos parámetros. No se pudo realizar una comparación directa con nuestros resultados debido a que, en gran parte de ellos, no valoraron los niveles plasmáticos de ANGPTL8 en obesidad, sino que se orientaron hacia pacientes diabéticos (Abu-Farha et al., 2015; X. Chen et al., 2015; Ebert et al., 2014; Gao et al., 2015; Ghasemi et al., 2015; Liu et al., 2016; H. Wang et al., 2016; Yamada et al., 2015; M. Yi et al., 2015), gestantes (Ebert et al., 2015; Huang et al., 2016; Trebotic et al., 2015; Wawrusiewicz-Kurylonek et al., 2015), o utilizaron otros criterios diferentes a los utilizados en nuestro trabajo para establecer los grupos (Calan et al., 2016; C. C. Chen et al., 2016; Chung et al., 2016; Gomez-Ambrosi et al.,

2016; Y. H. Lee et al., 2016; von Loeffelholz et al., 2017; Yamada et al., 2018).

La conclusión expresada en todos estos trabajos fue que incrementos en los niveles séricos de TAG, acompañados de un descenso de HDL, están asociados con un aumento de la concentración plasmática de ANGPTL8. Algunos de los artículos que apoyan esta propuesta, además, observaron que el IMC guarda cierta correlación positiva con dicha proteína (Calan et al., 2016; Chung et al., 2016; Y. H. Lee et al., 2016; von Loeffelholz et al., 2017). Solamente un artículo se alejaba de esta idea, sugiriendo que ANGPTL8 se correlaciona de manera positiva con HDL, y negativa con TAG (Gomez-Ambrosi et al., 2016). Cabe destacar que el grupo analizado fue de pacientes obesos con y sin dislipidemia, por lo que no corroboró dichos resultados en pacientes normopeso o con sobrepeso.

En pocos artículos aparecen correlaciones entre ANGPTL8 plasmática con las variables analíticas del control del perfil lipídico en individuos obesos y no obesos. Uno de ellos, a pesar de observar un descenso de niveles plasmáticos de ANGPTL8 en los pacientes obesos, describió una correlación positiva entre esta proteína con los valores de colesterol total y LDL, ambas variables aumentadas en los pacientes obesos (Fenzl et al., 2014).

Otros autores han descrito descensos de la concentración plasmática de ANGPTL8 en obesos, así como existencia de una correlación positiva con HDL, y negativa respecto a los niveles séricos de TAG (Ejarque et al., 2017; Gomez-Ambrosi et al., 2014). Dos de estos estudios, además de coincidir con los artículos anteriores, demostraron un incremento de leptina, relacionándolo con el descenso de ANGPTL8 plasmática (Barja-Fernandez et al., 2015; Pascual-Corrales et al., 2016).

En adipocitos murinos 3T3-L1, el cultivo durante 12 horas con la proteína recombinante de ANGPTL8 dio lugar a descenso de la actividad lipolítica, siendo la única evidencia de análisis directo del efecto de ANGPTL8 sobre la liberación de glicerol (Y. Zhang et al., 2016). Por otro lado, la delección de los genes que codificaban *angptl8* en la misma línea celular produjo un incremento de la lipólisis, siendo mayor cuando se utilizaba isoprenalina como fármaco potenciador de la liberación de glicerol (Mysore, Liebisch, Zhou, Olkkonen y Nidhina Haridas, 2017).

Para analizar la liberación de glicerol en nuestro estudio, aislamos los adipocitos del tejido graso visceral de los pacientes incluidos en el estudio, siempre que la cantidad de tejido fuera suficiente para el experimento, incubándolos con la proteína recombinante de ANGPTL8 para el estudio de la liberación de glicerol. Además, se comparó su efecto con fármacos ampliamente estudiados que modifican la actividad lipolítica, como isoprenalina e insulina.

En todos los grupos estudiados, tanto mujeres y varones, así como controles y obesos, existió una tendencia al descenso del glicerol liberado tras la incubación de los adipocitos en presencia de ANGPTL8 durante 90 minutos, sin ser estas diferencias estadísticamente significativas. Probablemente, manteniendo el efecto de esta proteína más allá del tiempo de incubación utilizado, esta disparidad podría ser más evidente al igual que en los estudios realizados con cultivos celulares murinos. Sin embargo, a partir de los 90 minutos la acumulación de glicerol en el medio tiende a mantenerse estable en este tipo de experimentos con adipocitos aislados (Carpene, 2001).

Al combinar ANGPTL8 con isoprenalina durante la incubación de los adipocitos, el descenso del glicerol liberado fue similar al observado en los valores basales. En todos los casos, al incubar los adipocitos con



insulina y ANGPTL8, la liberación de glicerol fue mayor que tras la incubación sólo con insulina. Esta diferencia fue más marcada en varones que en mujeres, siendo mayor que los valores basales. Debemos considerar que el efecto de insulina, como inhibidora de la lipólisis, fue mínimo incluso en los grupos controles a pesar de no tener antecedentes de resistencia insulínica dados por el análisis de las variables analíticas y por el cálculo de los índices HOMA2.

Pero lo realmente llamativo es que, el efecto de ANGPTL8 como inhibidora de la lipólisis, fuese contrario al incubar las células adiposas junto con insulina. Una posible explicación podría ser que el efecto de ANGPTL8 sobre la lipólisis esté relacionado con su concentración final en estos casos. Está descrito que el tratamiento con insulina en cultivos celulares murinos de adipocitos produce un aumento de la expresión del mensajero de *angptl8* (Ren et al., 2012). Considerando estos hallazgos, así como nuestras propias observaciones, el efecto de insulina sobre los adipocitos aislados podría desencadenar un aumento de la presencia de ANGPTL8, que, sumado al aporte exógeno de proteína recombinante, posiblemente aumenten la concentración de esta proteína por encima de la considerada para el experimento (20nM).

## 5. Homeostasis glucídica y ANGPTL8

Con relación al estudio del perfil glucídico, el análisis de los individuos obesos, tanto mujeres como varones, indicó que presentaban hiperinsulinemia, acompañada de un incremento de la concentración plasmática del péptido C. La hiperinsulinemia compensadora provocada por el incremento en la actividad de las células  $\beta$  pancreáticas, con el fin de mantener la regulación glucémica, es el principal indicador del comienzo del establecimiento de resistencia periférica a insulina, en este caso, asociada a la obesidad (Sachdeva y Stoffers, 2009).

El aumento de la insulinemia, como de la hemoglobina glucosilada y del péptido C, demostraron un empeoramiento del control glucídico de los pacientes obesos. La única variable que no presentó grandes diferencias fue la glucemia, pues no se observaron cambios estadísticamente significativos entre los grupos control y obesidad, en ambos sexos.

El estudio de ANGPTL8 en humanos ha estado dirigido, principalmente, a valorar su concentración plasmática con distintas variables asociadas a diabetes, debido a las características que, inicialmente, la consideraron como agente promotor de la proliferación de las células  $\beta$  pancreáticas (P. Yi et al., 2013). En la bibliografía son numerosos los estudios con individuos diabéticos que siguieron esta línea de investigación, sobre todo pacientes con DM2, en los que se analizaron las variables relacionadas con la valoración del perfil glucídico y de la concentración plasmática de ANGPTL8. Pocos estudios abordaron además la presencia de obesidad, por lo que fue difícil establecer comparaciones de nuestros resultados con estos.

Sin embargo, otros autores establecieron la condición de obesidad como variable codificadora de los grupos de estudio, analizando los parámetros indicadores del control glucídico además de valorar variables

relacionadas con el perfil lipídico. Algunos autores han descrito que no existía ninguna correlación entre la concentración plasmática de ANGPTL8 con las variables específicas del perfil glucídico en humanos, aunque no valoraban la presencia de obesidad como criterio de clasificación en sus grupos, sino presencia de diabetes gestacional (Ebert et al., 2015; Wawrusiewicz-Kurylonek et al., 2015; Zielinska et al., 2016), DM (Espes, Lau, et al., 2014; H. Wang et al., 2016; L. Wang et al., 2016), esteatosis hepática (von Loeffelholz et al., 2017), o sólo realizaron una valoración de un grupo de individuos normopeso (Yamada et al., 2018).

Utilizando criterios de clasificación similares a los seleccionados por nuestro grupo, y estableciendo la obesidad como eje de estudio, tampoco se observaron correlaciones entre las variables indicadoras de control del metabolismo glucídico con ANGPTL8 (Fenzl et al., 2014; Maurer et al., 2016; Pascual-Corrales et al., 2016; Wu et al., 2016).

Como se ha descrito anteriormente, la valoración de ANGPTL8 se ha realizado principalmente en pacientes diabéticos con la finalidad de observar si existía una posible relación entre esta proteína con el metabolismo glucídico. La mayoría de los artículos coincidían en que el empeoramiento de perfil glucídico de los individuos diabéticos se relacionaba con aumento de la concentración plasmática de ANGPTL8 (X. Chen et al., 2015; Ebert et al., 2014; Espes, Martinell, et al., 2014; Fu, Berhane, et al., 2014; Ghasemi et al., 2015; Hu et al., 2014; Liu et al., 2016; Yamada et al., 2015).

A pesar de esto, otros autores defendieron que el empeoramiento del perfil glucémico de individuos diabéticos estaba asociado con descenso de los niveles plasmáticos de ANGPTL8, siendo la glucemia y el índice HOMA-RI las variables que guardaron una relación más estrecha con esta proteína (Gokulakrishnan et al., 2015; Tokumoto et al., 2015; Xie et al.,

2015). En todos estos estudios no se tuvieron en cuenta pacientes con un elevado IMC, y estaban enfocados en pacientes diabéticos normopeso o con sobrepeso.

Otros estudios, que tampoco se centraron en la obesidad para establecer los criterios de clasificación, describieron también una correlación positiva entre las variables destinadas a evaluar el perfil glucémico y la concentración plasmática de ANGPTL8. En ellos se analizaron pacientes con diabetes gestacional (Huang et al., 2016; Trebotic et al., 2015), albuminuria (C. C. Chen et al., 2016), hígado graso no alcohólico (Y. H. Lee et al., 2016) y ovarios poliquísticos (Calan et al., 2016).

En aquellos trabajos realizados con pacientes obesos que consideraban el perfil lipídico, en muchas ocasiones también se describieron relaciones entre ANGPTL8 plasmática con las variables indicadoras del estado del perfil glucémico. Al igual que en los casos anteriores, también se observaron discrepancias entre los diferentes grupos de investigación. Mientras unos autores defendieron que existía una correlación positiva entre estas variables con ANGPTL8 (Abu-Farha, Abubaker, et al., 2016; Abu-Farha, Sriraman, et al., 2016; Al-Rawashdeh et al., 2017; Guo et al., 2015; Guo et al., 2016), otros determinaron que esta relación era negativa (Barja-Fernandez et al., 2015; Ejarque et al., 2017; Gomez-Ambrosi et al., 2014).

Después de analizar todos los datos anteriores, fue difícil comparar nuestros resultados con el resto de artículos. Por un lado, la discrepancia entre los estudios realizados con pacientes obesos no estableció una relación lo suficientemente clara entre las variables destinadas a la valoración del perfil glucémico con la concentración plasmática de ANGPTL8. Por otro lado, en la mayoría de los trabajos realizados con pacientes diabéticos no se contemplaban situaciones de obesidad mórbida

como en nuestro caso. A pesar de esto, algunos artículos tuvieron en cuenta tanto el estado de obesidad, como la presencia de resistencia a la insulina o DM2 diagnosticada, agrupándolas en estudios del síndrome metabólico. La mejor manera de contrastar nuestros resultados fue analizar los artículos que describían ambas patologías, permitiéndonos una visión más amplia de las complicaciones que provocan, y su posible relación con ANGPTL8.

Solamente un artículo indicó que no existía correlación entre ANGPTL8 con las variables indicadoras de empeoramiento del perfil glucémico, a pesar de identificar una correlación positiva entre esta proteína con el colesterol total y con LDL a nivel plasmático. Los pacientes obesos incluidos en este trabajo presentaron un IMC similar a los observados en nuestro grupo obesidad; sin embargo, mostraron unos indicadores de resistencia insulínica muy superiores a los de nuestros pacientes. De hecho, el grupo que consideraron “delgado” presentó un índice HOMA-RI que prácticamente duplicaba el valor observado en nuestro grupo control (Fenzl et al., 2014).

Por otra parte, algunos autores apreciaron una correlación negativa entre los indicadores de aumento de resistencia insulínica y ANGPTL8. Además, observaron que el empeoramiento del control del estado nutricional de los individuos, dado por un incremento de TAG, LDL y colesterol total y por un descenso de HDL, estaba acompañado de un descenso de los niveles plasmáticos de ANGPTL8. La importancia de estos trabajos radicó en el método de clasificación de los individuos de la muestra. Consideraban tanto al estado de obesidad mórbida o normopeso, como el de su perfil glucémico, teniendo en cuenta si padecían DM2, un deterioro inicial de la tolerancia a glucosa o un metabolismo glucídico normal. En estos casos se observó que los pacientes obesos diabéticos

presentaron niveles plasmáticos de ANGPTL8 por debajo del resto de grupos (Ejarque et al., 2017; Gomez-Ambrosi et al., 2014).

También se han descrito correlaciones positivas entre ANGPTL8 y los indicadores de aumento de resistencia insulínica en pacientes obesos y diabéticos. En dos de los artículos revisados observamos que los pacientes considerados control, que no presentaban síndrome metabólico, mostraban deterioro del perfil glucémico, expresado por aumento de la resistencia insulínica. Además, no se tuvo en cuenta la presencia de IMC extremos, asociados a obesidad mórbida, sino que los pacientes clasificados en estos grupos presentaron obesidad leve (Abu-Farha, Abubaker, et al., 2016; Al-Rawashdeh et al., 2017). En solo una ocasión se observó correlación positiva entre estas variables con individuos de diferentes IMC, desde normopeso hasta obesidad mórbida, teniendo en cuenta si eran diabéticos o no. Tampoco se ha encontrado relación directa entre ANGPTL8 y las variables indicadoras del estado del perfil lipídico de estos pacientes (Guo et al., 2015). En todos estos casos, la concentración de ANGPTL8 plasmática fue mayor en los individuos obesos diabéticos que en el resto de grupos.

En nuestro trabajo no se observaron correlaciones estadísticamente significativas entre las variables analíticas destinadas a la valoración del perfil glucídico y la concentración plasmática de ANGPTL8, independientemente del sexo de los individuos. Sin embargo, cabe destacar que todas ellas mostraron tendencia hacia la correlación negativa con ANGPTL8, indicando que, el empeoramiento del control glucémico acompañado de un aumento de los indicadores de establecimiento de resistencia insulínica, podrían estar asociados con descensos de los niveles plasmáticos de ANGPTL8.

Los índices HOMA2 tampoco se relacionaron de manera significativa con ANGPTL8 en los pacientes incluidos en el estudio. De hecho, el coeficiente de correlación  $r$  indicó que ni tan siquiera existía alguna tendencia, y que las variables eran independientes entre sí. Esto no concuerda con la mayoría de artículos que defendieron que el índice HOMA-RI es una de las principales variables relacionadas de manera negativa con la concentración plasmática de ANGPTL8 en individuos normopeso y obesos (Barja-Fernandez et al., 2015; Ejarque et al., 2017; Gomez-Ambrosi et al., 2014).

Tras analizar las modificaciones en plasma de ANGPTL8 y su relación con las variables indicadoras del control del perfil glucémico, se valoró si metformina podría modificar la presencia de esta proteína a nivel del tejido adiposo de mujeres obesas. Para ello, como se ha explicado en el apartado de Materiales y Métodos, se incubaron explantes de tejido con diferentes dosis de metformina y se determinó la expresión de ANGPTL8 mediante Western blot.

La elección de metformina se basó principalmente en que, aparte de ser el tratamiento hipoglucemiante oral más habitual en nuestra muestra de pacientes obesos, este fármaco es la primera línea de tratamiento farmacológico tras la detección de intolerancia a la glucosa y/o diagnóstico de DM2. Es capaz de reducir los niveles plasmáticos de glucosa y mejora la sensibilidad periférica a insulina. Además, no provoca hipoglucemia ni promueve ganancia ponderal, ni tampoco efectos adversos como los que producen otros hipoglucemiantes como insulina o sulfonilureas (Davidson y Peters, 1997). Una de las acciones de metformina es facilitar la activación de AMPK, uno de los principales sensores energéticos celulares. Su activación, por descensos de los niveles de ATP, promueve las rutas de señalización catabólicas a la vez que inhibe las anabólicas. A nivel mitocondrial, metformina reduce la producción de ATP, aumentando la

concentración de AMP, lo que desencadena un incremento en la activación de AMPK. En el tejido adiposo, metformina es capaz de aumentar la expresión relativa de la fracción activada de AMPK, indicando que estimula su activación (Boyle et al., 2011), hecho que podría derivar en la fosforilación de las principales lipasas relacionadas con el metabolismo lipídico, HSL y ATGL (Mihaylova y Shaw, 2011).

El cultivo de explantes de tejido adiposo obtenido de mujeres obesas con metformina produjo incremento de la expresión relativa de ANGPTL8 de manera dosis-dependiente, aumentando a lo largo del tiempo, siendo más elevadas a las 24 horas de tratamiento y con dosis altas de metformina (20mM). Como era de esperar, metformina produjo un aumento de la fracción fosforilada de AMPK de manera dosis-dependiente, siendo superior a las 24 horas de tratamiento.

En estudios realizados en líneas de carcinoma hepatocelular humano, HepG2, se observó que existía una posible relación entre AMPK y angptl8. Utilizando un activador de AMPK se observó descenso del ARNm, así como también de la propia proteína. Además, incubaciones con metformina dieron lugar a disminución de la presencia de esta proteína de manera dosis-dependiente (J. Lee et al., 2015). Sin embargo, el efecto de metformina sobre la activación de AMPK en esta línea celular pudo verse afectado por la presencia de resistencia insulínica en los hepatocitos (M. Zang et al., 2004).

Como se pudo comprobar al cuantificar el glicerol liberado por adipocitos aislados, las mujeres obesas presentaron resistencia a la acción de la insulina. Posiblemente, en los explantes de tejido adiposo visceral, el incremento de la expresión de ANGPTL8 tras la incubación con metformina se podría deber a la mejora en la sensibilidad a la insulina por parte del adipocito, estimulando las vías de señalización que genera la activación de



su receptor, ya que se ha descrito que la insulina es capaz de aumentar la expresión del ARNm que codifica ANGPTL8 (Nidhina Haridas et al., 2015).

Las diferencias observadas en relación con la incubación con metformina a diferentes dosis respecto a los valores basales observados a los distintos tiempos, nos hace pensar que toda la señalización desencadenada por la presencia de este fármaco podría influir en la producción a nivel local de ANGPTL8. Este hecho podría estar relacionado principalmente con el aumento de la sensibilidad a la insulina producido por la presencia de metformina en los medios de cultivo.

Debemos tener en cuenta, además, que los explantes no estaban en una situación de privación energética. Previo a la incubación con las diferentes dosis de metformina, las muestras fueron pre-incubadas durante 24 horas en medio de cultivo con glucosa e insulina, entre otras sustancias. Como se detalló en el apartado de Materiales y Métodos, posterior a la pre-incubación, las muestras se mantuvieron durante 3, 12 ó 24 horas en el mismo medio de cultivo, ya sea con metformina o sin el fármaco. Esta última situación fue considerada como basal, cuya expresión de ANGPTL8 se incrementó a las 24 horas de incubación, asemejándose a la expresión relativa observada en las muestras incubadas con metformina 1mM durante 3 horas. Es probable que la cantidad de nutrientes aportada por el medio de cultivo sea suficiente para provocar el aumento de producción de ANGPTL8 en los explantes de tejido adiposo durante las 24 horas de incubación.

Este hecho está relacionado con los hallazgos de otros grupos de investigación, donde se valoró la modificación de la expresión del mensajero de *angptl8*, tanto en líneas celulares 3T3-L1 como en modelos murinos, relacionadas con los estados de privación energética y con los de aporte de nutrientes. El resultado de dichos experimentos reveló que los periodos de ayuno provocaban una caída de la expresión del ARNm de *angptl8*, situación que se revertía tras el aporte de nutrientes (Ren et al., 2012; R. Zhang, 2012).

## 6. Consideraciones futuras

Tras analizar toda la información expuesta anteriormente, es preciso marcar los objetivos para futuros proyectos.

- Inicialmente, los resultados obtenidos han estado influenciados por el tamaño muestral del que disponíamos. Por este motivo, analizar un mayor volumen de pacientes, sobre todo individuos considerados controles, tanto a nivel plasmático como tisular, podría suponer un refuerzo a los hallazgos obtenidos en esta tesis.
- Sería oportuno, además, el análisis de los fármacos hipolipemiantes y antihiper glucemiantes utilizados en la clínica con la finalidad de valorar si se produce algún cambio de la expresión de ANGPTL8 en líneas celulares.
- Teniendo en cuenta que el efecto fisiológico de LPL se produce sobre todo en el torrente sanguíneo, y que ANGPTL8 controla la actividad de esta enzima, el estudio de las variaciones de la concentración de esta enzima, como de otros miembros de la familia de las ANGPTL podría aclarar las interacciones que se producen entre estos elementos a nivel plasmático para el control del metabolismo lipídico.
- Respecto a las concentraciones plasmáticas de ANGPTL8 consideradas normales, atendiendo al aporte de nutrientes, sería conveniente establecer pautas sistematizadas y protocolarizadas de la detección de esta proteína, sobre todo atendiendo a la manipulación de las muestras de plasma, así como también del sistema de detección más apropiado para tal fin.

- Al igual que con las determinaciones plasmáticas, deberían esclarecerse las modificaciones de la producción de ANGPTL8 en relación con las patologías de obesidad y diabetes.
- Una de las principales incógnitas es si esta proteína, además de participar en la inhibición de LPL, podría desempeñar alguna otra función relacionada con el desarrollo de enfermedades metabólicas.
- Además, el hecho de la existencia de la maquinaria necesaria para la producción de ANGPTL8 a nivel local, como la falta de evidencia de su presencia en las células endoteliales, no descartan que pueda existir algún mecanismo responsable del transporte de esta proteína a través del tejido vascular. Inicialmente, lo más adecuado sería desarrollar estos experimentos en modelos animales para, posteriormente, realizar el estudio con muestras humanas.





# CONCLUSIONES



Después de contrastar los resultados obtenidos con la bibliografía existente hemos alcanzado las siguientes conclusiones:

1. La determinación de los niveles de ANGPTL8 sugiere que las concentraciones en plasma y tejido adiposo visceral se comportan de forma inversa ante la obesidad mórbida, reduciéndose en plasma y aumentando en el tejido.
2. La hibridación in situ demostró la síntesis de ANGPTL8 en adipocitos del tejido adiposo visceral pero no en células endoteliales del mismo tejido graso. Los resultados sugieren la existencia de un dimorfismo sexual en la regulación de la expresión del ARNm de ANGPTL8, con un predominio en las mujeres obesas frente a los varones del mismo grupo.
3. ANGPTL8 no se correlacionó con ninguna variable del perfil lipídico, salvo en varones obesos, donde se determinó correlación positiva con HDL. ANGPTL8 tiende a reducir la actividad lipolítica en los adipocitos viscerales, pero podría depender de su concentración, sin influencia de la obesidad.
4. Los niveles plasmáticos de ANGPTL8 tienden a disminuir a medida que empeora el perfil glucémico asociado a obesidad. Por otro lado, el aumento de la producción ANGPTL8 en el tejido adiposo visceral de mujeres obesas podría estar relacionado con una mejora de la sensibilidad insulínica.







# ANEXOS



Anexo 1.

**HOSPITAL  
UNIVERSITARIO  
DE SALAMANCA**  
Paseo de San Vicente, 58-182  
37007 Salamanca  
Comité Ético de Investigación Clínica  
Teléfono: 923 29 11 00 – Ext. 55 515



E-mail: comite.etico.husa@saludcastillayleon.es

**EL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL AREA DE SALUD DE  
SALAMANCA,**

**INFORMA**

Que el Proyecto de Investigación presentado por D.<sup>a</sup> María Josefa García Barrado,

Titulado:

**“ESTUDIO DE LA HORMONA BETATROFINA EN PACIENTES DIABETICOS  
Y OBESOS PARA SU POSIBLE UTILIDAD EN UN NUEVO ENFOQUE  
TERAPÉUTICO EN LA DIABETES”.**

Que presenta como Investigador responsable a la Convocatoria de los proyectos de Biomedicina, Gestión Sanitaria y atención Sociosanitaria de la Junta de Castilla y León, SE AJUSTA A LAS NORMAS ÉTICAS Y DE BUENA PRÁCTICA CLÍNICA, establecidas para tales estudios.

Y para que conste lo firma en Salamanca con fecha 4 de junio de 2014

EL SECRETARIO



Fdo.: D. Ignacio Dávila González  
Secretario CEIC

## Anexo 2.

**ESTUDIO DE LA HORMONA BETATROFINA EN PACIENTES DIABÉTICOS Y OBESOS PARA SU  
POSIBLE UTILIDAD EN UN NUEVO ENFOQUE TERAPÉUTICO EN LA DIABETES**  
**Hoja de información al paciente**

Le invitamos a participar en este estudio, que se realiza en la Facultad de Medicina y en el Hospital Universitario de Salamanca, acerca del papel de la betatrofina en la diabetes con la finalidad de avanzar y mejorar el tratamiento farmacológico de los pacientes.

Las terapias actuales para el tratamiento de la diabetes mellitus 2 (DM2) incluyen generalmente un número importante de fármacos además de insulina subcutánea, que no consiguen en muchos casos ajustarse a los niveles glucémicos fisiológicos, lo que conlleva complicaciones asociadas a la enfermedad. El descubrimiento de una proteína (betatrofina) que aumenta la proliferación de las células  $\beta$  pancreáticas de forma extraordinaria en ratones diabéticos, ha despertado grandes esperanzas en la comunidad científica para el desarrollo de un nuevo enfoque terapéutico en el tratamiento de la DM2 e incluso DM1. Sin embargo, existen todavía muchas preguntas sin responder respecto a su mecanismo de acción o el receptor sobre el que actúan y sobre todo, existe un absoluto desconocimiento del papel de la betatrofina en humanos.

Si usted participa, se le extraerá una pequeña cantidad de sangre y de tejido graso durante la intervención quirúrgica, que permitirá el almacenamiento de productos derivados (plasma, células y proteínas) con los que en un futuro realizaremos estudios de investigación, cumpliendo siempre con las regulaciones y la normativa ética y legal vigentes. Dichas extracciones no supondrán en ningún caso un riesgo para su salud.

**Se solicita su consentimiento** para que, con la sangre y la grasa extraída, se realice:

**1. – Almacenamiento de muestras** (plasma, células y proteínas) por un tiempo indefinido, que estarán disponibles para llevar a cabo estudios de investigación y conseguir un mejor conocimiento sobre su enfermedad. Si usted autoriza el almacenamiento de las muestras, la Unidad de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca realizará los estudios metabólicos y preservará el **anonimato** de la muestra, guardando **total confidencialidad** sobre la identidad del paciente. Cada una de las muestras recibirá un número y no constará ningún dato de identificación personal, de forma que el equipo investigador que efectuará el estudio analítico nunca conocerá su identidad.

**2. – Análisis y estudios de los parámetros metabólicos en dichas muestras**, aportarán información sobre la posible utilidad de esta hormona en el tratamiento de la diabetes mellitus.

Su participación es voluntaria y Ud. tiene derecho a rechazar la colaboración en el estudio y a retirarse del mismo en cualquier momento por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y tampoco repercutirá ni variará su tratamiento futuro. En este caso, se procedería a la destrucción de la muestra codificada. La atención que Ud. recibe del personal sanitario no cambiará si decide no participar o se retira del estudio.

Los resultados de las investigaciones y análisis de sus muestras estarán sometidos a las normas éticas y a la confidencialidad que da cobertura a todo el estudio, tras su aprobación por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario de Salamanca.

Sus resultados, junto con los del resto de participantes, podrían ofrecer información de interés que permitirá conocer y comprender mejor la enfermedad, lo que repercutirá positivamente y garantizará un mejor manejo y cuidado de la misma y de los enfermos que la padecen. Los datos serán analizados por grupos de investigadores y expertos, y Ud. podrá decidir si desea saber o no el resultado de las pruebas realizadas; en caso afirmativo le serán comunicados por el médico solicitante, quien aclarará cuantas preguntas y dudas pueda tener sobre el estudio. Los resultados de los parámetros analizados podrán ser presentados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones especializadas, sin que los pacientes puedan ser identificados y manteniendo siempre la confidencialidad de los datos. La divulgación científica siempre será estadística y nunca individualizada.

**ANEXO I**

**INFORMACIÓN Y AUTORIZACIÓN PARA EL ESTUDIO DE PARÁMETROS  
METABÓLICOS**

**Título del proyecto: Estudio de la hormona betatrofina en pacientes diabéticos y obesos para su  
posible utilidad en un nuevo enfoque terapéutico en la diabetes.**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo, \_\_\_\_\_  
(nombre del paciente, o bien, del familiar, allegado o representante legal\*)

**Declaro que:**

1. He leído la hoja de información que me ha sido entregada
2. He podido hacer preguntas sobre la obtención, almacenamiento y análisis de las muestras.
3. He hablado y he aclarado las dudas con el Dr. \_\_\_\_\_ .
4. Comprendo que mi participación es voluntaria.
5. Comprendo que puedo solicitar la destrucción de mis muestras en cualquier momento sin que esto repercuta en mis cuidados médicos futuros.
6. Presto libremente mi conformidad para que se realice la extracción de sangre y grasa, así como lo especificado en los apartados 1 y 2 de la Hoja de Información.

En Salamanca, a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

Firma del médico                      Firma del paciente                      o                      Firma del representante legal,  
familiar o allegado (\*)

Nº colegiado \_\_\_\_\_

\* Representante legal en los casos contemplados en la Ley 41/2002, de 14 de noviembre.





# BIBLIOGRAFÍA





- Abate, N., Garg, A., Peshock, R. M., Stray-Gundersen, J., Adams-Huet B., y Grundy, S. M. (1996). Relationship of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men with NIDDM. *Diabetes* 45(12): 1684-1693.
- Abel, E. D., Peroni, O., Kim, J. K., Kim, Y. B., Boss, O., Hadro, E.,... Kahn, B. B. (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409(6821): 729-733.
- Abu-Farha, M., Abubaker, J., Al-Khairi, I., Cherian, P., Noronha, F., Hu, F. B.,... Elkum, N. (2015). Higher plasma betatrophin/ANGPTL8 level in Type 2 Diabetes subjects does not correlate with blood glucose or insulin resistance. *Sci Rep* 5: 10949.
- Abu-Farha, M., Abubaker, J., Al-Khairi, I., Cherian, P., Noronha, F., Kavalakatt, S.,... Elkum, N. (2016). Circulating angiopoietin-like protein 8 (betatrophin) association with HsCRP and metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol* 15: 25.
- Abu-Farha, M., Abubaker, J., Noronha, F., Al-Khairi, I., Cherian, P., Alarouj, M.,... Elkum, N. (2015). Lack of associations between betatrophin/ANGPTL8 level and C-peptide in type 2 diabetic subjects. *Cardiovasc Diabetol* 14: 112.
- Abu-Farha, M., Al-Khairi, I., Cherian, P., Chandy, B., Sriraman, D., Alhubail, A.,... Abubaker, J. (2016). Increased ANGPTL3, 4 and ANGPTL8/betatrophin expression levels in obesity and T2D. *Lipids Health Dis* 15(1): 181.
- Abu-Farha, M., Cherian, P., Qaddoumi, M. G., AlKhairi, I., Sriraman, D., Alanbaei, M., y Abubaker, J. (2018). Increased plasma and adipose tissue levels of ANGPTL8/Betatrophin and ANGPTL4 in people with hypertension. *Lipids Health Dis* 17(1): 35.
- Abu-Farha, M., Sriraman, D., Cherian, P., AlKhairi, I., Elkum, N., Behbehani, K., y Abubaker, J. (2016). Circulating ANGPTL8/Betatrophin Is Increased in Obesity and Reduced after Exercise Training. *PLoS One* 11(1): e0147367.
- Aburasayn, H., Al Batran, R., y Ussher, J. R. (2016). Targeting ceramide metabolism in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 311(2): E423-435.

- Al-Rawashdeh, A., Kasabri, V., Bulatova, N., Akour, A., Zayed, A., Momani, M.,... Hyasat, D. (2017). The correlation between plasma levels of oxytocin and betatrophin in non-diabetic and diabetic metabolic syndrome patients: A cross sectional study from Jordan. *Diabetes Metab Syndr* 11(1): 59-67.
- Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A.,... Smith, S. C. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120(16): 1640-1645.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25(17): 3389-3402.
- American Diabetes Association (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37 Suppl 1: S81-90.
- Aranceta-Bartrina, J., Perez-Rodrigo, C., Alberdi-Aresti, G., Ramos-Carrera, N., y Lazaro-Masedo, S. (2016). Prevalence of General Obesity and Abdominal Obesity in the Spanish Adult Population (Aged 25-64 Years) 2014-2015: The ENPE Study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 69(6): 579-587.
- Aranceta-Bartrina, J., Serra-Majem, L., Foz-Sala, M., Moreno-Esteban, B., y Grupo Colaborativo SEEDO (2005). Prevalencia de obesidad en España. *Med Clin (Barc)* 125(12): 460-466.
- Arias-Loste, M. T., Garcia-Unzueta, M. T., Llerena, S., Iruzubieta, P., Puente, A., Cabezas, J.,... Fabrega, E. (2015). Plasma betatrophin levels in patients with liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 21(37): 10662-10668.
- Arner, P., y Langin, D. (2014). Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 25(5): 255-262.

- Barja-Fernandez, S., Folgueira, C., Seoane, L. M., Casanueva, F. F., Dieguez, C., Castela, C.,... Nogueiras, R. (2015). Circulating Betatrophin Levels Are Increased in Anorexia and Decreased in Morbidly Obese Women. *J Clin Endocrinol Metab* 100(9): E1188-1196.
- Bastard, J. P., Jardel, C., Bruckert, E., Blondy, P., Capeau, J., Laville, M.,... Hainque, B. (2000). Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 85(9): 3338-3342.
- Berg, A. H., Combs, T. P., y Scherer, P. E. (2002). ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13(2): 84-89.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H.,... Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28(1): 235-242.
- Berndt, J., Kralisch, S., Klötting, N., Ruschke, K., Kern, M., Fasshauer, M.,... Bluher, M. (2008). Adipose triglyceride lipase gene expression in human visceral obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 116(4): 203-210.
- Bezaire, V., y Langin, D. (2009). Regulation of adipose tissue lipolysis revisited. *Proc Nutr Soc* 68(4): 350-360.
- Bolsoni-Lopes, A., y Alonso-Vale, M. I. (2015). Lipolysis and lipases in white adipose tissue - An update. *Arch Endocrinol Metab* 59(4): 335-342.
- Bostrom, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P., Korde, A., Ye, L., Lo, J. C., Rasbach, K. A.,... Spiegelman, B. M. (2012). A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 481(7382): 463-468.
- Boyle, J. G., Logan, P. J., Jones, G. C., Small, M., Sattar, N., Connell, J. M.,... Salt, I. P. (2011). AMP-activated protein kinase is activated in adipose tissue of individuals with type 2 diabetes treated with metformin: a randomised glycaemia-controlled crossover study. *Diabetologia* 54(7): 1799-1809.

- Calan, M., Yilmaz, O., Kume, T., Unal Kocabas, G., Yesil Senses, P., Senses, Y. M.,... Gursoy Calan, O. (2016). Elevated circulating levels of betatrophin are associated with polycystic ovary syndrome. *Endocrine* 53(1):271-9.
- Cannon, B., y Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84(1): 277-359.
- Carobbio, S., Pellegrinelli, V., y Vidal-Puig, A. (2017). Adipose Tissue Function and Expandability as Determinants of Lipotoxicity and the Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol* 960: 161-196.
- Carobbio, S., Rodriguez-Cuenca, S., y Vidal-Puig, A. (2011). Origins of metabolic complications in obesity: ectopic fat accumulation. The importance of the qualitative aspect of lipotoxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14(6): 520-526.
- Carpene, C. (2001). Assays of adrenergic receptors. Including lipolysis and binding measurements. *Methods Mol Biol* 155: 129-140.
- Carswell, K. A., Lee, M. J., y Fried, S. K. (2012). Culture of isolated human adipocytes and isolated adipose tissue. *Methods Mol Biol* 806: 203-214.
- Chawla, A., Nguyen, K. D., y Goh, Y. P. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 11(11): 738-749.
- Chen, C. C., Susanto, H., Chuang, W. H., Liu, T. Y., y Wang, C. H. (2016). Higher serum betatrophin level in type 2 diabetes subjects is associated with urinary albumin excretion and renal function. *Cardiovasc Diabetol* 15: 3.
- Chen, J., Chen, S., Huang, P., Meng, X. L., Clayton, S., Shen, J. S., y Grayburn, P. A. (2015). In vivo targeted delivery of ANGPTL8 gene for beta cell regeneration in rats. *Diabetologia* 58(5): 1036-1044.
- Chen, X., Lu, P., He, W., Zhang, J., Liu, L., Yang, Y.,... Yu, X. (2015). Circulating betatrophin levels are increased in patients with type 2 diabetes and associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 100(1): E96-100.

- Chi, X., Shetty, S. K., Shows, H. W., Hjelmaas, A. J., Malcolm, E. K., y Davies, B. S. (2015). Angiotensin-like 4 Modifies the Interactions between Lipoprotein Lipase and Its Endothelial Cell Transporter GPIHBP1. *J Biol Chem* 290(19): 11865-11877.
- Chung, H. S., Lee, M. J., Hwang, S. Y., Lee, H. J., Yoo, H. J., Seo, J. A.,... Choi, K. M. (2016). Circulating angiotensin-like protein 8 (ANGPTL8) and ANGPTL3 concentrations in relation to anthropometric and metabolic profiles in Korean children: a prospective cohort study. *Cardiovasc Diabetol* 15: 1.
- Cox, A. R., Lam, C. J., Bonnyman, C. W., Chavez, J., Rios, J. S., y Kushner, J. A. (2015). Angiotensin-like protein 8 (ANGPTL8)/betatrophin overexpression does not increase beta cell proliferation in mice. *Diabetologia* 58(7): 1523-1531.
- Davidson, M. B., y Peters, A. L. (1997). An overview of metformin in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Am J Med* 102(1): 99-110.
- Demerath, E. W., Sun, S. S., Rogers, N., Lee, M., Reed, D., Choh, A. C.,... Towne, B. (2007). Anatomical patterning of visceral adipose tissue: race, sex, and age variation. *Obesity (Silver Spring)* 15(12): 2984-2993.
- Despres, J. P. (2006). Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med* 38(1): 52-63.
- Dewey, F. E., Gusarova, V., O'Dushlaine, C., Gottesman, O., Trejos, J., Hunt, C.,... Shuldiner, A. R. (2016). Inactivating Variants in ANGPTL4 and Risk of Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 374(12): 1123-1133.
- Diabetes Trials Unit (2004). HOMA2 Calculator. The Oxford Center for Diabetes, Endocrinology and Metabolism, University of Oxford. Recuperado de: <https://www.dtu.ox.ac.uk/> [citado 21 de mayo de 2018].
- Dijk, W., Heine, M., Vergnes, L., Boon, M. R., Schaart, G., Hesselink, M. K.,... Kersten, S. (2015). ANGPTL4 mediates shuttling of lipid fuel to brown adipose tissue during sustained cold exposure. *Elife* 4.

- Dole, V. P., y Meinertz, H. (1960). Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J Biol Chem* 235: 2595-2599.
- Dong, X. Y., Pang, X. W., Yu, S. T., Su, Y. R., Wang, H. C., Yin, Y. H.,... Chen, W. F. (2004). Identification of genes differentially expressed in human hepatocellular carcinoma by a modified suppression subtractive hybridization method. *Int J Cancer* 112(2): 239-248.
- Drolet, R., Richard, C., Sniderman, A. D., Mailloux, J., Fortier, M., Huot, C.,... Tchernof, A. (2008). Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *Int J Obes (Lond)* 32(2): 283-291.
- Dubois, S. G., Heilbronn, L. K., Smith, S. R., Albu, J. B., Kelley, D. E., Ravussin, E., y Look AHEAD Adipose Research Group (2006). Decreased expression of adipogenic genes in obese subjects with type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring)* 14(9): 1543-1552.
- Ebert, T., Kralisch, S., Hoffmann, A., Bachmann, A., Lossner, U., Kratzsch, J.,... Fasshauer, M. (2014). Circulating angiopoietin-like protein 8 is independently associated with fasting plasma glucose and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 99(12): E2510-2517.
- Ebert, T., Kralisch, S., Wurst, U., Lossner, U., Kratzsch, J., Bluher, M.,... Fasshauer, M. (2015). Betatrophin levels are increased in women with gestational diabetes mellitus compared to healthy pregnant controls. *Eur J Endocrinol* 173(1): 1-7.
- Eck, M. J., y Sprang, S. R. (1989). The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* 264(29): 17595-17605.
- Eckel, R. H., Grundy, S. M., y Zimmet, P. Z. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet* 365(9468): 1415-1428.
- Ejarque, M., Borlaug, M., Vilarrasa, N., Martinez-Perez, B., Llaurodo, G., Megia, A.,... Vendrell, J. (2017). Angiopoietin-like protein 8/betatrophin as a new

determinant of type 2 diabetes remission after bariatric surgery. *Transl Res* 184: 35-44 e34.

Elmquist, J. K., Coppari, R., Balthasar, N., Ichinose, M., y Lowell, B. B. (2005). Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *J Comp Neurol* 493(1): 63-71.

English, J. T., Patel, S. K., y Flanagan, M. J. (1973). Association of pheochromocytomas with brown fat tumors. *Radiology* 107(2): 279-281.

Espes, D., Lau, J., y Carlsson, P. O. (2014). Increased circulating levels of betatrophin in individuals with long-standing type 1 diabetes. *Diabetologia* 57(1): 50-53.

Espes, D., Martinell, M., y Carlsson, P. O. (2014). Increased circulating betatrophin concentrations in patients with type 2 diabetes. *Int J Endocrinol* 2014: 323407.

Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (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(19): 2486-2497.

Fain, J. N., Madan, A. K., Hiler, M. L., Cheema, P., y Bahouth, S. W. (2004). Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145(5): 2273-2282.

Farooqi, S., y O'Rahilly, S. (2006). Genetics of obesity in humans. *Endocr Rev* 27(7): 710-718.

Feingold, K. R., y Grunfeld, C. (1987). Tumor necrosis factor-alpha stimulates hepatic lipogenesis in the rat in vivo. *J Clin Invest* 80(1): 184-190.

Feingold, K. R., Soued, M., Staprans, I., Gavin, L. A., Donahue, M. E., Huang, B. J.,... Grunfeld, C. (1989). Effect of tumor necrosis factor (TNF) on lipid metabolism in the diabetic rat. Evidence that inhibition of adipose tissue

lipoprotein lipase activity is not required for TNF-induced hyperlipidemia. *J Clin Invest* 83(4): 1116-1121.

Fenzl, A., Itariu, B. K., Kosi, L., Fritzer-Szekeres, M., Kautzky-Willer, A., Stulnig, T. M., y Kiefer, F. W. (2014). Circulating betatrophin correlates with atherogenic lipid profiles but not with glucose and insulin levels in insulin-resistant individuals. *Diabetologia* 57(6): 1204-1208.

Franck, N., Gummesson, A., Jernas, M., Glad, C., Svensson, P. A., Guillot, G.,... Olsson, B. (2011). Identification of adipocyte genes regulated by caloric intake. *J Clin Endocrinol Metab* 96(2): E413-418.

Fried, S. K., Bunkin, D. A., y Greenberg, A. S. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 83(3): 847-850.

Fried, S. K., y Moustaid-Moussa, N. (2001). Culture of adipose tissue and isolated adipocytes. *Methods Mol Biol* 155: 197-212.

Fruebis, J., Tsao, T. S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M. R., Yen, F. T.,... Lodish, H. F. (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4): 2005-2010.

Fu, Z., Abou-Samra, A. B., y Zhang, R. (2014). An explanation for recent discrepancies in levels of human circulating betatrophin. *Diabetologia* 57(10): 2232-2234.

Fu, Z., Berhane, F., Fite, A., Seyoum, B., Abou-Samra, A. B., y Zhang, R. (2014). Elevated circulating lipasin/betatrophin in human type 2 diabetes and obesity. *Sci Rep* 4: 5013.

Fu, Z., Yao, F., Abou-Samra, A. B., y Zhang, R. (2013). Lipasin, thermoregulated in brown fat, is a novel but atypical member of the angiopoietin-like protein family. *Biochem Biophys Res Commun* 430(3): 1126-1131.

Gao, T., Jin, K., Chen, P., Jin, H., Yang, L., Xie, X.,... Yu, X. (2015). Circulating Betatrophin Correlates with Triglycerides and Postprandial Glucose among



- Different Glucose Tolerance Statuses--A Case-Control Study. *PLoS One* 10(8): e0133640.
- Garg, A. (2004). Regional adiposity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 89(9): 4206-4210.
- Ge, H., Cha, J. Y., Gopal, H., Harp, C., Yu, X., Repa, J. J., y Li, C. (2005). Differential regulation and properties of angiopoietin-like proteins 3 and 4. *J Lipid Res* 46(7): 1484-1490.
- Gesta, S., Tseng, Y. H., y Kahn, C. R. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131(2): 242-256.
- Ghasemi, H., Tavilani, H., Khodadadi, I., Saidijam, M., y Karimi, J. (2015). Circulating Betatrophin Levels Are Associated with the Lipid Profile in Type 2 Diabetes. *Chonnam Med J* 51(3): 115-119.
- Gokulakrishnan, K., Manokaran, K., Pandey, G. K., Amutha, A., Ranjani, H., Anjana, R. M., y Mohan, V. (2015). Relationship of betatrophin with youth onset type 2 diabetes among Asian Indians. *Diabetes Res Clin Pract* 109(1): 71-76.
- Goldberg, I. J., y Merkel, M. (2001). Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. *Front Biosci* 6: D388-405.
- Gomez-Ambrosi, J., Pascual-Corrales, E., Catalan, V., Rodriguez, A., Ramirez, B., Romero, S.,... Fruhbeck, G. (2016). Altered Concentrations in Dyslipidemia Evidence a Role for ANGPTL8/Betatrophin in Lipid Metabolism in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 101(10): 3803-3811.
- Gomez-Ambrosi, J., Pascual, E., Catalan, V., Rodriguez, A., Ramirez, B., Silva, C.,... Fruhbeck, G. (2014). Circulating betatrophin concentrations are decreased in human obesity and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 99(10): E2004-2009.
- Graham, M. J., Lee, R. G., Brandt, T. A., Tai, L. J., Fu, W., Peralta, R.,... Tsimikas, S. (2017). Cardiovascular and Metabolic Effects of ANGPTL3 Antisense Oligonucleotides. *N Engl J Med* 377(3): 222-232.

- Gray, K. A., Yates, B., Seal, R. L., Wright, M. W., y Bruford, E. A. (2015). Genenames.org: the HGNC resources in 2015. *Nucleic Acids Res* 43(Database issue): D1079-1085.
- Gregoire, F. M., Smas, C. M., y Sul, H. S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78(3): 783-809.
- Gruzdeva, O., Uchasova, E., Dyleva, Y., Akbasheva, O., Karetnikova, V., Shilov, A., y Barbarash, O. (2017). Effect of different doses of statins on the development of type 2 diabetes mellitus in patients with myocardial infarction. *Diabetes Metab Syndr Obes* 10: 481-489.
- Guo, K., Lu, J., Yu, H., Zhao, F., Pan, P., Zhang, L.,... Jia, W. (2015). Serum betatrophin concentrations are significantly increased in overweight but not in obese or type 2 diabetic individuals. *Obesity (Silver Spring)* 23(4): 793-797.
- Guo, K., Yu, H., Lu, J., Bao, Y., Chen, H., y Jia, W. (2016). Decreased serum betatrophin levels correlate with improved fasting plasma glucose and insulin secretion capacity after Roux-en-Y gastric bypass in obese Chinese patients with type 2 diabetes: a 1-year follow-up. *Surg Obes Relat Dis* 12(7): 1343-1348.
- Gusarova, V., Alexa, C. A., Na, E., Stevis, P. E., Xin, Y., Bonner-Weir, S.,... Gromada, J. (2014). ANGPTL8/betatrophin does not control pancreatic beta cell expansion. *Cell* 159(3): 691-696.
- Gusarova, V., Alexa, C. A., Wang, Y., Rafique, A., Kim, J. H., Buckler, D.,... Gromada, J. (2015). ANGPTL3 blockade with a human monoclonal antibody reduces plasma lipids in dyslipidemic mice and monkeys. *J Lipid Res* 56(7): 1308-1317.
- Gustafson, B., Gogg, S., Hedjazifar, S., Jenndahl, L., Hammarstedt, A., y Smith, U. (2009). Inflammation and impaired adipogenesis in hypertrophic obesity in man. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(5): E999-E1003.

- Gustafson, B., Hammarstedt, A., Andersson, C. X., y Smith, U. (2007). Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(11): 2276-2283.
- Guyenet, S. J., y Schwartz, M. W. (2012). Clinical review: Regulation of food intake, energy balance, and body fat mass: implications for the pathogenesis and treatment of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 97(3): 745-755.
- Hato, T., Tabata, M., y Oike, Y. (2008). The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends Cardiovasc Med* 18(1): 6-14.
- Havel, P. J., Kasim-Karakas, S., Dubuc, G. R., Mueller, W., y Phinney, S. D. (1996). Gender differences in plasma leptin concentrations. *Nat Med* 2(9): 949-950.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., y Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374(Pt 1): 1-20.
- Hirsch, J., y Batchelor, B. (1976). Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab* 5(2): 299-311.
- Hotamisligil, G. S. (2003). Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3: S53-55.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., y Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259(5091): 87-91.
- Hu, H., Sun, W., Yu, S., Hong, X., Qian, W., Tang, B.,... Yuan, G. (2014). Increased circulating levels of betatrophin in newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 37(10): 2718-2722.
- Huang, Y., Fang, C., Ma, Z., Guo, H., Wang, R., y Hu, J. (2016). Betatrophin Levels were Increased in Pregnant Women with or without Gestational Diabetes Mellitus and Associated with Beta Cell Function. *Rev Bras Ginecol Obstet* 38(6): 287-292.

- Hube, F., Lietz, U., Igel, M., Jensen, P. B., Tornqvist, H., Joost, H. G., y Hauner, H. (1996). Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans. *Horm Metab Res* 28(12): 690-693.
- Huh, J. Y., Park, Y. J., Ham, M., y Kim, J. B. (2014). Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity. *Mol Cells* 37(5): 365-371.
- Huttunen, P., Hirvonen, J., y Kinnula, V. (1981). The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 46(4): 339-345.
- Ibrahim, M. M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* 11(1): 11-18.
- Iglesias-Osma, M. C., Bour, S., Garcia-Barrado, M. J., Visentin, V., Pastor, M. F., Testar, X.,... Carpene, C. (2005). Methylamine but not mafenide mimics insulin-like activity of the semicarbazide-sensitive amine oxidase-substrate benzylamine on glucose tolerance and on human adipocyte metabolism. *Pharmacol Res* 52(6): 475-484.
- Jiao, Y., Le Lay, J., Yu, M., Najj, A., y Kaestner, K. H. (2014). Elevated mouse hepatic betatrophin expression does not increase human beta-cell replication in the transplant setting. *Diabetes* 63(4): 1283-1288.
- Jo, J., Gavrilova, O., Pack, S., Jou, W., Mullen, S., Sumner, A. E.,... Periwé, V. (2009). Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol* 5(3): e1000324.
- Jones, M. E., Thorburn, A. W., Britt, K. L., Hewitt, K. N., Misso, M. L., Wreford, N. G.,... Simpson, E. R. (2001). Aromatase-deficient (ArKO) mice accumulate excess adipose tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79(1-5): 3-9.
- Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., y Tobe, K. (2006). Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116(7): 1784-1792.

- Kelsey, M. M., Zaepfel, A., Bjornstad, P., y Nadeau, K. J. (2014). Age-related consequences of childhood obesity. *Gerontology* 60(3): 222-228.
- Kersten, S., Mandard, S., Tan, N. S., Escher, P., Metzger, D., Chambon, P.,... Wahli, W. (2000). Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *J Biol Chem* 275(37): 28488-28493.
- Kim, I., Moon, S. O., Koh, K. N., Kim, H., Uhm, C. S., Kwak, H. J.,... Koh, G. Y. (1999). Molecular cloning, expression, and characterization of angiotensin-converting enzyme-related protein. angiotensin-converting enzyme-related protein induces endothelial cell sprouting. *J Biol Chem* 274(37): 26523-26528.
- Kitahara, C. M., Flint, A. J., Berrington de Gonzalez, A., Bernstein, L., Brotzman, M., MacInnis, R. J.,... Hartge, P. (2014). Association between class III obesity (BMI of 40-59 kg/m<sup>2</sup>) and mortality: a pooled analysis of 20 prospective studies. *PLoS Med* 11(7): e1001673.
- Knittle, J. L., Timmers, K., Ginsberg-Fellner, F., Brown, R. E., y Katz, D. P. (1979). The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. *J Clin Invest* 63(2): 239-246.
- Koishi, R., Ando, Y., Ono, M., Shimamura, M., Yasumo, H., Fujiwara, T.,... Furukawa, H. (2002). Angptl3 regulates lipid metabolism in mice. *Nat Genet* 30(2): 151-157.
- Koster, A., Chao, Y. B., Mosior, M., Ford, A., Gonzalez-DeWhitt, P. A., Hale, J. E.,... Eacho, P. (2005). Transgenic angiotensin-converting enzyme-like (angptl)4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism. *Endocrinology* 146(11): 4943-4950.
- Lafontan, M., y Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* 48(5): 275-297.
- Lee, E. C., Desai, U., Gololobov, G., Hong, S., Feng, X., Yu, X. C.,... Sonnenburg, W. K. (2009). Identification of a new functional domain in angiotensin-converting enzyme-like

- 3 (ANGPTL3) and angiotensin-like 4 (ANGPTL4) involved in binding and inhibition of lipoprotein lipase (LPL). *J Biol Chem* 284(20): 13735-13745.
- Lee, J., Hong, S. W., Park, S. E., Rhee, E. J., Park, C. Y., Oh, K. W.,... Lee, W. Y. (2015). AMP-activated protein kinase suppresses the expression of LXR/SREBP-1 signaling-induced ANGPTL8 in HepG2 cells. *Mol Cell Endocrinol* 414: 148-155.
- Lee, Y. H., Lee, S. G., Lee, C. J., Kim, S. H., Song, Y. M., Yoon, M. R.,... Cha, B. S. (2016). Association between betatrophin/ANGPTL8 and non-alcoholic fatty liver disease: animal and human studies. *Sci Rep* 6: 24013.
- Levy, J. C., Matthews, D. R., y Hermans, M. P. (1998). Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care* 21(12): 2191-2192.
- Li, E., Nakata, M., Shinozaki, A., Yang, Y., Zhang, B., y Yada, T. (2016). Betatrophin expression is promoted in obese hyperinsulinemic type 2 but not type 1 diabetic mice. *Endocr J* 63(7): 611-619.
- Li, S., Liu, D., Li, L., Li, Y., Li, Q., An, Z.,... Tian, H. (2016). Circulating Betatrophin in Patients with Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis. *J Diabetes Res* 2016: 6194750.
- Lichtenstein, L., Mattijssen, F., de Wit, N. J., Georgiadi, A., Hooiveld, G. J., van der Meer, R.,... Kersten, S. (2010). Angptl4 protects against severe proinflammatory effects of saturated fat by inhibiting fatty acid uptake into mesenteric lymph node macrophages. *Cell Metab* 12(6): 580-592.
- Liu, D., Qu, H., Wang, H., Duan, Y., Liu, F., Feng, Z., y Deng, H. (2016). Relationship between serum betatrophin levels and the first-phase of glucose-stimulated insulin secretion. *Obes Res Clin Pract* 12(1S1):9-15.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1): 265-275.

- MacDougald, O. A., y Lane, M. D. (1995). Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* 64: 345-373.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., y Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28(7): 412-419.
- Mattijssen, F., y Kersten, S. (2012). Regulation of triglyceride metabolism by Angiopoietin-like proteins. *Biochim Biophys Acta* 1821(5): 782-789.
- Maurer, L., Brachs, S., Decker, A. M., Brachs, M., Leupelt, V., Jumpertz von Schwartzberg, R.,... Mai, K. (2016). Weight Loss Partially Restores Glucose-Driven Betatrophin Response in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 101(11): 4014-4020.
- Mazurkiewicz, J. C., Watts, G. F., Warburton, F. G., Slavin, B. M., Lowy, C., y Koukkou, E. (1994). Serum lipids, lipoproteins and apolipoproteins in pregnant non-diabetic patients. *J Clin Pathol* 47(8): 728-731.
- McCombie, L., Leslie, W., Taylor, R., Kennon, B., Sattar, N., y Lean, M. E. J. (2017). Beating type 2 diabetes into remission. *BMJ* 358: j4030.
- Mehta, N., Qamar, A., Qu, L., Qasim, A. N., Mehta, N. N., Reilly, M. P., y Rader, D. J. (2014). Differential association of plasma angiopoietin-like proteins 3 and 4 with lipid and metabolic traits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34(5): 1057-1063.
- Mihaylova, M. M., y Shaw, R. J. (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* 13(9): 1016-1023.
- Minokoshi, Y., Kim, Y. B., Peroni, O. D., Fryer, L. G., Muller, C., Carling, D., y Kahn, B. B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415(6869): 339-343.
- Moebus, S., Hanisch, J. U., Neuhauser, M., Aidsburger, P., Wasem, J., y Jockel, K. H. (2006). Assessing the prevalence of the Metabolic Syndrome

according to NCEP ATP III in Germany: feasibility and quality aspects of a two step approach in 1550 randomly selected primary health care practices. *Ger Med Sci* 4: Doc07.

- Mohamed-Ali, V., Goodrick, S., Rawesh, A., Katz, D. R., Miles, J. M., Yudkin, J. S.,... Coppack, S. W. (1997). Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82(12): 4196-4200.
- Moller, D. E., y Kaufman, K. D. (2005). Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu Rev Med* 56: 45-62.
- Montague, C. T., Prins, J. B., Sanders, L., Zhang, J., Sewter, C. P., Digby, J.,... O'Rahilly, S. (1998). Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes* 47(9): 1384-1391.
- Morigny, P., Houssier, M., Mouisel, E., y Langin, D. (2016). Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie* 125: 259-266.
- Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., y Schwartz, M. W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443(7109): 289-295.
- Mottillo, S., Filion, K. B., Genest, J., Joseph, L., Pilote, L., Poirier, P.,... Eisenberg, M. J. (2010). The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 56(14): 1113-1132.
- Munzberg, H., Flier, J. S., y Bjorbaek, C. (2004). Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 145(11): 4880-4889.
- Musunuru, K., y Kathiresan, S. (2016). Surprises From Genetic Analyses of Lipid Risk Factors for Atherosclerosis. *Circ Res* 118(4): 579-585.
- Mysore, R., Liebisch, G., Zhou, Y., Olkkonen, V. M., y Nidhina Haridas, P. A. (2017). Angiopoietin-like 8 (Angptl8) controls adipocyte lipolysis and phospholipid composition. *Chem Phys Lipids* 207(Pt B): 246-252.



- Mysore, R., Ortega, F. J., Latorre, J., Ahonen, M., Savolainen-Peltonen, H., Fischer-Posovszky, P.,... Haridas, P. A. N. (2017). MicroRNA-221-3p Regulates Angiopoietin-Like 8 (ANGPTL8) Expression in Adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 102(11): 4001-4012.
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., y Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(2): E444-452.
- Nidhina Haridas, P. A., Soronen, J., Sadevirta, S., Mysore, R., Quagliarini, F., Pasternack, A.,... Yki-Jarvinen, H. (2015). Regulation of Angiopoietin-Like Proteins (ANGPTLs) 3 and 8 by Insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 100(10): E1299-1307.
- Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Shinohara, Y., Fujita, A., y Fujimoto, T. (2009). Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: from the lipid ester globule in the membrane to the visible structure. *Biochim Biophys Acta* 1791(6): 399-407.
- Ong, J. M., y Kern, P. A. (1989). Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue. *J Clin Invest* 84(1): 305-311.
- Ono, M., Shimizugawa, T., Shimamura, M., Yoshida, K., Noji-Sakikawa, C., Ando, Y.,... Furukawa, H. (2003). Protein region important for regulation of lipid metabolism in angiopoietin-like 3 (ANGPTL3): ANGPTL3 is cleaved and activated in vivo. *J Biol Chem* 278(43): 41804-41809.
- Pascual-Corrales, E., Gomez-Ambrosi, J., Moncada, R., Valenti, V., Catalan, V., Rodriguez, A.,... Fruhbeck, G. (2016). Circulating ANGPTL8/Betatrophin Concentrations Are Increased After Surgically Induced Weight Loss, but Not After Diet-Induced Weight Loss. *Obes Surg* 26(8):1881-9.
- Patel, L., Buckels, A. C., Kinghorn, I. J., Murdock, P. R., Holbrook, J. D., Plumpton, C.,... Smith, S. A. (2003). Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 300(2): 472-476.

- Patel, S. D., Rajala, M. W., Rossetti, L., Scherer, P. E., y Shapiro, L. (2004). Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science* 304(5674): 1154-1158.
- Peloso, G. M., Auer, P. L., Bis, J. C., Voorman, A., Morrison, A. C., Stitzel, N. O.,... Cupples, L. A. (2014). Association of low-frequency and rare coding-sequence variants with blood lipids and coronary heart disease in 56,000 whites and blacks. *Am J Hum Genet* 94(2): 223-232.
- Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., Baker, M. B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., y Collins, F. (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269(5223): 540-543.
- Poissonnet, C. M., Burdi, A. R., y Garn, S. M. (1984). The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early Hum Dev* 10(1-2): 1-11.
- Povel, C. M., Beulens, J. W., van der Schouw, Y. T., Dolle, M. E., Spijkerman, A. M., Verschuren, W. M.,... Boer, J. M. (2013). Metabolic syndrome model definitions predicting type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes Care* 36(2): 362-368.
- Proenca, A. R., Sertie, R. A., Oliveira, A. C., Campaa, A. B., Caminhoto, R. O., Chimin, P., y Lima, F. B. (2014). New concepts in white adipose tissue physiology. *Braz J Med Biol Res* 47(3): 192-205.
- Quagliarini, F., Wang, Y., Kozlitina, J., Grishin, N. V., Hyde, R., Boerwinkle, E.,... Hobbs, H. H. (2012). Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(48): 19751-19756.
- Ren, G., Kim, J. Y., y Smas, C. M. (2012). Identification of RIFL, a novel adipocyte-enriched insulin target gene with a role in lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303(3): E334-351.
- Robciuc, M. R., Maranghi, M., Lahikainen, A., Rader, D., Bensadoun, A., Orni, K.,... Jauhainen, M. (2013). Angptl3 deficiency is associated with increased

insulin sensitivity, lipoprotein lipase activity, and decreased serum free fatty acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33(7): 1706-1713.

Rondinone, C. M. (2006). Adipocyte-derived hormones, cytokines, and mediators. *Endocrine* 29(1): 81-90.

Rong Guo, X., Li Wang, X., Chen, Y., Hong Yuan, Y., Mei Chen, Y., Ding, Y.,... Sheng Li, D. (2015). ANGPTL8/betatrophin Alleviates insulin resistance via the Akt-GSK3beta or Akt-FoxO1 pathway in HepG2 Cells. *Exp Cell Res* 345(2):158-67.

Ruan, H., Miles, P. D., Ladd, C. M., Ross, K., Golub, T. R., Olefsky, J. M., y Lodish, H. F. (2002). Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes* 51(11): 3176-3188.

Sachdeva, M. M., y Stoffers, D. A. (2009). Minireview: Meeting the demand for insulin: molecular mechanisms of adaptive postnatal beta-cell mass expansion. *Mol Endocrinol* 23(6): 747-758.

Saely, C. H., Geiger, K., y Drexel, H. (2012). Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology* 58(1): 15-23.

Sethi, J. K., y Vidal-Puig, A. J. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res* 48(6): 1253-1262.

Shapiro, L., y Scherer, P. E. (1998). The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol* 8(6): 335-338.

Shimamura, M., Matsuda, M., Yasumo, H., Okazaki, M., Fujimoto, K., Kono, K.,... Shimomura, I. (2007). Angiopoietin-like protein3 regulates plasma HDL cholesterol through suppression of endothelial lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(2): 366-372.

- Siddiqa, A., Ahmad, J., Ali, A., Paracha, R. Z., Bibi, Z., y Aslam, B. (2016). Structural characterization of ANGPTL8 (betatrophin) with its interacting partner lipoprotein lipase. *Comput Biol Chem* 61: 210-220.
- Siegel, M. J., Hildebolt, C. F., Bae, K. T., Hong, C., y White, N. H. (2007). Total and intraabdominal fat distribution in preadolescents and adolescents: measurement with MR imaging. *Radiology* 242(3): 846-856.
- Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., y Hauner, H. (2007). Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 92(3): 1023-1033.
- Somers, W., Stahl, M., y Sehra, J. S. (1997). 1.9 Å crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO J* 16(5): 989-997.
- Sopasakis, V. R., Sandqvist, M., Gustafson, B., Hammarstedt, A., Schmelz, M., Yang, X.,... Smith, U. (2004). High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator. *Obes Res* 12(3): 454-460.
- Soukas, A., Socci, N. D., Saatkamp, B. D., Novelli, S., y Friedman, J. M. (2001). Distinct transcriptional profiles of adipogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 276(36): 34167-34174.
- Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O.,... Arner, P. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453(7196): 783-787.
- Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M.,... Lazar, M. A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409(6818): 307-312.
- Stitzel, N. O., Stirrups, K. E., Masca, N. G., Erdmann, J., Ferrario, P. G., König, I. R.,... Schunkert, H. (2016). Coding Variation in ANGPTL4, LPL, and SVEP1 and the Risk of Coronary Disease. *N Engl J Med* 374(12): 1134-1144.

- Strausberg, R. L., Feingold, E. A., Grouse, L. H., Derge, J. G., Klausner, R. D., Collins, F. S.,... Marra, M. A. (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26): 16899-16903.
- Sweeney, T. R., Moser, A. H., Shigenaga, J. K., Grunfeld, C., y Feingold, K. R. (2006). Decreased nuclear hormone receptor expression in the livers of mice in late pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290(6): E1313-1320.
- Tang, T., Li, L., Tang, J., Li, Y., Lin, W. Y., Martin, F.,... de Sauvage, F. J. (2010). A mouse knockout library for secreted and transmembrane proteins. *Nat Biotechnol* 28(7): 749-755.
- Taylor, F., Huffman, M. D., Macedo, A. F., Moore, T. H., Burke, M., Davey Smith, G.,... Ebrahim, S. (2013). Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev* (1): CD004816.
- Thaler, J. P., y Schwartz, M. W. (2010). Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology* 151(9): 4109-4115.
- Tokumoto, S., Hamamoto, Y., Fujimoto, K., Yamaguchi, E., Okamura, E., Honjo, S.,... Koshiyama, H. (2015). Correlation of circulating betatrophin concentrations with insulin secretion capacity, evaluated by glucagon stimulation tests. *Diabet Med* 32(5): 653-656.
- Trebotic, L. K., Klimek, P., Thomas, A., Fenzl, A., Leitner, K., Springer, S.,... Kautzky-Willer, A. (2015). Circulating Betatrophin Is Strongly Increased in Pregnancy and Gestational Diabetes Mellitus. *PLoS One* 10(9): e0136701.
- Tseng, Y. H., Ke, P. Y., Liao, C. J., Wu, S. M., Chi, H. C., Tsai, C. Y.,... Lin, K. H. (2014). Chromosome 19 open reading frame 80 is upregulated by thyroid hormone and modulates autophagy and lipid metabolism. *Autophagy* 10(1): 20-31.

- UniProt (2018). UniProtKB - Q6UXH0 (ANGL8\_HUMAN). The UniProt Consortium  
UniProt: the universal protein knowledgebase. Recuperado de:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q6UXH0> [citado 21 de mayo de 2018].
- Van Harmelen, V., Reynisdottir, S., Eriksson, P., Thorne, A., Hoffstedt, J.,  
Lonnqvist, F., y Arner, P. (1998). Leptin secretion from subcutaneous and  
visceral adipose tissue in women. *Diabetes* 47(6): 913-917.
- Van Snick, J. (1990). Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 8: 253-278.
- Verboven, K., Wouters, K., Gaens, K., Hansen, D., Bijnen, M., Wetzels, S.,...  
Jocken, J. W. (2018). Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size,  
lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese  
humans. *Sci Rep* 8(1): 4677.
- von Loeffelholz, C., Pfeiffer, A. F. H., Lock, J. F., Lieske, S., Docke, S.,  
Murahovschi, V.,... Birkenfeld, A. L. (2017). ANGPTL8 (Betatrophin) is  
Expressed in Visceral Adipose Tissue and Relates to Human Hepatic  
Steatosis in Two Independent Clinical Collectives. *Horm Metab Res* 49(5):  
343-349.
- Wajchenberg, B. L. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their  
relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21(6): 697-738.
- Wang, H., Lai, Y., Han, C., Liu, A., Fan, C., Wang, H.,... Shan, Z. (2016). The  
Effects of Serum ANGPTL8/betatrophin on the Risk of Developing the  
Metabolic Syndrome - A Prospective Study. *Sci Rep* 6: 28431.
- Wang, L., Song, J., Wang, C., Lin, P., Liang, K., Sun, Y.,... Chen, L. (2016).  
Circulating Levels of Betatrophin and Irisin Are Not Associated with  
Pancreatic beta-Cell Function in Previously Diagnosed Type 2 Diabetes  
Mellitus Patients. *J Diabetes Res* 2016: 2616539.
- Wang, Y., Gusarova, V., Banfi, S., Gromada, J., Cohen, J. C., y Hobbs, H. H.  
(2015). Inactivation of ANGPTL3 reduces hepatic VLDL-triglyceride  
secretion. *J Lipid Res* 56(7): 1296-1307.

- Wang, Y., McNutt, M. C., Banfi, S., Levin, M. G., Holland, W. L., Gusarova, V.,... Hobbs, H. H. (2015). Hepatic ANGPTL3 regulates adipose tissue energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(37): 11630-11635.
- Wang, Y., Quagliarini, F., Gusarova, V., Gromada, J., Valenzuela, D. M., Cohen, J. C., y Hobbs, H. H. (2013). Mice lacking ANGPTL8 (Betatrophin) manifest disrupted triglyceride metabolism without impaired glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(40): 16109-16114.
- Wawrusiewicz-Kurylonek, N., Telejko, B., Kuzmicki, M., Sobota, A., Lipinska, D., Pliszka, J.,... Gorska, M. (2015). Increased Maternal and Cord Blood Betatrophin in Gestational Diabetes. *PLoS One* 10(6): e0131171.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., y Ferrante, A. W. Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112(12): 1796-1808.
- Wernstedt Asterholm, I., Tao, C., Morley, T. S., Wang, Q. A., Delgado-Lopez, F., Wang, Z. V., y Scherer, P. E. (2014). Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. *Cell Metab* 20(1): 103-118.
- White, U. A., y Tchoukalova, Y. D. (2014). Sex dimorphism and depot differences in adipose tissue function. *Biochim Biophys Acta* 1842(3): 377-392.
- WHO, World Health Organization (2002). The World health report: 2002: reducing risks, promoting healthy life. Ginebra, World Health Organization. Recuperado de: <http://www.who.int/iris/handle/10665/67454> [citado 21 de mayo de 2018].
- WHO, World Health Organization (2008). Waist circumference and waist-hip ratio: report of a WHO expert consultation, Geneva, 8-11 December 2008. Ginebra, World Health Organization. Recuperado de: <http://www.who.int/iris/handle/10665/44583> [citado 21 de mayo de 2018].
- WHO, World Health Organization (2011). Global status report on noncommunicable diseases 2010. Ginebra, World Health Organization.

Recuperado de: [http://www.who.int/nmh/publications/ncd\\_report2010/en/](http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/en/) [citado 21 de mayo de 2018].

WHO, World Health Organization (2016). Consideration of the evidence on childhood obesity for the Commission on Ending Childhood Obesity: report of the ad hoc working group on science and evidence for ending childhood obesity, Geneva, Switzerland. Ginebra, World Health Organization. Recuperado de: <http://www.who.int/iris/handle/10665/206549> [citado 21 de mayo de 2018].

WHO, World Health Organization (2018). Obesity and overweight. Ginebra, World Health Organization. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> [citado 21 de mayo de 2018].

Wu, S., Gao, H., Ma, Y., Fu, L., Zhang, C., y Luo, X. (2016). Characterisation of betatrophin concentrations in childhood and adolescent obesity and insulin resistance. *Pediatr Diabetes* 17(1): 53-60.

Xie, X., Gao, T., Yang, M., Chen, P., Jin, H., Yang, L., y Yu, X. (2015). Associations of betatrophin levels with irisin in Chinese women with normal glucose tolerance. *Diabetol Metab Syndr* 7: 26.

Yamada, H., Kusaka, I., Saikawa, R., Hara, K., Kakei, M. y Ishikawa, S. E. (2018). Relationship Between Angiotensin-Like Protein 8 and Fasting Serum Triglyceride Level. *J Clin Med Res* 10(2): 134-136.

Yamada, H., Saito, T., Aoki, A., Asano, T., Yoshida, M., Ikoma, A.,... Ishikawa, S. E. (2015). Circulating betatrophin is elevated in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Endocr J* 62(5): 417-421.

Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K.,... Kadowaki, T. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7(8): 941-946.

Yang, W. S., Lee, W. J., Funahashi, T., Tanaka, S., Matsuzawa, Y., Chao, C. L.,... Chuang, L. M. (2001). Weight reduction increases plasma levels of an



- adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 86(8): 3815-3819.
- Yi, M., Chen, R. P., Yang, R., Guo, X. F., Zhang, J. C., y Chen, H. (2015). Betatrophin Acts as a Diagnostic Biomarker in Type 2 Diabetes Mellitus and Is Negatively Associated with HDL-Cholesterol. *Int J Endocrinol* 2015: 479157.
- Yi, P., Park, J. S., y Melton, D. A. (2013). Betatrophin: a hormone that controls pancreatic beta cell proliferation. *Cell* 153(4): 747-758.
- Yi, P., Park, J. S., y Melton, D. A. (2014). Perspectives on the activities of ANGPTL8/betatrophin. *Cell* 159(3): 467-468.
- Zhang, F., Basinski, M. B., Beals, J. M., Briggs, S. L., Churgay, L. M., Clawson, D. K.,... Schevitz, R. W. (1997). Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* 387(6629): 206-209.
- Zhang, F., Chen, Y., Heiman, M., y Dimarchi, R. (2005). Leptin: structure, function and biology. *Vitam Horm* 71: 345-372.
- Zang, M., Zuccollo, A., Hou, X., Nagata, D., Walsh, K., Herscovitz, H.,... Cohen, R. A., (2004). AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *J Biol Chem* 279(46): 47898-47905.
- Zhang, R. (2012). Lipasin, a novel nutritionally-regulated liver-enriched factor that regulates serum triglyceride levels. *Biochem Biophys Res Commun* 424(4): 786-792.
- Zhang, R. (2016). The ANGPTL3-4-8 model, a molecular mechanism for triglyceride trafficking. *Open Biol* 6(4): 150272.
- Zhang, R., y Abou-Samra, A. B. (2013). Emerging roles of Lipasin as a critical lipid regulator. *Biochem Biophys Res Commun* 432(3): 401-405.

- Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H., y Cai, D. (2008). Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135(1): 61-73.
- Zhang, Y., Li, R., Meng, Y., Li, S., Donelan, W., Zhao, Y.,... Tang, D. (2014). Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling. *Diabetes* 63(2): 514-525.
- Zhang, Y., Li, S., Donelan, W., Xie, C., Wang, H., Wu, Q.,... Yang, L. J. (2016). Angiopoietin-like protein 8 (betatrophin) is a stress-response protein that down-regulates expression of adipocyte triglyceride lipase. *Biochim Biophys Acta* 1861(2): 130-137.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., y Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372(6505): 425-432.
- Zheng, J., Umikawa, M., Cui, C., Li, J., Chen, X., Zhang, C.,... Zhang, C. C. (2012). Inhibitory receptors bind ANGPTLs and support blood stem cells and leukaemia development. *Nature* 485(7400): 656-660.
- Zielinska, A., Maciulewski, R., Siewko, K., Poplawska-Kita, A., Lipinska, D., Kozłowska, G.,... Szelachowska, M. (2016). Levels of betatrophin decrease during pregnancy despite increased insulin resistance, beta-cell function and triglyceride levels. *Diabetes Metab* 42(6): 409-415.