



Universitat de Girona

# MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL ANABOLISMO LIPÍDICO EN EL TEJIDO ADIPOSO DEL PACIENTE OBESO

**Francisco José ORTEGA DELGADO**

**Dipòsit legal: GI. 1248-2012**

<http://hdl.handle.net/10803/83713>

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

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

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



TESIS DOCTORAL

*MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL  
ANABOLISMO LIPÍDICO EN EL TEJIDO  
ADIPOSO DEL PACIENTE OBESO*

**Francisco José Ortega Delgado**

**2012**





**Universitat de Girona**

**TESIS DOCTORAL**

***MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL  
ANABOLISMO LIPÍDICO EN EL TEJIDO  
ADIPOSO DEL PACIENTE OBESO***

**Francisco José Ortega Delgado**

**2012**

**Ciències Experimentals i Sostenibilitat**

Dirigida por:

**Dr. José Manuel Fernández-Real Lemos**

Memoria presentada para optar al título de doctor por la  
*Universitat de Girona.*





Universitat de Girona

El Dr. **José Manuel Fernández-Real Lemos**, cap de secció del *Departament d'Endocrinologia, Diabetis i Nutrició* de l'*Hospital Dr. Josep Trueta* de Girona, i professor de la facultat de medicina de la *Universitat de Girona*.

CERTIFICO:

Que aquest treball, titulat "*Mecanismos de Regulación del Anabolismo Lipídico en el Tejido Adiposo del Paciente Obeso*", que presenta en **Francisco José Ortega Delgado** per a l'obtenció del títol de doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció i que compleix els requeriments per poder optar a aquest títol.

**Dr. José Manuel Fernández-Real**

Girona, 30 d'Abril del 2012



*“Junto con los demás, a quienes les había ocurrido lo mismo (¡tanto es el poder de las pociones!), fui encerrado en una pocilga; sólo Euríloco, según vimos, se libró de la figura de cerdo; sólo él había rechazado la taza que le había sido ofrecida.”*

*Metamorfosis de Ovidio;  
Libro XIV: Circe y Ulises.*

*“El médico que sólo de medicina sabe, ni medicina sabe.”*

*Dr. Letamendi.*





## *Agradecimientos*

La *Biología*, ciencia descriptiva en esencia, contemplativa y paciente, pretérita y vasta como sólo ella es, une sus esfuerzos ahora con las denominadas *Ciencias de la Salud* para originar una nueva disciplina: la *Biomedicina*. De este modo biólogos como yo tratan de hacerse valer en un campo que por derecho (que no por tradición) empieza a ser también *nuestro* campo. Y esto es posible gracias a unos pocos visionarios que han confiado en nosotros, los biólogos, y nuestra ciencia, la *Biología*, por encima de los viejos clichés. Doy gracias de todo corazón al **Dr. Wifredo Ricart** y, muy especialmente, al **Dr. José Manuel Fernández-Real** por la confianza depositada en mi capacidad profesional y por instruirme en este estimulante campo de investigación, permitiéndome hacer de él, más que una forma de ganarme la vida, una afición, casi una obsesión.

Nada de lo que hago sería posible sin la contribución y el apoyo de las personas que constituyen mi equipo de investigación, con el que siento y me identifico como pocas veces antes: gracias a la **Dra. Belén Peral**, investigadora titular del CSIC en Madrid, y a todos los miembros de su equipo; al **Dr. José María Moreno**, viejo amigo y compañero de fatigas, a **Gerard Pardo**, **Mónica Sabater**, **Oscar Rovira**, **Roser Rodríguez**; a la **Dra. Marta Serrano**, a **Emili García**, y, con todo mi afecto, a **Neus Pueyo**, por acompañarme en este camino y contribuir a hacerlo tan ameno. Gracias por ser, mucho más que compañeros de trabajo, auténticos amigos.

Dentro de esta misma categoría, la de los amigos con los que compartir las batallas, con todas sus victorias y las numerosas derrotas, aprovecho para destacar y agradecer también la amistad y el apoyo de otros buenos biólogos y mejores amigos: a **Pere Tubert**, **Albert Ribas** y a **Miquel Ribot**; y a **Silvia Cufí** y **Ana Bosch**, por estar ahí, sólo por estar ahí conmigo, muchas gracias.

Y, hablando de personas a destacar, no puedo dejar de agradecer con todo mi corazón a mi padre, **Paco Ortega**, mi madre, **M<sup>a</sup> Dolores Delgado**, y mi hermano, **Alberto Ortega**, el amor y apoyo completamente incondicional que día a día me procesan, creyendo en mí mucho más de lo que yo nunca llegaré a creer.

A todos vosotros, muchísimas gracias.

*Paco Ortega. Girona, Abril del 2012.*



## Artículos

La siguiente tesis se presenta en base a una recopilación de 4 artículos científicos escritos y publicados en revistas de investigación biomédica por el autor de la misma:

**Artículo #1: Ortega FJ**, Moreno-Navarrete JM, Ribas V, Esteve E, Rodriguez-Hermosa JI, Ruiz B, Peral B, Ricart W, Zorzano A, Fernández-Real JM. *Subcutaneous fat shows higher thyroid hormone receptor-alpha1 gene expression than omental fat*. *Obesity (Silver Spring)*. 2009 Dec; 17(12):2134-41. Epub 2009 Apr 9. PMID: 19360007 [PubMed - indexed for MEDLINE]

**Artículo #2: Ortega FJ**, Mayas D, Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Esteve E, Rodriguez-Hermosa JI, Ruiz B, Ricart W, Peral B, Fruhbeck G, Tinahones FJ, Fernández-Real JM. *The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects*. *Obesity (Silver Spring)*. 2010 Jan; 18(1):13-20. Epub 2009 Jun 18. PMID: 19543203 [PubMed - indexed for MEDLINE]

**Artículo #3: Ortega FJ**, Vazquez-Martin A, Moreno-Navarrete JM, Bassols J, Rodriguez-Hermosa J, Gironés J, Ricart W, Peral B, Tinahones FJ, Fruhbeck G, Menendez JA, Fernández-Real JM. *Thyroid hormone responsive Spot 14 increases during differentiation of human adipocytes and its expression is down-regulated in obese subjects*. *Int J Obes (Lond)*. 2010 Mar; 34(3):487-99. Epub 2009 Dec 22. PMID: 20029374 [PubMed - indexed for MEDLINE]

**Artículo #4: Ortega FJ**, Macek Jílková Z, Moreno-Navarrete JM, Pavelka S, Rodriguez-Hermosa JI, Kopecký J, Fernández-Real JM. *Type I 5'-deiodinase mRNA and activity is increased in adipose tissue of obese subjects*. *Int J Obes (Lond)*. 2012 Feb; 36(2):320-4. Epub 2011 May 24. PMID: 21610697 [PubMed - as supplied by publisher]

*Obesity (Silver Spring)* tiene un factor de impacto de **3,531** y está clasificada en la posición decimotercera (13<sup>a</sup>; primer cuartil) entre las 70 revistas de investigación biomédica incluidas en la categoría de *Nutrición y Dietética*. *International Journal of Obesity (London)* tiene un factor de impacto de **5,125** y está clasificada en la cuarta posición (4<sup>a</sup>; primer cuartil) entre las revistas incluidas en esta categoría (©2010 *Journal Citation Reports*, publicado por Thomson Reuters).



# *Índice General*

ÍNDICE GENERAL	<i>i</i>
LISTADO DE ABREVIACIONES	<i>iii</i>
<b>1.1 - RESUMEN</b>	<b>1.</b>
<b>1.2 - RESUM</b>	<b>3.</b>
<b>1.3 - SUMMARY</b>	<b>5.</b>
<b>2 - INTRODUCCIÓN</b>	
<b>2.1 - La obesidad</b>	<b>7.</b>
2.1.1 - Definición	7.
2.1.2 - Epidemiología y complicaciones asociadas	8.
2.1.3 - Etiopatogenia	12.
<b>2.2 - El tejido adiposo</b>	<b>19.</b>
2.2.1 - El tejido adiposo	19.
2.2.2 - Fisiopatología del tejido adiposo	22.
2.2.3 - El adipocito	25.
<b>2.3 - El metabolismo lipídico</b>	<b>29.</b>
2.3.1 - Lipogénesis	29.
2.3.2 - Lipólisis	32.
<b>2.4 - Vias de regulación endocrina</b>	<b>35.</b>
2.4.1 - La insulina	35.
2.4.2 - Las hormonas tiroideas	37.
<b>3 - HIPÓTESIS</b>	<b>43.</b>
<b>4 - OBJETIVOS</b>	<b>45.</b>

5 - METODOLOGÍA	47.
6 - ARTÍCULOS	
<b>6.1 - Artículo #1:</b>	<b>59.</b>
<p><b>Ortega FJ, Mayas D, Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Esteve E, Rodríguez-Hermosa JL, Ruiz B, Ricart W, Peral B, Fruhbeck G, Tinahones FJ, Fernández-Real JM. <i>The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. Obesity (Silver Spring). 2010 Jan; 18(1):13-20.</i></b></p>	
<b>6.2 - Artículo #2:</b>	<b>67.</b>
<p><b>Ortega FJ, Vazquez-Martin A, Moreno-Navarrete JM, Bassols J, Rodríguez-Hermosa J, Gironés J, Ricart W, Peral B, Tinahones FJ, Fruhbeck G, Menendez JA, Fernández-Real JM. <i>Thyroid hormone responsive Spot 14 increases during differentiation of human adipocytes and its expression is down-regulated in obese subjects. Int J Obes (Lond). 2010 Mar; 34(3):487-99.</i></b></p>	
<b>6.3 - Artículo #3:</b>	<b>81.</b>
<p><b>Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Ribas V, Esteve E, Rodríguez-Hermosa JL, Ruiz B, Peral B, Ricart W, Zorzano A, Fernández-Real JM. <i>Subcutaneous fat shows higher thyroid hormone receptor-alpha1 gene expression than omental fat. Obesity (Silver Spring). 2009 Dec; 17(12):2134-41.</i></b></p>	
<b>6.3 - Artículo #4:</b>	<b>89.</b>
<p><b>Ortega FJ, Macek Jílková Z, Moreno-Navarrete JM, Pavelka S, Rodríguez-Hermosa JL, Kopecký J, Fernández-Real JM. <i>Type I 5'-deiodinase mRNA and activity is increased in adipose tissue of obese subjects. Int J Obes (Lond). 2012 Feb; 36(2):320-4.</i></b></p>	
7 - DISCUSIÓN	95.
8 - CONCLUSIONES	105.
9 - BIBLIOGRAFÍA	107.

## *Listado de abreviaciones*

<b>ACC</b>	<i>Enzima carboxilasa para la acetil-Coenzima A</i>
<b>AdipoQ</b>	<i>Adiponectina</i>
<b>ATGL</b>	<i>Lipasa para triglicéridos del tejido adiposo</i>
<b>BAT</b>	<i>Tejido adiposo marrón</i>
<b>CART</b>	<i>Regulador de la transcripción de receptores de anfetamina y cocaína</i>
<b>CLA</b>	<i>Acido linoleico conjugado</i>
<b>CRH</b>	<i>Hormona liberadora de corticotropina</i>
<b>CS</b>	<i>Suero bovino</i>
<b>Ct</b>	<i>Ciclo térmico</i>
<b>DAG</b>	<i>Diacilglicerol</i>
<b>DIO</b>	<i>Desyodasas</i>
<b>DM2</b>	<i>Diabetes mellitus de tipo 2</i>
<b>DMEM</b>	<i>Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco</i>
<b>DXM</b>	<i>Dexametasona</i>
<b>FAs</b>	<i>Ácidos grasos</i>
<b>FASN</b>	<i>Enzima sintetizadora de ácidos grasos</i>
<b>FBS</b>	<i>Suero fetal bovino</i>
<b>FSIVGTT</b>	<i>Prueba modificada de tolerancia a la glucosa con muestras frecuentes</i>
<b>GF</b>	<i>Factor de crecimiento</i>
<b>GK</b>	<i>Glucokinasa</i>
<b>GLUT4</b>	<i>Molécula transportadora de glucosa de tipo 4</i>
<b>Hb</b>	<i>Hemoglobina</i>
<b>HbA1c</b>	<i>Hemoglobina glicada o glicosilada</i>
<b>HDL</b>	<i>Lípidos de alta densidad</i>
<b>HEPES</b>	<i>Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico</i>
<b>hnRNP</b>	<i>Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas</i>
<b>HOMA</b>	<i>Modelo homeostático de resistencia a la insulina</i>
<b>S14</b>	<i>Elemento de respuesta a hormona tiroidea 'Spot-14'</i>
<b>IBMX</b>	<i>Isobutil metilxantina</i>
<b>ICC</b>	<i>Índice cintura-cadera</i>
<b>IL</b>	<i>Interleucina</i>
<b>IMC</b>	<i>Índice de masa corporal</i>
<b>IRS</b>	<i>Sustrato receptor para la insulina</i>
<b>LIF</b>	<i>Factor inhibidor de la leucemia</i>
<b>LIPE</b>	<i>Lipasa sensible a hormonas</i>
<b>L-PK</b>	<i>Piruvato kinasa</i>
<b>LPL</b>	<i>Lipoproteína lipasa</i>
<b>MAG</b>	<i>Monoacilglicerol</i>



<b>MA<sub>s</sub></b>	<i>Adipocitos maduros</i>
<b>MCH</b>	<i>Melanocitos</i>
<b>MEC</b>	<i>Medio extracelular</i>
<b>MGL</b>	<i>Lipasa para monoglicéridos</i>
<b>MSH</b>	<i>Melanocortinas</i>
<b>OGTT</b>	<i>Test de sobrecarga oral de glucosa</i>
<b>OM</b>	<i>Tejido adiposo omental, visceral o abdominal.</i>
<b>OMS</b>	<i>Organización Mundial de la Salud</i>
<b>P/S</b>	<i>Penicilina/ Streptomycin</i>
<b>pCr</b>	<i>Proteína C reactiva</i>
<b>PGC1<sub>a</sub></b>	<i>Coactivadores del PPAR</i>
<b>POMC</b>	<i>Pro-opiomelanocortina</i>
<b>PPAR</b>	<i>Receptores del factor de proliferación del peroxisoma activado</i>
<b>PPIA</b>	<i>Isomerasa peptidil-prolil A</i>
<b>Pref-1</b>	<i>Factor 1 de pre-adipocitos</i>
<b>PUFAs</b>	<i>Ácidos grasos polinsaturados</i>
<b>RBP4</b>	<i>Proteína 4 de unión a retinol</i>
<b>Rs</b>	<i>Rosiglitazona</i>
<b>RXR</b>	<i>Receptores X del ácido retinoico</i>
<b>SC</b>	<i>Tejido adiposo subcutáneo o parietal</i>
<b>SCD</b>	<i>Enzima desaturasa para el estearoil-Coenzima A</i>
<b>SEEDO</b>	<i>Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad</i>
<b>SF2</b>	<i>Proteínas ricas en serinas y argininas</i>
<b>S<sub>I</sub></b>	<i>Índice de sensibilidad a la insulina</i>
<b>SREBP</b>	<i>Proteína de unión a elementos reguladores del esteroil</i>
<b>SVCs</b>	<i>Células del estroma-vascular</i>
<b>T<sub>2</sub></b>	<i>3, 3'-Diodotironina</i>
<b>T<sub>3</sub></b>	<i>3, 5, 3'-Triiodotironina</i>
<b>T<sub>4</sub></b>	<i>Tiroxina</i>
<b>TAG</b>	<i>Triglicéridos</i>
<b>THs</b>	<i>Hormonas tiroideas</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Factor alpha de necrosis tumoral</i>
<b>TR</b>	<i>Receptor para hormonas tiroideas</i>
<b>TRE</b>	<i>Elementos de respuesta a hormonas tiroideas</i>
<b>TSH</b>	<i>Hormona tirotrópica o estimuladora para la producción de THs</i>
<b>UCP-1</b>	<i>Proteína de desacoplamiento mitocondrial 1</i>
<b>WAT</b>	<i>Tejido adiposo blanco</i>

---

*1/- Resumen*

---



## 1.1- Resumen

La obesidad es actualmente uno de los problemas de salud pública más importante a nivel mundial. El tejido adiposo cuenta con grandes depósitos intra-abdominales (situados alrededor del epiplón, los intestinos y las áreas perirenales) y subcutáneos (en las nalgas, muslos y abdomen) que presentan propiedades bioquímicas únicas y perfiles de expresión propios, incluidos programas de lipogénesis y lipólisis específicos.

La expresión de factores críticos para la biosíntesis de ácidos grasos, como la *enzima carboxilasa para la acetil-Coenzima A* (ACC) y la *enzima sintetizadora de ácidos grasos* (FASN), están controlados por condicionantes nutricionales y hormonales. El *elemento de respuesta a hormona tiroidea 'Spot-14'* (S14) se encuentra también en células lipogénicas y está regulado por factores hormonales. La *hormona tiroidea* (TH) es un potente inductor de la lipogénesis. Los transcritos del gen *c-erbA-a* codifican para dos isoformas de *receptores alpha para hormonas tiroideas* (TR $\alpha$ 1 y TR $\alpha$ 2). El balance entre TR $\alpha$ 1 y TR $\alpha$ 2 depende del tejido y está relacionado con la familia de *proteínas ricas en serinas y argininas* (SF2) y las *ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas* (hnRNP). Los múltiples efectos de las THs dependen de la *3,5,3'-triiodo-L-tironina* (T<sub>3</sub>) que se produce en tejidos periféricos mediante una reacción catalizada por las *iodotironinas desyodasas* (DIOs). La actividad de las DIOs en el tejido adiposo puede ser alterada por la leptina y condiciones que modifican el grado de adiposidad.

Los datos que se muestran a continuación son compatibles con la noción de que la obesidad y la resistencia a la insulina alteran la actividad lipogénica del tejido adiposo. La reducción de la lipogénesis, representada por las expresiones de FASN y ACC (factores clave en el anabolismo lipídico), responde a procesos fisiológicos naturales cuando se alcanza un determinado grado de adiposidad. Acorde con este primer hallazgo, se demostró que la expresión del factor hS14 está vinculada a la diferenciación del adipocito (adipogénesis) y la expresión de enzimas lipogénicas, e inversamente asociada con el porcentaje de grasa corporal y marcadores de resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 como la glucosa basal y la hemoglobina glicosilada.

Por otro lado, la grasa subcutánea presenta una mayor expresión del TR $\alpha$  y una relación TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 más alta respecto al tejido adiposo omental.

Las diferencias regionales detectadas en la relación TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 pueden ser explicadas a través de la relación hnRNP A1:SF2, también diferente en el adiposo omental y el subcutáneo. La mayor expresión de TR $\alpha$ 1 en el tejido adiposo subcutáneo implica su posible contribución en la expansibilidad de este tejido, y explicaría la mayor capacidad para la diferenciación de los adipocitos que lo constituyen. Las diferencias detectadas en la expresión del hS14 para ambos depósitos de grasa podría ser un ejemplo de esta capacidad.

Finalmente, y en armonía con las observaciones realizadas previamente en ratones, se demostró la existencia de un incremento en la actividad y la expresión de la *desyodasa 1* (D1) en el tejido adiposo hipertrófico del paciente obeso. Estos hallazgos sugieren el posible rol de D1 como vínculo efectivo entre la obesidad, la leptina y las THs, y sus respectivos efectos en el metabolismo y la homeostasis del tejido adiposo.

Los resultados que recogen esta tesis apuntan que la producción de T<sub>3</sub>, el estado de diferenciación y la capacidad lipogénica de los adipocitos del paciente obeso están alterados, e indican importantes diferencias entre los depósitos de tejido adiposo omental y subcutáneo.

## 1.2- Resum

L'obesitat és actualment un dels problemes de salut pública més important a nivell mundial. El teixit adipós presenta grans depòsits intra-abdominals (situats al voltant de l'epipló, els intestins i las àrees perirenals) i subcutanis (a les natges, cuixes i abdomen) que es caracteritzen per propietats bioquímiques úniques i perfils d'expressió propis, inclosos programes de lipogènesis i lipòlisis específics.

L'expressió de factors crítics per la biosíntesis d'àcids grassos, com l'enzim carboxilasa per l'acetil-Coenzim A (ACC) i l'enzim sintetitzador d'àcids grassos (FASN), estan controlats per condicionants nutricionals i hormonals. L'element de resposta a hormona tiroidea 'Spot-14' (S14) es troba també a les cèl·lules lipogèniques i està regulat per factors hormonals. L'hormona tiroidea (TH) és un potent inductor de la lipogènesis. Els transcrits del gen *c-erbA-a* codifiquen per dues isoformes de receptors *alpha per hormones tiroidees* (TR $\alpha$ 1 i TR $\alpha$ 2). El balanç entre el TR $\alpha$ 1 i el TR $\alpha$ 2 depèn del teixit i està relacionat amb la família de proteïnes riques en serines i arginines (SF2) i les ribonucleoproteïnes nuclears heterogènies (hnRNP). Els múltiples efectes de les THs depenen de la 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T<sub>3</sub>) que es produeix als teixits perifèrics mitjançant una reacció catalitzada per les iodetironines desiodases (DIOs). L'activitat de les DIOs al teixit adipós pot ser alterada per la leptina i condicions que modifiquen el grau d'adipositat.

Les dades que es recullen a continuació són compatibles amb la noció de que l'obesitat i la resistència a la insulina alteren l'activitat lipogènica del teixit adipós. La reducció de la lipogènesis, representada per l'expressió de FASN i ACC (factors claus per l'anabolisme lipídic), respon a processos fisiològics naturals quan s'assoleix un cert grau d'adipositat. En concordança amb aquesta primera troballa, es va demostrar que l'expressió del factor hS14 està vinculada a la diferenciació de l'adipòcit (adipogènesis) i l'expressió d'enzims lipogènics, i inversament relacionada amb el percentatge de greix corporal i marcadors de resistència a la insulina i diabetis tipus 2 com la glucosa basal i l'hemoglobina glicosilada.

D'altra banda, el greix subcutani està caracteritzat per l'alta expressió del TR $\alpha$  i una major relació TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 respecte al teixit adipós omental. Les diferències regionals detectades en la relació TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 poden ser explicades

a través de la relació hnRNP A1:SF2, també diferent al teixit adipós omental i subcutani. L'alta expressió del TR $\alpha$ 1 al teixit adipós subcutani implica la seva possible contribució a l'expansibilitat d'aquest teixit, i pot explicar la major capacitat per la diferenciació dels adipòcits que el constitueixen. Les diferències detectades per l'expressió de l'hS14 entre ambdós dipòsits de greix podria ser un exemple d'aquesta capacitat.

Finalment, en harmonia amb les observacions realitzades prèviament en ratolins, es va demostrar l'existència d'un increment a l'activitat i l'expressió de la *desiodasa 1* (D1) al teixit adipós hipertròfic del pacient obès. Aquestes troballes suggereixen el possible rol de la D1 com a pont efectiu entre l'obesitat, la leptina i les THs, i els seus respectius efectes sobre el metabolisme i l'homeòstasi del teixit adipós.

Els resultats que recullen aquesta tesis apunten que la producció de T<sub>3</sub>, l'estat de diferenciació i la capacitat lipogènica dels adipòcits del pacient obès estan alterats, i indiquen importants diferències entre els dipòsits de teixit adipós omental i subcutani.

### 1.3- Summary

Obesity is one of the most important public health problems facing the world today. Adipose tissue has major intra-abdominal (around the omentum, intestines, and perirenal areas) and subcutaneous (in the buttocks, thighs, and abdomen) depots which are characterized by unique biochemical properties, and different expression profiles, including specific lipogenic and lipolytic programs.

The levels of critical factors in fatty acid biosynthesis such as *acetyl-coenzyme A carboxylase* (ACC) and *fatty acid synthase* (FASN) are tightly controlled by nutritional and hormonal conditions. The *thyroid hormone responsive element 'Spot 14'* (S14) is found in lipogenic cells, and is also strongly linked to hormonal mediators. *Thyroid hormones* (THs) are powerful inducers of lipogenesis. Transcripts from the *c-erbA- $\alpha$*  gene code for two major *thyroid hormone receptors alpha* isoforms (TR $\alpha$ 1 and TR $\alpha$ 2). The balance between TR $\alpha$ 1 and TR $\alpha$ 2 is tissue-specific and is linked to the family of *serine-arginine rich proteins* (SF2) and the *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNP). The multiple effects of THs depend on the *3,5,3'-triiodo-L-thyronine* (T<sub>3</sub>) which is mainly generated in peripheral tissues by the action of *iodothyronine deiodinases* (DIOs). DIOs' activity in adipose tissue can be altered by leptin and under conditions of changing adiposity.

The findings reported here are compatible with the notion that obesity and insulin resistance may down-regulate lipogenesis in adipose tissue. The reduction of lipogenesis, assessed through decreased FASN and ACC expressions (main key-factors of the anabolism of lipids), follows natural physiological processes when increased adiposity reaches some levels. In agreement, we demonstrated that hS14 expression in adipose tissue is directly associated with adipogenesis and the expression of lipogenic enzymes, but inversely related to the percent of fat and markers of insulin resistance and type 2 diabetes such as fasting glucose and glycated hemoglobin.

On the other hand, subcutaneous fat was characterized by higher TR $\alpha$  gene expression and ratio TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 than omental fat. Regional differences in TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 ratio may be explained through hnRNP A1:SF2 ratio, specific for each fat depot. The higher expression of TR $\alpha$ 1 in subcutaneous fat suggests the contribution of this receptor to subcutaneous fat expandability



and may explain the higher capacity of subcutaneous adipocytes to differentiate. Depot-related differences in hS14 expression may reflect that capacity, higher in subcutaneous than in omental adipose tissue.

Finally, the findings of differential deiodinase activity and gene expression in human fat depots, which are consistent with previous observations in mice, document increased activity and expression of *deiodinase 1* (D1) in hypertrophic adipose tissue from obese subjects. This suggests the potential role of D1, which may account for the relationship among obesity, leptin, and THs, and their effects on adipose tissue metabolism and homeostasis.

The results of this thesis pointed out increased  $T_3$  generation, and the impaired differentiation and lipogenic capacity of adipocytes from obese subjects, and suggest important differences between omental and subcutaneous adipose tissue.

---

## *2/- Introducción*

---



## 2.1- La obesidad

### 2.1.1- Definición

La obesidad se define como una acumulación anormal y/o excesiva de tejido adiposo que puede ser perjudicial para la salud e incluye tanto un exceso de la grasa corporal total (detectado en adultos mediante el *índice de masa corporal* (IMC)), como una distribución anormal y localizada en torno a la región abdominal (identificada mediante el *índice cintura-cadera* (ICC)).

El IMC, también conocido como *índice de Quetelet* (Lambert A. J. Quetelet, 1796-1874), es el parámetro antropométrico más ampliamente utilizado para determinar el sobrepeso y la obesidad en adultos (Eknoyan 2008). Estrechamente relacionado con el porcentaje de grasa corporal, se determina mediante la fórmula  $IMC = \text{peso} / (\text{altura})^2$ , donde el peso en kilogramos se divide por el cuadrado de la altura en metros.

La *Organización Mundial de la Salud* (OMS) define el sobrepeso en adultos con un IMC igual o superior a 25 kg/m<sup>2</sup>, y la obesidad con un IMC igual o superior a 30 (OMS, <http://www.who.int/es/>). La obesidad mórbida es el diagnóstico clínico que se aplica a aquellos pacientes que presentan un peso corporal de más de 45 kg por encima de su peso ideal en función de la edad, estatura, constitución y sexo, o un valor igual o mayor a 40 kg/m<sup>2</sup> para el IMC. Dentro de esta misma clasificación encontramos el criterio de infrapeso o malnutrición definido por un IMC inferior a 18,5 kg/m<sup>2</sup>.

El porcentaje de grasa corporal puede determinarse a partir del IMC, considerando también la edad y el sexo, mediante la *ecuación de Deurenberg* (Deurenberg, van der Kooy et al. 1991), según la cual el  $\% \text{ de grasa corporal} = 1,2*(IMC) + 0,23*(edad) - 10,8*(sexo) - 5,4$ , donde el sexo equivale a 1 para los hombres y 0 para las mujeres. Con un error estándar del 4% y a pesar de las irregularidades descritas (Deurenberg, Andreoli et al. 2001) esta ecuación es capaz de detectar hasta el 80% de variación en el porcentaje de grasa corporal de un mismo sujeto.

Los porcentajes de grasa corporal superiores al 25% en hombres y al 35% en mujeres se interpretan también como indicadores de obesidad, y valores entre el 21 y el 25% en hombres y entre el 31 y el 35% en mujeres limitan los rangos que definen el sobrepeso. Estos criterios de clasificación, así como la relación existente entre el IMC y los porcentajes de grasa corporal, pueden diferir notablemente entre poblaciones (Fernandez-Real, Vayreda et al. 2001).

La *Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad* (SEEDO) recomienda el uso de la antropometría considerando valores subsidiarios como el peso, la talla, las circunferencias corporales (perímetro de la cintura y la cadera) y los pliegues

cutáneos, según la edad y el sexo, para diagnosticar y valorar los casos de obesidad. Existen numerosos sistemas, ampliamente utilizados por profesionales de la medicina y el deporte, para determinar la composición corporal, el porcentaje de grasa y su aplicación en estudios epidemiológicos (Moon, Hull et al. 2007).

El papel de este tejido adiposo ha sido históricamente mejor considerado en el contexto de los beneficios que se le atribuían que a través de su potencial fisiopatogénico. Existen estudios que demuestran que las personas con un sobrepeso moderado presentan un menor índice de mortalidad por enfermedad en general y no muestran mayores índices de mortalidad por enfermedad cardiovascular o cáncer (Flegal, Graubard et al. 2007). Actualmente sabemos que no se trata tanto de la presencia de este exceso de grasa corporal como de su calidad y distribución lo que puede representar o no una amenaza para la salud.

En referencia a este aspecto, se utiliza el ICC como marcador antropométrico para la obesidad de carácter central u abdominal y como mejor indicador del riesgo de padecer enfermedades comúnmente asociadas a la obesidad (Canoy, Boekholdt et al. 2007). Este índice se obtiene mediante la división del perímetro de la cintura (medido a la altura de la última costilla flotante) por el perímetro máximo de la cadera (a la altura de los glúteos). En adultos se consideran ICCs adecuados los valores entre 0,78 y 0,94 para varones, y entre 0,71 y 0,85 para mujeres. Aquellos sujetos cuyos ICCs superan estos rangos presentan *obesidad androide* (o *de cuerpo de manzana*), mientras que valores inferiores definen la *obesidad ginoide* (o *de cuerpo de pera*). La *obesidad androide* supone un problema de obesidad central, caracterizada mayormente por la acumulación de tejido adiposo visceral, y conlleva un mayor riesgo para la salud. La actividad endocrina e inflamatoria de este tejido adiposo omental hiperplásico y disfuncional puede afectar de forma más directa a los órganos que envuelve y protege, además de liberar, directamente al torrente sanguíneo a través de la vena porta, las moléculas que produce (Bays, Rodbard et al. 2007).

## **2.1.2- Epidemiología y complicaciones asociadas**

Los datos obtenidos por la *Organización Mundial de la Salud* indican que 1,6 miles de millones de personas en el mundo presentan sobrepeso y que como mínimo 400 millones padecen obesidad. Se calcula además que, si la tendencia no cambia, en el 2.015 habrán 2,3 billones de personas con sobrepeso de entre las cuales más de 700 millones serán obesas (OMS, <http://www.who.int/es/>).

En los Estados Unidos de Norteamérica el porcentaje de personas con problemas de obesidad ha pasado, en los últimos 30 años, del 15 al 33% en adultos; del 5 al 14% en niños de entre 2 y 5 años; del 7 al 19% en niños de entre 6 y 11 años; y

del 5 al 17% en adolescentes (*Bays, Gonzalez-Campoy et al. 2008*). Los estudios consecutivos sobre la epidemia de la obesidad de *The National Health Examination Survey* (NHES) y *The National Health and Nutrition Examination Surveys* (NHANES) ponen de relieve un incremento exponencial de los casos de obesidad en la población americana. Estos estudios, realizados entre el 1960-1962 (NHES), el 1971-1975 (NHANES I), el 1976-1980 (NHANES II), y el 1999-2000 (NHANES 1999-2000), detectaron en adultos de entre 20 y 80 años un alarmante incremento del porcentaje de obesos pasando del 14,6% en el año 1960 al 30,4% 40 años después (*Wilborn, Beckham et al. 2005*).

La incidencia de la obesidad en Europa oscila entre el 15 y el 20%. En nuestro país, los estudios de la *Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO)* describían en el 2005 la distribución ponderal de una muestra aleatoria de la población global española de entre 25 y 64 años con una prevalencia de obesidad del 15,5% (el 13,2% de los hombres y el 17,5% de las mujeres), considerando un incremento considerable a partir de los 45 años asociado a bajos niveles culturales y ámbitos preferiblemente urbanos (*Salas-Salvado, Rubio et al. 2007*). En conjunto, se estima que el exceso ponderal afecta al 54,7% de la población española de entre 25 y 64 años (*Aranceta-Bartrina, Serra-Majem et al. 2005*).

La obesidad en la infancia es un importante factor predictivo para problemas de obesidad en la edad adulta dado que el riesgo de perpetuar la obesidad es hasta 2 veces superior en niños obesos (*Kuczmarski, Flegal et al. 1994; Carrascosa 2006*). De este modo, el porcentaje de niños obesos que muy probablemente lo seguirán siendo en la edad adulta aumenta con la edad y el grado de obesidad y varía entre el 26 y el 41% de los preescolares, y hasta el 63% en el caso de escolares y adolescentes (*Kuczmarski, Flegal et al. 1994*).

La distribución de la obesidad infantil no es, sin embargo, igual en las distintas comunidades autónomas de nuestro país, tal y como indicaba el estudio *SEEDO'97* hace más de 10 años (*Aranceta, Perez-Rodrigo et al. 2001*). En Cataluña, por ejemplo, *Serra et al. (Serra, Castell et al. 2003)* describían porcentajes de obesidad infantil entorno al 7%. En el período del 1992 al 2004 se registraron aumentos del 12,2% en la prevalencia de sobrepeso y obesidad en infantes para el total de la población española. Los resultados del estudio *ENKID* permitieron estimar en infantes y juveniles una incidencia de la obesidad del 13,9%, con un 12,4% de sobrepeso, lo que tipifica un 26,3% de la población española de entre 2 y 24 años con sobrecarga ponderal (*Aranceta-Bartrina, Serra-Majem et al. 2005*).

Estos estudios muestran la evolución histórica de un problema de salud de gran impacto mundial e importante coste económico. En 1999, sólo en los EUA, el gasto derivado del tratamiento de enfermedades asociadas a la obesidad fue de aproximadamente 24 billones de dólares (*Colditz 1999*). A partir del 2003, entre el 5 y

el 7% del total del gasto anual en cuidados médicos fue destinado a solucionar problemas derivados del sobrepeso y la obesidad. En la Unión Europea el gasto sanitario aplicado a problemas vinculados al exceso de peso suponen ya más del 5% del gasto total en medicina clínica y el problema sigue creciendo año tras año (Scarborough, Bhatnagar et al.; von Lengerke and Krauth; McCormick and Stone 2007; Durden, Huse et al. 2008; Hojgaard, Olsen et al. 2008).

La obesidad representa un importante factor de riesgo para numerosas enfermedades como cardiopatías y accidentes vasculares cerebrales (que, con más de 17 millones de muertes anuales, representan la principal causa de muerte en todo el mundo), la diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), enfermedades del aparato motor como la artrosis, y algunos tipos de cáncer como el de endometrio, mama y colon. La obesidad infantil, cuya incidencia crece año tras año a nivel mundial, se asocia a una mayor probabilidad de muerte prematura y discapacidad en la edad adulta (OMS, 2008).

El denominado *síndrome metabólico* se caracteriza por un conjunto de factores de riesgo para la salud que incluyen una excesiva acumulación de grasa visceral (u *obesidad central*), desórdenes en las concentraciones de lípidos circulantes (*dislipidemia*), incluida la *trigliceridemia* (concentraciones de triglicéridos circulantes >200mg/dL de sangre, y concentraciones de colesterol HDL <37mg/dL en hombres y <47mg/dL en mujeres), hipertensión arterial (>130/85mmHg), resistencia a la insulina, un estado protrombótico crónico (caracterizado por una elevada concentración de fibrinógeno y otros factores de coagulación en la sangre) y un estado inflamatorio sostenido (definido por las altas concentraciones de proteína C-reactiva, IL-6 y TNF- $\alpha$ , entre otras citocinas, no vinculadas a ninguna causa local o inflamación aguda), entre otros (Bjorntorp 1997; Cuspidi, Sala et al. 2008; Olufadi and Byrne 2008). El *síndrome metabólico* lleva el problema de la obesidad a su máximo exponente y la consecuencia previsible es, entre otras, la DM2, graves problemas cardiovasculares y la muerte prematura (Cuspidi, Valerio et al. 2008; Cuspidi, Valerio et al. 2009).

### 2.1.2-1. *Enfermedad cardiovascular e hipertensión*

La obesidad es uno de los mayores factores de riesgo para enfermedad cardiovascular. El tejido adiposo hipertrófico y disfuncional del sujeto obeso produce factores proinflamatorios que inducen un estrés sistémico crónico y libera lípidos al torrente sanguíneo (Vazzana, Santilli et al.). En consecuencia, la presión sanguínea aumenta de forma directamente proporcional al porcentaje de grasa corporal, especialmente al incremento de los depósitos de grasa intrabdominal (Oren, Grossman et al. 1996). El aumento de la presión sanguínea equivale, junto a una mayor tasa de deposición ectópica de grasas y factores de coagulación, a una mayor velocidad en la

formación y ruptura de placas arterioscleróticas (Rauch, Osende et al. 2001). La obesidad promueve también la aparición de arritmias y taquicardias ventriculares y supraventriculares en personas obesas que tienen, por regla general, una frecuencia cardíaca más alta que los sujetos delgados (Bray 2003).

### 2.1.2-2. Diabetes tipo 2

Aproximadamente el 85% de los pacientes diabéticos tienen *diabetes tipo 2* (DM2). En estos pacientes la resistencia sistémica y crónica a la insulina acaba condicionando el cese o la disminución de la producción de insulina. Cerca del 80% de los sujetos con DM2 presentan sobrepeso u obesidad. De hecho, la prevalencia de DM2 en personas obesas es, en varones, hasta 5 veces superior y cerca de 8 veces más alta en mujeres. La epidemia de la DM2 crece en incidencia a nivel mundial de forma directamente proporcional a la de la obesidad (Gomez-Ambrosi, Silva et al.; Bray, Jablonski et al. 2008).

El ICC (uno de los marcadores antropométricos más recurrentes para diagnosticar problemas de obesidad central) y el perímetro de la cintura son excelentes indicadores para la resistencia a la insulina y el riesgo de DM2 (Gomez-Ambrosi, Pastor et al. 2007). Se considera que la acumulación de tejido adiposo abdominal es el principal responsable de resistencia a la insulina en tejidos sensibles a la insulina como el hepático, el adiposo y el muscular. Este puede ser un efecto concomitante con el aumento de ácidos grasos circulantes propio de pacientes con problemas de obesidad o el efecto directo de la acción endocrina de este tejido (Guilherme, Virbasius et al. 2008). De hecho, la relación entre los porcentajes de grasa corporal y los trastornos del metabolismo glucídico es tan estrecha que una pérdida de entre el 5 y el 10% del peso de un paciente con DM2 es capaz de reducir significativamente las concentraciones plasmáticas de glucosa y la presión arterial, y permite la normalización del perfil lipídico circulante (Lago, Gomez et al.), además de mejorar los valores de *hemoglobina glicosilada* (HbA1c).

La importancia de la relación existente entre la grasa corporal y la resistencia a la insulina es tal que, si el paciente diabético no puede perder peso mediante métodos convencionales, pueden llegar a utilizarse métodos farmacológicos para inducir esta pérdida. Recientemente se está valorando con creciente interés la posibilidad de utilizar tratamientos quirúrgicos como la reducción de estómago (o *by-pass* gástrico) para garantizar la reducción del peso corporal y restablecer el control del metabolismo hidrocarbonado en este tipo de pacientes (Colucci; Catalan, Gomez-Ambrosi et al. 2007; Gomez-Ambrosi, Pastor et al. 2007).

### 2.1.2-3. Osteoartritis



La obesidad es también un efector común para problemas del sistema musculoesquelético (Lago, Gomez et al.). Siendo este tipo de dolencias una de las causas más comunes de absentismo laboral e intervenciones sanitarias el gasto económico que suponen para la sociedad occidental se ve notablemente acrecentado.

Existen diversos mecanismos que pueden explicar la acción del sobrepeso sobre problemas clínicos de esta índole. Hay que considerar los aspectos físicos pero cabe tener en cuenta también algunos otros de naturaleza molecular. Las evidencias que sugieren que el tejido adiposo hipertrófico de los pacientes obesos produce mediadores inflamatorios capaces de afectar la fisiología sinovial del cartílago y participar así en la enfermedad reumática son cada vez más numerosas (Zhang, Xie et al.; Oh, Lee et al. 2005; Peng, Xie et al. 2008). El papel central de la *adiponectina* (anti-inflamatoria y anti-aterogénica) y la *visfatina* (*adipocina* también anti-inflamatoria), así como el efecto de la *leptina* (*adipocina* de acción pro-inflamatoria) entre otras *citocinas* producidas por el tejido adiposo en la enfermedad del sistema musculoesquelético está siendo ampliamente estudiado (Lago, Gomez et al.). Por otro lado, la existencia de un importante sistema de comunicación entre el tejido adiposo y el sistema esquelético se ha visto recientemente respaldada por nuevos datos sobre la acción de la *osteocalcina*, *citocina* sintetizada por los *osteoblastos* que influye sobre el metabolismo energético del hígado y el tejido adiposo, y sobre la interacción entre los depósitos de calcio y el metabolismo glucídico en general (Fernandez-Real, Ortega et al.; Reinehr and Roth).

### **2.1.3- Etiopatogenia**

Entendemos por enfermedad la desregulación de las funciones corporales y sistémicas que normalmente viene acompañada por alteraciones de los procesos celulares y tisulares y que desembocan en problemas clínicos (Bays, Gonzalez-Campoy et al. 2008). La obesidad es una enfermedad multifactorial y multisistémica caracterizada por el crecimiento anormal y desproporcionado de los depósitos de grasa corporal. En su etiología se mezclan factores, tanto genéticos como ambientales, que condicionan que la materia absorbida en exceso (i.e. mediante dietas copiosas) sea, en deferencia a la que se consume (e.g. mediante el ejercicio físico), transformada y almacenada en forma de tejido adiposo. El tejido adiposo acumulado de forma excesiva puede representar un importante riesgo para la salud. Los aspectos nocivos de la acumulación excesiva de tejido adiposo pueden verse acusados por factores intrínsecos y extrínsecos a cada persona, entendiendo por factores intrínsecos los genéticos, fisiológicos y metabólicos, y por factores extrínsecos los patrones culturales y sociales afines a cada individuo.

Suele asumirse que mediante el control de la dieta y evitando el sedentarismo el volumen de los depósitos de grasa puede ser controlado, evitando así la obesidad y sus efectos negativos sobre la salud. La patogénesis de la obesidad es sin embargo, además de diversa, mucho más compleja de lo que se suele pensar. No sólo se trata de un desequilibrio en el balance entre la materia que se ingiere y la que se consume (*homeostasis energética*). Existen un gran número de estudios que sugieren que el problema de la obesidad es mucho más complejo. Los nativos americanos *indios Pima*, por ejemplo, presentan células adiposas hipertróficas y una mayor predisposición a la obesidad y la diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) que los sujetos caucásicos (*Abbott and Foley 1987*). Ciertas poblaciones asiáticas tienen altos porcentajes de obesidad central como consecuencia de una incapacidad innata para desarrollar un tejido adiposo equilibrado desde un punto de vista fisiológico, histológico y molecular. En consecuencia, la incidencia de enfermedades comúnmente asociadas a la obesidad como la resistencia a la insulina, la DM2 o la enfermedad coronaria y vascular es, en estas poblaciones, muy superior a la esperada. Estos dos ejemplos respaldan las hipótesis que apuntan el tejido adiposo como principal responsable de la expresión de algunas enfermedades metabólicas sistémicas (*Bays, Gonzalez-Campoy et al. 2008*), y su excesivo desarrollo como una respuesta ambiental fuertemente condicionada por la predisposición innata de cada persona.

La heredabilidad de un carácter fisiológico se define como el porcentaje de variación entre sujetos que puede ser explicada por factores inherentes. La dificultad de estimar la heredabilidad de caracteres para el fenotipo *obesidad* radica en el hecho de que la expresión fenotípica depende en gran medida de la exposición ambiental. Dicho de otra forma, aunque se esté genética, metabólica y fisiológicamente predestinado a tener un alto IMC, si no se ingieren alimentos, ese *potencial* genético inherente difícilmente podrá ser desarrollado. Sin embargo, existen numerosos estudios que sugieren que la obesidad y su patogénesis no están *sólo* vinculados a la falta de un balance proporcionado entre la alimentación y el gasto energético.

Las comparaciones antropométricas y metabólicas entre gemelos representan excelentes modelos para estimar *in vivo* la base genética de los caracteres humanos. Este tipo de estudios han permitido establecer la heredabilidad del IMC entre el 64 y el 84% (*Herrera and Lindgren; O'Rahilly and Farooqi 2006*). Los estudios realizados por *Bouchard et al.* a principios de los 90 (*Bouchard 1988; Bouchard 1993*) sobre las variaciones del IMC en 12 parejas de gemelos univitelinos bajo condiciones ambientales controladas sugerían que los factores genéticos inherentes al sujeto determinan con fuerza las oscilaciones del IMC. De esta forma, la variabilidad entre individuos no emparentados triplicaba la variabilidad detectada entre sujetos genéticamente idénticos (*Herrera and Lindgren; O'Rahilly and Farooqi 2006*).

La homeostasis energética, entendida como los mecanismos involucrados en el control de la ingesta, el almacenamiento y el consumo de energía, depende de una serie de moléculas que regulan estos procesos. En este imbricado sistema de comunicación-acción participan diferentes neurotransmisores, tanto adrenergicos como serotoninérgicos, péptidos intestinales e hipotalámicos *orexigénicos* (que inducen el apetito) y *anorexigénicos* (que inhiben el apetito), así como otros mecanismos que actúan sobre los tejidos responsables de la acumulación y el consumo de energía (Schwartz, Woods et al. 2000; Morton, Cummings et al. 2006). La naturaleza molecular y el desarrollo de la obesidad responden a esta compleja e imbricada red de mediadores, susceptibles todos ellos de provocar, en su defecto o exceso, problemas de sobrepeso y obesidad.

### 2.1.3-1. Factores centrales

#### *El sistema nervioso central*

Muchas de las moléculas liberadas al torrente sanguíneo por tejidos como el adiposo, el hepático y el epitelio intestinal (mediadores periféricos) son capaces de reducir o aumentar la sensación de hambre vía receptores hipotalámicos (Sisley and Sandoval). La secreción de neuropéptidos hipotalámicos *orexigénicos* como el neuropéptido Y, la hormona concentradora de melanina (MCH), las *orexinas A* y *B*, la *galanina* y el péptido asociado a *Agouti* (*AgRP*) está inhibida por factores periféricos como la *leptina* (Zhang, Della-Fera et al. 2008), que es producida casi exclusivamente por el tejido adiposo. Al mismo tiempo la *leptina* induce la expresión de neuropéptidos *anorexigénicos* como las *melanocortinas* (*MSH*), el factor *Regulador de la Transcripción de Receptores de Anfetamina y Cocaína* (*CART*), la *Pro-opiomelanocortina* (*POMC*) y la *Hormona Liberadora de Corticotropina* (*CRH*).

Las *Hormonas Estimuladoras de Melanocitos* (*MSH*) son un grupo de hormonas producidas por la hipófisis que además de regular la pigmentación de la piel actúan sobre el cerebro con funciones *anorexigénicas*. Mutaciones en los receptores para estas hormonas han sido detectadas como causa original de algunas formas de obesidad severa (Qi, Kraft et al. 2008).

La *POMC* es un polipéptido de 241 aminoácidos que puede originar hasta 10 oligopéptidos biológicamente activos (*melanotropinas*, *lipotropinas*, *endorfinas*, y las *adrenocorticotropinas*, entre otros), después de someterse diversos procesos proteolíticos específicos según el tipo celular (presenta hasta 8 sitios de activación proteolítica). Entre sus diversas funciones cabe destacar el control de la homeostasis energética a través del sistema nervioso central y la estimulación *melanocítica*. Mutaciones en el gen que codifica para *POMC* han sido descritas y vinculadas a la obesidad humana (Creemers, Lee et al. 2008) y otras patologías.

También entre los mediadores del apetito y la homeostasis energética a nivel del sistema nervioso central, el *neuropeptido Y* es sintetizado por el hipotálamo y transportado por los axones neuronales hasta el núcleo *paraventricular*. Se trata de un potente agente estimulador del hambre (*orexigénico*) cuya segregación está vinculada a las concentraciones circulantes de *leptina*, *insulina*, estrógenos y glucocorticoides. En los últimos años han sido descritas asociaciones significativas entre la expresión de estos neuropéptidos y algunas de las comorbilidades características de la obesidad, como la hipertensión y la DM2 (Baranowska, Wolinska-Witort et al. 2003).

### 2.1.3-2. Factores periféricos

#### *La Ghrelina*

La *ghrelina*, cuyo nombre proviene de la raíz indoeuropea 'ghre' que significa 'crecimiento', es una hormona *orexigénica* producida por las células *P/D1* del *fundus* estomacal. Las concentraciones de *ghrelina* aumentan antes de comer y caen inmediatamente después (Cummings, Purnell et al. 2001). La participación de la *ghrelina* en el consumo de alimentos está mediada a nivel hipotalámico a través de su efecto adverso sobre la acción de sus antagonistas en función, la *leptina* y otras citocinas *anorexigénicas* (Shintani, Ogawa et al. 2001).

#### *La Leptina*

La *leptina* es una proteína de 167 aminoácidos (incluido un péptido señal de 21) y 16 KDa de peso codificada en el brazo corto del cromosoma 7 (7q31). De estructura y función similar a las citocinas proinflamatorias tipo *interleucinas*, se considera que esta *adipocina* (del griego 'adipo', 'grasa'; 'cyto', 'celula'; y 'kinos', 'movimiento') es el *mensaje* que los depósitos de grasa envían al cerebro para estimular una reacción fisiológica consecuente a su estado metabólico (Schwartz, Woods et al. 2000). Por otro lado, existen evidencias que vinculan la expresión de *leptina* al correcto desarrollo de ciertas áreas del hipotálamo claves en el control del balance energético (Stocker and Cawthorne 2008). No en vano, tras su descubrimiento en 1994, al gen de la *leptina* (del griego 'leptos', 'delgado') lo llamaron 'gen de la obesidad', codificante entonces para la *proteína OB*.

Se han descrito indicios que asocian las concentraciones plasmáticas de *leptina* con la producción de insulina (Cases, Gabriely et al. 2001). La secreción de *leptina* aumenta de forma proporcional al tamaño de los depósitos de grasa corporal (Zhang, Proenca et al. 1994) y actúa sobre los tejidos estimulando la *lipólisis* y la oxidación de ácidos grasos e inhibiendo el anabolismo lipídico (*lipogénesis*). Esta *adipocina* inhibe, por ejemplo, la expresión de la *enzima desaturasa del stearoil CoA (SCD)*, enzima clave para la *lipogénesis* cuya inhibición condiciona también el catabolismo lipídico

(Minokoshi, Kim et al. 2002; Cohen and Friedman 2004; Paton and Ntambi 2009). En consecuencia, además de disminuir la sensación de hambre vía receptores hipotalámicos, la *leptina* es un factor periférico capaz de inducir a nivel tisular un aumento en el consumo energético (Minokoshi, Kim et al. 2002).

La mayoría de las personas obesas no presentan, sin embargo, deficiencias en las concentraciones circulantes de *leptina* que puedan explicar una mayor tendencia a la ingesta de alimentos o una menor capacidad tisular para la degradación de grasas. De hecho, los sujetos obesos suelen caracterizarse por elevadas concentraciones de *leptina* circulante (Dahlman and Arner 2007). Esta observación sugiere que la obesidad puede interpretarse más como una consecuencia de la falta de respuesta a esta hormona que deducirse de posibles deficiencias en su producción. El fenómeno en cuestión ha sido descrito y se utiliza en la actualidad para trabajar con modelos experimentales de animales obesos útiles en investigación biomédica. Las ratas *Koletsky*, con una mutación que provoca la sustitución de la Tyr 763 para un codón STOP en el dominio extracelular del receptor para *leptina*, o los ratones *db/db* y *ob/ob* que tienen, respectivamente, mutaciones autosómicas recesivas en el gen de la *leptina* y en el gen que codifica para su receptor, son buenos ejemplos. Todos estos organismos son incapaces de responder al estímulo de la *leptina* y desarrollan obesidad. En humanos, ciertas mutaciones en el gen del receptor para la *leptina* no condicionaban la ausencia total de respuesta pero sí que originaron un fenotipo muy similar al de los animales deficientes en *leptina* (Clement, Vaisse et al. 1998). Por otro lado, se han descubierto y descrito mutaciones en el gen de la *leptina* como causa poco común de obesidad severa en humanos (Koerner, Kratzsch et al. 2005; Dahlman and Arner 2007).

### *La Adiponectina*

La *adiponectina* (AdipoQ) es una proteína de 247 aminoácidos y 30 KDa de peso que tiende a polimerizar. Se sintetiza casi exclusivamente en los adipocitos, siendo producida y liberada al torrente sanguíneo por el tejido adiposo (Chandran, Phillips et al. 2003). Paradójicamente, la expresión de AdipoQ en los depósitos de grasa, así como su concentración en plasma, están inversamente asociados al porcentaje de grasa corporal y ambos valores son invariablemente inferiores en sujetos obesos (Arita, Kihara et al. 1999) y pacientes diabéticos (Weyer, Funahashi et al. 2001). Por otro lado, aunque la expresión de AdipoQ es prácticamente la misma en el tejido visceral y el subcutáneo (Fain, Madan et al. 2004), su regulación es completamente diferente en cada caso (Motoshima, Wu et al. 2002).

Se han descrito diversos mecanismos que explican los efectos metabólicos de la AdipoQ. Esta *adipocina* es capaz de disminuir la resistencia a la insulina en el hígado y el músculo (Yamauchi, Kamon et al. 2001) e incrementar la oxidación de

ácidos grasos libres. También reduce la hiperlipidemia y la hiperglucemia, y parece estar implicada en la protección frente al desarrollo de aterosclerosis, muy probablemente a través de su efecto antiinflamatorio sobre el endotelio vascular (Yang, Lee et al. 2001).

### *La Inteleucina-6*

La *interleucina-6* (IL-6) es como la *leptina* una *adipocina* proinflamatoria. De producción específica en el tejido adiposo, las concentraciones circulantes de IL-6 están positivamente asociadas al IMC. De esta forma, altas concentraciones circulantes de esta citocina son característica inherente de los sujetos obesos y un biomarcador para anomalías en la actividad del adipocito y la desregulación de los depósitos de grasa y el metabolismo sistémico. La IL-6 puede modular la producción de *leptina* y el metabolismo lipídico en el tejido adiposo (Trujillo, Sullivan et al. 2004).

### *El factor $\alpha$ de necrosis tumoral*

Los *Factores  $\alpha$  de Necrosis Tumoral* (TNF- $\alpha$ ) son *citocinas* capaces de estimular la respuesta inmune de fase aguda e inducir procesos inflamatorios. Pese a no ser específicos del tejido adiposo (se sintetizan mayormente en el tejido hepático) pueden estimular la producción de IL-6 a través de los *receptores P80* del adipocito, contribuir a la diferenciación de la célula adiposa e inhibir la producción de *leptina*. Las concentraciones plasmáticas de TNF- $\alpha$  suelen ser mas altas en sujetos obesos que en sujetos normopeso (Bray 2003).

La síntesis de AdipoQ por parte del tejido adiposo está fuertemente inhibida por factores proinflamatorios como el TNF- $\alpha$  y la IL-6 (Fasshauer, Klein et al. 2003; Fasshauer, Kralisch et al. 2003), o por los glucocorticoides (Fasshauer, Klein et al. 2002). Por otro lado, existen documentos que describen la capacidad de la AdipoQ para revertir los efectos proinflamatorios de ciertas *citocinas* como el TNF- $\alpha$  (Kern, Di Gregorio et al. 2003). De hecho, la AdipoQ desempeña una importante acción antiinflamatoria que contrasta con la acción proinflamatoria de la mayoría de las *adipocinas* (Nawrocki and Scherer 2004).

### *El Cortisol y otras hormonas esteroideas*

El tejido adiposo sintetiza oxidorreductasas y aromatasas capaces de producir hormonas *esteroideas* tales como los *glucocorticoides* (*cortisol*) y las hormonas sexuales (*estrógenos* y *andrógenos*). Gracias a esta capacidad inherente al tejido adiposo se observan en personas obesas altas concentraciones de *estrógenos*.

El balance entre las hormonas sexuales es fundamental, por ejemplo, a la hora de determinar el dimorfismo sexual y la distribución del tejido adiposo según el sexo



### *Mecanismos de regulación del anabolismo lipídico en el tejido adiposo humano*

(Bjorntorp 1996). Mientras los *estrógenos* estimulan la adipogénesis en la zona mamaria y el tejido subcutáneo, los *andrógenos* promueven el desarrollo del tejido adiposo intrabdominal, responsable de la obesidad central o *androide*.

El *cortisol* es un glucocorticoide con potentes efectos metabólicos que incluyen la movilización de ácidos grasos en los depósitos de grasa, la *glucogenólisis* (liberación hepática de las reservas de glucosa mediante la descomposición de polímeros de glucosa como el *glicógeno*) y la proteólisis. La enfermedad de *Cushing* está caracterizada por elevadas concentraciones de *cortisol* circulante, concomitantes con un importante grado de obesidad abdominal (Bjorntorp and Rosmond 2000). Existen relaciones efectivas entre las concentraciones de *cortisol* circulante y la acumulación de grasa abdominal, la disfunción hipotalámica y la concentración y la sensibilidad tisular a la *leptina* (Bjorntorp, Rossner et al. 2001).

### *Las Norepinefrina y la serotonina*

La *norepinefrina* y la *serotonina* son hormonas que estimulan o inhiben el consumo energético en función de los receptores con los que interaccionan (Bray 2003). Los ligandos para receptores  $\beta$ -adrenérgicos han sido intensamente estudiados en endocrinología con el objetivo de proporcionar una alternativa farmacológica al tratamiento de la obesidad. A lo largo de los últimos 35 años los avances en este campo han originado fármacos que interfieren eficazmente las rutas serotoninérgicas. Los efectos secundarios del uso de este tipo de drogas, sin embargo, han invalidado, por el momento, cada una de las apuestas (Bello and Liang).

## 2.2- El tejido adiposo

### 2.2.1- El tejido adiposo

Dado que la hipertrofia del tejido adiposo es, por definición, la única constante de todos los casos de sobrepeso y obesidad, entender el proceso que provoca el desarrollo hipertrófico de los depósitos de grasa constituye uno de los principales objetivos de la investigación biomédica en general, y la endocrinología en particular. En consecuencia, existe en la actualidad un enorme esfuerzo investigador enfocado a entender y corregir este tipo de desórdenes y las complicaciones clínicas que conllevan. La diana terapéutica contra los problemas de sobrepeso y obesidad se sitúa, en última instancia, en el tejido adiposo y las células que lo constituyen.

En condiciones normales el tejido adiposo representa un 15-20% del peso corporal del hombre, y entre el 20-25% del peso de la mujer. Se trata de un tejido conjuntivo altamente especializado en el almacenaje energético donde predomina un tipo celular de origen epitelial denominado *adipocito*. Los *fibroblastos* del tejido adiposo (también llamados *lipoblastos*, o células precursoras de *adipocitos*) son células ricas en colágeno de tipo I y II con una elevada plasticidad y capacidad mitótica. Los *adipocitos* maduros pierden una vez diferenciados la capacidad de desplazarse o duplicarse (*mitosis*) y representan aproximadamente un 50% de las células del tejido adiposo. El 50% restante está constituido por células de naturaleza intersticial o de estroma vascular (SVC), incluidos fibroblastos, células endoteliales y nerviosas, macrófagos y *pre-adipocitos* (estadio intermedio de la diferenciación adipocitaria o *adipogenesis*).

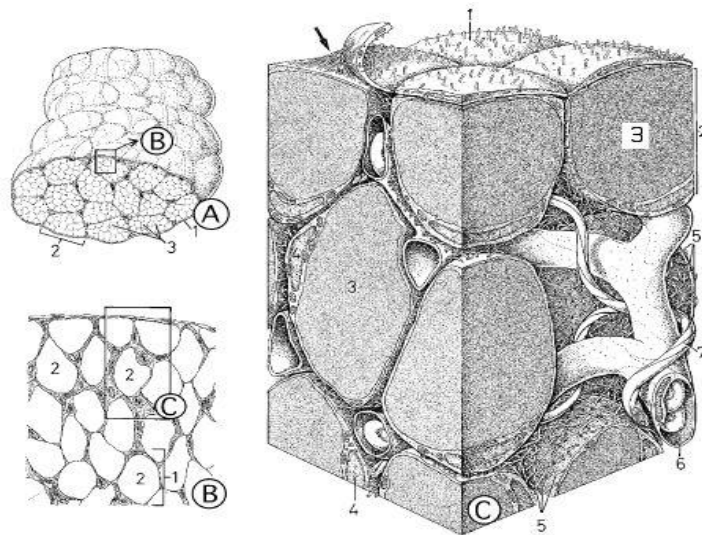
El tejido adiposo asume funciones que no sólo tienen que ver con la reserva energética. Constituye por su naturaleza maleable un soporte adaptativo contra presiones y agresiones mecánicas que podrían degradar los órganos que recubre y protege, como son los riñones, ganglios linfáticos u ojos, y el relleno ideal para la repartición física del peso en zonas periféricas, las grandes articulaciones y las palmas de pies y manos. Representa también la masa que confiere turgencia y plasticidad a aquellos órganos que se ven sometido a variaciones importantes en el volumen, como son los pechos de la mujer, y juega un importante papel en el equilibrio hídrico y como aislante térmico.

El tejido adiposo centrado en la reserva energética es, sin embargo, el más extendido anatómicamente. Ocupa la región subcutánea (*tejido adiposo subcutáneo o parietal*), y gran parte de la cavidad abdominal (*tejido adiposo visceral, abdominal u omental*). Se trata de un tejido muy susceptible a las condiciones metabólicas, capaz de hipertrofiarse en situaciones de alto aporte energético y atrofiarse ante



condiciones de elevado gasto energético y aporte calórico insuficiente. Ante carencias alimenticias importantes el tejido adiposo puede llegar prácticamente a desaparecer dejando en su lugar un tejido reticular de naturaleza fibroblástica.

Existen dos tipos bien diferenciados de tejidos adiposos: el *tejido adiposo blanco* (WAT), con función estructural, metabólica y energética, y el *tejido adiposo marrón* (BAT), común entre los mamíferos invernantes o semi-invernantes, pero reducido en el ser humano adulto a pequeños depósitos testimoniales de la zona suprarrenal, hipoclavicular (cuello y espalda) y mesentérica. Constituyen el WAT adipocitos poliédricos que contienen una única vacuola lipídica que ocupa la mayor parte del citoplasma y desplaza el resto de orgánulos (incluido el núcleo, excéntrico y aplanado) a la periferia celular (*Figura 1.1*).



**Figura 1.1** El *tejido adiposo blanco*. (A) El apéndice epiplóico de la última capa del colon está recubierto por el mesotelio peritoneal (1). El tejido adiposo está dividido en lóbulos (2) definidos por pequeñas láminas de tejido conjuntivo laxo. Estos lóbulos contienen los adipocitos (3), muy evidentes en corte transversal (B) debido a la presencia de la vacuola lipídica (2). (C) Sobre la representación de corte tridimensional se aprecian la naturaleza epitelial del mesotelio (1), los adipocitos maduros (2), la vacuola lipídica (3) y el núcleo plano y excéntrico del adipocito maduro (4). Las células están separadas por fibras de *reticulina* (5) entre las que discurren capilares sanguíneos (6) y terminaciones nerviosas (7). (Kühnel, W. *Atlas de Poche d'Histologie*, 1997)

A diferencia de los adipocitos del WAT, los adipocitos del BAT presentan numerosas mitocondrias y vacuolas lipídicas repartidas por todo el citoplasma y un núcleo central muy activo. Las mitocondrias contribuyen positivamente al consumo energético y el consecuente desgaste del contenido de las vacuolas lipídicas. De

hecho, una de sus principales características es la elevada expresión de la *proteína de desacoplamiento mitocondrial 1* (UCP-1), que induce el consumo energético mediante la producción de calor (Cannon and Nedergaard 2004).

La existencia de este singular sistema de consumo de energía en el BAT ha abierto durante años la expectativa de modificar farmacológicamente los adipocitos blancos acercándolos a la naturaleza metabólica del adiposo marrón, tratando de disminuir mediante el consumo no productivo de energía la hiperplasia del tejido adiposo en los casos de obesidad severa. La posibilidad de un precursor común quedaba respaldada por la no coexistencia en el desarrollo humano de estos dos tipos celulares, dado que el BAT aparece y desaparece durante la infancia (Moulin, Truel et al. 2001). Los programas de transcripción génica en ambas líneas sin embargo difieren desde los primeros estadios de la diferenciación e indican diferentes origen y naturaleza (Timmons and Sundberg 2006).

En cuanto a la relación existente entre el tejido adiposo omental (OM) y el subcutáneo (SC) han existido históricamente importantes discrepancias entre investigadores del mundo del deporte y la medicina. Mientras Brozek et al. (Brozek, Kihlberg et al. 1963) declaraban en los 60 que el 50% del tejido adiposo corporal es subcutáneo, Coon y Meyers (Meyers, Goldberg et al. 1991; Coon, Rogus et al. 1992) afirmaban en los 90 que, por cada kilogramo de tejido adiposo SC que se acumula, sólo 200 gramos se añaden al depósito OM en el punto de intersección de la recta de regresión lineal que establecieron para esta relación. Según estos autores, si desapareciera todo el tejido adiposo SC, la cantidad de adiposo OM restante sería de 667 gramos en varones y de -373 en mujeres. Según los estudios de Brodie et al. (Brodie, Lamb et al. 1988; Brodie and Slade 1988), el cociente para la relación entre los depósitos de tejido adiposo OM y SC aumenta con la edad y es mayor en mujeres que en hombres. Por otro lado, estímulos ambientales como el entrenamiento físico intenso pueden hacer variar esta relación. Despres et al. (Despres, Prud'homme et al. 1991; Mauriege, Despres et al. 1991; Tremblay, Despres et al. 1991) observaron a principios de los noventa que después del entrenamiento aeróbico los depósitos de tejido adiposo SC disminuían en mayor medida que los omentales.

Las diferencias existentes entre ambos depósitos son evidentes tanto a nivel fisiológico como molecular (Peinado, Jimenez-Gomez et al.; Perez-Perez, Garcia-Santos et al.; Vohl, Sladek et al. 2004; Peral, Camafeita et al. 2009; Perez-Perez, Ortega-Delgado et al. 2009). Cabe destacar cambios importantes en la expresión de moléculas transportadoras de glucosa de tipo 4 (GLUT4) y proteínas 4 de unión a retinol (RBP4), los PPAR $\gamma$ , la leptina y los sustratos receptores para la insulina (IRS1) (Lefebvre, Laville et al. 1998), entre otros (Vohl, Sladek et al. 2004). La actividad de la lipoproteína lipasa (LPL), la tasa lipolítica basal y la capacidad de respuesta al estímulo adrenérgico, así como el tamaño promedio de los adipocitos, también difieren entre ambos tejidos (Tchernof,

Belanger et al. 2006; Boivin, Brochu et al. 2007). Destaca en el tejido adiposo OM la mayor expresión de proteínas implicadas en el transporte y el metabolismo de la glucosa y los lípidos, la síntesis de proteínas, la respuesta a estrés, y otras involucradas en procesos inflamatorios (Perez-Perez, Ortega-Delgado et al. 2009).

## **2.2.2- Fisiopatología del tejido adiposo**

En ocasiones sucede que la acumulación de energía en forma de grasa excede los límites no establecidos de los depósitos de tejido adiposo. La *hipertrófia* del adipocito y la acumulación desproporcionada de tejido adiposo mediante el reclutamiento de nuevas células adiposas (*hiperplasia*) pueden ocasionar el mal funcionamiento de estos sistemas de almacenamiento. El tejido adiposo hipertrófico de los sujetos obesos se considera responsable de alteraciones importantes en otros órganos y sistemas mediante la secreción de estímulos inflamatorios como las *adipocinas* y la liberación de moléculas como los triglicéridos que, en exceso en el torrente sanguíneo, pueden resultar perniciosas para el organismo.

El potencial fisiopatogénico del tejido adiposo debe ser comprendido en un contexto que contempla tanto factores ambientales como la condición y la predisposición genética inherente a cada individuo. El doctor Philip J. Goscinski ponía de relieve esta característica con su célebre metáfora "*Genetics loads the gun; lifestyle pulls the trigger*", que, referida a desordenes metabólicos en general (y al cáncer en particular), encaja con el concepto de *predisposición-acción* que numerosos estudios sugieren para el desarrollo de la obesidad y otros trastornos metabólicos. En este sentido, los asiáticos del sur, por ejemplo, son más propensos a padecer problemas vinculados a la capacidad patogénica del tejido adiposo. Estas poblaciones muestran una elevada tendencia para las deposiciones de grasa visceral, la hipertrofia de los adipocitos, un el bajo número de células adiposas en los depósitos de grasa, y altas concentraciones de *leptinas*, ácidos grasos libres y factores proinflamatorios circulantes como la *proteína C reactiva* (pCr), a diferencia de factores anti-inflamatorios como la AdipoQ o los *lípidos de alta densidad* (HDL), claramente disminuidos (Chandalia, Abate et al. 1999; Chandalia, Cabo-Chan et al. 2003; Abate, Chandalia et al. 2004; Sniderman, Bhopal et al. 2007).

Cuando el tejido adiposo deja de desempeñar sus funciones correctamente, el almacenamiento de los ácidos grasos ingeridos con la dieta es deficiente y aumentan las concentraciones de grasas libres en el plasma provocando un fenómeno conocido como *lipotoxicidad* (Unger 2003; Bays 2004). La *lipotoxicidad* implica la deposición ectópica de ácidos grasos en el músculo, el hígado (contribuyendo a la resistencia a la

insulina) y el páncreas (provocando *insulinopenia*). La deposición de grasas en estos tejidos puede provocar DM2 (Bays, Rodbard et al. 2007) y otras patologías.

Los ratones *lipoatrópicos* son modelos experimentales de lipotoxicidad. Al carecer de tejido adiposo blanco, estos animales desarrollan formas severas de DM2 debido a la deposición ectópica de ácidos grasos. El trasplante quirúrgico del tejido adiposo de ratones salvajes revierte el fenómeno y corrige el problema, evitando el desarrollo de comorbidades propias de un tejido adiposo disfuncional o, en este caso, ausente (Gavrilova, Marcus-Samuels et al. 2000). Al igual que en el ejemplo de los ratones *lipoatrópicos*, donde la falta de tejido adiposo condiciona toda una serie de problemas de salud, un exceso de tejido adiposo puede tener consecuencias similares. Hablamos entonces de *lipodistrofia adquirida*.

La generación de tejido graso se desarrolla a lo largo de toda la vida y contempla tanto la *adipogénesis* (maduración de las células precursoras, los *pre-adipocitos*, en adipocitos) como la proliferación y el reclutamiento de nuevos *pre-adipocitos* (Hausman, DiGirolamo et al. 2001; Heilbronn, Smith et al. 2004; Bays and Dujovne 2006). En la desregulación de estos dos procesos claves en el tejido adiposo se origina el problema de la *lipodistrofia adquirida*. Teniendo en cuenta que más del 90% del peso del *adipocito* es lípido en forma de triglicéridos, lo que el tejido adiposo más libera al torrente sanguíneo son ácidos grasos libres.

Por otro lado, el tejido adiposo participa en la señalización endocrina del organismo e interacciona con el resto de tejidos (Ahima 2006). La disrupción o exaltación de este sistema de comunicación, condicionada por un incremento desproporcionado de los depósitos de grasa, puede provocar la producción de factores precursores para trastornos como la DM2, la hipertensión, la arteriosclerosis y el cáncer.

Finalmente, el tejido adiposo genera elementos de defensa propios del sistema inmune innato tales como *citocinas* clásicas, *chemocinas*, factores del complemento, *adipocinas* inmunomoduladoras, factores de crecimiento, elementos *toll-like* y otros receptores para *citocinas* (Caspar-Bauguil, Cousin et al. 2006; Schaffler, Muller-Ladner et al. 2006). Algunos autores indican que este es el aspecto más delicado de la desregulación en las funciones del tejido adiposo debidas a la obesidad (Trayhurn and Wood 2004; Fantuzzi 2005). Por otro lado, un incremento del porcentaje de grasa corporal está directamente vinculado a una mayor permeabilidad del tejido adiposo a los macrófagos (Weisberg, McCann et al. 2003). La presencia de estos macrófagos tiene un triple efecto sobre los adipocitos al promover la secreción de agentes pro-inflamatorios, la síntesis de factores que estimulan la secreción de los primeros en otros sistemas y tejidos, y la reducción de la producción de mensajeros anti-inflamatorios como la AdipoQ (Bays and Dujovne 2006).

### 2.2.2-1. *Lipogénesis*

Una parte importante de la endocrinología básica trata de describir los procesos moleculares que se suceden en el tejido adiposo y que condicionan que, por ejemplo, dos personas desarrollen diferentes grados de obesidad ante una situación similar. Que la obesidad y el trastorno metabólico sean problemas multifactoriales en los que participan una cantidad indeterminada de agentes moleculares y rutas metabólicas dificulta el problema. Solo a través del conocimiento exhaustivo de los procesos que permiten una acumulación y distribución anómala del tejido adiposo se progresará en el desarrollo de soluciones médicas certeras para cada caso de obesidad en función de su origen y naturaleza.

Todas las células tienen la capacidad de sintetizar ácidos grasos a partir de carbohidratos y monosacáridos en un proceso conocido como *lipogénesis* o *anabolismo lipídico*. Tanto los adipocitos como los hepatocitos tienen esta capacidad especialmente desarrollada. Los monosacáridos y los *ácidos grasos* (FAs) son absorbidos a través del intestino delgado. Mientras los primeros llegan al hígado por el sistema porta hepático, los FAs son incorporados por los quilomicrones y transportados a los tejidos a través del sistema linfático. Cualquier glucosa que no haya sido inmediatamente metabolizada puede ser utilizada para la síntesis de FAs y la producción de triglicéridos (TAGs) en tejidos lipogénicos como el adiposo y el hepático. Los TAGs sintetizados en el tejido adiposo son, en mamíferos, la principal fuente de energía almacenada y son hidrolizados (*lipólisis*) para liberar de nuevo FAs al torrente sanguíneo.

Numerosos autores consideran que la activación descontrolada de las vías anabólicas que sintetizan FAs en los tejidos adiposo y hepático puede desempeñar un papel protagonista en el desarrollo de la obesidad y los trastornos metabólicos vinculados (*Mobbs and Makimura 2002; Thupari, Landree et al. 2002; Kuhajda, Landree et al. 2005*). Aunque es conocido que en el ser humano la mayoría de los lípidos almacenados en el tejido adiposo son incorporados a través de la dieta, la contribución de la síntesis endógena de lípidos al desarrollo de problemas de sobrepeso y obesidad continua sometida a un intenso debate en la comunidad científica internacional.

Estudios con modelos murinos han demostrado que la síntesis *de novo* de lípidos en los tejidos lipogénicos depende de una larga serie de factores hormonales, de la cantidad y el tipo de dieta, y de la expresión génica y la actividad de ciertas enzimas y factores de transcripción (*Kersten 2001*). En humanos se ha demostrado que una dieta rica en carbohidratos y pobre en grasas incrementa de forma significativa la actividad lipogénica del hígado y el tejido adiposo (*Aarsland, Chinkes et al. 1997; Diraison, Dusserre et al. 2002*), e induce una mayor actividad en enzimas y factores de



transcripción implicados en el proceso lipogénico (Claycombe, Jones et al. 1998; Wang, Jones Voy et al. 2004).

### 2.2.2-2. Lipólisis

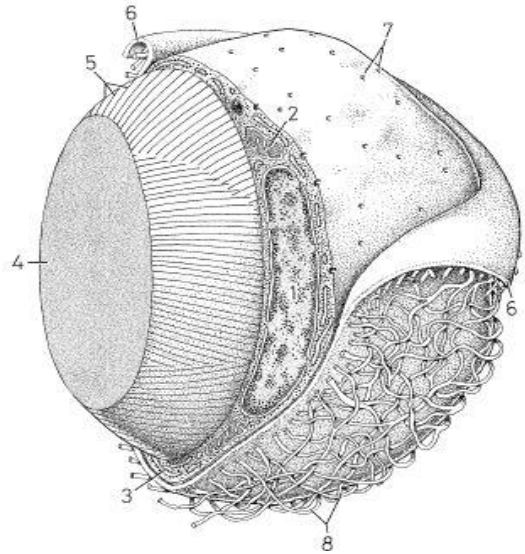
La lipólisis engloba todas aquellas rutas metabólicas implicadas en el catabolismo de los triglicéridos (TAGs). La degradación hidrolítica de estos TAGs genera diacilgliceroles (DAGs) y ácidos grasos (FAs) no esterificados susceptibles de ser utilizados como sustrato energético, precursores lipídicos útiles en la síntesis de membranas o mediadores de los sistemas de señalización intercelular. La lipólisi, como paso previo a la oxidación de los FAs, permite la movilización, el uso y la degradación del lípido acumulado en los adipocitos y, por consiguiente, es un proceso sumamente importante en el control del volumen de los depósitos de tejido adiposo (Marcelin and Chua).

### 2.2.3- El adipocito

El *pre-adipocito* es una célula de tipo mesenquimal derivada de células pluripotenciales llamadas a ser *adipocitos* mediante diversos estímulos. Un primer paso en este proceso es la pérdida de la capacidad de proliferación, un fenómeno que requiere la inhibición del ciclo celular en el estadio G1/S. Este bloqueo es inducido por el contacto entre células y de las células con el sustrato, y por la participación de factores extracelulares que anulan la capacidad mitótica como el *factor inhibidor de la leucemia* (LIF). Inmediatamente después entran en juego factores estimuladores de la adipogénesis como los glucocorticoides y otros sustratos para los PPAR $\gamma$ . El *pre-adipocito* inicia su transformación, caracterizada, entre otras cosas, por la pérdida del *factor 1 de pre-adipocitos* (Pref-1, o *proteína 1 similar a Delta*, Dlk-1), un modulador transmembrana del crecimiento epidérmico que activa las vías de señalización MAPK/ERK (Sul 2009).

Las células adiposas o *adipocitos* son células redondas de entre 10 y 200  $\mu\text{m}$  de diámetro que contienen una o más vacuolas lipídicas. La vacuola está constituida por una gran cantidad de ácidos grasos y representa hasta el ~95% del peso del adipocito (Figura 1.2). El *adipocito* es una célula estable pero maleable, muy sensible a los estímulos externos. Esta programado para absorber, sintetizar, almacenar o liberar energía en forma de ácidos grasos en función de las necesidades fisiológicas y las demandas del organismo. El *adipocito* es una célula que ejerce una fuerte influencia sobre el resto de células del organismo mediante el uso de mensajeros moleculares llamados *adipocinas*.

**Figura 1.2** El adipocito. Se caracteriza por su voluminosa vacuola lipídica (4), y su núcleo (1), desplazado por la primera contra la membrana plasmática (6), que presenta numerosos poros (7) para el intercambio con el medio. El citoplasma es rico en mitocondrias (2) y un retículo endoplasmático (3) que participan en la formación, modificación y degradación de lípidos. La vacuola, de consistencia semi-líquida, está en contacto con el citoplasma y revestida por una densificación de la red microfibrilar citoplasmática (5). El adipocito está recubierto por una red periférica de fibras de reticulina (8). (Kühnel, W. *Atlas de Poche d'Histologie*, 1997)



El establecimiento de líneas transformadas de células embrionarias fibroblásticas de ratón (*adipoblastos*), nombradas según el *National Institutes of Health* (NIH) como *NIH 3T3-L1* y *NIH 3T3-F442* (entre otras), permitieron en los 80 el desarrollo de los trabajos pioneros de los investigadores *Spiegelman* y *Lane*, dando fin a años de investigación infructuosa sobre la biología del tejido adiposo y las células que lo componen (*Spiegelman, Frank et al. 1983; Lin and Lane 1994*). Los datos derivados de estos y otros estudios revelaron un proceso finamente regulado que incluye el balance y la interacción entre mediadores del ciclo celular y factores asociados a la diferenciación de las células (*Fajas 2003*). Gracias a estos modelos *in vitro* cada fase de la diferenciación del adipocito está siendo caracterizada e identificados los perfiles de expresión de los genes que intervienen (**Figura 1.3**) así como los procesos de activación de los factores responsables de cada etapa (*Ntambi and Young-Cheul 2000; Avram, Avram et al. 2007*).

### 2.2.3-1. Proteínas de unión a elementos reguladores del estero

Para genes involucrados en la utilización y el almacenaje de energía a partir de glucosa, la repuesta a dietas ricas en carbohidratos suele ser intensa, rápida y regulada por factores de transcripción. En el estado postprandial la concentración de glucosa en el plasma alcanza su punto máximo y se induce la rápida producción de insulina a nivel pancreático. Los *Sterol Regulatory Element-Binding Proteins* (SREBPs) son factores de transcripción de respuesta rápida al estímulo insulínico que interaccionan con secuencias genéticas reguladoras (*Dif, Euthine et al. 2006*). La isoforma SREBP-1c está vinculada al uso y almacenaje de energía, especialmente en tejidos lipogénicos (*Ferre and Foufelle 2007*). SREBP-1c induce la expresión de la

*glucokinasa (GK), la piruvato kinasa (L-PK), la enzima sintetizadora de ácidos grasos (FASN), y la enzima carboxilasa para la acetil-Coenzima A (ACC), entre otros.*

Los SREBPs están codificados por 2 genes pero existen en humanos hasta tres isoformas descritas. Los SREBP-1a y -1c (*posición génica: NC\_000017.9, mRNA: NM\_004176.3/NM\_001005291.1, proteína: NP\_004167.3, isoforma  $\beta$  o SREBP-1c/NP\_001005291.1, isoforma  $\alpha$  o SREBP-1a*) están codificados en el mismo gen (17q11.2), muy cerca de los genes que codifican para FASN y ACC, y difieren a nivel post-transcripcional por la disposición del primer exón. La isoforma -1a se expresa mayormente en tejidos con un alto grado de proliferación celular, como el epitelio intestinal. El SREBP-2 (22q13) presenta cerca de un 50% de homología con las otras 2 isoformas y está relacionado con la síntesis de colesterol.

La relación entre los factores lipogénicos y SREBP-1c ha quedado establecida tanto en el hígado como en el tejido adiposo mediante modelos animales y celulares que demuestran que el efecto lipogénico de la insulina puede ser conducido a través de la expresión y la activación de este factor (*Wong and Sul*). También han sido identificados centros promotores para la expresión de FASN y ACC, del *Thyroid Hormone Receptor Spot 14 (hS14)*, y del propio SREBP, reconocibles para este factor de transcripción (*Ferre and Foulfelle 2007*).

Según estudios previos, los SREBPs están poco expresados en el tejido adiposo de pacientes obesos con y sin DM2. El mayor o menor grado de resistencia a la insulina, observado en la mayoría de los casos de obesidad, sirve para explicar este fenómeno (*Kolehmainen, Vidal et al. 2001; Sewter, Berger et al. 2002*).

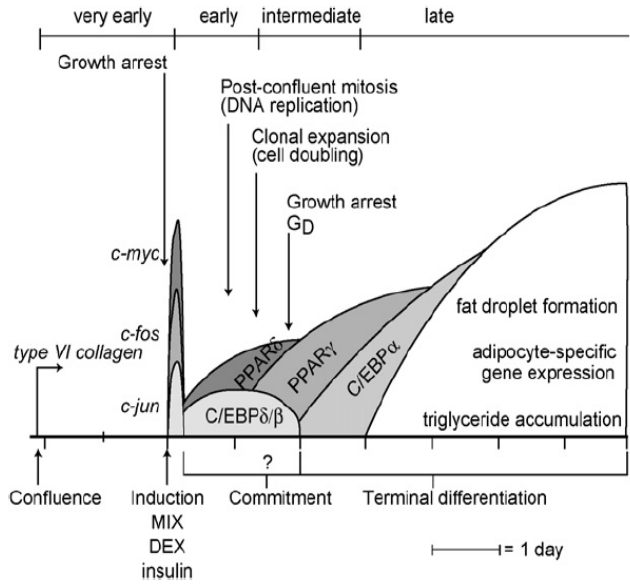
### 2.2.3-2. *Receptores del factor de proliferación del peroxisoma activado*

Los *receptores del factor de proliferación del peroxisoma activado (PPARs)* son receptores nucleares y factores de transcripción que forman heterodímeros con los *receptores X del ácido retinoico (RXR)*. Promueven la expresión de una amplia variedad de genes y la síntesis de numerosos factores clave en el desarrollo del adipocito maduro. Existen 3 isoformas conocidas, los PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , y los PPAR $\gamma$ , siendo estos últimos factores indispensables en la adipogénesis (*Lowell 1999*). Todos ellos son receptores para *glucocorticoides*, lípidos como el *palmitato* y el *linolenato*, y para análogos sintéticos de los primeros como las *rosiglitazonas*.

### 2.2.3-3. *Proteínas de unión a regiones CCAAT*

Los *CCAAT-Element Binding Proteins (C/EBP)* son una importante familia de factores de transcripción que van del C/EBP $\alpha$  al C/EBP $\zeta$ . Controlan las diferentes etapas de la adipogénesis (*Lin and Lane 1994*). También son receptores para glucocorticoides y análogos sintéticos como la *dexametasona (DEX)* (*Gaillard, Wabitsch et al. 1991*).





**Figura 1.3** Sucesión de elementos reguladores y fenómenos implicados en la adipogénesis. Las áreas representan el grado de expresión de los factores implicados. (Modificado de (Ntambi and Young-Cheul 2000)). C/EBP, CCAAT/ enhancer binding protein; DEX, Dexamethasone; MIX, methylisobutylxanthine; PPAR, Peroxisome Proliferator-activated Receptor.

## 2.3- El metabolismo lipídico

### 2.3.1- Lipogénesis

La síntesis de *ácidos grasos* (FAs) en los tejidos lipogénicos está sometida a un estricto control nutricional y hormonal. Muchas de las enzimas involucradas en la producción de estas moléculas están reguladas durante los periodos de ayuno e ingesta de alimentos a través de mediadores moleculares como los mencionados anteriormente. Entre estas enzimas cabe destacar la *enzima sintetizadora de ácidos grasos* (FASN) y la *enzima carboxilasa para la acetil-CoA* (ACC), pero también la *enzima desaturasa para el estearoil-CoA* (SCD) y la *ligasa para citrato y ATP* (ACL), las enzimas dedicadas a la producción de NADPHs (e.g. la *enzima málica*), y aquellas involucradas en la ruta de las hexosas monofosfato, como la *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa*, y implicadas en la esterificación de los triglicéridos (TAGs) y del *diacilglicerol* (DGAT), como la *aciltransferasa mitocondrial de glicerol-3-fosfato* (mGPAT). La expresión y actividad de algunas enzimas glicolíticas como la *cinasa del piruvato* (L-PK) del hígado y la *glucocinasa* (GK) también están firmemente reguladas para proveer de fuentes de carbono la síntesis de FAs y TAGs.

Las actividades específicas de estas enzimas son muy bajas en situación preprandial, por regla general. Con la ingesta de alimentos (especialmente durante el consumo de dietas ricas en carbohidratos) sus actividades específicas aumentan de forma concomitante a la concentración plasmática de glucosa e insulina. Algunas de ellas están sometidas a fuertes mecanismos de control alostérico o mediante la fosforilación/defosforilación de algunos de sus aminoácidos. En la regulación de la ACC, por ejemplo, participa la *cinasa AMP dependiente*, una enzima sensible al estado energético de las células que inactiva mediante fosforilación la actividad catalítica de ACC. Por otro lado, el *malonil Coenzima A*, cuya producción cataliza ACC, es sustrato para FASN pero también un inhibidor para la actividad de ACC y la *carnitina palmitoiltransferasa I* (CPTI) que evita la translocación de FAs dentro de la mitocondria y la síntesis y oxidación de FAs (Brownsey, Boone et al. 2006). En cualquier caso, el primer sistema de control de la lipogénesis lo encontramos a nivel transcripcional.

#### 2.3.1-1. Enzima sintetizadora de ácidos grasos

Como biomarcador de la síntesis lipídica suele utilizarse la expresión, presencia o actividad de la *Fatty Acid Synthase* (FASN; EC 2.3.1.85, *posición génica*: NC\_000017.9; *mRNA*: NM\_004104.4; *proteína*: NP\_004095.4), una de las enzimas clave en el proceso de diferenciación de los adipocitos y para la lipogénesis. FASN cataliza la formación de un ácido graso saturado esencial de 16 carbonos, el *palmitato* ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ ).

Se trata de una estructura enzimática homodimérica y multifactorial de unos 270 KDa por monómero cuya función principal es la de catalizar la formación de palmitato a partir de *acetil* y *malonil* -CoA y NADPHs, participando en el proceso de elongación de los ácidos grasos (Maier, Jenni et al. 2006).

La administración de inhibidores para la actividad de FASN como la *cereulina* (un potente antifúngico) o el compuesto C-75 (*α*-metilen- $\gamma$ -butirolactona, competidor irreversible para los sustratos de FASN) evita la diferenciación *in vitro* de los adipocitos (Liu, Wang et al. 2004) e inhibe en ratones la producción hepática de ácidos grasos, disminuyendo el porcentaje de grasa acumulada, pero también el apetito (Loftus, Jaworsky et al. 2000). Por otro lado, los ratones *knockout* para la expresión de FASN en el tejido adiposo tienen poco apetito y una marcada incapacidad para engordar. Otros modelos murinos que desarrollan obesidad presentan en el tejido adiposo un elevado grado de expresión y actividad para FASN (Penicaud, Ferre et al. 1991; Guichard, Dugail et al. 1992). En el ser humano, han sido identificados polimorfismos que modifican la secuencia y afectan la actividad de FASN. Son variaciones genéticas asociadas también a una mayor o menor tendencia a desarrollar problemas de sobrepeso u obesidad (Kovacs, Harper et al. 2004; Moreno-Navarrete, Botas et al. 2009).

Pese a que la abundancia de FASN en el tejido adiposo humano es reducida respecto a su presencia en el tejido hepático (Swierczynski, Goyke et al. 2000), FASN, así como ACC, siguen considerándose interesantes dianas terapéuticas contra los problemas de obesidad en humanos. Se hipotetiza que el bloqueo de estos factores lipogénicos puede hacer inviable la síntesis endógena de lípidos (*lipogénesis*) y, por extensión, la hipertrofia del adipocito e hiperplasia del tejido adiposo (Schmid, Rippmann et al. 2005; Berndt, Kovacs et al. 2007).

### 2.3.1-2. Enzima carboxilasa para la acetil-Coenzima A

La *Acetyl-CoA Carboxylase* (ACACA; EC 6.4.1.2, posición génica: NC\_000017.9, mRNA (5 isoformas): NM\_198834.1, 39.1, 36.1, 37.1 y 38.1, proteína: NP\_942131.1, 36.1, 33.1, 34.1 y 35.1) fue descubierta a finales de los años 50 por Salih Wakil como una enzima fundamental en el anabolismo lipídico. Cataliza la formación de *malonil*-CoA a partir del *acetil*-CoA en una reacción de transferencia en dos tiempos: 1º)  $ATP + CO_2 + \text{biotinyl-ACC} \rightarrow ADP + P_i + \text{carboxy-biotinyl-ACC}$ , y 2º)  $\text{Carboxy-biotinyl-ACC} + \text{Acetyl-CoA} \rightarrow \text{biotinyl-ACC} + \text{Malonil-CoA}$ . El *malonil*-CoA es uno de los sustratos de FASN. La actividad de ACC depende del control alostérico de la *biotina*, también llamada vitamina H, B7 y B8 (Wakil and Abu-Elheiga 2009).

Existen 2 isoformas para la ACC. La ACC-1 (267 KDa) es la forma predominante y polimeriza en estructuras filamentosas muy activas (Brownsey, Boone et al. 2006). La expresión y actividad de ACC-1 es de importancia en tejidos

lipogénicos tales como el adiposo, hepático y la glándula mamaria. La expresión de ACC en estos tejidos depende del estímulo insulínico y de las dietas hidrocarbonadas. Las dietas ricas en grasas inhiben su expresión, que también depende de factores de transcripción como SREBP-1c, los PPAR $\gamma$  y los *receptores para hormonas tiroideas* (TRs). Su actividad está regulada por diversos controles de naturaleza alostérica (incluida la propia polimerización) y modificaciones covalentes (más de 8 de sus residuos pueden ser fosforilados). En un proceso de retroalimentación negativa, el *malonil-CoA* reduce la actividad catalítica de ACC. Por otro lado, el glutamato y el citrato inducen la expresión y activación de esta enzima (Brownsey, Boone et al. 2006).

Durante años la elevada complejidad de ACC ha dificultado su estudio y la correcta valoración de su potencial como diana terapéutica en trastornos metabólicos complejos como el cáncer o la obesidad. Estudios recientes como los de Harwood et al. (Harwood 2005; Tong 2005; Corbett and Harwood 2007) han empezado a dilucidar el papel de la ACC en este tipo de problemas clínicos (Choi, Savage et al. 2007).

### 2.3.1-3. Enzima desaturasa para el estearoil CoA

La *Stearoyl-CoA desaturase* (SCD; EC 1.14.19.1, *posición génica*: NC\_000010.10; *mRNA*: NM\_005063.4; *proteína*: NP\_005054.3) es una enzima limitante en la producción de ácidos grasos (FAs). Anclada al retículo endoplasmático, cataliza la conversión de FAs saturados como el *palmitato* a FAs monosaturados, especialmente en forma de *oleato*. Pese a que el *oleato* es uno de los FAs más abundantes en la dieta y el tejido adiposo, la regulación de esta enzima está sujeta a importantes variaciones y su modulación afecta numerosos procesos en diferentes tejidos (Ntambi and Miyazaki 2003).

La disrupción del gen que codifica para SCD-1 reduce la acumulación de tejido adiposo inducida por dieta y aumenta la sensibilidad a la insulina en modelos murinos (Cohen, Ntambi et al. 2003; Rahman, Dobrzyn et al. 2003). En los tejidos lipogénicos de estos modelos aumenta la expresión de genes vinculados a la oxidación de FAs y disminuye la síntesis de factores necesarios para la lipogénesis (Rahman, Dobrzyn et al. 2003; MacDonald, Singaraja et al. 2008). Un aumento en la expresión y la actividad de SCD-1 está asociado con la progresión de la resistencia a la insulina, el trastorno metabólico y la obesidad (Cohen, Ntambi et al. 2003; Flowers, Miyazaki et al. 2006). Dietas ricas en glucosa, colesterol y vitamina A o D, la insulina y los *factores de crecimiento* (GF) regulan positivamente la expresión de SCD-1 mediante la activación del SREBP-1c (Mauvoisin, Rocque et al. 2007). Los estrógenos, el glucagón, la T<sub>3</sub> y la leptina, así como la ingesta de FAs polinsaturados (PUFAs) de cadena larga como el *omega-3* inhiben su expresión en tejidos lipogénicos como el hepático y el adiposo (Mauvoisin and Mounier).

## 2.3.2 - Lipólisis

Los procesos lipolíticos ocurren continuamente en todos los tejidos y tipos celulares. Importantes enzimas y factores reguladores de este sistema han sido identificados y caracterizados a lo largo de los últimos 15 años. Cabe destacar la acción de hidrolasas como la *lipasa para triglicéridos del tejido adiposo* (ATGL), la *lipasa sensible a hormonas*, también llamada *lipasa E* (LIPE), y la *lipasa para monoglicéridos* (MGL), así como todos aquellos factores y rutas metabólicas que regulan la catálisis lipídica en el *liposoma* y los factores que lo constituyen (Lass, Zimmermann et al.).

### 2.3.2-1. Enzima lipasa para triglicéridos del tejido adiposo

La *Adipose triglyceride lipase* (ATGL; EC 3.1.1.3, posición génica: NC\_000011.9, mRNA: NM\_020376.3, proteína: NP\_065109) es una enzima de 504 aminoácidos responsable del primer paso en la hidrólisis de los TAGs liberando DAGs y FAs no esterificados. Su importancia fue puesta de relieve con la creación de ratones *knock-out* para el gen *ATGL*. Estos ratones *knock-out* presentaban una elevada tasa de deposición ectópica de grasas (*lipotoxicidad*), especialmente en el músculo y el sistema renal. La deposición masiva de FAs en el corazón de estos modelos animales desencadenaba problemas cardíacos agudos y su muerte prematura (Haemmerle, Lass et al. 2006). Del mismo modo, mutaciones para el gen *ATGL* en humanos han sido vinculados a la acumulación de TAGs y la alta incidencia de miopatías cardíacas (Chen, Hong et al.; Ohkuma, Nonaka et al. 2008).

La actividad catalítica de las lipasas está regulada por numerosos moduladores alostéricos. La actividad de ATGL, por ejemplo, aumenta ante la presencia de un coactivador denominado CGI-58, también conocido como  *$\alpha/\beta$  hydrolase domain containing protein 5* o *1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase*. Se trata de un pequeño transcrito evolutivamente muy conservado que codifica para una proteína de 349 aa capaz de interactuar con el dominio N-terminal de la enzima cambiando su conformación y facilitando la presentación del sustrato y el reemplazamiento del producto (Lass, Zimmermann et al. 2006). La *proteína activadora G0/G1 2* (G0S2), por otro lado, inhibe la actividad de ATGL induciendo *in vitro* la acumulación de lípidos (Yang, Lu et al.).

Los estimulación  $\beta$ -adrenérgica regula positivamente la actividad de las lipasas a través de la inducción de CGI-58 y la desvinculación del mismo de las *perilipinas*, una familia de factores que *protegen* la vacuola lipídica y su contenido de las hidrolasas (Granneman, Moore et al. 2007). La expresión de ATGL está fuertemente inducida durante la diferenciación del adipocito y mediante la acción de los PPAR $\gamma$ . Glucocorticoides como la DEX y agonistas de PPAR $\gamma$  como la rosiglitazona, así como,

en términos generales, el ayuno, inducen la expresión de ATGL. La insulina y la ingesta de alimentos inhiben la expresión de estos factores (Kralisch, Klein et al. 2005; Kim, Tillison et al. 2006). El papel de la *leptina*, un potente agente anti-lipogénico y lipolítico (Marti, Novo et al. 1998), en la regulación de la presencia de lipasas en los tejidos lipogénicos no acaba de estar claro. La obesidad y la resistencia a la insulina parecen estar estrechamente asociadas con cambios significativos en la expresión y la actividad de estas hidrolasas (Langin, Dicker et al. 2005; Kershaw, Hamm et al. 2006; Langin 2006).

### 2.3.2-2. Enzima lipasa sensible a hormonas

La *Hormone-sensitive lipase* (LIPE; EC 3.1.1.79, posición génica: NC\_000019.9, mRNA: NM\_005357.2, proteína: NP\_005348.2) es una enzima multifactorial capaz de hidrolizar una gran variedad de ésteres de acilo, incluidos TAGs, DAGs, y monoacilglicéridos (MAGs). La estimulación hormonal desencadena, mediante receptores  $\beta$ -adrenérgicos, la fosforilación de las *perilipinas* y LIPE en el adipocito. La *perilipina-1* permite la translocación de la enzima al lumen de la vacuola lipídica e induce su actividad lipolítica (Schweiger, Schreiber et al. 2006).

### 2.3.2-3. Enzima lipasa para monoglicéridos

La *Monoglyceride lipase* (MGL; EC 3.1.1.23, posición génica: NC\_000003.11, mRNA (2 isoformas): NM\_001003794.1 y NM\_007283.5, proteína: NP\_001003794.1 y NP\_009214.1) hidroliza MAGs, pero no TAGs ni DAGs. La regulación, estructura y función específica de MGL, una enzima de 33 KDa y expresión constitutiva, sigue los mismos patrones que el resto de lipasas. MGL forma parte de la superfamilia de *hidrolasas de serinas* y contiene, por lo tanto, el dominio catalítico GX SXG típico de este tipo de hidrolasas. La triada catalítica de MGL, identificada en la Ser<sup>122</sup>, His<sup>269</sup> y la Asp<sup>239</sup>, consigue la degradación completa de los TAGs. Sin embargo la capacidad lipasa de monoglicéridos no es específica de MGL dado que la presentan también LIPE y otras lipasas menos frecuentes, por lo que la importancia de esta enzima en los tejidos en que se expresa no está clara (Wang and Eckel 2009).





## 2.4- Vías de regulación endocrina

El metabolismo sistémico, entendido como los procesos de síntesis y destrucción de moléculas, está controlado por dos hormonas pancreáticas y el balance entre ellas y sus efectos antagonistas. Se trata de la insulina y el glucagón (*Levine and Haft 1970*) que operan en constante coordinación con el sistema hormonal inherente a cada situación y tejido para mantener el balance entre *catabolismo* y *anabolismo*.

En numerosas situaciones, como la fase post-traumática temprana (*Kotani, Usami et al. 1996*) o la respuesta metabólica a sepsis severa (*Bessey, Watters et al. 1984; Gelfand, Matthews et al. 1984*), la regulación de este balance energético puede verse alterado. A lo largo de los últimos años está resultando evidente que alteraciones de la función del sistema inmune innato están intrínsecamente asociadas a las rutas metabólicas y el correcto balance (*homeostasis*) de las mismas (*Pickup and Crook 1998; Festa, D'Agostino et al. 2000; Fernandez-Real and Ricart 2003; Ridker, Buring et al. 2003*). La obesidad, la resistencia a la insulina, la hipertensión y la hipertrigliceridemia son parte integrante del denominado *síndrome metabólico* (*Festa, D'Agostino et al. 2000; Ridker, Buring et al. 2003*), donde la producción alterada de citocinas pro-inflamatorias está vinculada a (si no ser directamente responsable de) muchas de sus complicaciones.

La IL-6 o la *leptina*, por ejemplo, inducen importantes cambios en los ejes endocrinológicos y alteran la expresión de numerosos mediadores hormonales como el glucagón, la norepinefrina, la insulina y las hormonas tiroideas (*Biondi; Reichlin 1993; Chrousos 1995; Papanicolaou and Chrousos 1995; Cohen and Friedman 2004*), modificando así el metabolismo intermedio (*Fried, Bunkin et al. 1998*). El hipermetabolismo sistémico resultante de esta asociación es susceptible de promover comorbilidades vinculadas a este tipo de patologías (*Ortega, Moreno-Navarrete et al.; Kotani, Usami et al. 1996; Roubenoff 1997*).

### 2.4.1 - La insulina

La *insulina* es una hormona de 51 aminoácidos que permite la entrada de glucosa a las células. Actúa directamente sobre la capacidad de uso y acumulación energética por parte de las células, incluidas las células adiposas (*Giorgino, Laviola et al. 2005*). Desde principios de los 90 se valora cada vez con más énfasis el papel de la insulina también en el sistema nervioso central (SNC), considerado no dependiente de insulina, donde desempeña un papel crucial en la supervivencia y la plasticidad sináptica de las neuronas (*Wickelgren 1998*).



La resistencia a la insulina es un estado fisiológico en el que la capacidad de acción de la insulina sobre los tejidos se ve alterada. Cuando un sujeto desarrolla resistencia a la insulina sus células  $\beta$ -pancreáticas segregan más insulina para compensar la demanda energética de los tejidos *insulinodependientes* que dejan de ser parcial o totalmente capaces de absorber la glucosa del medio extracelular. La resistencia a la insulina representa un problema al comprometer el correcto abastecimiento energético de las células que componen los tejidos. En paralelo a esta eventualidad, existe un peligroso incremento de las concentraciones de glucosa en el plasma y otros fluidos corporales, mientras el páncreas se extralimita en la producción de hormona para tratar de reconducir la situación.

La obesidad abdominal está estrechamente vinculada a la resistencia a la insulina y la DM2 (Rorive, Letiexhe et al. 2005). Un aumento en el volumen de tejido adiposo abdominal puede provocar importantes pérdidas en la *insulinosenibilidad periférica* (Festa, D'Agostino et al. 2000; Fernandez-Real and Ricart 2003; Fernandez-Real and Pickup 2008). Los rangos de *insulina* circulante en ayunas se sitúan entre las 5 y 20  $\mu$ U por mililitro de sangre. Cuando las concentraciones preprandiales de insulina en el plasma superan este rango se habla de *hiperinsulinemia*, una característica común en sujetos obesos e indicador de resistencia a la insulina y riesgo de DM2. Otras moléculas como la leptina y la adiponectina, ambas con capacidad moduladora para la producción de insulina y concentraciones variables en función del porcentaje de grasa corporal, o el factor alpha de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), la IL-6 y la resistina, capaces todos ellos de inducir resistencia a la insulina, pueden establecer un puente efectivo entre la obesidad y la resistencia a la insulina (Lafontan 2005), o a la inversa, entre los problemas de *insulinosenibilidad* y la tendencia al sobrepeso y la obesidad.

La insulina es una hormona con funciones anabólicas y una demostrada capacidad para la monitorización de los ciclos de almacenaje y utilización de la energía acumulada en los tejidos lipogénicos (Giorgino, Laviola et al. 2005). Al desarrollar resistencia a la insulina las células pierden su capacidad de traslocar la glucosa del MEC al citoplasma. La ausencia de glucosa dentro de las células lipogénicas es susceptible de inhabilitar la expresión y activación de factores relacionados con las rutas lipogénicas. La insensibilidad a la insulina puede también jugar un papel en la expresión de estos factores. De hecho, en condiciones normales, después de la ingesta de alimentos la concentración de insulina circulante aumenta de forma concomitante con la concentración de glucosa induciendo la actividad y expresión de enzimas y factores involucrados en la síntesis de FAs (Chascione, Elwyn et al. 1987; Girard, Perdereau et al. 1994).

La insulina ha sido identificada como un estímulo imprescindible para la diferenciación del adipocito (Suryawan, Swanson et al. 1997), un proceso que requiere también un aumento progresivo de enzimas lipogénicas como FASN y ACC

(Claycombe, Jones et al. 1998), así como el de factores de transcripción claves en este proceso. La importancia de la insulina en el desarrollo y la manutención del tejido adiposo quedaron establecidas tras los estudios con ratones *knock-out* para el *sustrato receptor para la insulina 1* (IRS1) en el tejido graso (ratones FIRKO). Estos modelos animales desarrollaban depósitos de grasa reducidos y tenían muy poca propensión al desarrollo de obesidad (Bluher, Patti et al. 2004). En el tejido adiposo humano la relación existente entre la insulina y el anabolismo lipídico ha sido también descrita. En voluntarios sin problemas de sobrepeso fueron identificados elementos de respuesta a la insulina en las regiones 5'-terminal de genes adipo y lipogénicos, y se demostró experimentalmente que la lipogénesis en el tejido adiposo humano acontece en respuesta a estímulos hormonales como la insulina y los glucocorticoides, siendo posible la completa supresión mediante dietas ricas en grasas (Wang, Jones Voy et al. 2004).

## 2.4.2 - Las hormonas tiroideas

Las *hormonas tiroideas* (THs) juegan un papel fundamental tanto en el desarrollo como en el metabolismo sistémico del individuo adulto y son imprescindibles para el correcto funcionamiento de todos los tejidos y sistemas del organismo (Ismail-Beigi, Haber et al. 1986; Loeb, Haber et al. 1987). Las THs son sintetizadas y liberadas al torrente sanguíneo por la *glándula tiroides* en respuesta a diversos estímulos hipotalámicos. La *tiroides* es una pequeña glándula neuroendocrina situada sobre la tráquea a la altura de la nuez. La 3, 5, 3'-*triiodotironina* (T<sub>3</sub>) es la única TH capaz de interaccionar con los *receptores para hormonas tiroideas* (TRs) y estimular una respuesta fisiológica en consecuencia. La T<sub>3</sub> induce la expresión de numerosos factores lipogénicos como el *malato deshidrogenasa* y controla a través de sus receptores la lipólisis y la lipogénesis en los principales tejidos lipogénicos. Por esta razón, numerosos estudios hipotetizaban sobre el papel de la *disfunción tiroidea* en el origen y el desarrollo de la obesidad humana. También se estudiaron y ensayaron medicamentos inspirados en la T<sub>3</sub> para combatir el sobrepeso y la obesidad (Oppenheimer, Schwartz et al. 1991).

El diagnóstico de la disfunción tiroidea se realiza mediante el estudio de los valores circulantes de la *hormona tirotrópica* (TSH, o hormona estimuladora para la producción de THs), que oscilan en sujetos con la función tiroidea normal (*eutiroideos*) entre los 0.3 y 3 mUI/mL (Ladenson, Singer et al. 2000). En aquellos sujetos con concentraciones de TSH irregulares son necesarios análisis adicionales para determinar las concentraciones circulantes de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> totales y *libres* (no asociadas a alguna de las proteínas que, como las globulinas, se encargan de su estabilización y transporte). Las T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> *libres* representan menos del 0.5% del total.

Los hipertiroidismos clínicos ( $T_4 > 11.2 \mu\text{g/dL}$  y  $T_4$  libre ( $fT_4$ )  $> 1.9 \text{ ng/dL}$ ) propios de patologías como la *enfermedad de Graves* se caracterizan por el adelgazamiento no condicionado del paciente, un incremento sistémico del metabolismo basal y la termogénesis y la activación de rutas catabólicas a través de los receptores  $\beta$  para THs ( $\text{TR}\beta$ ). Por otro lado, un incremento subclínico en la presencia circulante de THs suele ser inherente en pacientes con obesidad (*Biondi; Reinehr*) independientemente de otras características clínicas como la sensibilidad a la insulina (*De Pergola, Ciampolillo et al. 2007*).

#### 2.4.2-1. Receptores para hormonas tiroideas

La existencia de diversos biomarcadores para la actividad tisular específica de las THs permite estudiar con más detalle el efecto de estas hormonas sobre los tejidos. Son buenos ejemplos las *desyodasas*, enzimas que catalizan la formación de  $T_3$  a partir de  $T_4$ . Curiosamente, uno de los efectores más potentes para la expresión de estas enzimas es la propia  $T_3$  actuando en un sistema de retroalimentación positiva a través de los  $\text{TR}\beta$  (*Amma, Campos-Barros et al. 2001*).

Los receptores para hormonas tiroideas (TRs) fueron descubiertos en la década de los 80 por *Evans (Evans 1988)* y *Vennstrom (Forrest and Vennstrom 2000)*. Se expresan de forma constitutiva permitiendo el correcto funcionamiento de los tejidos y una gran variedad de procesos metabólicos. Todos los TRs son receptores nucleares para la *triiodotironina* ( $T_3$ ) y factores de transcripción con un amplio abanico de acción sobre la célula. Existen 2 clases de TRs con un total de 5 isoformas básicas. Los  $\text{TR}\beta$  (*c-erbA- $\beta$* ;  $\text{TR}\beta 1$ ,  $\text{TR}\beta 2$ , y  $\text{TR}\beta 3$ ) están codificados en la región p21 del cromosoma 3. Los  $\text{TR}\alpha$  (*c-erbA-a*; posición génica: NC\_000017.9, mRNA (2 isoformas): NM\_199334.2 y NM\_003250.4, proteínas: NP\_955366.1 para la isoforma  $\text{TR}\alpha 1$  y NP\_003241.2 para la isoforma  $\text{TR}\alpha 2$ ) se encuentran codificados en la región q21 del cromosoma 17.

Todos los TRs presentan un elevado grado de homología para el dominio de interacción a DNA, que consta de una estructura típica en muchos factores de transcripción, los *dedos de zinc*, y un elevado grado de afinidad por las *secuencias TRE (Thyroid Hormone Response Elements)*. Los TRE son secuencias promotoras altamente conservadas constituidas por la secuencia consenso (A/G)GGT(C/A/G)A. Todos los TRs, a excepción del  $\text{TR}\alpha 2$ , presentan también un elevado grado de homología para el dominio de interacción a ligando ( $T_3$ ). Todos ellos menos la isoforma  $\text{TR}\alpha 2$  dependen del cambio conformacional que les confiere la unión a ligando para llevar a cabo sus funciones como factores de transcripción.

La isoforma  $\text{TR}\alpha 2$  pierde, gracias al *splicing* alternativo del pre-mRNA del *c-erbA-a*, una parte importante de la información contenida en el 9º exón y, con ella, la capacidad de interaccionar con  $T_3$ . Sin embargo, la capacidad de unión del  $\text{TR}\alpha 2$  a secuencias TRE no se ve alterada. De esta forma  $\text{TR}\alpha 2$  se convierte en un antagonista

en función para el resto de TRs, siendo capaz de unirse y competir por las mismas secuencias genéticas que el resto de TRs pero sin la capacidad de inducir la transcripción de los genes que acompañan (Zhang and Lazar 2000).

Las moléculas responsables del procesamiento y la maduración del pre-mRNA del *c-erbA-a* y, por lo tanto, de la relación entre el TR $\alpha$ 1 y el TR $\alpha$ 2, son enzimas constitutivas como las *proteínas ricas en serinas y argininas* (SRs, o *Splicing Factors 2*, SF2) y las *ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas* (hnRNP), entre las cuales cabe destacar la H1 y A1 por su papel antagonista y dosis dependiente para el *splicing* alternativo del *c-erbA-a*. Ambas enzimas actúan a través del dominio rico en guaninas que constituye la *región SE80* o SE $\alpha$ 2 del *c-erbA-a* (Dreyfuss, Matunis et al. 1993; Hastings, Wilson et al. 2001; Expert-Bezancon, Sureau et al. 2004).

La T<sub>3</sub> incrementa a través de sus receptores el metabolismo basal y promueve la termogénesis y el gasto de oxígeno a través de la respiración mitocondrial en todos los tejidos del organismo, incluido el tejido adiposo. Se considera que hasta un 40% del consumo corporal de oxígeno está regulado por las THs y los cambios que inducen en la producción de factores celulares vinculados al catabolismo. La exposición al frío, por ejemplo, es un potente inductor de la termogénesis facultativa a través de la producción de la proteína de desacoplamiento mitocondrial *uncoupling protein-1* (UCP-1) en el WAT y, sobretodo, el BAT, mediante la acción de T<sub>3</sub>. Estos indicios permiten hipotetizar sobre una relación efectiva entre la falta de respuesta a THs, y la consecuente pérdida de capacidad catabólica en las células adiposas para explicar la hiperplasia del tejido adiposo en personas obesas.

Sin embargo, las THs tienen, también en los tejidos lipogénicos, importantes acciones anabólicas. De hecho, la T<sub>3</sub> es un factor crucial en la proliferación y la diferenciación del adipocito a través de los receptores TR $\alpha$ , las formas predominantes en el tejido adiposo humano (Galofre, Santos et al. 2006). Los THs promueven a través de los TR $\alpha$  la producción en adipocitos y hepatocitos de factores asociados tanto a procesos lipolíticos como lipogénicos (Feng, Jiang et al. 2000; Jiang, Miyamoto et al. 2004). La relación entre la función tiroidea local, el metabolismo lipídico y la obesidad central, estudiada a través del análisis de los TRs y los factores vinculados, podría permitir la caracterización de la relación existente entre estas variables para explicar algunos casos de obesidad en humanos (Grover, Mellstrom et al. 2007; Oetting and Yen 2007).

#### 2.4.2-2. Proteína de respuesta a T<sub>3</sub> 'Spot 14'

Entre los factores de transcripción señalados recientemente como posibles vectores para el desarrollo del sobrepeso y la obesidad (potenciales dianas terapéuticas, en consecuencia, para este tipo de problemas) cabe destacar una pequeña proteína ácida de 17 KDa llamada *thyroid hormone-responsive protein 'spot 14'* (proteína de respuesta a

T<sub>3</sub> 'Spot-14', S14; posición génica: NC\_000011.8, mRNA: NM\_003251.2, proteína: NP\_003242.1).

S14 se expresa casi exclusivamente en los tejidos lipogénicos. La respuesta hepática de S14 a los estímulos que inducen lipogénesis es rápida y robusta (Narayan, Liaw et al. 1984; Mariash, Seelig et al. 1986; Jump, Bell et al. 1990; Jump, Bell et al. 1990). De hecho, han sido identificadas numerosas secuencias de regulación genética para carbohidratos y THs en la región 5'-upstream del gen que codifica para S14 (Liu and Towle 1994; Shih, Liu et al. 1995). Además, tal y como ocurre con otros factores lipogénicos, la expresión de S14 se ve fuertemente inhibida por los ácidos grasos (Jump, Clarke et al. 1993).

Algunos estudios sugieren que S14 puede desempeñar un importante papel en la regulación de la lipogénesis (Kinlaw, Church et al. 1995; Martel, Bingham et al. 2006), mientras otros discrepan (Zhu, Anderson et al. 2005; Tsatsos, Augustin et al. 2008). El gen de S14 también ha sido relacionado *in vivo* con la resistencia a la insulina (Anderson, Zhu et al. 2009) y existen evidencias sobre la interacción de esta pequeña proteína con los factores de transcripción que regulan su expresión (e.g. los TRs), e incluso con la proteína 53 (p53), un factor crucial para el control del ciclo celular (Chou, Cheng et al. 2007; Chou, Ho et al. 2008).

La expresión nuclear de hS14 en algunas células tumorales aumenta junto a la presencia de enzimas lipogénicas (Sanchez-Rodriguez, Kaninda-Tshilumbu et al. 2005; Menendez, Vazquez-Martin et al. 2009). Por otro lado, el aumento de hS14 inhibe la proliferación celular e incentiva la diferenciación y la acumulación de vacuolas lipídicas en algunas líneas celulares (Sanchez-Rodriguez, Kaninda-Tshilumbu et al. 2005). Los tratamientos *in vitro* con ácido linoleico conjugado (CLA) reducen la lipogénesis y el crecimiento tumoral a través de la inhibición de hS14 y FASN (Donnelly, Olsen et al. 2009).

El gen que codifica para S14 en humanos (hS14) se sitúa en el cromosoma 11q13.5 y comparte entre un 78 y un 81% de homología con el S14 de roedores (Grillasca, Gastaldi et al. 1997; Ota, Mariash et al. 1997). El comportamiento de hS14 en tejidos lipogénicos sugiere un vínculo entre la acción de los THs y la lipogénesis, y, por lo tanto, definen hS14 como un factor a tener en cuenta en el estudio de las asociaciones existentes entre las THs, la adipogénesis, la lipogénesis y el desarrollo de la obesidad. Sin embargo, la escasez de datos sobre la naturaleza molecular y la actividad bioquímica del péptido hS14, así como sobre su rol en el anabolismo lipídico, dificulta su comprensión (Zhang, Peng et al.).

### 2.4.2-3. Desyodasas

Existen evidencias bien documentadas en humanos (mediante estudios transversales (Reinehr and Andler 2002; De Pergola, Ciampolillo et al. 2007; Reinehr, Isa et al. 2008), y

longitudinales (Bray, Fisher et al. 1976), basados en el análisis de la función tiroidea en pacientes obesos antes y después de perder peso) sobre la relación que existe entre las concentraciones circulantes de  $T_3$  libre ( $fT_3$ ) y el perímetro de la cintura o el índice de masa corporal. Según estos estudios las concentraciones de  $fT_3$  son más elevadas en sujetos con obesidad, pero por debajo de los criterios clínicos para el diagnóstico de hipertiroidismo (Biondi; Reinehr). De hecho, una acumulación progresiva de grasa corporal está vinculada a un aumento concomitante de la concentración circulante de  $T_3$  independientemente de otros parámetros metabólicos como la sensibilidad a la insulina (De Pergola, Ciampolillo et al. 2007). Existe, sin embargo, muy poca información sobre los mecanismos involucrados en esta relación o sobre las consecuencias fisiológicas de la misma.

La secreción tiroidea explica solo un ~20% de las concentraciones circulantes de  $T_3$ . La  $T_3$  se produce mayormente en tejidos periféricos mediante la *desyodonización* del anillo externo de la *tiroxina* ( $T_4$ ) en una reacción catalizada por unas enzimas denominadas *desyodasas* (Bianco, Salvatore et al. 2002). Las *Iodothyronine Deiodinases* (DIOs; EC 1.97.1.20 y EC 1.97.1.11) son una familia de enzimas muy importante en la regulación de las THs y sus actividades en los tejidos. La *desyodasa de tipo 1* (D1) ejerce su versátil capacidad enzimática sobre un amplio abanico de sustratos ( $T_4$ ,  $T_3$  y  $T_3$  reversa) mediante la catálisis de la desyodonización del anillo externo o interno de la  $T_4$  para formar, respectivamente,  $T_3$  y  $T_3$  reversa. La D1 se expresa en el hígado, los riñones, la glándula tiroidea y pituitaria, entre otros, y se considera, en el ser humano, la principal productora de  $T_3$  circulante (Leonard, Mellen et al. 1983; Pavelka, Kopecky et al. 1997). La actividad de D1 ha sido descrita como dependiente de  $T_3$  (Bianco, Salvatore et al. 2002) y de leptina (Cabanelas, Lisboa et al. 2006; Araujo, Andrade et al. 2009) pero su función en el tejido adiposo humano sigue siendo desconocida. La *desyodasa de tipo 2* (D2) cataliza la conversión de  $T_4$  a  $T_3$  y se expresa en el tejido adiposo marrón, la placenta, la glándula pituitaria y el músculo (Pavelka, Kopecky et al. 1997). La *desyodasa de tipo 3* (D3) es mucho menos prevalente y cataliza la desyodonización del anillo interno de la tiroxina y de la triiodotironina para producir, respectivamente,  $T_3$  reversa y diiodotironina ( $T_2$ ).

Pese a que se considera que la  $fT_3$  circulante deriva principalmente de la actividad de D1 en hígado y riñones (Chanoine, Braverman et al. 1993; Chopra, Taing et al. 1996), este papel ha sido recientemente puesto en duda por las concentraciones circulantes de  $T_3$  en ratones deficientes para D1 que no muestran, respecto a los ratones salvajes, cambios significativos en la  $fT_3$  circulante (Streckfuss, Hamann et al. 2005; Schneider, Fiering et al. 2006; Avram, Avram et al. 2007), y por las estimaciones realizadas para roedores (Nguyen, Chapa et al. 1998) y humanos (Maia, Kim et al. 2005), que sugieren que una fracción significativa de la  $T_3$  circulante es generada por la actividad catalítica de D2. Por otro lado, la producción diaria de  $T_3$  en 1.5 Kg de tejido



*Mecanismos de regulación del anabolismo lipídico en el tejido adiposo humano*

hepático humano se estima en  $\sim 8$  nmoles/día, mucho menos de los aproximadamente 40 nmoles de  $T_3$  extratiroidal que se producen cada día, según otros estudios (*Visser, Kaptein et al. 1988*).

---

*3/- Hipótesis*

---





### **3.1- Regulación del anabolismo lipídico en el tejido adiposo del paciente obeso**

La insulina es capaz de monitorizar los ciclos de almacenaje y utilización de la energía acumulada en los tejidos lipogénicos y representa un estímulo imprescindible para la adipogénesis, un fenómeno que depende del incremento progresivo de enzimas lipogénicas como FASN y ACC. Uno de los aspectos más destacados de la obesidad es la inducción de resistencia a la insulina. Luego, la obesidad y la resistencia a la insulina podrían disminuir la capacidad lipogénica del tejido adiposo del paciente obeso.

### **3.2- *hS14* en el tejido adiposo y durante la adipogénesis**

La respuesta del S14 a los estímulos que inducen lipogénesis es rápida y robusta. A finales de los 90 se analizó la respuesta postprandial del hS14 en tejido adiposo y se detectaron cambios en sujetos delgados pero no en individuos con obesidad. Otros indicios sugieren que hS14 podría condicionar la adipo/lipogénesis, el crecimiento del tejido adiposo y el desarrollo de la obesidad. Se hipotetiza una asociación entre la expresión de hS14 en el tejido adiposo humano y la obesidad, y cambios a lo largo del proceso de diferenciación del adipocito.

### **3.3- Participación de la relación *TRa1:TRa2* en la obesidad y las diferencias existentes entre los depósitos adiposos**

La  $T_3$  promueve a través de sus receptores la expresión de factores fundamentales para la diferenciación de la célula adiposa y la síntesis endógena de FAs. Los TR $\alpha$  y, concretamente, la expresión diferencial de sus dos isoformas (el TR $\alpha$ 1 y el TR $\alpha$ 2) en el tejido adiposo podrían estar vinculados a la acumulación de tejido adiposo, el grado de obesidad y la diferenciación del adipocito, y explicar algunas de las diferencias existentes en humanos entre los depósitos adiposos omental y subcutáneo.

### **3.4- Actividad de las *DIOs* en el tejido adiposo humano: contribución al trastorno metabólico y la $T_3$ circulante**

Estudios recientes demostraron que la actividad de las desyodasas del tejido adiposo del ratón puede ser alterada mediante la inducción de cambios en el porcentaje de tejido adiposo y por la leptina. Luego, la expresión y la actividad de las diferentes

*Mecanismos de regulación del anabolismo lipídico en el tejido adiposo humano*

desyodasas podrían variar también en el tejido adiposo humano en función del peso, condicionando otros parámetros clínicos como la concentración circulante de  $T_3$  o el perfil lipídico.

---

## *4/- Objetivos*

---



## **4.1- Análisis de la expresión de factores lipogénicos en el tejido adiposo omental. Asociación con parámetros clínicos**

- 4.1.1- Analizar la expresión de la *enzima sintetizadora de ácidos grasos* (FASN) y la *enzima carboxilasa para la acetil-Coenzima A* (ACC) en el tejido adiposo omental.
- 4.1.2- Comparar estos valores de expresión entre grupos de sujetos considerando el efecto de parámetros clínicos como el grado de obesidad y resistencia a la insulina, marcadores para el estado inflamatorio, lípidos circulantes, la edad y el sexo.
- 4.1.3- Valorar estadísticamente la existencia de asociaciones con otras variables bioquímicas en función del sexo, la edad, el grado de obesidad y sensibilidad a la insulina.

## **4.2- Análisis de *hS14* en el tejido adiposo y durante la adipogénesis. Asociación con parámetros clínicos**

- 4.2.1- Analizar la expresión del *elemento de respuesta a hormona tiroidea 'Spot 14'* (hS14) en el tejido adiposo visceral y subcutáneo, en células aisladas a partir de tejido adiposo humano, y durante la adipogénesis.
- 4.2.2- Evaluar la relación entre la expresión de hS14 en el tejido adiposo humano y la obesidad, analizar las diferencias entre grupos de sujetos en función del grado de obesidad y resistencia a la insulina, y la existencia de asociaciones con variables bioquímicas y metabólicas como la expresión de FASN y ACC.
- 4.2.3- Estudiar la evolución y la distribución subcelular de hS14 en pre-adipocitos y adipocitos humanos cultivados *in vitro*.

## **4.3- Análisis de la relación *TRa1:a2* en el tejido adiposo y las diferencias entre depósitos adiposos**

- 4.3.1- Analizar la expresión del TR $\alpha$ 1, el TR $\alpha$ 2 y la relación *TRa1:TRa2* en el tejido adiposo visceral y subcutáneo.
- 4.3.2- Analizar la expresión relativa de hS14 (como marcador tisular de la acción TR $\alpha$ 1) y de algunos de los factores de *splicing* implicados en la relación *TRa1:TRa2* (hnRNP H1, hnRNP A1 y SF2).
- 4.3.3- Evaluar la relación *hnRNP A1:SF2* como responsable último de la relación *TRa1:TRa2* en el tejido adiposo visceral y subcutáneo humano.

- 4.3.4- Analizar diferencias en la expresión y el procesamiento del transcrito primario codificante para los receptores TR $\alpha$ 1 y TR $\alpha$ 2 en el tejido adiposo de sujetos agrupados en función del grado de obesidad.

#### **4.4- Estudio de las DIOs en el tejido adiposo humano: contribución al desorden metabólico**

- 4.4.1- Analizar la actividad de las *desyodasas* (D1, D2 y D3) en los depósitos de tejido adiposo visceral y subcutáneo humano.
- 4.4.2- Analizar la expresión de las *desyodasas*, la *leptina* y la *enzima desaturasa para el estearoil CoA 1* (SCD-1) en el tejido adiposo humano.
- 4.4.3- Evaluar la existencia de diferencias significativas en la actividad y la expresión de las *desyodasas* entre grupos de sujetos en función del peso corporal y la relación entre las variables bioquímicas y metabólicas, incluidas las concentraciones circulantes de las diferentes THs, y las determinaciones obtenidas para cada sujeto y tejido en función del sexo, la edad y el grado de obesidad.

---

## *5/- Metodología*

---





## 5.1- Determinaciones clínicas

### 5.1.1- Caracterización antropométrica

El *índice de masa corporal* (IMC) se calcula mediante la división del peso (en quilogramos) por la altura (en metros) al cuadrado. El perímetro de la cintura se establece a la altura de la última costilla flotante y la cresta ilíaca. El perímetro de la cadera se mide en la región glútea. La fórmula de Deurenberg (*Deurenberg, van der Kooy et al. 1991*) y la bioimpedancia eléctrica (*TANITA® MC-190 Body Composition Analyzer, Tanita Corporation; Tokyo, Japan*) se usan para estimar el porcentaje de grasa corporal.

Los participantes se clasifican en función del IMC como sujetos delgados ( $IMC \leq 25 \text{ kg/m}^2$ ), con sobrepeso ( $25 < IMC \leq 30 \text{ kg/m}^2$ ), obesidad ( $30 < IMC \leq 40 \text{ kg/m}^2$ ), u obesidad mórbida ( $40 \text{ kg/m}^2 < IMC$ ), según las directrices de la OMS (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>). Puede utilizarse un IMC de  $30 \text{ kg/m}^2$  como punto de corte para identificar los casos de obesidad. Los porcentajes de grasa obtenidos mediante *bioimpedancia* también son útiles para distinguir los sujetos obesos de los individuos control ( $\geq 25\%$  en hombres y  $\geq 35\%$  en mujeres).

### 5.1.2- Caracterización bioquímica

Las concentraciones de glucosa circulante se obtienen (en ayunas y por duplicado) mediante una reacción de oxidación y la consecuente variación colorimétrica, monitorizada con un espectrofotómetro *Beckman Glucose Analyzer II* (*Beckman Instruments; Brea, Calif*). El colesterol total se mide también por espectrofotometría y utiliza la reacción de esterificación/oxidación catalizada por peroxidasas en un *BM/Hitachi 747-100 analyzer* (*Roche Diagnostics; Indianapolis*). Los lípidos de alta (HDL) y baja (LDL) densidad precipitan con ácido fosfotúngstico e iones de magnesio. Los triglicéridos se analizan mediante la reacción del glicerol fosfato oxidasa/peroxidasa, que origina un compuesto coloreado, la *quinonaimina*. Las concentraciones circulantes en ambos casos se estiman en suero mediante métodos espectrofotométricos. Las concentraciones séricas de  $T_3$ ,  $T_4$  y TSH, totales y libres, se obtienen por electroquimioluminiscencia (*Roche Diagnostics; Basel, Switzerland*). La *hemoglobina total* (Hb) y la *proteína C reactiva* (pCr) son también determinaciones bioquímicas rutinarias que se obtienen por espectrofotometría en muestras de plasma con un anticoagulante común, el *ácido etilendiaminotetraacético* (EDTA) (*Coulter Electronics; Hialeah, FL*).

Las proteínas suspendidas en fluidos con una elevada concentración de glucosa se *glucosilan* mediante la unión covalente de moléculas de glucosa y generan proteínas *glucosiladas* o *glucosiladas*. La Hb tiene una fuerte tendencia a unir moléculas de glucosa libres en el plasma. El porcentaje de estas proteínas con moléculas de glucosa adheridas es lo que se denomina *hemoglobina glicada* o *glucosilada* (HbA1c), un indicador de las concentraciones de glucosa en el torrente sanguíneo durante el tiempo de vida media de la Hb (de 6 a 8 semanas) y un marcador indirecto de resistencia a la insulina. La HbA1c de un sujeto adulto sano oscila entre el 5 y el 6%. Los pacientes diabéticos bien controlados presentan valores de entre el 6 y el 7%. En general, valores superiores al 12% indican un control deficiente de la diabetes. Se analiza mediante métodos cromatográficos, inmunológicos y electroforéticos en un lisado de eritrocitos.

### **5.1.3- Sensibilidad a la insulina**

Mediante el *test de sobrecarga oral de glucosa* (OGTT) se puede establecer el grado de intolerancia a la glucosa de un sujeto, un parámetro inversamente proporcional a la sensibilidad a la insulina. El OGTT tiene en cuenta los valores de glucosa circulante en ayunas, y 30, 60, 90 y 120 min después de ingerir 75 g de glucosa.

Los valores establecidos para el criterio de *normotolerancia* son de 60 a 100 mg de glucosa por decilitro (dL) de sangre en ayunas, de menos de 200 mg/dL 1 hora después, y de menos de 140 mg/dL al finalizar el OGTT. Valores entre 140 y 200 mg/dL en el minuto 120 indican un cierto deterioro en la tolerancia a la glucosa y un mayor riesgo de desarrollar diabetes. Concentraciones de glucosa circulante por encima de 200 mg/dL a lo largo del OGTT son signo inequívoco de diabetes.

La *prueba modificada de tolerancia a la glucosa con muestras frecuentes* (FSIVGTT) permite obtener una medida de sensibilidad a la insulina más precisa que la anterior. Después de tomar muestras de sangre en ayunas 15 y 5 minutos antes de empezar el test, se administran por vía parenteral 300 mg de glucosa por kg de peso. 20 min después se inoculan también 0.03 U de insulina recombinante (*Actrapid; Novo, Denmark*) por kg de peso. Se recogen a continuación muestras de sangre de las venas antecubitales en los minutos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, y 180 posteriores al inicio del test (minuto 0). Las concentraciones de glucosa e insulina de cada punto del test se introducen en programas informáticos ideados para calcular la naturaleza de la curva al compararla con los modelos mínimos de respuesta (*Mínimal Model*). La desaparición de la glucosa circulante, corregida por los niveles de insulina y de glucosa en cada punto, permite la obtención del parámetro  $S_I$  ( $10^{-4}$ ) por minuto y microunidad/mililitro, o *índice de*

*sensibilidad a la insulina* ( $S_i$ ), como una medida del efecto de la insulina sobre el organismo y la capacidad de absorción de glucosa por parte de los tejidos.

La resistencia a la insulina puede calcularse también según *el modelo homeostático de resistencia a la insulina* (HOMA) (Bonora, Targher et al. 2000) que utiliza los valores de glucosa e insulina en ayunas según la fórmula  $HOMA_{IR} = (\text{insulina} \times \text{glucosa}) / 22.5$ , donde la insulina se presenta en  $\mu\text{U}/\text{ml}$  y la glucosa en  $\text{mmol}/\text{L}$ .

## 5.2- Determinaciones básicas

### 5.2.1- Muestra de tejido adiposo

Las muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral se obtienen mediante cirugía abierta o laparoscópica en los *Servicios de Cirujía* de los centros participantes (Hospital Dr. Josep Trueta de Girona, Hospital Virgen del Rocío de Málaga y Clínica Universitaria de Navarra). Los principales motivos de intervención son, por este orden, el *by-pass* gástrico, las colecistectomías y las operaciones abdominales para reparar hernias inguinales. El tejido es inmediatamente lavado en solución salina estéril, troceado en fragmentos de  $\sim 100$  mg sobre una base de nieve carbónica y ultracongelado con nitrógeno líquido antes de ser almacenado a menos  $80^\circ\text{C}$ . Se obtiene un fragmento de tejido adiposo de aquellos donantes que acceden a participar y firman un *consentimiento informado* (CI) donde se detalla la naturaleza y riesgos potenciales del estudio en el que participan. Todos estos voluntarios son de raza caucásica y están caracterizados por un peso estable durante los 3 meses previos al tratamiento quirúrgico, sea este de la índole que sea. Ninguno de ellos debe mostrar síntomas evidentes de enfermedad infecciosa o mental, o procesos inflamatorios o cancerosos en el momento de la operación. En todos los casos, el *Comité de Ética del Hospital Universitario Dr. Josep Trueta de Girona* ha aprobado los protocolos experimentales que se describen a continuación.

### 5.2.2- Fraccionamiento celular

El tejido adiposo fresco puede ser procesado para aislar los adipocitos del resto de tipos celulares que lo integran, las *células del estroma-vascular* (SVC). El procedimiento se basa en una característica inherente al adipocito maduro: su vacuola lipídica y la flotabilidad que la misma le confiere.

El fragmento de tejido graso fresco se manipula en condiciones asépticas dentro de una campana de flujo laminar. La muestra se lava para eliminar restos de sangre y se tritura en una solución de digestión compuesta por un tampón químico,

el ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfónico o HEPES (*Sigma Aldrich; St Louis, USA*) a 100 mM, 120 mM de NaCl, 50 mM de KCl, 5 mM de D-glucosa, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, al 1.5% de albúmina de suero bovino (BSA) de tipo V, un 2% de penicilina/streptomicina (P/S), y 1.5 mg de colagenasa de tipo I (*CLS type 1, Worthing Biochemical Corp; Lakewood, USA*) por mL. La mezcla se incubaba a 37°C en agitación durante 1 hora para la total disgregación del tejido. Las fracciones celulares se separan a continuación mediante centrifugación (5 min a 400 g). Los adipocitos maduros (MAs) que flotan en la superficie y las SVCs que quedan sedimentadas en forma de *pellet* después de centrifugar se separan y resuspenden en 20 mL de solución salina al 2% de P/S, y se filtran y se lavan en filtros de nylon estériles (*Becton Dickinson Biosciences; Erembodegem, Belgium*). Las fracciones celulares son centrifugadas por última vez (5 min a 400 g) para acabar de concentrar las células, ya limpias y aisladas, transferirlas a nuevos recipientes estériles y congelarlas a -80°C.

### **5.2.3- Cultivo y diferenciación de adipocitos**

#### *5.2.3-1. Cultivo y diferenciación de células adiposas humanas*

El cultivo y la diferenciación *in vitro* de células adiposas humanas permite una aproximación experimental a la *adipogénesis* y el estudio de los factores moleculares que participan. Si bien es posible aislar *adipoblastos* a partir de tejido adiposo humano fresco (i.e. mediante medios de cultivo que favorecen la supervivencia y el crecimiento de los adipoblastos entre todos los tipos celulares que constituyen el SVC), existen casas comerciales que venden *adipoblastos* aislados y criopreservados con este fin (e.g. *Zen-Bio Inc.; Research Triangle Park, NC, USA*). Estas empresas ofrecen al usuario una amplia variedad de tipos celulares y los medios de cultivo necesarios para su correcto cultivo y desarrollo.

Los pre-adipocitos humanos se cultivan en flascos T-75 a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> con un medio al 50% de *medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco* (DMEM) y la mezcla nutritiva F-12 suplementada con *suero fetal bovino* (FBS) al 10%, HEPES y glutamina al 1% y 10 U/mL de P/S (*GIBCO, BRL; Grand Island, NY, USA*). Una semana después, las células habrán triplicado su número. Los pre-adipocitos se resuspenden, cuentan y siembran de nuevo con *medio para pre-adipocitos* (PM) a razón de ~40,000 células por cm<sup>2</sup>. En aproximadamente 24 h los adipoblastos habrán sedimentado y alcanzado la confluencia. Es en este instante (día 0) cuando se aplica sobre la monocapa de pre-adipocitos el estímulo que induce la adipogénesis en forma de *medio de diferenciación* (DM; *Zen-Bio, Inc.*). El DM consiste en PM enriquecido con insulina, *dexametasona* (DXM), *isobutil metilxantina* (IBMX), agonistas de PPAR $\gamma$  como la *rosiglitazona* (Rs), biotina, vitaminas como el pantotenato de calcio y antibióticos y

antifúngicos como la amfotericina B. Siete días más tarde (día 7) el DM es reemplazado por un medio de cultivo fresco y adecuado para el mantenimiento y la maduración de los adipocitos humanos (AM; *Zen-Bio, Inc.*). Este nuevo medio de cultivo, enriquecido con todos los suplementos del DM salvo los agonistas de PPAR $\gamma$  y la IBMX, favorecerá la ‘maduración’ de los adipocitos para que, unos 14 días después de inducir la adipogénesis (día 14), las células presenten el aspecto redondeado y con numerosas vacuolas lipídicas característico de los *adipocitos ‘maduros’*.

### 5.2.3-2. *Cultivo y diferenciación de células inmortales 3T3-L1*

Si bien existen importantes diferencias entre los cultivos *in vitro* de células embriogénicas fibroblásticas de ratón transformadas 3T3-L1 (*Zen-Bio Inc.; Research Triangle Park, NC, USA*) y adipoblastos humanos, el modelo murino permite, gracias a su versatilidad, una aproximación experimental cuando los modelos de células humanas germinales no están disponibles. Estas líneas inmortales permiten numerosos pases y su consiguiente expansión antes de perder la capacidad para transformarse en adipocitos. De este modo, a diferencia de las células germinales humanas, un solo vial de células permite un buen número de experimentos.

Las 3T3-L1 se cultivan en DMEM con 20 mM de glucosa, *suero de vaca* (CS) al 10%, HEPES y piruvato de sodio al 1%, 100 U/mL de penicilina y 100  $\mu$ g/mL de estreptomina hasta alcanzar la confluencia en una atmósfera estéril y estable a 37°C y 5% de CO $_2$ . Dos días después (día 0) se induce la diferenciación mediante medio de cultivo DMEM enriquecido con glucosa, *suero fetal de vaca* (FBS), HEPES, piruvato de sodio, penicilina, estreptomina y un cóctel hormonal compuesto de insulina (5  $\mu$ g/mL), DXM (0.25  $\mu$ M) y IBMX (0.5 mM). El medio de diferenciación se mantiene durante 2 días más y se reemplaza a continuación por medio fresco sin IBMX ni DXM (día 2). A partir del día 5 los adipocitos comenzarán a mostrar numerosas gotas lipídicas en su interior y cambios muy significativos en el perfil de expresión. A partir del día 7 más del 80% de las células de la monocapa mostrarán el aspecto típico del adipocito maduro, redondeado y lleno de refringentes vacuolas lipídicas bajo el microscopio óptico.

## 5.2.4- Monitorización de la adipogénesis mediante microscopía

### 5.2.4-1. *Fijación*

Al tratar una monocapa de células en cultivo con formaldehído al 4% (*formalina*) se consigue la fijación y la preservación de la misma al promover la formación de puentes reversibles entre los grupos amino de las proteínas con los átomos de

hidrógeno de las moléculas circundantes. Las células fijadas se mantienen inmutables y admiten tratamientos posteriores como el 'marcaje' de proteínas citoplasmáticas con anticuerpos o la tinción mediante reactivos químicos afines a algunos de sus componentes (e.g. el *rojo de Sudán* o *Oil Red O* (C.I. 26125;  $C_{26}H_{24}N_4O$ ), un agente soluble en lípidos neutrales como los triglicéridos útil para valorar el grado de diferenciación *in vitro* de las células adiposas).

#### 5.2.4-2. *Permeabilización y bloqueo*

El *Tritón® X-100* ( $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ , *polietilenglicol octilfenol eter*) es un detergente hidrofílico no iónico que permite, al 0.1% en PBS, la permeabilización reversible de células en cultivo. Después del tratamiento de 5 min es importante lavar con abundante PBS fresco antes de seguir con el protocolo.

El bloqueo consiste en la aplicación de PBS con un 5% de FBS a temperatura ambiente por un intervalo de 30 min. Los componentes del FBS reducen el número de interacciones inespecíficas entre los anticuerpos y las proteínas celulares durante el *marcaje* posterior.

#### 5.2.4-3. *Marcaje con anticuerpos*

Al igual que en el *western blotting*, la inmunofluorescencia se vale de la especificidad de la interacción entre un anticuerpo y su respectivo antígeno para señalar la posición del segundo y, en consiguiente, de la proteína que lo contiene. En uno de los artículos que forman parte de esta tesis se realizó la monitorización y el seguimiento mediante microscopia confocal del *elemento de respuesta a hormona tiroidea 'Spot-14'* (hS14) en pre-adipocitos humanos a lo largo de su conversión a adipocitos (*adipogénesis*). En paralelo, se reveló también la evolución de la *enzima sintetizadora de ácidos grasos* (FASN) y la formación y acumulación de gotas lipídicas.

Durante el *marcaje* con anticuerpos se aplica sobre pre-adipocitos y adipocitos maduros cultivados, diferenciados, fijados y permeabilizados *in vitro*, soluciones de 2.5 µg/mL de anticuerpos policlonales de conejo y monoclonales de ratón (*Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA*), respectivamente, para el revelado y análisis de hS14 y FASN durante la *adipogénesis*. Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente, se suceden lavados con PBS fresco y la aplicación de anticuerpos secundarios (0.05 mg/mL) dirigidos contra las cadenas pesadas de los anticuerpos primarios (*Invitrogen, Molecular Probes; Eugene, OR, USA*). Adheridos a cada uno de estos últimos, diferentes fluorocromos (*Alexa Fluor 488* y *594*, respectivamente) emitirán sendas señales luminiscentes para marcar la posición subcelular de las proteínas de interés. Después de la incubación con los anticuerpos secundarios (1 h a temperatura ambiente) sigue un último lavado con PBS fresco y la aplicación de una



solución de PBS con 2 µg/mL del *Hoechst 33342 (Invitrogen)*, un colorante para DNA que es excitado a longitudes de onda cercanas a los 350 nm que emite fluorescencia azul/cian con un máximo de emisión alrededor de 461 nm. El *Hoechst* puede usarse tanto en células vivas como en células fijadas y se emplea a menudo en sustitución de otros tintes para ácidos nucleicos como el DAPI (*4',6-diamidino-2-fenilindol*), un marcador fluorescente que se une a las regiones celulares ricas en adenina-timina.

Las imágenes son capturadas mediante un microscopio confocal *BD Pathway 855 Bioimager System (Becton Dickinson Biosciences)* con un objetivo fotográfico de x20 aumentos (*NA 075 Olympus; Madrid, Spain*), según las indicaciones del *Recommended Assay Procedure*, montadas y mezcladas con el software de *BD Attovision*.

## 5.2.5- Análisis de la expresión génica

### 5.2.5-1. Extracción de RNA

Es posible extraer y purificar el RNA total de un fragmento de tejido adiposo (o de cualquier otro tipo de muestra biológica) mediante métodos cromatográficos. La muestra congelada se introduce en un tubo de vidrio estéril de base redonda con 1 mL de *QIAzol® Lysis Reagent (QIAGEN; EUA)* frío. El *QIAzol®* (o *Trizol®*) es una mezcla comercial de guanidina, tiocianatos, fenoles y alcoholes que condiciona la degradación de las células y la manutención del material genético. El *QIAzol®* estabiliza el DNA y el RNA, e inactiva las RNAsas y DNAsas que podrían degradarlos. Dentro de este solvente, y mediante el uso de un homogeneizador (*Ultraturrax Werke®; Londres, Inglaterra*), se tritura la muestra a nivel subcelular.

Después de un periodo de reposo se añaden a la solución 0.2 volúmenes de cloroformo y se mezcla con energía. A continuación, la solución se centrifuga por un periodo de 15 min a 4°C y 1,200 xg. La mezcla pierde entonces su homogeneidad para mostrar tres fases claramente diferenciadas de las cuales, la fase superior, completamente incolora, es la que contiene el RNA disuelto y ya separado del resto de componentes. Esta fase, de unos ~600 µL, es transferida a un nuevo *Eppendorf®* estéril donde se mezcla con un volumen equivalente de etanol absoluto frío y estéril. En estas condiciones es posible que el material genómico contenido en la solución comience a ser visible debido a la desnaturalización de las hebras de RNA. La solución se transfiere entonces a una columna cromatográfica *RNeasy® Mini Spin column* del *RNeasy® Lipid Tissue Kit (QIAGEN, EUA)*, un kit comercial que permite aislar y purificar el RNA total de forma rápida y sencilla. El mecanismo de purificación se basa en las concentraciones alcohólicas decrecientes con las que se lava la columna cromatográfica con el material genómico adherido antes de su



elución final en un volumen de agua destilada libre en RNAsas. De esta forma es posible obtener entre 4 y 10 µg de RNA puro a partir de 100 mg de tejido adiposo.

La pureza y la concentración del RNA obtenido se estiman mediante métodos espectrofotométricos. El *NanoDrop™* (*Thermo Fisher Scientific; Wilmington, EUA*) permite valorar de forma precisa la concentración de RNA de la solución final y su pureza al analizar también otros espectros de absorción para longitudes de onda diferentes a la de los oligonucleótidos (260 nm). Un Bioanalizador (*Bioanalyzer™, Agilent Technologies; Santa Clara, EUA*) es una plataforma microfluídica útil para cuantificar el grado de degradación del material genómico obtenido (*RIN number*). Se basa en la presencia relativa de las principales subunidades ribosomales, la 18S y la 28S, ambas muy abundantes, para valorar la integridad de la muestra.

### 5.2.5-2. *Retrotranscripción*

El RNA en solución acuosa aún libre de RNAsas es extremadamente lábil. Los ciclos de congelación y descongelación conllevan la formación de cristales que pueden fragmentar los oligonucleótidos e inutilizar la información que de su estudio se pueda derivar. Por esta razón es preferible desechar cualquier muestra de RNA en solución acuosa a partir del tercer ciclo de congelación/descongelación, o aquellas cuyos *RIN numbers* en el bioanalizador sean inferiores a 7.

La alternativa más recurrente para alargar el tiempo de vida útil de este tipo de muestras es la *retrotranscripción* del RNA mensajero (mRNA) a cDNA, un DNA monocatenario sintetizado a partir de los mRNAs en suspensión pero mucho más estable. Con este propósito kits comerciales como el *High Capacity® cDNA Archive Kit* (*Applied Biosystems; Dinamarca*) permiten, mediante el uso de cebadores aleatorios, nucleótidos libres y una retrotranscriptasa termosensible, la total conversión del mRNA a cDNA.

La reacción de retrotranscripción consta de 2 etapas, una de *melting* o asociación de secuencias complementarias (cebadores con moléculas de mRNAs), de 10 min a 25°C, y otra de elongación de secuencias y degradación de moléculas de mRNA, dirigida por la acción de las retrotranscriptasas a 37°C durante 120 min.

### 5.2.5-3. *PCR a tiempo real*

Mediante el uso de parejas de cebadores, sondas, fluorocromos, tampones, nucleótidos libres y polimerasas termófilas, las técnicas de *Real time* (RT)-PCR permiten deducir de la emisión fluorescente, relativa y específica para cada ciclo de amplificación, los valores de expresión de los genes estudiados. Cada ensayo *TaqMan®* (*Applied Biosystems; Dinamarca*) incluye un cebador (partidor, iniciador o *primer*) directo (*forward primer*) que permitirá duplicar la hebra de cDNA de 3' a 5', y

otro inverso (*reverse primer*) para la secuencia complementaria. Los ensayos *TaqMan*® contienen además una sonda de alrededor de 50 nts con un fluorocromo adherido a un extremo y su inhibidor específico (*quencher*) fijado al otro. La sonda (*probe*) es también complementaria a la secuencia genómica sometida a estudio.

La tecnología *TaqMan*® aprovecha la capacidad exonucleasa 5' → 3' de la DNA polimerasa para degradar las sondas a medida que se extienden los *primers* y se duplican las secuencias de cDNA. Cada sonda degradada equivale a un fluorocromo libre en el medio del efecto inhibitorio del *quencher* que antes lo acompañaba. De esta forma, a medida que se suceden los *ciclos térmicos* (Cts) para la replicación exponencial de secuencias (40 ciclos de 15 seg a 92°C y 60 seg a 60°C, para separar oligonucleótidos y amplificar secuencias, respectivamente) aumenta la señal fluorescente de la solución.

La tecnología *Sybr*® *Green* (*Applied Biosystems; Darmstadt, Inglaterra*) utiliza este agente intercalante que emite fluorescencia cuando se acopla a las moléculas de DNA para el estudio de la expresión génica mediante RT-PCR. El sistema aprovecha el fenómeno de la *transferencia de energía mediante resonancia de fluorescencia* (FRET, por sus siglas en inglés) para deducir la expresión de un gen a partir de la emisión fluorescente resultante en cada Ct.

Hablamos de expresión *relativa* cuando los valores de expresión por gen y muestra se dan como número de veces en que el gen diana se expresa respecto a un *control endógeno* (gen cuya expresión no se ve alterada por los parámetros sometidos a estudio). En el caso particular del tejido adiposo y los adipocitos humanos, se ha testado y seleccionado como control endógeno la *ciclofilina A* (*PPIA; RefSeq. NM\_002046.3*). Las *ciclofilinas* (*Cyp40*) son proteínas de expresión constitutiva que se unen a las *ciclosporinas* y actúan como inmunosupresores. Se caracterizan, entre otras cosas, por su actividad *isomerasa peptidil-prolil* y catalizan la isomerización del enlace peptídico para formar enlaces *cis* a partir de enlaces *trans* de residuos prolina, facilitando el replegamiento de las proteínas y sus estructuras secundarias y terciarias. En esencia, las *ciclofilinas* actúan como *chaperonas* para otras proteínas. La *isomerasa peptidil-prolil A* (*CypA* o *PPIA*) es una proteína del citoplasma que combina una hoja β con 2 hélices α, interacciona con la *ciclosporina A* e inhibe las fosfatasa dependientes de complejos Ca<sup>2+</sup>/calmodulina.

Durante la RT-PCR cada muestra origina una curva sigmoideal para cada uno de los genes estudiados, y un nivel de fluorescencia determinado para cada Ct a lo largo de los 40 ciclos de amplificación. A partir de estas curvas se determina el número de ciclos necesarios para llegar a un valor de fluorescencia arbitrario (*threshold*). El *valor Ct* se define entonces como el número de ciclos necesarios en la RT-PCR para alcanzar un nivel de fluorescencia determinado y es inversamente proporcional al número de copias del transcrito original de forma que, cuantas más

copias hay en la muestra estudiada, menos Cts serán necesarios para alcanzar ese *threshold* arbitrario.

La  $\Delta C_t$  se calcula como la diferencia entre las Cts del gen diana y las Cts del control endógeno para la misma muestra de cDNA. Las variaciones en la expresión de los diferentes genes para cada muestra respecto al control endógeno se cuantifican mediante el valor  $2^{-\Delta C_t}$ , que normaliza la expresión de cada diana con la del control endógeno (*Livak and Schmittgen 2001*).

## **5.2.6- Análisis de la presencia de proteína**

### *5.2.6-1. Extracción de proteína*

El *Cell Lysis Buffer* (*Cell Signaling Technology; Danvers, EUA*) es un reactivo comercial con *Triton X-100* al 1% útil para la extracción de proteínas. Para el tejido adiposo, el proceso consiste en la degradación mediante homogeneizador de un fragmento de ~100 mg en 0.5 mL de reactivo y 5  $\mu$ L de un cóctel de inhibidores de proteasas (1 mmol/L de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 0.002 g/L de aprotinina y 0.002 g/L de leupeptina). Sigue un periodo de incubación a 4°C y agitación constante para acabar de degradar membranas y separar y solubilizar las proteínas celulares. La separación entre las proteínas solubles y los lípidos y el resto de componentes no hidrosolubles se consigue con una centrifugación de 15 min a 4°C y 14,000 xg. La solución se aspira con cuidado de debajo una fina capa lipídica solidificada en la superficie.

La concentración proteica se determina mediante el método colorimétrico de *Lowry* (*Lowry, Rosebrough et al. 1951*) e interpolación directa con una recta patrón de albumina en solución acuosa.

### *5.2.6-2. Electroforesis y electrotransferencia*

La *electroforesis* utiliza el potencial eléctrico y la carga inherente a cualquier proteína para mover moléculas a través de un gel de agarosa o poliacrilamida. En el caso de la electroforesis proteica se utilizan geles de poliacrilamida y las proteínas se desplazan a velocidades variables, en función del peso molecular y el *punto isoeléctrico*, a través de la red formada por el polímero. La fuerza electromagnética (~200V) que se origina entre el ánodo y el cátodo y la carga inherente a la proteína condicionan este desplazamiento. De esta forma, para un mismo intervalo de tiempo las proteínas más grandes y con menos carga eléctrica se desplazarán menos que las pequeñas, creando un gradiente de dispersión que concentrará en bandas las diferentes proteínas de la solución inicial en función del peso molecular y la carga eléctrica.

El mismo principio de electrotransposición se usa en la *electrotransferencia* para transferir las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa mediante un potencial eléctrico transversal (~30V) sin perder la posición alcanzada en el gel durante la electroforesis.

### 5.2.6-3. Western Blotting

Las proteínas de la muestra original, dispersas ahora en la membrana de nitrocelulosa, están mejor expuestas al reconocimiento y la interacción con anticuerpos. El *marcaje* mediante anticuepos se divide en 3 etapas básicas separadas por sendas etapas de lavado con solución salina (PBS) y un surfactante polisorbato a modo de detergente y emulsionante, el *Tween 20*, al 0.1%. En primer lugar, se bloquea la membrana con un exceso de proteína (PBS con *Tween 20* el 0.1% y BSA o lactoalbúmina) para evitar la unión inespecífica de anticuerpos. Sigue la aplicación del anticuerpo *primario*, específico para la proteína diana, disuelto en una solución similar a la anterior. Cierra el proceso el anticuerpo *secundario*, que es específico para las cadenas pesadas del *primario*. El Ab 2º lleva adherida una enzima peroxidasa responsable última de la reacción colorimétrica que revela la cantidad absoluta (si se dispone de una recta patrón para establecer la relación entre la intensidad de color y la cantidad de proteína) o relativa (si se utiliza la presencia de un *control endógeno*) de la proteína estudiada.

## 5.2.7- Análisis de la actividad emzimática

### 5.2.7-1. Actividad de las desyodasas

Los ensayos radiactivos útiles para analizar la actividad de las desyodasas fueron puesto a punto en los años ochenta (Kopecky, Sigurdson et al. 1986) y perfeccionados en adelante (Pavelka, Kopecky et al. 1997; Macek Jilkova, Pavelka et al. 2009) por un grupo de investigadores del Instituto de Fisiología de la Academia de Ciencias de la República Checa (Praga, República Checa) dirigido por el Dr. Jan Kopecký.

La actividad catalítica de las desyodasas sobre el anillo externo (mediada por la D1 y la D2) y el anillo interno (mediada por la D3) de la T<sub>4</sub> o la T<sub>3</sub> puede ser medida en fracciones microsomales preparadas a partir de fragmentos de tejido adiposo ultracongelado y degradado en un medio de cultivo con 100 mM de fosfato sódico, 1 mM de EDTA y cóctel inhibidor de proteasas (antipaina, aprotinina, leupeptina y pepstatina A, cada uno a 1 µg/mL). Entre 1.5 y 300 µg de proteína son incubados durante 30 min a 37°C con sustratos no radiactivos, y con 5,000 cpm (*counts per minute*) de los respectivos sustratos radiactivos a 50 nM para la rT<sub>3</sub>, 2 nM para la T<sub>4</sub> y 2 nM para la T<sub>3</sub>, en los ensayos para las actividades de D1, D2 y D3,

respectivamente. A continuación se añaden 10 mM de DTT (*ditiotreititol* o *reactivo de Cleland*,  $C_4H_{10}O_2S_2$ ; un agente reductor) en la reacción de D1, 20 mM de DTT y 10 mM de *6-n-propil-2-tiouracil* (PTU) en la de D2, y 40 mM de DTT con 10 mM de PTU en la reacción para D3. Menos del 30% del sustrato es consumido durante la incubación en el instante en que, mediante la adicción de 10  $\mu$ L de una solución de hidróxido de amonio concentrado con 10  $\mu$ M de  $T_3$  y otros 10 de  $T_4$ , seguido de 30 uL de metanol y una centrifugación de 2 min a 10,000 xg, se para la reacción.

Ocho microlitros de cada uno de los sobrenadantes son analizados mediante cromatografía de capa fina en un gel de sílice (20x20 cm; *Merck & Co., Inc.*) utilizando como fase móvil un solvente a base de cloroformo, metanol e hidróxido de amonio para la correcta separación de todos y cada uno de los componentes radiomarcados:  $^{125}I$ -r $T_3$ ,  $^{125}I$ - $T_4$ ,  $^{125}I$ - $T_3$ ,  $^{125}I$ -3,3'- $T_2$ ,  $^{125}I$ -3'- $T_1$ , y  $^{125}I$ . La cantidad de cada uno de estos componentes se revela mediante radiocromatogramas con un *BAS-5000 laser scanner* (*Fujifilm Co.; Japan*) y se cuantifica el grado de reacción mediante el cálculo de la radiactividad remanente respecto a los 5,000 cpm originales con el *Phosphorimager® SF* (*Molecular Dynamics; Cambridge, England*). Los productos separados que emiten más de un 0.5% del total de radiactividad original (más de 25 cpm) podrán ser cuantificados. Las actividades relativas de cada enzima serán expresadas en picomoles del producto producido por hora y mg de proteína.

## 5.2.8- Análisis estadístico

Los resultados obtenidos para las variables con una distribución *gausiana* se expresan como promedio  $\pm$  la *desviación estándar* (SD) o  $\pm$  el *error estándar* (SE). Antes de proceder con las comparaciones entre grupos, se evalúa mediante el test de *Levene* la distribución normal y la homogeneidad de varianzas. Para comparar parámetros continuos entre grupos de sujetos se emplea el test de *ANOVA* para comparaciones múltiples cuando la equiparabilidad de las varianzas puede ser asumida (incluido el análisis estadístico para comparaciones entre parejas de grupos mediante *Bonferroni*), o el test *t de Student* para comparaciones entre parejas. La relación lineal simple entre variables cuantitativas se analiza con modelos bivariantes mediante el test de *Pearson*. El tratamiento estadístico de modelos que incluyen más de una variable independiente es una extensión del análisis con modelos bivariantes. El modelo lineal múltiple tiene en cuenta el comportamiento de distintas variables independientes para determinar su efecto sobre la variable dependiente (e.g. el efecto independiente y conjunto de la edad, el BMI y la concentración circulante de glucosa (variables independientes) en la expresión de FASN (variable dependiente) en el tejido adiposo). El análisis estadístico y los gráficos son realizados con el programa SPSS (versión 13.0; *SPSS, Chicago, IL*).





*The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. Obesity (Silver Spring). 2010 Jan; 18(1):13-20.*





Francisco J. Ortega, Dolores Mayas, Jose M. Moreno-Navarrete, Victoria Catalan, Javier Gomez-Ambrosi et al. "The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. *Obesity*. Vol. 18, issue 1 (January 2010) : p. 13-20

Copyright © 2009, Rights Managed by Nature Publishing Group

<http://www.nature.com/oby/journal/v18/n1/full/oby2009202a.html>

<http://dx.doi.org/10.1038/oby.2009.202>

## **The Gene Expression of the Main Lipogenic Enzymes is Downregulated in Visceral Adipose Tissue of Obese Subjects**

Francisco J. Ortega<sup>1,2</sup>, Dolores Mayas<sup>2,3</sup>, José M. Moreno-Navarrete<sup>1,2</sup>, Victoria Catalán<sup>4,5</sup>, Javier Gómez-Ambrosi<sup>4,5</sup>, Eduardo Esteve<sup>1,2</sup>, Jose I. Rodriguez-Hermosa<sup>6</sup>, Bartomeu Ruiz<sup>6</sup>, Wifredo Ricart<sup>1,2</sup>, Belen Peral<sup>7,8,9</sup>, Gema Fruhbeck<sup>4,5</sup>, Francisco J. Tinahones<sup>2,3</sup> and José M. Fernández-Real<sup>1,2</sup>

1. <sup>1</sup>Service of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi), Girona, Spain
2. <sup>2</sup>CIBEROBN (CB06/03/010) and Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain
3. <sup>3</sup>Service of Endocrinology and Nutrition, Hospital Clinico Universitario Virgen de Victoria de Malaga, Malaga, Spain
4. <sup>4</sup>Department of Endocrinology & Metabolic Research Laboratory, Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona, Spain
5. <sup>5</sup>CIBEROBN (CB06/03/1014) and Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain
6. <sup>6</sup>Department of Surgery, Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi), Girona, Spain
7. <sup>7</sup>Department of Endocrinology, Physiopathology and Nervous System, Instituto de Investigaciones Biomédicas 'Alberto Sols' (IIB), Madrid, Spain
8. <sup>8</sup>Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain
9. <sup>9</sup>Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Correspondence: José M. Fernandez-Real ([jmfernandezreal.girona.ics@gencat.cat](mailto:jmfernandezreal.girona.ics@gencat.cat))

Received 27 February 2009; Accepted 20 May 2009; Published online 18 June 2009.

## Abstract

Contradictory findings regarding the gene expression of the main lipogenic enzymes in human adipose tissue depots have been reported. In this cross-sectional study, we aimed to evaluate the mRNA expression of fatty acid synthase (FAS) and acetyl-CoA carboxylase (ACC) in omental and subcutaneous (SC) fat depots from subjects who varied widely in terms of body fat mass. *FAS* and *ACC* gene expression were evaluated by real time-PCR in 188 samples of visceral adipose tissue which were obtained during elective surgical procedures in 119 women and 69 men. Decreased sex-adjusted *FAS* (−59%) and *ACC* (−49%) mRNA were found in visceral adipose tissue from obese subjects, with and without diabetes mellitus type 2 (DM-2), compared with lean subjects (both  $P < 0.0001$ ). *FAS* mRNA was also decreased (−40%) in fat depots from overweight subjects ( $P < 0.05$ ). Indeed, *FAS* mRNA was significantly and positively associated with *ACC* gene expression ( $r = 0.316$ ,  $P < 0.0001$ ) and negatively with BMI ( $r = -0.274$ ), waist circumference ( $r = -0.437$ ), systolic blood pressure ( $r = -0.310$ ), serum glucose ( $r = -0.277$ ), and fasting triglycerides ( $r = -0.226$ ), among others (all  $P < 0.0001$ ). Similar associations were observed for *ACC* gene expression levels. In a representative subgroup of nonobese ( $n = 4$ ) and obese women ( $n = 6$ ), relative *FAS* gene expression levels significantly correlated ( $r = 0.657$ ,  $P = 0.034$ ;  $n = 10$ ) with *FAS* protein values. *FAS* protein levels were also inversely correlated with blood glucose ( $r = -0.640$ ,  $P = 0.046$ ) and fasting triglycerides ( $r = -0.832$ ,  $P = 0.010$ ). In conclusion, the gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue from obese subjects.

## Introduction

Obesity is an epidemic health problem worldwide that impacts the risk and prognosis of many diseases, including diabetes mellitus type 2 (DM-2), cardiovascular disease, hyperlipidemia, and cancer (1). However, not all obese patients have the same risk of developing these disorders. Individuals with peripheral obesity (i.e., fat distributed subcutaneously in the gluteofemoral region) are at little or no risk of the common medical complications of obesity, whereas individuals with central obesity (i.e., fat accumulated in visceral depots) are prone to these complications (2,3,4). The study of this visceral fat depot may help in the understanding of the physiopathology of these disorders.

There are two sources of fatty acids (FAs) for animal metabolism, exogenously derived (dietary) FAs and endogenously synthesized FAs. The biosynthesis of the latter (lipogenesis) depends on well known enzyme-regulated processes. FA synthesis is of vital importance in cell physiology in general, and in adipose tissue physiology in particular. Adipose tissue is, in fact, an important site of endogenous FA synthesis (5). The contribution of human adipose tissue to whole-body lipogenesis was considered to be low and less than that of liver (6,7). However, studies in humans fed with a high carbohydrate diet demonstrated that total body fat synthesis significantly exceeded hepatic *de novo* lipogenesis, suggesting that adipose tissue may be the major site for fat synthesis, with the adipose tissue accounting for up to 40% of whole-body lipogenesis under this condition (8,9).

Fatty acid synthase (*FAS*; EC 2.3.1.85) and acetyl-CoA carboxylase (*ACC*; EC 6.4.1.2) constitute master enzymes in lipid synthesis which may be linked to the development of obesity in humans (10,11,12). *FAS* is the central enzyme in *de novo* lipogenesis, catalyzing the conversion of malonyl-CoA into palmitate (13,14). Changes in *FAS* activity are primarily due to alterations in the transcription rate of the *FAS* gene (15,16,17). *ACC* catalyses the

formation of malonyl-CoA, an essential substrate for FAS and the chain elongation systems (18).

Some studies have previously analyzed the gene expression of these lipogenic enzymes in human adipose tissue. Diraison *et al.* (19) found decreased FAS mRNA expression in subcutaneous (SC) adipose tissue from obese individuals. These data directly corroborate the results of Swierczynski *et al.* (5). Adipose tissue mRNA, protein or activity levels of lipogenic genes such as *FAS* and *ACC* were lower in overweight and obese subjects compared with lean individuals in several other studies (6,20,21,22,23).

In contrast to these findings, other studies have reported that FAS expression was increased in adipose tissue from genetically obese rats (24,25). *FAS* gene expression and protein levels in both visceral and SC adipose tissue has been recently found to be increased in obese humans with and without DM-2 (26).

Unlike the analyzes performed by Berndt *et al.* (26), most of these gene expression studies are of small sample size and only describe SC adipose tissue. Thereby, we aimed to evaluate the lipogenic pathway through the gene expression of these lipogenic enzymes in visceral fat depots from a large cohort of subjects who varied widely in terms of obesity and dissect the differences of altered FAS expression levels between overweight, obesity and/or DM-2 and lean and healthy volunteers. To gain further insight into the lipogenic pathway state, we have also analyzed ACC. We tried to understand how lipid anabolism machinery in human fat is linked to the metabolic status.

## Methods and Procedures

### Subjects and samples

A total of 188 adipose tissue samples were obtained from visceral depots during elective surgical procedures (cholecystectomy, surgery of abdominal hernia, and gastric by-pass surgery), washed, fragmented and immediately flash-frozen in liquid nitrogen before being stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . These samples were provided from a group of 188 subjects (69 men and 119 women) with a BMI between 18 and  $70\text{ kg/m}^2$  who were invited to participate at the Endocrinology Service of the Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta (Girona, Spain), at the Clinica Universitaria de Navarra (Navarra, Spain) and at the Hospital Clinico Universitario Virgen de Victoria de Malaga (Málaga, Spain). Forty-nine paired SC adipose tissue biopsies were also obtained from 12 men and 37 women in the Endocrinology Service of the Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta (Girona, Spain).

For all samples, the protocol was as follows: all subjects were of white origin and reported that their body weight had been stable for at least 3 months before the study. They had no systemic disease other than type 2 diabetes and obesity and all were free of any infections in the previous month before the study. Liver disease and thyroid dysfunction were specifically excluded by biochemical work-up. Other exclusion criteria for those patients included the following: (i) clinically significant hepatic, neurological, or other major systemic disease, including malignancy; (ii) history of drug or alcohol abuse, defined as  $>80\text{ g/day}$ , or serum transaminase activity more than twice the upper limit of normal; (iii) an elevated serum creatinine concentration; (iv) acute major cardiovascular event in the previous 6 months; (v) acute illnesses and current evidence of high grade chronic inflammatory or infective diseases; and (vi) mental illness rendering the subjects unable to understand the nature, scope, and

possible consequences of the study. All subjects gave written informed consent after the purpose of the study was explained to them. The institutional review board of each institution approved the protocol.

### **Anthropometric measurements**

BMI was calculated as weight (in kilograms) divided by height (in meters) squared. The subjects' waist was measured with a soft tape midway between the lowest rib and the iliac crest. The hip circumference was measured at the widest part of the gluteal region. The waist-to-hip ratio was then calculated. Deurenberg's formula (27) was used to estimate body fat composition in those subjects. Air-displacement plethysmography was also used to determine the body fat composition in a subsample of subjects ( $n = 36$ ). In these subjects, the percent body fat mass assessed by air-displacement plethysmography and estimated by Deurenberg's formula correlated significantly ( $r = 0.917$ ,  $P < 0.0001$ ).

According to these anthropometric parameters and considering also DM-2 subjects were classified as lean ( $\text{BMI} < 25.0 \text{ kg/m}^2$ ), overweight ( $25 \leq \text{BMI} < 30.0 \text{ kg/m}^2$ ) and obese ( $\text{BMI} \geq 30.0 \text{ kg/m}^2$ ) with and without DM-2. Blood pressure was measured in the supine position on the right arm after a 10-min rest; a standard sphygmomanometer of appropriate cuff size was used and the first and fifth phases were recorded. Values used in the analysis are the average of three readings taken at 5-min intervals. Patients were requested to withhold alcohol and caffeine during at least 12 h prior to the different tests.

### **Analytical determinations**

The serum glucose levels were measured in duplicate by the glucose oxidase method with a Beckman Glucose Analyzer 2 (Brea, CA). The coefficient of variation was 1.9%.

Total serum cholesterol was measured through the reaction of cholesterol esterase/oxidase/peroxidase, using a BM/Hitachi 747. High-density lipoprotein cholesterol was quantified after precipitation with polyethylene glycol at room temperature. Total serum triglycerides were measured through the reaction of glycerol-phosphate-oxidase and peroxidase by routine laboratory tests.

### **Gene expression analyses**

RNA was prepared from adipose tissue fragments using RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Gaithersburg, MD). The integrity of each RNA sample was checked by either agarose gel electrophoresis or with an Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Total RNA was quantified by means of spectrophotometer (GeneQuant, GE Health Care, Piscataway, NJ) or with the bioanalyzer. 3  $\mu\text{g}$  of RNA from each fat sample were then reverse transcribed to cDNA using High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's protocol.

Gene expression was assessed by real time-PCR using an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany), using TaqMan technology suitable for relative gene expression quantification. The reaction was performed following manufacturers' protocol in a final volume of 25  $\mu\text{l}$ . The cycle program consisted of an initial denaturing of 10 min at 95 °C then 40 cycles of 15 sec denaturizing phase at 92 °C and 1 min

annealing and extension phase at 60 °C. Positive and negative controls were included in all the reactions.

The commercially available and prevalidated TaqMan primer/probe sets used were as follows: Cyclophilin A (PPIA; Hs99999904\_m1, RefSeq. NM\_002046.3) was used such as endogenous control for all target genes in each reaction and (FAS; Hs00188012\_m1, RefSeq. NM\_004104.4) and Acetyl-Coenzyme A Carboxylase alpha (ACACA; Hs00167385\_m1, RefSeqs. NM\_198834.1, NM\_198836.1, NM\_198837.1, NM\_198838.1 and NM\_198839.1) were the target genes. A threshold cycle ( $C_t$  value) was obtained for each amplification curve and a  $\Delta C_t$  value was first calculated by subtracting the  $C_t$  value for human Cyclophilin A (PPIA) cDNA from the  $C_t$  value for each sample and transcript. Fold changes compared with the endogenous control were then determined by calculating  $2^{-\Delta C_t}$ , so gene expression results are expressed in all cases as expression ratio relative to PPIA gene expression according to manufacturers' instructions.

### **Western blotting analysis**

Approximately 100 mg of adipose tissue samples from 10 women with clinical features according to each group (four nonobese (BMI <30.0 kg/m<sup>2</sup>) and six obese (BMI ≥30.0 kg/m<sup>2</sup>) with ( $n = 3$ ) and without ( $n = 3$ ) DM-2) were degraded by homogenization in radioimmunoprecipitation assay using RIPA lysis buffer (Uptate) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma, St Louis, MO) at 4 °C for 30 min. Cellular debris were eliminated by centrifugation of the samples at 2000 g for 10 min (4 °C). Protein concentration was determined using Lowry assay. RIPA protein extracts (30 µg) were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes by conventional procedures. Membranes were immunoblotted with rabbit IgG anti-FAS and mouse anti-β-actin (Santa Fe). Both antirabbit and antimouse IgG coupled to horseradish peroxidase were used as secondary antibody. Horseradish peroxidase activity was detected by chemiluminescence and quantification of protein levels were performed using Scion Image software. Optical density was obtained as a marker for absolute FAS and β-actin (used such as endogenous control) levels in each sample. Final results are expressed as ratio relative to β-actin protein levels by dividing optical density of FAS band by optical density of β-actin band for each sample.

### **Statistical analyses**

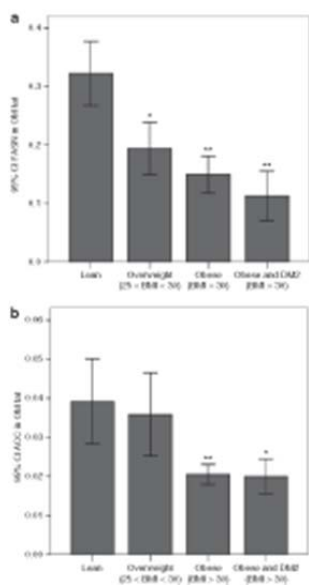
Descriptive results of continuous variables are expressed as mean ± s.d. Before statistical analysis, normal distribution and homogeneity of the variances were evaluated using Levene's test. One-way ANOVA, for multiple comparisons, using post hoc by Bonferroni's test when equal variances could be assumed, was used to compare groups according to its obesity and glucose tolerance status (presence or not of DM-2) with respect to continuous variables. Relation between quantitative variables was tested using Pearson's test. All data were expressed as means ± s.d. The statistical analyses and graphics were performed using the program SPSS (version 13.0; SPSS, Chicago, IL).

## Results

### *FAS* and *ACC* gene expression levels in omental and SC fat samples

The anthropometric and metabolic variables of the studied subjects and the gene expression levels for *FAS* and *ACC* in omental adipose tissue depots (OM) from both men and women are summarized in [Table 1](#). Analysis of these 188 OM fat samples revealed that *FAS* gene expression levels were decreased by a 39.7% ( $P < 0.05$ ), 53.5% ( $P < 0.0001$ ), and 65.0% ( $P < 0.0001$ ) in overweight ( $25 \leq \text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$ ), obese ( $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) without DM-2 and obese ( $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) with DM-2 subjects compared with lean individuals ( $\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$ ), respectively ([Figure 1a](#)). This finding was uniformly present in the three cohorts of subjects from the different recruiting centers. Differences between nonobese ( $\text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$ ,  $n = 11$ ) and obese ( $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) with and without DM-2 ( $n = 44$ ) were also remarkable when *FAS* gene expression values were normalized by 18S mRNA as an endogenous control ( $0.75 \pm 1.36$  vs.  $0.27 \pm 0.41$ , respectively,  $P < 0.05$ ). Despite we did not find significant differences linked to sex for *FAS* levels, differences in *FAS* gene expression according to obesity status were better appreciated in women than in men ([Table 1](#)). Visceral adipose tissue from obese subjects with DM-2 showed gene expression levels that did not differ significantly to that present in non DM-2 obese individuals.

[Figure 1.](#)



Mean and 95% confidence interval for the mean of gene expression levels for *FAS* ([Figure 1a](#)) and *ACC* ([Figure 1b](#)) in omental fat from lean ( $\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$ ), overweight ( $25 \leq \text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$ ) and obese ( $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) with or without type 2 diabetes mellitus (DM-2) subjects. \*\* $P < 0.001$  and \* $P < 0.05$  for comparisons between groups.

[Full figure and legend \(25K\)](#)

[Table 1 - Anthropometrical and biochemical characteristics of study subjects.](#)

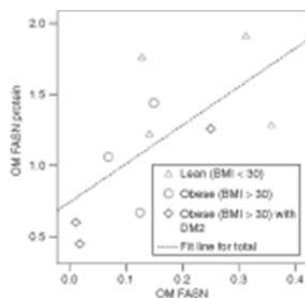
[Full table \(109K\)](#)

To gain further insight in the detected gene expression differences and the association between lipogenic pathway and obesity parameters, we analyzed *ACC* gene expression levels in these samples. *ACC* mRNA was also downregulated by a ~50% in obese subjects with and without DM-2 ( $P < 0.05$  and  $P < 0.0001$ , respectively) vs. the control group ([Figure 1b](#)). This time again, differences for *ACC* gene expression between groups were uniformly detected in the three cohorts of subjects from the different recruiting centers.

The analysis of 49 SC paired fat samples revealed that both SC and OM FAS ( $r = 0.582$ ,  $P < 0.0001$ ) and SC and OM *ACC* ( $r = 0.655$ ,  $P < 0.0001$ ) gene expression were significantly correlated. SC FAS levels were decreased by 83.7% ( $P = 0.006$ ) in obese (BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) with and without DM-2 ( $n = 36$ ) subjects compared with nonobese (BMI  $< 30$  kg/m<sup>2</sup>) and healthy individuals ( $n = 13$ ). Accordingly, SC *ACC* mRNA was 49% lower ( $P = 0.006$ ) in obese compared with nonobese subjects.

Finally, in a representative subgroup of nonobese (BMI  $< 30$  kg/m<sup>2</sup>,  $n = 4$ ) and obese (BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) women with ( $n = 3$ ) or without ( $n = 3$ ) DM-2, we measured visceral FAS protein levels ([Figure 2](#)) to validate our real time-PCR results. Differences in protein levels between groups are only helpful to corroborate gene expression results.

[Figure 2.](#)



In a representative subgroup of nonobese (BMI  $< 30$  kg/m<sup>2</sup>) and obese (BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) with and without DM-2 women, *FAS* gene expression correlated significantly with FAS protein levels.

[Full figure and legend \(15K\)](#)

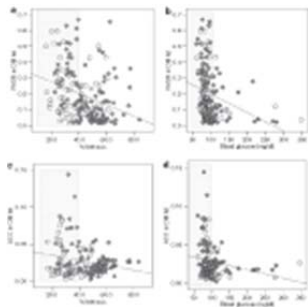
Relative *FAS* gene expression levels significantly correlated ( $r = 0.657$ ,  $P = 0.034$ ;  $n = 10$ ) with both absolute and relative (normalized by  $\beta$ -actin) FAS protein levels ([Figure 2](#)). FAS protein was, as well as *FAS* gene expression levels, inversely correlated with blood glucose ( $r = -0.640$ ,  $P = 0.046$ ) and fasting triglycerides ( $r = -0.832$ ,  $P = 0.010$ ).



## Correlation of lipogenic key-factors levels with parameters of body fat mass, fat mass distribution, and glucose metabolism

To investigate further these differences in expression levels between groups, we performed correlation analyses for the entire population ( $n = 188$ ). FAS expression levels were significantly and inversely correlated with BMI ( $r = -0.274$ ,  $P < 0.0001$ ), % fat mass ( $r = -0.310$ ,  $P < 0.0001$ ), waist and hip diameters circumferences ( $r = -0.437$  and  $r = -0.386$ , respectively, both  $P < 0.0001$ ), waist-to-hip ratio ( $r = -0.270$ ,  $P = 0.011$ ), systolic and diastolic blood pressure ( $r = -0.310$ ,  $P < 0.0001$ , and  $r = -0.183$ ,  $P = 0.042$ , respectively), blood glucose ( $r = -0.277$ ,  $P < 0.0001$ ) and fasting circulating triglycerides ( $r = -0.226$ ,  $P = 0.004$ ). These correlations were found in both men and women ([Figure 3a,b](#)).

**Figure 3.**



Linear relationship between FAS ([Figure 3a](#)) and ACC ([Figure 3c](#)) expression level and % fat mass. FAS ([Figure. 3b](#)) and ACC ([Figure. 3d](#)) gene expression levels were also inversely and significantly correlated, in men (circles) as well as among women (diamonds), with blood glucose levels.

[Full figure and legend \(113K\)](#)

ACC gene expression levels were also significantly and directly associated with FAS expression values ( $r = 0.316$ ,  $P < 0.0001$ ) in omental fat samples from both men and women. ACC ([Figure 3c,d](#)) gene expression levels were also significantly and inversely related to obesity measures such as BMI ( $r = -0.260$ ,  $P = 0.001$ ), % fat mass ( $r = -0.218$ ,  $P = 0.006$ ), waist-to-hip ratio ( $r = -0.285$ ,  $P = 0.018$ ), systolic blood pressure ( $r = -0.247$ ,  $P = 0.015$ ), blood glucose ( $r = -0.199$ ,  $P = 0.015$ ), and fasting triglycerides ( $r = -0.201$ ,  $P = 0.018$ ) also in both men and women.

Multiple linear regression analyses to predict omental FAS levels revealed that age ( $P = 0.017$ ), BMI ( $P = 0.001$ ) and fasting blood glucose ( $P = 0.013$ ) contributed independently to explain 14.1% ( $P < 0.0001$ ) of the variance at omental FAS gene expression. Only BMI ( $P = 0.002$ ) significantly contributed to 8.4% of the variance in omental ACC levels. Otherwise, despite the fact that including obese and DM-2 subjects in our analyses made more noticeable some of these associations, the relationship between the gene expression of the individual lipogenic factor (FAS or ACC) with anthropometrical parameters such as BMI ( $r = -0.256$ ,  $P = 0.001$  and  $r = -0.251$ ,  $P = 0.004$ , respectively) and metabolic markers such as preprandial blood glucose ( $r = -0.291$ ,  $P < 0.0001$  and  $r = -0.218$ ,  $P = 0.016$ , respectively) remained significant after excluding DM-2 patients. Indeed, the consideration of fasting vs. post-load

glucose levels did not affect the results. Taking into account diabetes therapy in a multiple linear regression analysis did not change the significance of the findings.

*FAS* gene expression was significantly and directly correlated with ACC mRNA ( $r = 0.638$ ,  $P < 0.0001$ ) for all analyzed SC fat samples and inversely related to BMI ( $r = -0.342$ ,  $P = 0.016$ ).

## Discussion

*FAS* and *ACC* gene expression levels were significantly under-expressed in omental fat samples from overweight and, particularly, from obese and/or DM-2 subjects, suggesting that the lipogenic pathway was, at least, at the gene expression levels, downregulated in obesity.

*FAS* and *ACC* levels have been consistently linked and upregulated by hormonal lipogenic stimuli including insulin and thyroid hormones (15,28). Abdominal obesity is a well known contributor to insulin resistance, attributed in part to the concomitant increases in circulating free FA concentrations (29). Insulin is an anabolic hormone known to direct the storage and utilization of energy in adipocytes (30). When cells become insulin resistant, they lose its relative capacity to uptake glucose and free FAs from the bloodstream. This relative intracellular hypogluco-cytopenia of insulin resistant adipocytes could be responsible for the decreased gene expression levels of the lipogenic factors reported here.

Explained through insulin action itself or because of decreased intracellular glucose levels, the importance of the interrelationships between insulin action and lipogenic and/or adipogenic factors are exemplified by the findings in several *in vitro* studies. Insulin has been defined as an obligate hormone for primary adipocyte differentiation (31), a process that necessarily involves the progressive upregulation of lipogenic enzymes (15). In human adipose tissue the relationship between insulin and lipogenesis activity, explained through the gene expression levels of *FAS* and by its post-transcriptional activation, has been also reported in a cohort of healthy and nonobese subjects (16). Furthermore, circulating insulin, along with glucose, is elevated during feeding of a high carbohydrate diet and induces enzymes involved in FA and triacylglycerol synthesis (9,32).

Our findings are in sharp contrast with those reported by Berndt *et al.* (26) who reported increased adipose tissue *FAS* gene expression and protein levels in obese compared with lean subjects. However, a review of the literature discloses that all previous studies examining adipose tissue *FAS* expression have found decreased *FAS* and decreased *ACC* expression in obese fasted subjects with a large and long-lasting excess in body fat mass (6,19,20,22,33) than they have (26). Interestingly, the findings of Guichard *et al.* (24) and Penicaud *et al.* (25), working with genetically obese rats, are also in sharp contrast with those reported by Nadler *et al.* (34) and Soukas *et al.* (35), who performed their studies with ob/ob mice with established obesity. Briefly, whereas on the first publications an over-expression of lipogenic factors in fat depots from obese rats was reported, lipogenic key-factors were downregulated in adipose tissue from obese with regard to lean mice. These differences might be species-specific or arise from the dynamic or long-lasting fat excess linked to the obesity status.

It may be that during the period of dynamic obesity, when fat stores are rapidly expanding, an increase in the lipogenic capacity of adipose tissue is expected, but, in obese subjects with a large and long-lasting fat excess, the decreased expression of lipogenic genes (36) could be a late and adaptive process, aimed in fact at limiting a further development of fat mass. Other

differences could arise from the nutritional and/or the inflammatory status of each population tested (26).

A remarkable reduction in the expression of the genes controlling lipogenic enzymes, namely SREBP-1c, and genes coding lipogenic enzymes (FAS, PEPCK, ATP citrate-lyase, pyruvate carboxylase) (34,35) and/or involved in adipocyte differentiation (37) has been shown in obesity. Indeed, considering that pharmacological inhibition of FAS activity blocks adipocyte differentiation and leads to the reduction of adipocyte number in rodents (37), it is reasonable to suggest that the induction of FAS-catalyzed adipocyte lipogenesis may contribute to obesity. On the other hand, it could be also conceivable that, during the development of obesity and insulin resistance, the adipose tissue may reach an inflexion point in which the lipogenic capacity is downregulated in a natural inhibitory feed-back process. As Nadler and Attie (38) suggested, it looks as if, once the storage capacity of the adipocytes is reached, the cells reduce their ability to synthesize additional FAs.

The lipogenic responsiveness of human adipose tissue to dietary carbohydrates (20,21), and other nutritional components (39,40), has been well characterized. There are growing evidences showing an antilipogenic effect of inflammatory adipocytokines (41,42,43). A possible explanation for the reported contradictory findings regarding *FAS* gene expression in obese subjects could arise from differences at nutritional and inflammatory status between populations (26).

Of note were the negative associations between the lipogenic factors and serum glucose concentration. Both the downregulation of the lipogenic pathways in fat depots and the higher blood glucose levels may probably reflect underlying insulin resistance. Interestingly, we also analyzed seven adipose tissue samples from lean subjects with type 2 diabetes (data not shown). In these samples, *FAS* gene expression levels, as well as ACC values, were significantly decreased. Specifically, omental *FAS* gene expression levels were 4.2-fold ( $P < 0.0001$ ) lower than in lean and healthy volunteers.

On the other hand, among lean individuals, the standard deviation was within 1.5 and 3.0-fold higher than among obese volunteers with or without DM-2 (Table 1). This suggests that the adipose tissue lipogenic pathway reflects, at the gene expression level, dietary lifestyles, and metabolic disturbances among nonobese subjects. When obesity and/or DM-2 develop, a generalized downregulation of this pathway occurs in the omental fat depot.

In conclusion, although it is not possible to determine the causality that leads to downregulation of the reported gene expression levels in omental adipose tissue, the findings reported here are compatible with the notion that obesity, insulin resistance and DM-2 downregulate the lipogenic pathway, at least at the level of gene expression. Inhibition of the lipogenic pathway seems to follow natural physiological processes in human adipose tissue when omental adiposity reaches inappropriate levels.

## Disclosure

The authors declared no conflict of interest.

## References

### REFERENCES

1. Lean ME. Pathophysiology of obesity. *Proc Nutr Soc* 2000;59:331–336. | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
2. Mauriege P, Despres JP, Moorjani S *et al.* Abdominal and femoral adipose tissue lipolysis and cardiovascular disease risk factors in men. *Eur J Clin Invest* 1993;23:729–740. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
3. Gillum RF. The association of the ratio of waist to hip girth with blood pressure, serum cholesterol and serum uric acid in children and youths aged 6-17 years. *J Chronic Dis* 1987;40:413–420. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
4. Abate N, Garg A. Heterogeneity in adipose tissue metabolism: causes, implications and management of regional adiposity. *Prog Lipid Res* 1995;34:53–70. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
5. Swierczynski J, Goyke E, Wach L *et al.* Comparative study of the lipogenic potential of human and rat adipose tissue. *Metab Clin Exp* 2000;49:594–599. | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
6. Letexier D, Pinteur C, Large V, Fréring V, Beylot M. Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *J Lipid Res* 2003;44:2127–2134. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
7. Marin P, Høgh-Kristiansen I, Jansson S *et al.* Uptake of glucose carbon in muscle glycogen and adipose tissue triglycerides *in vivo* in humans. *Am J Physiol* 1992;263:E473–E480. | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
8. Aarsland A, Chinkes D, Wolfe RR. Hepatic and whole-body fat synthesis in humans during carbohydrate overfeeding. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1774–1782. | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
9. Chascione C, Elwyn DH, Davila M *et al.* Effect of carbohydrate intake on de novo lipogenesis in human adipose tissue. *Am J Physiol* 1987;253:E664–E669. | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
10. Mobbs CV, Makimura H. Block the FAS, lose the fat. *Nat Med* 2002;8:335–336. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
11. Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL *et al.* Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 2000;288:2379–2381. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
12. Kovacs P, Harper I, Hanson RL *et al.* A novel missense substitution (Val1483Ile) in the fatty acid synthase gene (FAS) is associated with percentage of body fat and substrate oxidation rates in nondiabetic Pima Indians. *Diabetes* 2004;53:1915–1919. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
13. Hillgartner FB, Salati LM, Goodridge AG. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol Rev* 1995;75:47–76. | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
14. Semenkovich CF. Regulation of fatty acid synthase (FAS). *Prog Lipid Res* 1997;36:43–53. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
15. Claycombe KJ, Jones BH, Standridge MK *et al.* Insulin increases fatty acid synthase gene transcription in human adipocytes. *Am J Physiol* 1998;274:R1253–R1259. | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
16. Wang Y, Jones Voy B, Urs S *et al.* The human fatty acid synthase gene and de novo lipogenesis are coordinately regulated in human adipose tissue. *J Nutr* 2004;134:1032–1038. | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |

17. Jones BH, Standridge MK, Moustaid N. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology* 1997;138:1512–1519. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
18. Brownsey RW, Boone AN, Elliott JE, Kulpa JE, Lee WM. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* 2006;34:223–227. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
19. Diraison F, Dusserre E, Vidal H, Sothier M, Beylot M. Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E46–E51. | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
20. Minehira K, Vega N, Vidal H, Acheson K, Tappy L. Effect of carbohydrate overfeeding on whole body macronutrient metabolism and expression of lipogenic enzymes in adipose tissue of lean and overweight humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28:1291–1298. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
21. Hudgins LC, Baday A, Hellerstein MK *et al.* The effect of dietary carbohydrate on genes for fatty acid synthase and inflammatory cytokines in adipose tissues from lean and obese subjects. *J Nutr Biochem* 2008;19:237–245. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
22. Ranganathan G, Unal R, Pokrovskaya I *et al.* The lipogenic enzymes DGAT1, FAS, and LPL in adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and TZD treatment. *J Lipid Res* 2006;47:2444–2450. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
23. Swierczynski J, Zabrocka L, Goyke E *et al.* Enhanced glycerol 3-phosphate dehydrogenase activity in adipose tissue of obese humans. *Mol Cell Biochem* 2003;254:55–59. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
24. Guichard C, Dugail I, Le Liepvre X, Lavau M. Genetic regulation of fatty acid synthetase expression in adipose tissue: overtranscription of the gene in genetically obese rats. *J Lipid Res* 1992;33:679–687. | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
25. Penicaud L, Ferre P, Assimacopoulos-Jeannet F *et al.* Increased gene expression of lipogenic enzymes and glucose transporter in white adipose tissue of suckling and weaned obese Zucker rats. *Biochem J* 1991;279:303–308. | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
26. Berndt J, Kovacs P, Ruschke K *et al.* Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007;50:1472–1480. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
27. Deurenberg P, van der Kooy K, Leenen R, Weststrate JA, Seidell JC. Sex and age specific prediction formulas for estimating body composition from bioelectrical impedance: a cross-validation study. *Int J Obes* 1991;15:17–25. | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
28. Kim KH. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annu Rev Nutr* 1997;17:77–99. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
29. Rorive M, Letiexhe MR, Scheen AJ, Ziegler O. [Obesity and type 2 diabetes]. *Rev Med Liege* 2005;60:374–382. | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
30. Giorgino F, Laviola L, Eriksson JW. Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from *in vivo* and *in vitro* studies. *Acta Physiol Scand* 2005;183:13–30. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
31. Suryawan A, Swanson LV, Hu CY. Insulin and hydrocortisone, but not triiodothyronine, are required for the differentiation of pig preadipocytes in primary culture. *J Anim Sci* 1997;75:105–111. | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
32. Girard J, Perdereau D, Foufelle F, Prip-Buus C, Ferré P. Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J* 1994;8:36–42. | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
33. Kolehmainen M, Vidal H, Alhava E, Uusitupa MI. Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) expression in human obesity. *Obes Res* 2001;9:706–712. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |



34. Nadler ST, Stoehr JP, Schueler KL *et al.* The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:11371–11376. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
35. Soukas A, Cohen P, Socci ND, Friedman JM. Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev* 2000;14:963–980. | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
36. Poulain-Godefroy O, Lecoœur C, Pattou F, Frühbeck G, Froguel P. Inflammation is associated with a decrease of lipogenic factors in omental fat in women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:R1–R7. | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
37. Liu LH, Wang XK, Hu YD *et al.* Effects of a fatty acid synthase inhibitor on adipocyte differentiation of mouse 3T3-L1 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25:1052–1057. | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
38. Nadler ST, Attie AD. Please pass the chips: genomic insights into obesity and diabetes. *J Nutr* 2001;131:2078–2081. | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
39. Boon N, Hul GB, Stegen JH *et al.* An intervention study of the effects of calcium intake on faecal fat excretion, energy metabolism and adipose tissue mRNA expression of lipid-metabolism related proteins. *Int J Obes (Lond)* 2007;31:1704–1712. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
40. Zhang W, Della-Fera MA, Hartzell DL, Hausman D, Baile CA. Adipose tissue gene expression profiles in ob/ob mice treated with leptin. *Life Sci* 2008;83:35–42. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
41. Doerrler W, Feingold KR, Grunfeld C. Cytokines induce catabolic effects in cultured adipocytes by multiple mechanisms. *Cytokine* 1994;6:478–484. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
42. Ruan H, Hacohen N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF. Tumor necrosis factor- $\alpha$  suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor- $\kappa$ B activation by TNF- $\alpha$  is obligatory. *Diabetes* 2002;51:1319–1336. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
43. Ruan H, Miles PD, Ladd CM *et al.* Profiling gene transcription *in vivo* reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor- $\alpha$ : implications for insulin resistance. *Diabetes* 2002;51:3176–3188. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |

## Acknowledgments

We greatly appreciate the technical assistance of Gerard Pardo and Oscar Rovira (Unit of Diabetes, Endocrinology and Nutrition; Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi), Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta). The work of all the members of the Multidisciplinary Obesity Team of the Clínica Universitaria de Navarra is also gratefully acknowledged. This work was supported by research grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2008-02073 and SAF2006-02354), Generalitat de Catalunya (2005SGR00947 and 2005SGR00467), and the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and CIBERObN.

*Thyroid hormone responsive Spot 14 increases during differentiation of human adipocytes and its expression is down-regulated in obese subjects. Int J Obes (Lond). 2010 Mar; 34(3):487-99.*





F J Ortega, A Vazquez-Martin, J-M Moreno-Navarrete, J Bassols, J Rodriguez-Hermosa, J Gironés, W Ricart, B Peral, F J Tinahones, G Frühbeck, J A Menendez and J-M Fernández-Real. "Thyroid hormone responsive Spot 14 increases during differentiation of human adipocytes and its expression is down-regulated in obese subjects". *International journal of obesity*. Vol. 34, issue 3 (March 2010) : p. 487-99

Copyright © 2009, Rights Managed by Nature Publishing Group

<http://www.nature.com/ijo/journal/v34/n3/abs/ijo2009263a.html>

<http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2009.263>

Received 22 April 2009; Revised 23 October 2009; Accepted 31 October 2009; Published online 22 December 2009

## ABSTRACT

**Context:** Very limited information is available regarding the function of human thyroid hormone responsive Spot 14 (human S14, hS14) in adipogenesis and human adiposity.

**Objective:** To evaluate hS14 levels during differentiation of human pre-adipocytes, in human fat depots and isolated fat cells.

**Design:** This was a cross-sectional study.

**Subjects:** A total of 161 omental (OM) and 87 subcutaneous (SC) adipose tissue samples obtained during elective surgical procedures from a population who varied widely in terms of obesity.

**Measurements:** *hS14* gene expression and protein levels during adipogenesis were assessed by RT-PCR, western blot, and using an automated confocal imaging approach.

**Results:** hS14 gene expression levels were decreased in OM adipose tissue from overweight (−42.0%) and obese subjects (−56.5%) compared with lean subjects ( $P<0.05$  and  $P<0.0001$ , respectively). hS14 mRNA (but not hS14-related) was inversely associated with obesity measures such as body mass index ( $P=0.001$ ), percent fat mass ( $P=0.001$ ), waist-to-hip ratio ( $P=0.020$ ), and systolic blood pressure ( $P=0.031$ ). hS14 gene expression and protein levels were up-regulated at the early stages of differentiation of human pre-adipocytes as well as for 3T3-L1 cells. That observation was most prominent in those individual cells exhibiting the more marked differentiation features. hS14 gene expression levels increased by ~45 000-fold in mature adipocytes. Increased hS14 levels were also found in stromal-vascular cells/pre-adipocytes (3.8-fold,  $P<0.05$ ) and in adipose tissue samples (1.9-fold,  $P<0.0001$ ) from SC compared with OM fat depots.

**Conclusions:** These results suggest that hS14 is involved in human adipogenesis, but inversely related to obesity and OM fat accumulation.

**Keywords:**

adipogenesis; pre-adipocytes; mature adipocytes; adipose tissue; gene expression; thyroid hormone responsive Spot 14



*Subcutaneous fat shows higher thyroid hormone receptor-alpha1 gene expression than omental fat. Obesity (Silver Spring). 2009 Dec; 17(12):2134-41.*



Francisco J. Ortega, Jose M. Moreno-Navarrete, Vicent Ribas, Eduardo Esteve, Jose I. Rodriguez-Hermosa et al. "Subcutaneous fat shows higher thyroid hormone receptor-[alpha]1 gene expression than omental fat". *Obesity*. Vol. 17, issue 12 (Dec. 2009) : p. 2134-41

Copyright © 2009, Rights Managed by Nature Publishing Group

<http://www.nature.com/oby/journal/v17/n12/full/oby2009110a.html>

<http://dx.doi.org/10.1038/oby.2009.110>

## Subcutaneous Fat Shows Higher Thyroid Hormone Receptor- $\alpha$ 1 Gene Expression Than Omental Fat

Francisco J. Ortega<sup>1</sup>, José M. Moreno-Navarrete<sup>1</sup>, Vicent Ribas<sup>2</sup>, Eduardo Esteve<sup>1</sup>, Jose I. Rodriguez-Hermosa<sup>3</sup>, Bartomeu Ruiz<sup>3</sup>, Belén Peral<sup>4</sup>, Wifredo Ricart<sup>1</sup>, Antonio Zorzano<sup>2</sup> and José M. Fernández-Real<sup>1</sup>

1. <sup>1</sup>Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Institut d'Investigació Biomèdica de Girona and CIBEROBN (CB06/03/010), Instituto de Salud Carlos III, Girona, Spain
2. <sup>2</sup>Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Institute for Research in Biomedicine and CIBERDEM, Barcelona, Spain
3. <sup>3</sup>Department of Surgery, Institut d'Investigació Biomèdica de Girona, Girona, Spain
4. <sup>4</sup>Department of Endocrinology, Physiopathology and Nervous System, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (IIB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) and Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Correspondence: José M. Fernández-Real ([jmfernandezreal.girona.ics@gencat.cat](mailto:jmfernandezreal.girona.ics@gencat.cat))

Received 28 October 2008; Accepted 17 March 2009; Published online 9 April 2009.

### Abstract

The aims of this work were to evaluate thyroid hormone receptor- $\alpha$  (TR $\alpha$ ), TR $\alpha$ 1, and TR $\alpha$ 2 mRNA gene expression and TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 ratio, identified as candidate factors for explaining regional differences between human adipose tissue depots. TR $\alpha$ , TR $\alpha$ 1, and TR $\alpha$ 2 mRNA levels, and the gene expressions of arginine-serine-rich, splicing factor 2 (SF2), heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (hnRNP H1), heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1), and Spot 14 (S14) were evaluated in 76 paired adipose tissue samples obtained from a population of 38 women who varied widely in terms of obesity and body fat distribution. Gene expression for these factors was also studied in stromal-vascular cells (SVCs) and mature adipocytes (MAs) from eight paired fat depots. TR $\alpha$  gene and TR $\alpha$ 1 mRNA expression were increased 1.46-fold ( $P = 0.006$ ) and 1.80-fold ( $P < 0.0001$ ), respectively, in subcutaneous (SC) vs. visceral fat. These differences in gene expression levels were most significant in the obese group, in which the TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 ratio

was 2.24-fold ( $P < 0.0001$ ) higher in SC vs. visceral fat. *S14* gene expression was also increased by 2.42-fold ( $P < 0.0001$ ) and correlated significantly with  $TR_{\alpha}$  and  $TR_{\alpha 1}$  gene expression and with the  $TR_{\alpha 1}:TR_{\alpha 2}$  ratio. In agreement with these findings, hnRNP A1:SF2 ratio was decreased by 1.39-fold ( $P = 0.001$ ).  $TR_{\alpha}$  and *S14* levels were 2.1-fold ( $P < 0.0001$ ) and 112.4-fold ( $P < 0.0001$ ), respectively, higher in MAs than in SVCs from both fat depots. In summary, genes for  $TR_{\alpha}$ , their upstream regulators, and downstream effectors were differentially expressed in SC vs. omental (OM) adipose tissue. Our findings suggest that  $TR_{\alpha 1}$  could contribute to SC adipose tissue expandability in obese subjects.

## Introduction

Thyroid hormone plays a central role in normal development, differentiation, and metabolic homeostasis. It is well known that thyroid hormone stimulates basal metabolic rate and adaptive thermogenesis. In fact, the relationship between body fat, thyroidal state, and metabolism became firmly established with the measurement of basal metabolic rates.

Some insights into the thyroidal regulation of fat tissue have been obtained from animal studies. Both stimulations and inhibitions of fatty acid synthesis or lipogenic enzymes by thyroid hormones have been described (1,2,3). Although some studies reported a stimulation of lipogenesis by hypothyroidism, others showed an inhibition under the same circumstances (3,4). Careful review of these animal studies reveals no consistent differences in rat strain, sex, treatment, or adipose site to explain these discrepant results.

However, it seems clear that thyroid hormones are linked to lipogenesis in lipogenic tissues such as the liver (5) and adipose tissue (2,3) through activated thyroid hormone receptor (TR)-induced gene expression. The two major TR isoforms,  $TR_{\alpha}$  and  $TR_{\beta}$ , are differentially expressed during development and are differentially distributed in adult tissues (6).  $TR_{\beta}$  plays an essential role in inner ear, cerebellar, and retinal development, thyrotropic hormone regulation, and mediating the metabolic actions of  $T_3$  in the liver (7).  $TR_{\alpha}$  has specific roles in the brain and heart and mediating adaptive thermogenesis in brown adipose tissue (8,9,10).  $TR_{\beta 1}$  and, specially,  $TR_{\alpha 1}$  are the most prevalent isoforms of TRs (11).

In mammals, transcripts from the *c-erbA- $\alpha$*  gene (*NR1A1*; Nuclear Receptors Committee, 1999) code for two major TR isoforms,  $TR_{\alpha 1}$  (*NR1A1a*) and  $TR_{\alpha 2}$  (*NR1A1b*), which are functionally antagonistic (for a review, see ref. 12).  $TR_{\alpha 1}$  is an authentic TR that binds thyroid hormone ( $T_3$ ) and mediates its activity in many cells and tissues. Interestingly, impaired adipogenesis caused by a mutated  $TR_{\alpha 1}$  has been described (3).  $TR_{\alpha 2}$  (also known to be expressed in human adipose tissue) is a variant receptor that lacks a functional hormone-binding site and antagonizes the ability of  $TR_{\alpha 1}$  to activate gene transcription in the presence of  $T_3$  (ref. 13). Although both isoforms are expressed in most mammalian cells, the levels of each vary widely in different tissues and at different stages of development. Thus, the regulation of  $TR_{\alpha}$  alternative processing is important for determining cellular levels of  $TR_{\alpha 1}$  and  $TR_{\alpha 2}$  mRNAs, which, in turn, are critical for modulating the response to  $T_3$ .

The balance of the  $TR_{\alpha 1}:TR_{\alpha 2}$  ratio may be responsible for variations in thyroid hormone sensitivity between different tissues. The  $TR_{\alpha 1}:TR_{\alpha 2}$  ratio is tissue-specific and depends on cell differentiation status (11,14). The  $TR_{\alpha 1}:TR_{\alpha 2}$  ratio also depends on certain components of the general splicing mechanism, such as the family of serine-arginine proteins and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) related proteins (15,16) and the balance between them. These proteins bind the RNA on specific sequences and thereby regulate the

splicing direction and the expression pattern of proteins encoded by a single gene in a dose-dependent manner (15). Among these splicing factors, hnRNP H1 seems to enhance the arginine–serine-rich, splicing factor 2 (SF2) splicing effect (17). While hnRNP A1 mediates silencing, hnRNP H1 antagonizes this silencing and hnRNP A1 competes with SF2 in the binding to some G-rich pre-mRNA tracts (18). This phenomenon has been previously described with  $\beta$ -tropomyosin exon 6B alternative splicing (19) and in the *c-src* exon N1 (ref. 20). The presence of an splicing enhancer element (SE $\alpha$ 2), a purine-rich sequence with several G-rich motifs in the final intronic sequences of *c-erbA- $\alpha$*  gene, supports the idea that these splicing factors could be involved in the tissue TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 ratio (16). SE $\alpha$ 2 would stimulate TR $\alpha$ 2 production interacting with serine–arginine and hnRNP proteins.

It is commonly assumed that omental (OM) and subcutaneous (SC) adipocytes are different at lipogenic and lipolytic activities. Although findings on this subject are not at all unanimous, these differences include differential GLUT4, RBP4, peroxisome proliferator–activated receptor- $\gamma$ , and insulin receptor gene expression (21), lipoprotein lipase activity, lipolytic rate under maximal stimulation by  $\beta$ -adrenergic agonist, and adipocyte size (22,23), among others (24). To our knowledge, none of these studies have linked these documented differences in both human fat depots to thyroid hormone-induced effects through TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 ratio. We thus aimed to examine the expression of TR $\alpha$ 1 and TR $\alpha$ 2 mRNA in human adipose tissue samples representing the two largest fat mass depots, OM and SC adipose tissue, and to test whether this expression is different in obese and nonobese subjects. We found that the TR $\alpha$  expression was significantly higher in human SC than in OM adipose tissue and that the TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 ratio was also higher in SC than in OM adipose tissue. To further substantiate our results, we analyzed Spot 14 (S14) gene expression. The most striking aspect of S14 gene expression is its T<sub>3</sub> dependence, very useful in the study of thyroid hormone action in lipogenic tissues, at least in the liver (25). Finally, we also evaluated SF2, hnRNP H1 and hnRNP A1 gene expression levels, and hnRNP A1:SF2 ratio as a possible determinant factor for alternative *c-erbA- $\alpha$*  gene 5'-splice-site selection *in vivo* as well as *in vitro* (26).

## Methods and Procedures

### Subjects

A group of 76 samples, 38 OM, and 38 SC adipose tissue fragments, from 38 women, with a BMI between 20 and 68 kg/m<sup>2</sup>, who were recruited at the Endocrinology Service of the Hospital Universitari Dr Josep Trueta (Girona, Spain), were analyzed. All subjects were of white origin, euthyroid, and reported that their body weight had been stable for at least 3 months before the study. Liver and renal diseases were specifically excluded by biochemical work-up. All subjects gave written informed consent after the purpose of the study was explained to them. The institutional review board approved the protocol, so we certify that all applicable institutional regulations concerning the ethical use of information and samples from human volunteers were followed during this research.

### Anthropometric measurements

BMI was calculated as weight (in kilograms) divided by height (in meters) squared. The subjects' waist was measured with a soft tape midway between the lowest rib and the iliac crest. The hip circumference was measured at the widest part of the gluteal region. The waist-to-hip ratio was then calculated. Deurenberg formula (27) was used to estimate body fat composition in those subjects. According to these anthropometric parameters, subjects were



classified on nonobese (BMI <30 kg/m<sup>2</sup>) and obese (BMI ≥30 kg/m<sup>2</sup>) following World Health Organization guidelines.

## **Samples treatment**

Adipose tissue samples were obtained from SC and visceral depots during elective surgical procedures (cholecystectomy, surgery of abdominal hernia, and gastric by-pass surgery). All samples were washed, fragmented, and immediately flash-frozen in liquid nitrogen before being stored at -80 °C.

Approximately 5 g of SC and OM adipose tissue samples from eight subjects were aseptically isolated and all visible connective tissue was removed. Tissues were finely minced and subjected to a 1-h digestion at 37 °C in a shaking water bath. The digestion buffer included 100 mmol/l HEPES (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) buffer containing 120 mmol/l NaCl, 50 mmol/l KCl, 5 mmol/l D-glucose, 1 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 1.5% type-V bovine serum albumin (Sigma-Aldrich), 2% P/S, and 0.075% collagenase type I (Sigma-Aldrich) solution. The collagenase type I solution used to isolate stromal-vascular cells (SVCs) and mature adipocytes (MAs) from fat samples contained ~1.5 mg collagenase type I/ml. The remaining procedure was similar to a previously described method for isolating SVCs from adipose tissue (28). Briefly, upon disintegration of the adipose tissue aggregates, digested tissue was centrifuged and two cellular fractions, a pellet of SVCs and a supernatant of MAs, were placed in 20 ml of phosphate buffered saline 2% P/S and passed through sterile nylon mesh filters (autoclaved metal screen) to isolate digested cells. Finally, both SVCs and MAs filtered fractions were washed and centrifuged for 1 min at 400g before being stored at -80 °C.

RNA was prepared from all these samples (both fat biopsies and cellular debris) using RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Gaithersburg, MD). The integrity of each RNA sample was checked by either agarose gel electrophoresis or with an Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Total RNA was quantified by means of spectrophotometer (GeneQuant; GE Healthcare, Piscataway NJ) or with the bioanalyzer and reverse transcribed to cDNA using High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's protocol.

## **Cell culture**

SVCs from both visceral and SC fat samples (two paired samples) were resuspended in 2 ml of red cell lysis buffer (ammonium chloride) for 10 min on ice, washed two times with 20 ml of phosphate buffered saline 2% P/S and centrifuged at 400g for 5 min at 37 °C. SVCs ( $n = 4$ ) were then plated on T-75 cell culture flasks and cultured at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mix F-12 medium (1:1, v/v) supplemented with 10 U/ml P/S, fetal bovine serum 10%, HEPES 1% and glutamine 1% (all from Gibco BRL, Grand Island, NY). One week later, human visceral and SC preadipocytes were resuspended and cultured (~40,000 cells/cm<sup>2</sup>) in 12-well plates in preadipocytes medium (Zen-Bio, Research Triangle Park, NC) composed of Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mix F-12 medium (1:1, v/v), HEPES, fetal bovine serum, penicillin, and streptomycin in a humidified 37 °C incubator with 5% CO<sub>2</sub>. At 24 h after plating, cells were checked for complete confluence (day 0) and differentiation was induced using

differentiation medium (Zen-Bio) composed of preadipocytes medium, human insulin, dexamethasone, isobutylmethylxanthine, and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists (rosiglitazone). After 7 days, differentiation medium was replaced with fresh adipocyte medium (Zen-Bio) composed of Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mix F-12 medium (1:1, v/v), HEPES, fetal bovine serum, biotin, pantothenate, human insulin, dexamethasone, penicillin, streptomycin, and amphotericin. Two weeks after initiation of differentiation (day 14), cells appeared rounded with large lipid droplets apparent in the cytoplasm. Cells were then considered MAs, harvested, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for RNA extraction following the aforementioned methods.

### Analytical determinations

The serum glucose concentrations were measured in duplicate by the glucose oxidase method with the use of a Beckman Glucose Analyzer II (Beckman Instruments, Brea, CA). Total serum cholesterol was measured through the reaction of cholesterol esterase/oxidase/peroxidase, using a BM/Hitachi 747. High-density lipoprotein-cholesterol was quantified after precipitation with polyethylene glycol at room temperature. Total serum triglycerides were measured through the reaction of glycerol-phosphate-oxidase and peroxidase. Free  $T_4$ , free  $T_3$ , and thyrotropic hormone were measured by electro-chemiluminescence (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) with intra- and interassay coefficients of variation  $<5\%$ .

### Gene expression analyses

Gene expression was assessed by real-time PCR using an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), using SybrGreen and TaqMan technology suitable for relative genetic expression quantification. The human *Cyclophilin A* (peptidylprolyl isomerase A (PPIA)) was used as endogenous control and gene expression results are expressed as expression ratio relative to PPIA gene expression, ratio relative to  $TR\alpha_2$  in  $TR\alpha_1:TR\alpha_2$  or to SF2 in hnRNP A1:SF2 ratio, using the delta threshold cycle ( $\Delta C_t$ ) method with SybrGreen primer and TaqMan primer/probes (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol.

The SybrGreen primer sets used were previously validated to give an optimal amplification over serial dilutions of target, and analysis of melting curves demonstrated specific single product for each gene primer. Primer sequences were as follows: PPIA forward/reverse primer sequences were 5'-CAAATGCTGGACCCAACACAA/CCTCCACAATATTCATGCCTTCTT-3';  $TR\alpha_1$  and  $TR\alpha_2$  forward/reverse primer sequences were 5'-GTTCCCAGGACCCCATCCT/GGGTGAGTTGAGGGCATCTTC-3' and 5'-GGCCCCAACTCAAGTGTAC/CTTGGGAAACAGACTCATGCC-3', respectively.  $TR\alpha$  gene expression was assessed by adding up relative  $TR\alpha_1$  and  $TR\alpha_2$  mRNA values in each sample.

The commercially available and prevalidated TaqMan primer/probe sets used were as follows: endogenous control PPIA (4333763, RefSeq. NM\_002046.3, cyclophilin A) and target genes THRSP14 (Hs00930058\_m1, RefSeq. NM\_003251.2, Spot 14), HNRPH1 (Hs00800662\_sH, RefSeq. NM\_005520.1, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1), HNRPA1 (Hs01656228\_s1, RefSeq. NM\_031157.2 and NM\_002136.2, heterogeneous

nuclear ribonucleoprotein A1), and SF2 (Hs00199471\_m1, RefSeq. NM\_006924.4 and NM\_001078166.1, arginine–serine-rich, splicing factor 2).

In both RT-PCR techniques, SybrGreen and TaqMan, the reaction was performed in a final volume of 25  $\mu$ l. The cycle program consisted of an initial denaturing of 10 min at 95 °C then 40 cycles of 15-s denaturing phase at 95 °C and 1-min annealing and extension phase at 60 °C. A  $C_t$  value was obtained for each amplification curve and a  $\Delta C_t$  value was first calculated by subtracting the  $C_t$  value for human *Cyclophilin A* (PPIA) RNA from the  $C_t$  value for each sample. Fold changes compared with the endogenous control were then determined by calculating  $2^{-\Delta C_t}$ , so gene expression results are expressed as expression ratio relative to PPIA gene expression according to manufacturers' guidelines. The TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 ratio was performed using TR $\alpha$ 2 mRNA gene expression as reference and TR $\alpha$ 1 mRNA as target gene. The same analysis was performed to establish hnRNP A1:SF2 ratio. Positive and negative controls were included in all reactions.

### Statistical analyses

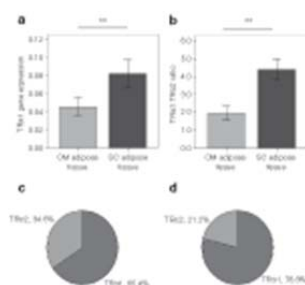
Descriptive results of continuous variables are expressed as mean  $\pm$  s.d. Before statistical analysis, normal distribution and homogeneity of the variances were evaluated using Levene's test. Student's paired two-sample *t*-test was used to compare groups of adipose tissue samples according to its origin, SC or visceral. All data from human samples are expressed as mean  $\pm$  s.d. Relation between quantitative variables were tested using Pearson's test. The statistical analyses and graphics were performed using the program SPSS (version 13.0; SPSS, Chicago, IL).

### Results

#### TR $\alpha$ gene expression and TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 ratio in both adipose tissue samples

The anthropometric and metabolic characteristics of the study subjects and the relative gene expression levels in both fat depots are summarized in [Tables 1](#) and [2](#), respectively, for both nonobese (BMI <30,  $n = 15$ ) and obese (BMI  $\geq$ 30,  $n = 23$ ) subjects. Analysis of these 76 samples (38 pairs) of OM and SC fat depots revealed that TR $\alpha$  gene expression (the sum of TR $\alpha$ 1 and TR $\alpha$ 2 relative gene expression levels) was significantly increased in the SC vs. OM adipose tissue of obese women (1.61-fold,  $P = 0.010$ ) ([Table 2](#)). TR $\alpha$ 1 gene expression was also significantly increased only in SC fat depot from obese women ( $P < 0.0001$ , [Figure 1a](#), [Table 2](#)).

**Figure 1.**



Regional differences in TR $\alpha$  gene expression levels and TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 ratios: (a) relative TR $\alpha$ 1 mRNA gene expression and (b) TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 ratio in omental (OM) and subcutaneous (SC) adipose tissue samples from both nonobese ( $n = 15$ ) and obese ( $n = 23$ ) women. The mean relative prevalence for each TR isoform (TR $\alpha$ 1 and TR $\alpha$ 2) is represented in c for OM and in d for SC fat depot. Values are mean and 95% confidence interval for the mean. \*\* $P < 0.001$  for comparisons between fat depots in all subjects as a whole. TR, thyroid hormone receptor.

[Full figure and legend \(13K\)](#)

[Table 1 - Anthropometric and metabolic characteristics of the study group.](#)

[Full table \(32K\)](#)

[Table 2 - Differences in relative gene expression levels and ratios between omental \(OM\) and subcutaneous \(SC\) fat depots for nonobese \(upper panel\) and obese \(lower panel\) women.](#)

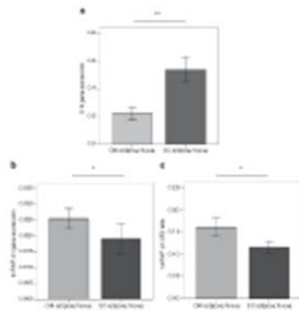
[Full table \(62K\)](#)

TR $\alpha$ 2 gene expression was not significantly different in the SC vs. OM fat depots. In all subjects as a whole, the TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 ratio was 2.18-fold higher ( $P < 0.0001$ ) ([Figure 1b](#)) in SC than in OM fat depots (2.07-fold higher ( $P = 0.002$ ) in nonobese and 2.39-fold higher ( $P < 0.0001$ ) in obese women) ([Table 2](#)). We calculated that ~35% of the TR $\alpha$  gene is spliced into the orphan receptor isoform, TR $\alpha$ 2, in OM adipose tissue but only ~21% in the SC fat depot ([Figure 1c,d](#)). Thyroid function was not significantly associated with the expression of any of these factors.

### S14 gene expression analyses

To gain further insight in the detected gene expression differences, we analyzed S14 gene expression and the splicing factors involved in this process. S14 gene expression was also increased by 2.42-fold ( $P < 0.0001$ ) in SC vs. visceral adipose tissue depots ([Figure 2a](#)) in both groups. In fact, S14 gene expression correlated significantly with TR $\alpha$  ( $P = 0.001$ ), with TR $\alpha$ 1 gene expression ( $P < 0.0001$ ), and with the TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 ratio ( $P = 0.001$ ) in both obese and nonobese subjects.

**Figure 2.**



Regional differences in S14 and hnRNP A1 gene expression levels and hnRNP A1:SF2 ratio: (a) relative Spot 14 and (b) hnRNP A1 gene expression levels and hnRNP A1:SF2 ratio (c) in omental (OM) and subcutaneous (SC) adipose tissue samples from both nonobese ( $n = 15$ ) and obese ( $n = 23$ ) women. Values are mean and 95% confidence interval for the mean.  $**P < 0.001$  and  $*P < 0.05$  for comparisons between fat depots in all subjects as a whole. hnRNP, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein; SF2, arginine–serine-rich, splicing factor 2; S14, Spot 14.

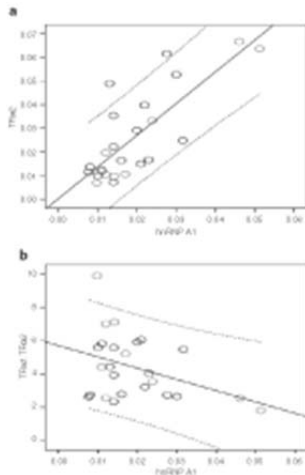
[Full figure and legend \(14K\)](#)

### Differential hnRNP A1:SF2 ratio between adipose tissues

Trying to analyze more in depth the molecular processes involved, we analyzed the expression of three splicing proteins, hnRNP H1, hnRNP A1, and SF2, the levels of which are supposed to determine  $TR_{\alpha}$  gene alternative and constitutive splicing. We found no differences in hnRNP H1 gene expression in OM vs. SC adipose tissue from nonobese subjects. Interestingly, hnRNP A1 expression was significantly higher in OM vs. SC adipose tissue from obese subjects ([Table 2](#)). In fact, in all subjects as a whole, hnRNP A1 gene expression was significantly higher in OM vs. SC fat depots (1.32-fold,  $P = 0.025$ ) ([Figure 2b](#)). Because SF2 gene expression levels were not different between fat depots ([Table 2](#)), hnRNP A1:SF2 ratio was 1.39-fold ( $P = 0.001$ ) higher in OM vs. SC fat in all subjects (1.55-fold,  $P = 0.003$ ) and 1.33-fold ( $P = 0.030$ ) in nonobese and obese women, respectively ([Figure 2c](#)).

In fact, hnRNP A1 gene expression correlated significantly with  $TR_{\alpha 2}$  gene expression ( $r = 0.78$ ,  $P < 0.0001$ ; [Figure 3](#) upper panel) and inversely with  $TR_{\alpha 1}:TR_{\alpha 2}$  ratio ( $r = -0.39$ ,  $P = 0.05$ ; [Figure 3](#) lower panel). This suggests that the relative presence of these splicing factors in human adipose tissue from different depots could determine *c-erbA- $\alpha$*  gene processing.

**Figure 3.**



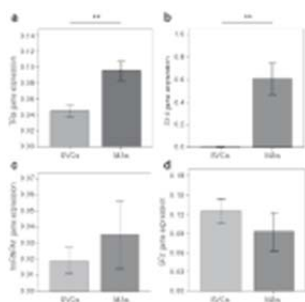
Linear relationship between hnRNP A1 expression and (a) thyroid hormone receptor  $\alpha 2$  ( $r = 0.78$ ,  $P < 0.0001$ ) and (b) thyroid hormone receptor  $\alpha 1/\alpha 2$  ratio ( $r = -0.39$ ,  $P = 0.05$ ) in subcutaneous adipose tissue from nonobese (gray circles) and obese (black circles) women. hnRNP, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein.

[Full figure and legend \(24K\)](#)

### TR $\alpha$ , S14, hnRNP A1, and SF2 levels in SVCs and MAs from OM and SC fat samples

Adipose tissue represents a pool of adipocytes, preadipocytes, and macrophages. Analysis of these 32 samples (16 pairs) of SVCs and MAs obtained from OM (eight pairs) and SC (eight pairs) fat depots revealed that TR $\alpha$  gene expression was 2.1-fold ( $P < 0.0001$ ) higher in MAs than in SVCs from both fat depots ([Figure 4a](#)). On the other hand, S14 levels were 112-fold ( $P < 0.0001$ ) higher in MAs ([Figure 4b](#)). It should be noted that also hnRNP A1 (but not SF2) levels were higher in MAs than in SVCs ([Figure 4c,d](#)).

**Figure 4.**

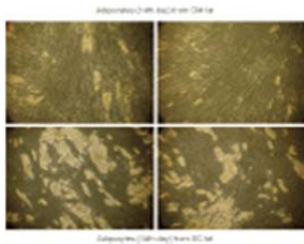


TR $\alpha$ , S14, hnRNP A1, and SF2 gene expression levels in isolated fat cells: (a) TR $\alpha$  gene expression and (b) Spot 14, (c) hnRNP A1, and (d) SF2 levels in stromal-vascular cells (SVCs) and mature adipocytes (MAs) isolated from 16 adipose tissue biopsies. Values are mean and 95% confidence interval for the mean. \*\* $P < 0.001$  for comparisons between cells from both SC and OM fat depots. hnRNP, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein; PPIA, peptidylprolyl isomerase A; SF2, arginine–serine-rich, splicing factor 2; S14, Spot 14; TR, thyroid hormone receptor.

[Full figure and legend \(16K\)](#)

The expression of these factors was similar in cells from SC or OM adipose tissue ([Table 3](#)). Interestingly, under the same culture conditions (free T<sub>3</sub> = 1.68 pg/ml), preadipocytes from SC fat depots differentiated earlier (lipid droplets were detected at ~5th day vs. ~7th day) and "better" ([Figure 5](#)) than those from OM fat. Furthermore, S14 gene expression levels were significantly increased in preadipocytes from SC samples at the 1st day (~300%), and remained higher (~33%) at the 14th day in MAs from SC fat depots than in those from OM samples.

[Figure 5.](#)



Appearance of human preadipocytes isolated from visceral (upper panels) and subcutaneous (lower panels) fat depots, differentiated to mature adipocytes (MAs) during 14 days under the same conditions.

[Full figure and legend \(114K\)](#)

[Table 3 - Differences in relative gene expression levels and ratios between stromal-vascular cells \(SVCs, upper panel\) and mature adipocytes \(MA, lower panel\) from omental \(OM\) and subcutaneous \(SC\) fat depots.](#)

[Full table \(28K\)](#)

## Discussion



We here describe that TR $\alpha$  and TR $\alpha$ 1 gene expressions were significantly increased in SC vs. OM fat depot from obese women ( $P < 0.0001$ ) but not in nonobese subjects. According to these findings, human SC adipose tissue from obese subjects is supposed to be more T<sub>3</sub>-responsive than OM adipose tissue. In this regard, S14 gene expression was also higher in SC than in OM fat depots. Furthermore, we also found that MA is the cell responsible for TR $\alpha$  gene expression levels ([Figure 4a](#)), for both TR $\alpha$ 1 and TR $\alpha$ 2, and for S14 expression levels ([Figure 4b](#)). These data could help to understand the role of thyroid hormone in the development of the obesity.

TR $\alpha$ 2 is an alternative product of the *c-erbA- $\alpha$*  gene expression that lacks the intact ninth intronic sequence and acquires a unique carboxyl-terminal region. Given its inability to bind T<sub>3</sub>, the TR $\alpha$ 2 capacity to act as a transcription factor is abolished ([12](#)) but not to bind thyroid hormone response elements. As a result, TR $\alpha$ 2 exerts a dominant negative effect by competing for TR binding to thyroid hormone response elements on DNA ([29](#)). The balance between TR $\alpha$ 1 and TR $\alpha$ 2 is thus important given their clearly opposite effects on T<sub>3</sub>-responsive gene expression ([5](#)). In this regard, the balance of the TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 ratio could be responsible for development changes through the control of growth and homeostasis ([30](#)). The present results showed higher TR $\alpha$  gene expression in SC fat, mainly due to increased TR $\alpha$ 1 mRNA isoform levels, in detriment to TR $\alpha$ 2, in SC adipose tissue. Considering the sum of TR $\alpha$ 1 and TR $\alpha$ 2 values as the total *c-erbA- $\alpha$*  gene expression, TR $\alpha$ 1 constituted the 78.8% of the total expression in SC but only the 65.4% in OM adipose tissue depot.

Additionally, our results imply the existence of differential splicing events of *c-erbA- $\alpha$*  pre-mRNA according to adipose depots. To further study this differential pre-mRNA processing, we aimed to analyze the involved splicing factors, such as hnRNP A1, hnRNP H1, and SF2. We found that hnRNP H1 and hnRNP A1 (but not SF2) tended to be under-expressed in SC samples. Importantly, in parallel to TR $\alpha$  and TR $\alpha$ 1 changes, hnRNP A1 was significantly downregulated in the SC adipose tissue depot of obese subjects. Our findings suggest that hnRNP A1:SF2 ratio could be responsible for tissue-specific TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 ratio differences detected between SC and OM adipose tissue depots. The distal splicing site leading to TR $\alpha$ 2 is chosen over polyadenylation of TR $\alpha$ 1. This relationship has been previously reported in *in vitro* studies ([31](#)) but, to our knowledge, this phenomenon has not been observed *in vivo*.

Serine–arginine-rich protein factors are important mediators of splicing enhancement in both constitutive and alternative splicing ([32](#)). hnRNPs constitute a set of polypeptides that bind heterogeneous nuclear RNA with a full range of functions, most of them presently unknown ([33](#)). Among these splicing factors, hnRNP A1 seems to be implicated in a variety of cellular splicing silencing mechanism, through its cooperative recognition of UAGGG[U/A] and related motifs, in a manner that is opposite to the effects exerted by serine–arginine proteins ([18](#)). On the other hand, hnRNP H acts as dose-dependent splicing enhancer cooperating with serine–arginine proteins ([17](#)). The relative abundance of these spliceosome-related factors and, in particular, the ratio of SF2 or hnRNP H1 to its antagonist, hnRNP A1, could be important in regulating the patterns of alternative splicing in a tissue-specific or developmentally regulated manner ([19](#)).

Thyroid status influences specifically for each tissue the expression of a number of genes involved in lipid and glucose metabolism. Examples of T<sub>3</sub>-regulated genes include S14 ([2](#)), peroxisome proliferator–activated receptor, malic enzyme, and adenosine triphosphate citrate liase ([34](#)), fatty acid synthase and glucose transporters ([35](#)), acetyl-CoA carboxylase I, and  $\beta$ -adrenoceptor genes ([36](#)). S14, commonly related to lipogenic pathways, and  $\beta$ <sub>2</sub>-adrenergic



receptor, associated to lipolytic processes (37), are especially prominent among the most T<sub>3</sub>-responsive genes in lipogenic tissues.

Others studies have previously focused on TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 ratio as a reflection of T<sub>3</sub>-sensitivity. This ratio increases with age and severity of illness in liver samples of critically ill patients (38) but decreases in the liver of patients with chronic liver disease (39) or in fasted rats (30). On the other hand, many studies have investigated the differences between OM and SC adipose depots. Although findings of these studies are not at all unambiguous, most of them showed higher basal lipolysis rates per cell but lower absolute response to lipolytic stimuli above basal levels to isoproterenol or other catecholamines in SC fat (40), in parallel to increased adipocyte size (22).

In summary, SC fat was characterized by higher TR $\alpha$  gene expression and TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 ratio. These differences are associated with differential S14 gene expression. Regional differences in TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 ratio between both adipose depots can be explained thought differential hnRNP A1:SF2 ratios, also detected between both fat depots. The significantly higher expression of the TR $\alpha$ 1 in SC vs. OM fat in obese subjects suggests that TR $\alpha$ 1 could contribute to SC adipose tissue expandability in obese subjects. Further investigations will be required to evaluate the functional consequences of these findings.

## Disclosure

The authors declared no conflict of interest.

## References

### REFERENCES

1. Hellström L, Wahrenberg H, Reynisdottir S, Arner P. Catecholamine-induced adipocyte lipolysis in human hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:159–166. | [Article](#) | [PubMed](#)
2. Jiang W, Miyamoto T, Kakizawa T *et al.* Expression of thyroid hormone receptor  $\alpha$ in 3T3-L1 adipocytes; triiodothyronine increases the expression of lipogenic enzyme and triglyceride accumulation. *J Endocrinol* 2004;182:295–302. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
3. Ying H, Araki O, Furuya F, Kato Y, Cheng SY. Impaired adipogenesis caused by a mutated thyroid hormone  $\alpha$ 1 receptor. *Mol Cell Biol* 2007;27:2359–2371. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
4. Bjorntorp P. The regulation of adipose tissue distribution in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996;20:291–302. | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
5. Cachefo A, Boucher P, Vidon C *et al.* Hepatic lipogenesis and cholesterol synthesis in hyperthyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5353–5357. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
6. Forrest D, Sjöberg M, Vennström B. Contrasting developmental and tissue-specific expression of  $\alpha$  and  $\beta$  thyroid hormone receptor genes. *EMBO J* 1990;9:1519–1528. | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
7. Weiss RE, Murata Y, Cua K *et al.* Thyroid hormone action on liver, heart, and energy expenditure in thyroid hormone receptor  $\beta$ -deficient mice. *Endocrinology* 1998;139:4945–4952. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |

8. Gullberg H, Rudling M, Forrest D, Angelin B, Vennström B. Thyroid hormone receptor  $\beta$ -deficient mice show complete loss of the normal cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylase (CYP7A) response to thyroid hormone but display enhanced resistance to dietary cholesterol. *Mol Endocrinol* 2000;14:1739–1749. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
9. Ribeiro MO, Carvalho SD, Schultz JJ *et al.* Thyroid hormone--sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform--specific. *J Clin Invest* 2001;108:97–105. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
10. Bernal J. Action of thyroid hormone in brain. *J Endocrinol Invest* 2002;25:268–288. | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
11. Reyne Y, Nougès J, Cambon B, Viguierie-Bascands N, Casteilla L. Expression of c-erbA $\alpha$ , c-erbA $\beta$  and Rev-erbA $\alpha$  mRNA during the conversion of brown adipose tissue into white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 1996;116:59–65. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
12. Lazar MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev* 1993;14:184–193. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
13. Lazar MA, Chin WW. Nuclear thyroid hormone receptors. *J Clin Invest* 1990;86:1777–1782. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
14. Hastings ML, Milcarek C, Martincic K, Peterson ML, Munroe SH. Expression of the thyroid hormone receptor gene, erbA $\alpha$ , in B lymphocytes: alternative mRNA processing is independent of differentiation but correlates with antisense RNA levels. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4296–4300. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
15. Hanamura A, Cáceres JF, Mayeda A, Franza BR, Krainer AR. Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors. *RNA* 1998;4:430–444. | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
16. Hastings ML, Wilson CM, Munroe SH. A purine-rich intronic element enhances alternative splicing of thyroid hormone receptor mRNA. *RNA* 2001;7:859–874. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
17. Caputi M, Zahler AM. SR proteins and hnRNP H regulate the splicing of the HIV-1 *tev*-specific exon 6D. *EMBO J* 2002;21:845–855. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
18. Eperon IC, Makarova OV, Mayeda A *et al.* Selection of alternative 5' splice sites: role of U1 snRNP and models for the antagonistic effects of SF2/ASF and hnRNP A1. *Mol Cell Biol* 2000;20:8303–8318. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
19. Expert-Bezançon A, Sureau A, Durosay P *et al.* hnRNP A1 and the SR proteins ASF/SF2 and SC35 have antagonistic functions in splicing of  $\beta$ -tropomyosin exon 6B. *J Biol Chem* 2004;279:38249–38259. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
20. Rooke N, Markovtsov V, Cagavi E, Black DL. Roles for SR proteins and hnRNP A1 in the regulation of c-src exon N1. *Mol Cell Biol* 2003;23:1874–1884. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
21. Lefebvre AM, Laville M, Vega N *et al.* Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes* 1998;47:98–103. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
22. Tchernof A, Bélanger C, Morisset AS *et al.* Regional differences in adipose tissue metabolism in women: minor effect of obesity and body fat distribution. *Diabetes* 2006;55:1353–1360. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
23. Boivin A, Brochu G, Marceau S *et al.* Regional differences in adipose tissue metabolism in obese men. *Metab Clin Exp* 2007;56:533–540. | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
24. Vohl MC, Sladek R, Robitaille J *et al.* A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res* 2004;12:1217–1222. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |

25. LaFave LT, Augustin LB, Mariash CN. S14: insights from knockout mice. *Endocrinology* 2006;147:4044–4047. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
26. Cáceres JF, Stamm S, Helfman DM, Krainer AR. Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science* 1994;265:1706–1709. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
27. Deurenberg P, van der Kooy K, Leenen R, Weststrate JA, Seidell JC. Sex and age specific prediction formulas for estimating body composition from bioelectrical impedance: a cross-validation study. *Int J Obes* 1991;15:17–25. | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
28. Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 2008;45:115–120. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
29. Burgos-Trinidad M, Koenig RJ. Dominant negative activity of thyroid hormone receptor variant  $\alpha 2$  and interaction with nuclear corepressors. *Mol Cell Endocrinol* 1999;149:107–114. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
30. Bakker O, Razaki H, de Jong J, Ris-Stalpers C, Wiersinga WM. Expression of the  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , and  $\beta 1$  T3-receptor mRNAs in the fasted rat measured using competitive PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;242:492–496. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
31. Timmer DC, Bakker O, Wiersinga WM. Triiodothyronine affects the alternative splicing of thyroid hormone receptor  $\alpha$ mRNA. *J Endocrinol* 2003;179:217–225. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
32. Graveley BR. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* 2000;6:1197–1211. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
33. Dreyfuss G, Matunis MJ, Piñol-Roma S, Burd CG. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* 1993;62:289–321. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
34. Brown SB, Maloney M, Kinlaw WB. "Spot 14" protein functions at the pretranslational level in the regulation of hepatic metabolism by thyroid hormone and glucose. *J Biol Chem* 1997;272:2163–2166. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
35. Xiong S, Chirala SS, Hsu MH, Wakil SJ. Identification of thyroid hormone response elements in the human fatty acid synthase promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:12260–12265. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
36. Wahrenberg H, Engfeldt P, Arner P, Wennlund A, Ostman J. Adrenergic regulation of lipolysis in human adipocytes: findings in hyper- and hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:631–638. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
37. Viguerie N, Millet L, Avizou S *et al.* Regulation of human adipocyte gene expression by thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:630–634. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
38. Thijssen-Timmer DC, Peeters RP, Wouters P *et al.* Thyroid hormone receptor isoform expression in livers of critically ill patients. *Thyroid* 2007;17:105–112. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
39. Williams GR, Franklyn JA, Neuberger JM, Sheppard MC. Thyroid hormone receptor expression in the "sick euthyroid" syndrome. *Lancet* 1989;2:1477–1481. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
40. Hellmér J, Marcus C, Sonnenfeld T, Arner P. Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:15–20. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |

## Acknowledgments

We greatly appreciate the technical assistance of Judit Bassols, Gerard Pardo, and Oscar Rovira (Unit of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi), Hospital Universitari Dr Josep Trueta de Girona). This work was supported by research grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2008-02073 and SAF2006-02354), Generalitat de Catalunya (2005SGR00947 and 2005SGR00467), and the Instituto de Salud Carlos III (ISCIIRETIC RD06, REDIMET, CIBERDEM).

*Type I 5'-deiodinase mRNA and activity is increased in adipose tissue of obese subjects. Int J Obes (Lond). 2012 Feb; 36(2):320-4.*



F J Ortega, Z M Jílková, J M Moreno-Navarrete, S Pavelka, J I Rodriguez-Hermosa, J Kopecký and J M Fernández-Real. "Type I iodothyronine 5'-deiodinase mRNA and activity is increased in adipose tissue of obese subjects". *International journal of obesity*. Vol. 36, issue 2 (February 2012) : p. 320-4

Copyright © 2011, Rights Managed by Nature Publishing Group

Received 18 January 2011; Revised 16 February 2011; Accepted 4 April 2011; Published online 24 May 2011.

<http://www.nature.com/ijo/journal/v36/n2/abs/ijo2011101a.html>

<http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2011.101>

## Abstract

Differentiation and metabolism of adipose tissue are modulated by thyroid hormones (THs), but relatively little is known about the metabolism of THs in this tissue. Expression of the genes for type I iodothyronine 5'-deiodinase (D1), leptin (LEP) and stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD-1) was evaluated in omental (OM) and subcutaneous (SC) fat using a cohort of 70 humans. Activities of iodothyronine deiodinases (D1, D2 and D3) were assessed in a randomly selected subpopulation of 19 subjects. D1 expression was upregulated in both OM (P=0.011) and SC (P=0.003) fat of obese subjects. Concomitantly, OM (P=0.002) and SC (P=0.028) LEP expression were increased in obesity, associated with both D1 mRNA (r=0.315, P=0.014) and activity (r=0.647, P=0.023) and inversely related to SCD-1 (r=-0.266, P=0.034) expression in SC fat. Also D1 (but not D2 and D3) activity was increased in OM (~fourfold, P=0.010) and SC (~eightfold, P=0.004) fat of obese when compared with non-obese subjects and correlated in both OM (r=0.528, P=0.036) and SC (r=0.749, P=0.005) fat with body mass index. Our results document increased D1 gene expression and activity in adipose tissue of obese humans and suggest a role of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine formed by D1 in response to leptin in the modulation of adipose tissue metabolism.





---

## *7/- Discusión*

---



## 7.1- *Las rutas lipogénicas en el tejido adiposo humano y para el desarrollo de la obesidad*

Uno de los aspectos más destacados de la obesidad (especialmente la de carácter abdominal) es la inducción de resistencia a la insulina, atribuida, en parte, al incremento paralelo de los ácidos grasos (FAs) circulantes (*Rorive, Letiexhe et al. 2005*). El estudio de factores involucrados en el anabolismo lipídico (i.e. la síntesis de FAs a partir de carbohidratos), vinculados también al proceso de diferenciación del adipocito (*adipogénesis*), resulta de interés para dilucidar la participación de estos procesos en el desarrollo de la obesidad y sus comorbilidades.

Según los resultados aquí expuestos la expresión de genes lipogénicos como los que codifican para la *enzima sintetizadora de ácidos grasos* (FASN) y la *enzima carboxilasa para el acetil-CoA* (ACC) en el tejido adiposo humano es significativamente más baja en sujetos con sobrepeso y obesidad, especialmente en aquellos individuos con resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 (DM2). Esta evidencia sugiere mecanismos que reducen las vías lipogénicas en el tejido adiposo hipertrófico de pacientes obesos, y que la resistencia a la insulina tiende a acentuar este fenómeno. De hecho, la expresión y la actividad de estas enzimas dependen del estímulo hormonal, mayormente lipogénico, de la insulina y la T<sub>3</sub>, y están fuertemente vinculadas a la adipogénesis, un proceso también dependiente de insulina (*Kim 1997; Claycombe, Jones et al. 1998; Giorgino, Laviola et al. 2005*). Cuando las células desarrollan resistencia a la insulina la translocación de receptores para la glucosa circulante queda alterada y se reduce la capacidad de internalizar moléculas de glucosa desde el medio extracelular. El resultado es la *hipoglucocitopenia* (falta de glucosa en el citoplasma celular), que podría ser responsable, por ejemplo, de la reducción de las rutas lipogénicas por falta de sustrato.

El gen del SREBP-1c codifica para un factor de transcripción capaz de inducir la expresión de genes implicados en la síntesis de FAs y el uso de glucosa (*Ferre and Foufelle 2007*). La expresión de SREBP-1c en el tejido adiposo de pacientes obesos con y sin DM2 respecto a la de voluntarios delgados sanos está significativamente disminuida (*Kolehmainen, Vidal et al. 2001; Sewter, Berger et al. 2002*). Siendo SREBP-1c, un factor de transcripción de consabida participación en la transducción del señal lipo y adipogénico, dependiente del estímulo insulínico para su expresión y activación proteolítica (*Foretz, Guichard et al. 1999; Foretz, Pacot et al. 1999*), la inhibición de SREBP-1c en el tejido adiposo del sujetos obeso concuerda con una reducción en la expresión de los factores lipogénicos que regula, incluidos FASN, ACC, y también hS14 (*Martel, Bingham et al. 2006*).

Entre los factores vinculados al proceso lipogénico destacamos aquí el hS14, cuya expresión, tanto en células como en el tejido adiposo, se asemeja al de otros elementos lipogénicos mejor conocidos. En primer lugar, la expresión de hS14, tanto en adipocitos como en hepatocitos, es rápidamente inducida por estímulos lipogénicos, como la T<sub>3</sub> y la insulina, y por las dietas ricas en carbohidratos, (Kinlaw, Tron *et al.* 1992; Kinlaw, Tron *et al.* 1993; Chou, Cheng *et al.* 2007). La insulina promueve en el tejido hepático la expresión y las modificaciones post-transcripcionales de S14 (Jump, Bell *et al.* 1990). Algunos estudios subrayan la importancia de este factor en el correcto desarrollo de la lipogénesis (Jones, Standridge *et al.* 1997; LaFave, Augustin *et al.* 2006; Martel, Bingham *et al.* 2006) y se ha llegado a sugerir que S14 actúa como cofactor en la interacción de T<sub>3</sub> con sus respectivos receptores, y en la activación transcripcional de enzimas lipogénicas, a través de interacciones físicas con los TRs (Chou, Cheng *et al.* 2007; Chou, Ho *et al.* 2008). En concordancia con los resultados expuestos por estudios anteriores, la expresión de FASN y hS14 en células adiposas humanas mostraba un incremento paralelo en el citoplasma, precedido por un aumento de la presencia nuclear de hS14, que podría actuar también como factor de transcripción para factores adipogénicos.

De forma concomitante a la expresión de FASN, la presencia nuclear y citoplasmática de hS14 durante la adipogénesis es más evidente en aquellas células que muestran características propias de adipocitos *maduros*, como la mayor acumulación de gotas lipídicas en el citoplasma. Además, la presencia de hS14 alcanza su grado máximo el día 14 después de inducir la diferenciación. La colocalización de FASN y hS14 en el citoplasma, especialmente en los últimos días del proceso adipogénico, sugiere que hS14 no solo podría regular la expresión de enzimas lipogénicas si no estar activamente implicado en la síntesis de FAs.

La expresión de hS14 en algunos procesos carcinogénicos es también concordante con la expresión de enzimas lipogénicas (Sanchez-Rodriguez, Kaninda-Tshilumbu *et al.* 2005; Menendez, Vazquez-Martin *et al.* 2009). Sanchez-Rodriguez *et al.* (Sanchez-Rodriguez, Kaninda-Tshilumbu *et al.* 2005) explicaban en el 2009 que la expresión de hS14 inhibe la proliferación celular y promueve la diferenciación y la acumulación de vacuolas lipídicas. Donnelly *et al.* (Donnelly, Olsen *et al.* 2009) demostraron que tratamientos *in vitro* con ácido linoleico conjugado (CLA) reducían la lipogénesis y el crecimiento tumoral a través de la inhibición de hS14 y FASN.

En este estudio transversal se observó una reducción significativa de hS14 en el tejido adiposo omental de pacientes con obesidad y/o DM2 de forma concordante con estudios anteriores (Jump, Bell *et al.* 1990). La expresión de hS14, así como la de las principales enzimas lipogénicas, estaba significativa e inversamente asociada con el índice de masa corporal, el porcentaje de grasa, el perímetro de la cintura y con

marcadores de resistencia a la insulina como la glucosa basal, la hemoglobina glicada, o el HOMA<sub>IR</sub>.

La fuerte relación existente entre la insulina y la expresión de factores lipogénicos es ampliamente conocida (*Suryawan, Swanson et al. 1997; Wang, Jones Voy et al. 2004*). El estado postprandial condiciona un incremento en las concentraciones circulantes de glucosa e insulina, y estimula la expresión de factores implicados en la síntesis de FAs en el tejido adiposo (*Girard, Perdereau et al. 1994; Letexier, Pinteur et al. 2003*). La dispersión de los valores de expresión de FASN, ACC y hS14 en el grupo de sujetos control (sin obesidad ni desórdenes del metabolismo hidrocarbonado), con desviaciones estándar que duplicaban y triplicaban los valores de pacientes con obesidad y DM2, podría sugerir que, si bien la expresión de factores lipogénicos está vinculada al estilo de vida y otros determinantes individuales, cuando se alcanza un determinado grado de obesidad y resistencia a la insulina se produce una reducción *permanente* en la expresión de estos factores. La obesidad y la resistencia a la insulina se caracterizarían entonces por la baja expresión y actividad de factores lipogénicos en el tejido adiposo visceral, independientemente del estilo de vida (*Nadler, Stoehr et al. 2000; Nadler and Attie 2001*).

Los resultados expuestos en esta tesis respecto a las rutas lipogénicas divergen con los que expusieron antes otros autores. Berndt *et al.* (*Berndt, Kovacs et al. 2007*) asociaban positivamente la expresión de FASN en el tejido adiposo visceral y subcutáneo humano con parámetros de obesidad y resistencia a la insulina, y con el diagnóstico temprano de DM2. Otros autores detectaron una alta expresión para los factores lipogénicos en modelos animales de obesidad como los ratones *ob/ob* (*Guichard, Dugail et al. 1992*). Más recientemente algunos investigadores han puesto de relieve la baja expresión de FASN en el tejido adiposo de pacientes con obesidad mórbida (*Diraison, Dusserre et al. 2002*) y se ha llegado a demostrar que las expresiones de FASN, ACC y SREBP-1c pueden estar significativamente reducidas en sujetos con sobrepeso (*Minehira, Vega et al. 2004*). Observaciones similares fueron descritas en ratones *ob/ob* mayores con un largo historial de obesidad que, a diferencia de los ratones *ob/ob* jóvenes y con obesidad incipiente (*Guichard, Dugail et al. 1992*), mostraban una reducida expresión de los efectores mencionados (*Nadler, Stoehr et al. 2000*).

Una revisión detallada y objetiva de todos estos resultados aparentemente contradictorios implica que el escenario de estas determinaciones no siempre es el mismo. Podría ser que, si bien en periodos de obesidad *dinámica*, cuando los adipocitos aumentan rápidamente de volumen al metabolizar en lípidos los carbohidratos del citoplasma celular, las rutas lipogénicas y los factores asociados a las mismas están aumentados. Sin embargo, es al alcanzar y mantener niveles críticos en el volumen del tejido graso acumulado cuando la expresión y la actividad de los

factores lipogénicos podrían verse reducidas así como la capacidad de internalización de lípidos circulantes. Considerando que la inhibición farmacológica de la actividad de FASN bloquea la diferenciación del adipocito y reduce el número de adipocitos en el tejido adiposo del ratón (Liu, Wang et al. 2004), es razonable suponer que la adipogénesis puede contribuir al desarrollo de la obesidad. Del mismo modo, si la obesidad es capaz de inducir resistencia a la insulina, los adipocitos y, por extensión, el tejido adiposo, pueden alcanzar un punto de inflexión a partir del cual su capacidad lipogénica queda *neutralizada* en un proceso natural de retroalimentación negativa vinculado a la capacidad de respuesta a la insulina. Como Nadler y Attie sugerían (Nadler and Attie 2001), debe ser como si, una vez alcanzada su máxima capacidad de almacenamiento, los adipocitos *redujeran* su capacidad para la síntesis endógena de lípidos.

## **7.2- Expresión de los TR $\alpha$ en los depósitos de tejido adiposo omental y subcutáneo**

Pese a que su efecto sistémico suele vincularse más a procesos catabólicos que a funciones anabólicas, otro de los principales estímulos hormonales lipogénicos es el de la *triiodotironina* ( $T_3$ ). La  $T_3$  es capaz de inducir la adipogénesis y permitir la lipogénesis en el tejido adiposo (Obregon 2008). La respuesta de cada tejido a las concentraciones de  $T_3$  circulante incluye un importante número de genes implicados tanto en el metabolismo glucídico como lipídico. Entre los factores cuya expresión se ve condicionada por el efecto de  $T_3$  a través de sus respectivos receptores cabe destacar el hS14 (Jiang, Miyamoto et al. 2004), pero también PPAR $\gamma$ , la *enzima málica*, la *adenosina trifosfato citrato liasa* (Brown, Maloney et al. 1997), FASN y GLUT4 (Xiong, Chirala et al. 1998), ACC, y muchos de los genes que codifican para los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Wahrenberg, Engfeldt et al. 1986; Wahrenberg, Wennlund et al. 1994). S14 (asociado al anabolismo lipídico), y el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (vinculado con procesos catabólicos) son dos de los factores cuya expresión más depende de  $T_3$  (Viguerie, Millet et al. 2002).

Pese a que no se observaron diferencias significativas para la expresión de los diferentes TR $\alpha$  en el tejido adiposo omental y subcutáneo de los grupos de sujetos clasificados en función del grado de obesidad, una mayor expresión del *c-erbA-a* en el tejido adiposo subcutáneo respecto al omental (especialmente en pacientes con obesidad) fue detectada. Las diferencias regionales para la expresión de TR $\alpha$  estaban caracterizadas por un incremento muy significativo en la expresión de la isoforma TR $\alpha$ 1, cerca de un 15% más prevalente que la isoforma TR $\alpha$ 2 en los depósitos de grasa subcutánea. Considerando la función inherente a ambas proteínas, estos

indicios sugerían que el tejido adiposo subcutáneo puede ser más sensible que el visceral al efecto de  $T_3$  a través de sus receptores  $\alpha$ .

Estudios previos se referían a la relación TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 como un mecanismo de transmisión selectiva del efecto de  $T_3$ , modulable a través de la capacidad de respuesta de cada célula y tejido a esta hormona. Esta relación aumenta en el tejido hepático con la edad y la severidad de una enfermedad hepática (Viguerie, Millet et al. 2002), pero decrece en sujetos con enfermedades hepáticas crónicas (Williams, Franklyn et al. 1989) y en el tejido hepático de ratas expuestas a una dieta rica en ácidos grasos (Bakker, Razaki et al. 1998). Estos estudios demostraban que la relación TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 puede ser modificada y es responsable de la función tiroidea específica de cada tejido. En este sentido, la expresión de hS14 fue seleccionada como biomarcador para el efecto de  $T_3$  a través del TR $\alpha$ 1 y, acorde con la relación TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2, su expresión también era significativamente más alta en el tejido adiposo subcutáneo que en el adiposo visceral.

Las expresiones relativas de los TR $\alpha$  en cada uno de los depósitos de grasa sugerían la existencia de diferencias en los procesos de *splicing* (o de maduración del transcrito primario) que afectan al mRNA del gen *c-erbA-a*. Las proteínas ricas en serinas y argininas (SF2) son importantes reguladoras del *splicing* constitutivo y alternativo y factores clave en la maduración de las moléculas pre-mRNA (Fu 1995; Graveley 2000). Las ribonucleoproteínas heterogéneas y, entre ellas, las isoformas A1 y H1 (hnRNP A1 y hnRNP H1, respectivamente), constituyen un set de polipéptidos que, al interactuar con estructuras moleculares complejas de proteína y RNA, llevan a cabo una serie de funciones relacionadas con la correcta maduración del transcrito primario (Dreyfuss, Matunis et al. 1993). La isoforma hnRNP A1 está implicada en una gran variedad de mecanismos de silenciamiento a través del reconocimiento de motivos UAGGG[U/A] de forma directamente opuesta a la de las proteínas SF2 (Chabot, LeBel et al. 2003). Por otra parte, la isoforma hnRNP H1 potencia la actividad de las SF2 (Caputi and Zahler 2002). Según estos datos, la presencia y abundancia relativa de cada uno de estos factores del *spliceosoma* podría condicionar y modificar los patrones de *splicing* alternativo en cada tejido y tipo celular, en respuesta a los diferentes estímulos moleculares y en función de sus necesidades específicas (Caceres and Kornblihtt 2002; Han, Yeo et al. 2005).

Para estudiar esta hipótesis y validar nuestros hallazgos en lo referente a la relación TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 se analizaron las expresiones relativas de algunas de las moléculas implicadas en los procesos de *splicing* alternativo, las hnRNP A1 y H1, y los factores de *splicing* SF2, y se estudió la relación entre hnRNP A1 y SF2, susceptible de condicionar el *splicing* alternativo del *c-erbA-a* y la relación entre la expresión del TR $\alpha$ 1 y el TR $\alpha$ 2. De este modo, además de analizar la posibilidad de una asociación efectiva entre la expresión de cada TR $\alpha$  y los factores que modulan su expresión, se

pretendía corroborar las diferencias en la relación TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 detectadas entre los depósitos de adiposo humano. Efectivamente, diferencias significativas para las relaciones hnRNP A1:SF2 en ambos depósitos de tejido adiposo fueron descritas en plena concordancia con los valores de la relación TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2.

Numerosos autores han investigado antes las diferencias existentes entre los dos principales depósitos de tejido adiposo en el ser humano. Pese a las numerosas discrepancias existe en la actualidad un consenso tácito sobre la mayor capacidad lipolítica y lipogénica del tejido adiposo subcutáneo (Arner, Engfeldt et al. 1979; Hellmer, Marcus et al. 1992), que explica, entre otras cosas, el mayor tamaño de los adipocitos que lo integran (Panarotto, Poisson et al. 2000; Tchernof, Belanger et al. 2006). Estas diferencias podrían ser interpretadas a través de los resultados de este estudio transversal teniendo en cuenta la capacidad de T<sub>3</sub> para promover tanto la lipogénesis (por inducción de la expresión de diversos factores y enzimas lipogénicas) como la lipólisis (mediante, por ejemplo, la inducción de la actividad mitocondrial y la expresión de receptores  $\beta$ -adrenérgicos) a través de sus receptores TR $\alpha$  o TR $\beta$ .

### **7.3- Expresión y actividad de las *desyodasas* del tejido adiposo en asociación con la obesidad y la T<sub>3</sub> circulante**

El amplio rango de sustratos susceptibles de ser metabolizados por las diferentes *desyodasas* (entre los cuales solo T<sub>3</sub> constituye un producto con actividad biológica demostrada) confiere a estas enzimas un importante rol que puede afectar tanto al anabolismo como al catabolismo lipídico. Hay que tener en cuenta que T<sub>3</sub> regula tanto la adipogénesis como ciertos procesos circundantes tales como la glucogenólisis y la lipogénesis en el tejido hepático y adiposo (Oppenheimer, Schwartz et al. 1991; Ailhaud, Grimaldi et al. 1992). Muchas de las enzimas involucradas en la síntesis lipídica son reguladas por el efecto de T<sub>3</sub>, sea de forma directa a través de sus receptores o mediante la participación de otros efectores como los PPAR $\gamma$  (Obregon 2008).

Las *desyodasas* juegan un papel fundamental en el anabolismo lipídico al proveer las células lipogénicas de T<sub>3</sub>. Mientras la *desyodasa* 3 (D3) es estimulada durante la proliferación de los adipocitos, la *desyodasa* 2 (D2) participa en el desarrollo del tejido adiposo y condiciona tanto la termogénesis como la lipogénesis (Obregon 2008). Poco se sabe, sin embargo, sobre el rol, la importancia y la actividad específica de la *desyodasa* 1 (D1) en el tejido adiposo humano.

Existe un amplio abanico de compuestos químicos y condiciones susceptibles de condicionar la actividad y la expresión de D1, modificando en consecuencia la disponibilidad tisular de T<sub>3</sub> (e.g. 6-n-propil-2-tiouracil (PTU), la T<sub>3</sub> o el ayuno



prolongado). Los estudios realizados a lo largo de este trabajo demuestran que la expresión de leptina en ambos depósitos de tejido adiposo está significativa y positivamente asociada a la actividad de D1. La leptina ha sido descrita como un factor susceptible de estimular la actividad de D1 en el tejido adiposo blanco de roedores (Araujo, Andrade et al. 2009; Macek Jilkova, Pavelka et al. 2009), pero también en otros tejidos como el hipotálamo, la glándula pituitaria y la glándula tiroidea (Cabanelas, Lisboa et al. 2006). La fuerte asociación inversa descrita entre la expresión de leptina y de SCD en el tejido adiposo humano concuerda con la capacidad de inhibición que tanto la leptina como la  $T_3$  poseen para la expresión de esta enzima lipogénica (Waters, Miller et al. 1997; Macek Jilkova, Pavelka et al. 2009).

Por otro lado, la mayor concentración circulante de  $T_3$  libre ( $fT_3$ ) detectada en sujetos eutiroideos obesos, y la asociación existente entre la  $fT_3$ , el perímetro de la cintura y el grado de obesidad (De Pergola, Ciampolillo et al. 2007) indican una alta conversión de  $T_4$  a  $T_3$  mediada por desyodasas tisulares en sujetos con obesidad. Este podría ser un proceso destinado a compensar la acumulación de grasa y promover el consumo energético (De Pergola, Ciampolillo et al. 2007). Dado que la pérdida de peso es susceptible de normalizar los valores circulantes de  $T_3$  en individuos obesos (Bray, Fisher et al. 1976), es muy probable que este tipo de alteraciones sean consecuencia de la obesidad.

Los resultados expuestos en esta tesis mostraban que tanto la expresión como la actividad de D1 (pero no la de D2 ni la de D3) se asocian positivamente tanto a parámetros antropométricos descriptivos para la obesidad como a las concentraciones circulantes de  $T_3$ . La actividad específica de D1 en el tejido adiposo del ratón se considera unas 500 veces inferior a la del hígado. Visser et al. (Visser, Kaptein et al. 1988) demostraron a finales de los 80 que la actividad relativa de D1 en el hígado del ratón y en el del ser humano era muy similar, y que la actividad de D1 en 1.5 kg de hígado equivalía a una producción diaria absoluta de 8 nmoles de  $T_3$ , mucho menos de los 40 nmoles de  $T_3$ /día que produce el cuerpo humano a nivel tisular. Siguiendo estos cálculos, se podría estimar la producción de unos 16 pmoles de  $T_3$ /día en 1.5 kg de tejido adiposo, que es, efectivamente, una producción muy reducida respecto a la del hígado. Sin embargo, cabe considerar que el porcentaje de grasa de un sujeto obeso supera el 25% del peso corporal en varones y el 35% en mujeres, con lo cual la contribución absoluta de este tejido a las concentraciones circulantes de  $T_3$  puede ser importante.

Según los datos recogidos en esta tesis doctoral, las enzimas responsables del metabolismo lipogénico están significativamente asociadas a la expresión de leptina y a la actividad y la expresión de D1 en el tejido adiposo subcutáneo. FASN (Xiong, Chirala et al. 1998) y ACC (Wahrenberg, Wennlund et al. 1994), así como SCD1 (Paton and Ntambi 2009), son ejemplos de factores modulados por las THs. La leptina y la  $T_3$

son importantes mediadores de la homeostasis energética en el tejido adiposo. La leptina es un factor esencial en el mantenimiento de la función metabólica de los adipocitos (Wang, Orci et al. 2005) que incrementa la oxidación de FAs (Orci, Cook et al. 2004) e inhibe las rutas lipogénicas (Zhang, Della-Fera et al. 2008). Aunque T<sub>3</sub> es importante para la adipogénesis, su efecto positivo sobre el metabolismo catabólico es también conocido (Liu and Brent). En cualquier caso, si el efecto paracrino de la T<sub>3</sub> producida por las D1 del tejido adiposo de sujetos obesos puede o no explicar la reducción en la expresión de factores clave en la lipogénesis (i.e. SCD1, FASN o ACC) no puede ser deducido de los resultados expuestos aquí y merece una valoración experimental mas detallada.

## 7.4- Discusión General

Los dos grandes depósitos de tejido adiposo en humanos, el omental y el subcutáneo, se caracterizan por propiedades bioquímicas únicas y perfiles de expresión propios, incluidos la respuesta a hormonas y los diferentes programas de lipogénesis y lipólisis. Los estudios de expresión aplicados a ambos depósitos en sujetos obesos y delgados han aportado importantes indicios sobre la fisiopatología del tejido adiposo y la etiopatogenia de la obesidad. Gran parte de estos estudios indican que la obesidad representa una condición inflamatoria crónica que afecta a muchos tejidos, pero sobretodo al (y desde el) tejido adiposo. Del mismo modo, el estado de diferenciación y la capacidad lipogénica de los adipocitos del paciente obeso parecen estar alterados. La disfunción de la capacidad lipogénica y adipogénica del tejido adiposo del paciente obeso podría contribuir a la dispersión del exceso de lípidos, sobre todo en el tejido adiposo omental a través de la vena porta. La lipotoxicidad participa en la patogénesis de comorbilidades relacionadas con la obesidad como la diabetes tipo 2 y la enfermedad cardiovascular, entre muchas otras.

Uno de los aspectos más destacados de la obesidad es la inducción de resistencia a la insulina (Rorive, Letiexhe et al. 2005), que puede desarrollarse en respuesta a procesos inflamatorios y desórdenes lipídicos. La insulina es capaz de monitorizar los ciclos de almacenaje y utilización de la energía acumulada en los tejidos lipogénicos en forma de FAs (Giorgino, Laviola et al. 2005) y es un estímulo indispensable en la adipogénesis (Suryawan, Swanson et al. 1997), procesos que dependen también de un incremento progresivo de enzimas lipogénicas como FASN y ACC (Claycombe, Jones et al. 1998).

La función tiroidea está estrechamente vinculada tanto al anabolismo como al catabolismo lipídico en el tejido adiposo (Lazar 1993). La T<sub>3</sub> promueve la expresión de factores fundamentales para la diferenciación de la célula adiposa y la síntesis

endógena de FAs (*Chatterjee and Tata 1992; Feng, Jiang et al. 2000; Obregon 2008*), pero también puede estimular la lipólisis (*Bakker, Razaki et al. 1998*).

Tanto la *hiperinsulinemia* (*Han, Williams et al. 2002; Lakka, Salonen et al. 2002*) como las altas concentraciones circulantes de T<sub>3</sub> (*Biondi; Reinehr*) son concomitantes con el incremento de peso y la obesidad. Mientras la resistencia a la insulina (característica inherente al sujeto obeso) responde por lo primero, pocos estudios permiten explicar lo segundo.

Recientemente se demostró que la producción de T<sub>3</sub> en el tejido adiposo del ratón pueden ser alterada mediante la inducción de cambios en el porcentaje de grasa (*Macek Jilkova, Pavelka et al. 2009*). Solo la D1, la más activa de las desyodasas presentes en el tejido adiposo, parece estar involucrada en este fenómeno tanto en ratones como en humanos. La relación existente entre la expresión y la actividad de D1 y la acumulación de tejido adiposo en el sujeto obeso es susceptible de estar modulada por la producción inherente de leptina. La producción y secreción de leptina aumenta en el tejido adiposo hiperplásico y disfuncional del sujeto obeso (*Zhang, Proenca et al. 1994*) y estimula tanto la oxidación de los FAs como la disminución de la lipogénesis (*Minokoshi, Kim et al. 2002*). La leptina reduce, por ejemplo, la producción de la *enzima desaturasa para el estearoil CoA* (SCD), una enzima lipogénica cuya inhibición comporta la estimulación del catabolismo lipídico (*Cohen and Friedman 2004; Paton and Ntambi 2009*). La acción paracrina de la leptina sobre el tejido adiposo hipertrófico del paciente obeso podría explicar tanto la baja expresión de factores lipogénicos como las elevadas concentraciones de T<sub>3</sub> circulante que caracterizan al paciente obeso.

Entre los factores directamente controlados por estas hormonas cabe destacar el *elemento de respuesta a hormona tiroidea 'spot 14'* (S14), cuya expresión responde a los estímulos que inducen la lipogénesis (*Mariash, Seelig et al. 1986; Jump, Bell et al. 1990; Jump, Bell et al. 1990*) y cuenta con sitios de regulación genética por carbohidratos y THs (*Liu and Towle 1994; Shih, Liu et al. 1995*). Tal y como ocurre con otros factores lipogénicos, la expresión de S14 es inhibida por los FAs (*Jump, Clarke et al. 1993*), y no son pocos los estudios que sugieren que S14 puede desempeñar un importante papel en la regulación de la lipogénesis (*Kinlaw, Church et al. 1995; Martel, Bingham et al. 2006*). La expresión de S14 también está asociada de forma inversa con la resistencia a la insulina (*Anderson, Zhu et al. 2009*). Acorde con nuestros resultados, la obesidad y la resistencia a la insulina reducen la expresión de hS14 también en el tejido adiposo humano. Por otro lado, la evolución de hS14 durante el desarrollo del adipocito sigue un patrón muy parecido al de FASN, salvo por su presencia nuclear en los primeros estadios de la diferenciación, que podría sugerir su participación como factor de transcripción o como cofactor para otros elementos nucleares. De hecho, existen evidencias sobre la capacidad de interacción de esta pequeña proteína ácida con los

factores de transcripción que regulan su expresión, los TRs, e incluso con la *proteína 53 (p53)*, un factor crucial en el control del ciclo celular (Chou, Cheng et al. 2007; Chou, Ho et al. 2008).

Los TRs de presencia más extendida el tejido adiposo de mamíferos son las isoformas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del TR $\alpha$  (Lazar 1993). El TR $\alpha 2$  escinde parte del 9º exón (Hastings, Milcarek et al. 1997) y no puede actuar como factor de transcripción (Burgos-Trinidad and Koenig 1999) pero sí ejercer un efecto negativo sobre la acción de las THs mediante el bloqueo de las secuencias TREs (Burgos-Trinidad and Koenig 1999). El balance entre estas dos isoformas podría ser un factor relevante en el efecto tisular de las THs (Cachefo, Boucher et al. 2001; Hastings, Wilson et al. 2001). Pese a no descubrir diferencias significativas en la expresión de estas isoformas entre sujetos en función del peso, existen interesantes variaciones entre los dos grandes depósitos de grasa del ser humano (el visceral y el subcutáneo). El tejido adiposo subcutáneo posee un marcado balance *positivo* hacia el receptor TR $\alpha 1$ , mayor que el que muestra el adiposo omental. Estos hallazgos completamente originales *in vivo* para el tejido adiposo humano quedaban respaldados por el análisis de algunas de las moléculas implicadas en los procesos de *splicing* alternativo del TR $\alpha$ , las hnRNP A1 y los factores de *splicing* SF2, y la relación entre ellos, susceptible de condicionar en un sentido u otro la expresión relativa del TR $\alpha 1$  y el TR $\alpha 2$ , y mediante los valores de expresión de hS14, significativamente más altos en el adiposo subcutáneo en asociación positiva con la relación TR $\alpha 1$ :TR $\alpha 2$ .

Los estudios desarrollados por Vohl et al. (Vohl, Sladek et al. 2004) identificaron más de 300 genes cuyas expresión difería entre ambos depósitos de grasa. También a nivel protéico han sido descritos perfiles muy diferentes (Perez-Perez, Garcia-Santos et al.). La expresión de *moléculas transportadoras de glucosa de tipo 4 (GLUT4)* y la *proteína 4 de unión a retinol (RBP4)*; los PPAR $\gamma$ , la *leptina* y los *sustratos receptores para la insulina (IRS1)* (Lefebvre, Laville et al. 1998); la actividad de la *lipoproteína lipasa (LPL)*, la tasa lipolítica basal y la respuesta al estímulo adrenérgico, son también características que difieren entre ambos depósitos (Tchernof, Belanger et al. 2006; Boivin, Brochu et al. 2007) y que podrían ser explicadas en parte por una diferente capacidad de respuesta al estímulo de T<sub>3</sub>.

---

## *8/- Conclusiones*

---



1<sup>a</sup>/- La expresión de las enzimas lipogénicas FASN y ACC está disminuida en el tejido adiposo visceral de los sujetos con obesidad, resistencia a la insulina o DM2.

2<sup>a</sup>/- La expresión de hS14 es significativamente más baja en el tejido adiposo visceral de sujetos con obesidad, resistencia a la insulina o DM2.

3<sup>a</sup>/- La expresión de hS14 en los tejidos adiposos subcutáneo y visceral humano es directamente proporcional a la expresión de las enzimas lipogénicas FASN y ACC.

4<sup>a</sup>/- La expresión de hS14 es muy superior en el tejido adiposo subcutáneo respecto al visceral.

5<sup>a</sup>/- hS14 es un factor inherente al proceso diferenciación adipocitaria (*adipogénesis*).

6<sup>a</sup>/- hS14 colocaliza a nivel citoplasmático con FASN en adipocitos maduros.

7<sup>a</sup>/- No existen diferencias significativas en las expresiones de los TR $\alpha$  (TR $\alpha$ 1 o TR $\alpha$ 2), ni en la relación TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 en el tejido adiposo omental o subcutáneo de los sujetos clasificados en función de su peso corporal.

8<sup>a</sup>/- Las expresiones relativas de los TR $\alpha$  (TR $\alpha$ 1 o TR $\alpha$ 2) y la relación TR $\alpha$ 1:TR $\alpha$ 2 son significativamente más altas en los depósitos de tejido adiposo subcutáneo que en el de tejido adiposo visceral, especialmente entre sujetos con obesidad.

9<sup>a</sup>/- La relación hnRNP A1:SF2 es susceptible de explicar la relación entre los transcritos TR $\alpha$ 1 y TR $\alpha$ 2, y es significativamente más baja en los depósitos de tejido adiposo subcutáneo.

10<sup>a</sup>/- La actividad de la enzima D1 (pero no la de D2 ni la de D3) en los depósitos de tejido adiposo difiere entre humanos en función del grado de obesidad.

11<sup>a</sup>/- Tanto la expresión como la actividad de D1 en el tejido adiposo humano están positiva y significativamente asociadas al grado de obesidad, la expresión de leptina y las concentraciones circulantes de  $fT_3$ .





---

## *9/- Bibliografía*

---



- Aarsland, A., D. Chinkes, et al. (1997). "Hepatic and whole-body fat synthesis in humans during carbohydrate overfeeding." *Am J Clin Nutr* **65**(6): 1774-82.
- Abate, N., M. Chandalia, et al. (2004). "Adipose tissue metabolites and insulin resistance in nondiabetic Asian Indian men." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(6): 2750-5.
- Abbott, W. G. and J. E. Foley (1987). "Comparison of body composition, adipocyte size, and glucose and insulin concentrations in Pima Indian and Caucasian children." *Metabolism* **36**(6): 576-9.
- Ahima, R. S. (2006). "Adipose tissue as an endocrine organ." *Obesity (Silver Spring)* **14 Suppl 5**: 242S-249S.
- Ailhaud, G., P. Grimaldi, et al. (1992). "Cellular and molecular aspects of adipose tissue development." *Annu Rev Nutr* **12**: 207-33.
- Amma, L. L., A. Campos-Barros, et al. (2001). "Distinct tissue-specific roles for thyroid hormone receptors beta and alpha1 in regulation of type 1 deiodinase expression." *Mol Endocrinol* **15**(3): 467-75.
- Anderson, G. W., Q. Zhu, et al. (2009). "The Thrsp null mouse (Thrsp(tm1cnm)) and diet-induced obesity." *Mol Cell Endocrinol* **302**(1): 99-107.
- Aranceta-Bartrina, J., L. Serra-Majem, et al. (2005). "[Prevalence of obesity in Spain]." *Med Clin (Barc)* **125**(12): 460-6.
- Aranceta, J., C. Perez-Rodrigo, et al. (2001). "Influence of sociodemographic factors in the prevalence of obesity in Spain. The SEEDO'97 Study." *Eur J Clin Nutr* **55**(6): 430-5.
- Araujo, R. L., B. M. Andrade, et al. (2009). "Tissue-specific deiodinase regulation during food restriction and low replacement dose of leptin in rats." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**(5): E1157-63.
- Arita, Y., S. Kihara, et al. (1999). "Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity." *Biochem Biophys Res Commun* **257**(1): 79-83.
- Arner, P., P. Engfeldt, et al. (1979). "Relationship between lipolysis, cyclic AMP, and fat-cell size in human adipose tissue during fasting and in diabetes mellitus." *Metabolism* **28**(3): 198-209.
- Avram, M. M., A. S. Avram, et al. (2007). "Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell." *J Am Acad Dermatol* **56**(3): 472-92.
- Bakker, O., H. Razaki, et al. (1998). "Expression of the alpha 1, alpha 2, and beta 1 T3-receptor mRNAs in the fasted rat measured using competitive PCR." *Biochem Biophys Res Commun* **242**(3): 492-6.
- Baranowska, B., E. Wolinska-Witort, et al. (2003). "The role of neuropeptides in the disturbed control of appetite and hormone secretion in eating disorders." *Neuro Endocrinol Lett* **24**(6): 431-4.
- Bays, H. and C. A. Dujovne (2006). "Adiposopathy is a more rational treatment target for metabolic disease than obesity alone." *Curr Atheroscler Rep* **8**(2): 144-56.

- Bays, H., H. W. Rodbard, et al. (2007). "Adiposopathy: treating pathogenic adipose tissue to reduce cardiovascular disease risk." *Curr Treat Options Cardiovasc Med* **9**(4): 259-71.
- Bays, H. E. (2004). "Metabolic syndrome: what might be occurring?" *Manag Care* **13**(10 Suppl): 13-6.
- Bays, H. E., J. M. Gonzalez-Campoy, et al. (2008). "Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity." *Expert Rev Cardiovasc Ther* **6**(3): 343-68.
- Bello, N. T. and N. C. Liang "The use of serotonergic drugs to treat obesity - is there any hope?" *Drug Des Devel Ther* **5**: 95-109.
- Berndt, J., P. Kovacs, et al. (2007). "Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes." *Diabetologia* **50**(7): 1472-80.
- Bessey, P. Q., J. M. Watters, et al. (1984). "Combined hormonal infusion simulates the metabolic response to injury." *Ann Surg* **200**(3): 264-81.
- Bianco, A. C., D. Salvatore, et al. (2002). "Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases." *Endocr Rev* **23**(1): 38-89.
- Biondi, B. "Thyroid and obesity: an intriguing relationship." *J Clin Endocrinol Metab* **95**(8): 3614-7.
- Bjorntorp, P. (1996). "The regulation of adipose tissue distribution in humans." *Int J Obes Relat Metab Disord* **20**(4): 291-302.
- Bjorntorp, P. (1997). "Body fat distribution, insulin resistance, and metabolic diseases." *Nutrition* **13**(9): 795-803.
- Bjorntorp, P. and R. Rosmond (2000). "Obesity and cortisol." *Nutrition* **16**(10): 924-36.
- Bjorntorp, P., S. Rossner, et al. (2001). "[ "Consolatory eating" is not a myth. Stress-induced increased cortisol levels result in leptin-resistant obesity]." *Lakartidningen* **98**(48): 5458-61.
- Bluher, M., M. E. Patti, et al. (2004). "Intrinsic heterogeneity in adipose tissue of fat-specific insulin receptor knock-out mice is associated with differences in patterns of gene expression." *J Biol Chem* **279**(30): 31891-901.
- Boivin, A., G. Brochu, et al. (2007). "Regional differences in adipose tissue metabolism in obese men." *Metabolism* **56**(4): 533-40.
- Bonora, E., G. Targher, et al. (2000). "Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity." *Diabetes Care* **23**(1): 57-63.
- Bouchard, C. (1988). "[Genetics and obesity in man]." *Diabete Metab* **14**(4): 407-13.
- Bouchard, C. (1993). "Genetics of obesity and its prevention." *World Rev Nutr Diet* **72**: 68-77.

- Bray, G. A. (2003). "Evaluation of obesity. Who are the obese?" *Postgrad Med* **114**(6): 19-27, 38.
- Bray, G. A., D. A. Fisher, et al. (1976). "Relation of thyroid hormones to body-weight." *Lancet* **1**(7971): 1206-8.
- Bray, G. A., K. A. Jablonski, et al. (2008). "Relation of central adiposity and body mass index to the development of diabetes in the Diabetes Prevention Program." *Am J Clin Nutr* **87**(5): 1212-8.
- Brodie, D. A., K. L. Lamb, et al. (1988). "Body composition and self-perceived health and fitness among indoor sports participants." *Ergonomics* **31**(11): 1551-7.
- Brodie, D. A. and P. D. Slade (1988). "The relationship between body-image and body-fat in adult women." *Psychol Med* **18**(3): 623-31.
- Brown, S. B., M. Maloney, et al. (1997). "'Spot 14" protein functions at the pretranslational level in the regulation of hepatic metabolism by thyroid hormone and glucose." *J Biol Chem* **272**(4): 2163-6.
- Brownsey, R. W., A. N. Boone, et al. (2006). "Regulation of acetyl-CoA carboxylase." *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 2): 223-7.
- Brozek, J., J. K. Kihlberg, et al. (1963). "Skinfold Distributions In Middle-Aged American Men: A Contribution To Norms Of Leanness-Fatness." *Ann N Y Acad Sci* **110**: 492-502.
- Burgos-Trinidad, M. and R. J. Koenig (1999). "Dominant negative activity of thyroid hormone receptor variant alpha2 and interaction with nuclear corepressors." *Mol Cell Endocrinol* **149**(1-2): 107-14.
- Cabanelas, A., P. C. Lisboa, et al. (2006). "Leptin acute modulation of the 5'-deiodinase activities in hypothalamus, pituitary and brown adipose tissue of fed rats." *Horm Metab Res* **38**(8): 481-5.
- Caceres, J. F. and A. R. Kornblihtt (2002). "Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease." *Trends Genet* **18**(4): 186-93.
- Cachefo, A., P. Boucher, et al. (2001). "Hepatic lipogenesis and cholesterol synthesis in hyperthyroid patients." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(11): 5353-7.
- Cannon, B. and J. Nedergaard (2004). "Brown adipose tissue: function and physiological significance." *Physiol Rev* **84**(1): 277-359.
- Canoy, D., S. M. Boekholdt, et al. (2007). "Body fat distribution and risk of coronary heart disease in men and women in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition in Norfolk cohort: a population-based prospective study." *Circulation* **116**(25): 2933-43.
- Caputi, M. and A. M. Zahler (2002). "SR proteins and hnRNP H regulate the splicing of the HIV-1 tev-specific exon 6D." *Embo J* **21**(4): 845-55.
- Carrascosa, A. (2006). "[Obesity during infancy and adolescence: a pandemic that claims our attention]." *Med Clin (Barc)* **126**(18): 693-4.
- Cases, J. A., I. Gabriely, et al. (2001). "Physiological increase in plasma leptin markedly inhibits insulin secretion in vivo." *Diabetes* **50**(2): 348-52.

- Caspar-Bauguil, S., B. Cousin, et al. (2006). "Weight-dependent changes of immune system in adipose tissue: importance of leptin." *Exp Cell Res* **312**(12): 2195-202.
- Catalan, V., J. Gomez-Ambrosi, et al. (2007). "Proinflammatory cytokines in obesity: impact of type 2 diabetes mellitus and gastric bypass." *Obes Surg* **17**(11): 1464-74.
- Claycombe, K. J., B. H. Jones, et al. (1998). "Insulin increases fatty acid synthase gene transcription in human adipocytes." *Am J Physiol* **274**(5 Pt 2): R1253-9.
- Clement, K., C. Vaisse, et al. (1998). "A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction." *Nature* **392**(6674): 398-401.
- Cohen, P. and J. M. Friedman (2004). "Leptin and the control of metabolism: role for stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1)." *J Nutr* **134**(9): 2455S-2463S.
- Cohen, P., J. M. Ntambi, et al. (2003). "Stearoyl-CoA desaturase-1 and the metabolic syndrome." *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **3**(4): 271-80.
- Colditz, G. A. (1999). "Economic costs of obesity and inactivity." *Med Sci Sports Exerc* **31**(11 Suppl): S663-7.
- Colucci, R. A. "Bariatric surgery in patients with type 2 diabetes: a viable option." *Postgrad Med* **123**(1): 24-33.
- Coon, P. J., E. M. Rogus, et al. (1992). "Role of body fat distribution in the decline in insulin sensitivity and glucose tolerance with age." *J Clin Endocrinol Metab* **75**(4): 1125-32.
- Corbett, J. W. and J. H. Harwood, Jr. (2007). "Inhibitors of mammalian acetyl-CoA carboxylase." *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov* **2**(3): 162-80.
- Creemers, J. W., Y. S. Lee, et al. (2008). "Mutations in the N-Terminal Region of Pro-Opiomelanocortin (Pomc) in Patients with Early-Onset Obesity Impair Pomc Sorting to the Regulated Secretory Pathway." *J Clin Endocrinol Metab*.
- Cummings, D. E., J. Q. Purnell, et al. (2001). "A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans." *Diabetes* **50**(8): 1714-9.
- Cuspidi, C., C. Sala, et al. (2008). "Metabolic syndrome and target organ damage: role of blood pressure." *Expert Rev Cardiovasc Ther* **6**(5): 731-43.
- Cuspidi, C., C. Valerio, et al. (2008). "Metabolic syndrome and multiple organ damage in essential hypertension." *Blood Press* **17**(4): 195-203.
- Cuspidi, C., C. Valerio, et al. (2009). "Metabolic syndrome and biventricular hypertrophy in essential hypertension." *J Hum Hypertens* **23**(3): 168-75.
- Chabot, B., C. LeBel, et al. (2003). "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle A/B proteins and the control of alternative splicing of the mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle A1 pre-mRNA." *Prog Mol Subcell Biol* **31**: 59-88.
- Chandalia, M., N. Abate, et al. (1999). "Relationship between generalized and upper body obesity to insulin resistance in Asian Indian men." *J Clin Endocrinol Metab* **84**(7): 2329-35.

- Chandalia, M., A. V. Cabo-Chan, Jr., et al. (2003). "Elevated plasma high-sensitivity C-reactive protein concentrations in Asian Indians living in the United States." *J Clin Endocrinol Metab* **88**(8): 3773-6.
- Chandran, M., S. A. Phillips, et al. (2003). "Adiponectin: more than just another fat cell hormone?" *Diabetes Care* **26**(8): 2442-50.
- Chanoine, J. P., L. E. Braverman, et al. (1993). "The thyroid gland is a major source of circulating T3 in the rat." *J Clin Invest* **91**(6): 2709-13.
- Chascione, C., D. H. Elwyn, et al. (1987). "Effect of carbohydrate intake on de novo lipogenesis in human adipose tissue." *Am J Physiol* **253**(6 Pt 1): E664-9.
- Chatterjee, V. K. and J. R. Tata (1992). "Thyroid hormone receptors and their role in development." *Cancer Surv* **14**: 147-67.
- Chen, J., D. Hong, et al. "A novel PNPLA2 mutation causes neutral lipid storage disease with myopathy (NLSMD) presenting muscular dystrophic features with lipid storage and rimmed vacuoles." *Clin Neuropathol* **29**(6): 351-6.
- Choi, C. S., D. B. Savage, et al. (2007). "Continuous fat oxidation in acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(42): 16480-5.
- Chopra, I. J., P. Taing, et al. (1996). "Direct determination of free triiodothyronine (T3) in undiluted serum by equilibrium dialysis/radioimmunoassay (RIA)." *Thyroid* **6**(4): 255-9.
- Chou, W. Y., Y. S. Cheng, et al. (2007). "Human spot 14 protein interacts physically and functionally with the thyroid receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **357**(1): 133-8.
- Chou, W. Y., C. L. Ho, et al. (2008). "Human Spot 14 protein is a p53-dependent transcriptional coactivator via the recruitment of thyroid receptor and Zac1." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(9): 1826-34.
- Chrousos, G. P. (1995). "The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation." *N Engl J Med* **332**(20): 1351-62.
- Dahlman, I. and P. Arner (2007). "Obesity and polymorphisms in genes regulating human adipose tissue." *Int J Obes (Lond)* **31**(11): 1629-41.
- De Pergola, G., A. Ciampolillo, et al. (2007). "Free triiodothyronine and thyroid stimulating hormone are directly associated with waist circumference, independently of insulin resistance, metabolic parameters and blood pressure in overweight and obese women." *Clin Endocrinol (Oxf)* **67**(2): 265-9.
- Despres, J. P., D. Prud'homme, et al. (1991). "Estimation of deep abdominal adipose-tissue accumulation from simple anthropometric measurements in men." *Am J Clin Nutr* **54**(3): 471-7.
- Deurenberg, P., A. Andreoli, et al. (2001). "The validity of predicted body fat percentage from body mass index and from impedance in samples of five European populations." *Eur J Clin Nutr* **55**(11): 973-9.



- Deurenberg, P., K. van der Kooy, et al. (1991). "Sex and age specific prediction formulas for estimating body composition from bioelectrical impedance: a cross-validation study." *Int J Obes* **15**(1): 17-25.
- Dif, N., V. Euthine, et al. (2006). "Insulin activates human sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) promoter through SRE motifs." *Biochem J* **400**(1): 179-88.
- Diraison, F., E. Dusserre, et al. (2002). "Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**(1): E46-51.
- Donnelly, C., A. M. Olsen, et al. (2009). "Conjugated linoleic acid (CLA) inhibits expression of the Spot 14 (THRSP) and fatty acid synthase genes and impairs the growth of human breast cancer and liposarcoma cells." *Nutr Cancer* **61**(1): 114-22.
- Dreyfuss, G., M. J. Matunis, et al. (1993). "hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA." *Annu Rev Biochem* **62**: 289-321.
- Durden, E. D., D. Huse, et al. (2008). "Economic costs of obesity to self-insured employers." *J Occup Environ Med* **50**(9): 991-7.
- Eknoyan, G. (2008). "Adolphe Quetelet (1796-1874)--the average man and indices of obesity." *Nephrol Dial Transplant* **23**(1): 47-51.
- Evans, R. M. (1988). "The steroid and thyroid hormone receptor superfamily." *Science* **240**(4854): 889-95.
- Expert-Bezancou, A., A. Sureau, et al. (2004). "hnRNP A1 and the SR proteins ASF/SF2 and SC35 have antagonistic functions in splicing of beta-tropomyosin exon 6B." *J Biol Chem* **279**(37): 38249-59.
- Fain, J. N., A. K. Madan, et al. (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): 2273-82.
- Fajas, L. (2003). "Adipogenesis: a cross-talk between cell proliferation and cell differentiation." *Ann Med* **35**(2): 79-85.
- Fantuzzi, G. (2005). "Adipose tissue, adipokines, and inflammation." *J Allergy Clin Immunol* **115**(5): 911-9; quiz 920.
- Fasshauer, M., J. Klein, et al. (2003). "Interleukin (IL)-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumour necrosis factor alpha, growth hormone, and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes." *Horm Metab Res* **35**(3): 147-52.
- Fasshauer, M., J. Klein, et al. (2002). "Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **290**(3): 1084-9.
- Fasshauer, M., S. Kralisch, et al. (2003). "Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **301**(4): 1045-50.



- Feng, X., Y. Jiang, et al. (2000). "Thyroid hormone regulation of hepatic genes *in vivo* detected by complementary DNA microarray." *Mol Endocrinol* **14**(7): 947-55.
- Fernandez-Real, J. M., F. Ortega, et al. "Circulating osteocalcin concentrations are associated with parameters of liver fat infiltration and increase in parallel to decreased liver enzymes after weight loss." *Osteoporos Int* **21**(12): 2101-7.
- Fernandez-Real, J. M. and J. C. Pickup (2008). "Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes." *Trends Endocrinol Metab* **19**(1): 10-6.
- Fernandez-Real, J. M. and W. Ricart (2003). "Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome." *Endocr Rev* **24**(3): 278-301.
- Fernandez-Real, J. M., M. Vayreda, et al. (2001). "[Body mass index (BMI) and percent fat mass. A BMI > 27.5 kg/m<sup>2</sup> could be indicative of obesity in the Spanish population]." *Med Clin (Barc)* **117**(18): 681-4.
- Ferre, P. and F. Foufelle (2007). "SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective." *Horm Res* **68**(2): 72-82.
- Ferre, P. and F. Foufelle (2007). SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Horm Res*. **68**: 72-82.
- Festa, A., R. D'Agostino, Jr., et al. (2000). "Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS)." *Circulation* **102**(1): 42-7.
- Flegal, K. M., B. I. Graubard, et al. (2007). "Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity." *Jama* **298**(17): 2028-37.
- Flowers, M. T., M. Miyazaki, et al. (2006). "Probing the role of stearyl-CoA desaturase-1 in hepatic insulin resistance." *J Clin Invest* **116**(6): 1478-81.
- Foretz, M., C. Guichard, et al. (1999). "Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(22): 12737-42.
- Foretz, M., C. Pacot, et al. (1999). "ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose." *Mol Cell Biol* **19**(5): 3760-8.
- Forrest, D. and B. Vennstrom (2000). "Functions of thyroid hormone receptors in mice." *Thyroid* **10**(1): 41-52.
- Fried, S. K., D. A. Bunkin, et al. (1998). "Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid." *J Clin Endocrinol Metab* **83**(3): 847-50.
- Fu, X. D. (1995). "The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors." *Rna* **1**(7): 663-80.
- Gaillard, D., M. Wabitsch, et al. (1991). "Control of terminal differentiation of adipose precursor cells by glucocorticoids." *J Lipid Res* **32**(4): 569-79.
- Galofre, J. C., S. Santos, et al. (2006). "[Markers of thyroid function (II). Assessment of tissue action]." *Rev Med Univ Navarra* **50**(2): 13-20.
- Gavrilova, O., B. Marcus-Samuels, et al. (2000). "Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipotrophic mice." *J Clin Invest* **105**(3): 271-8.

- Gelfand, R. A., D. E. Matthews, et al. (1984). "Role of counterregulatory hormones in the catabolic response to stress." *J Clin Invest* **74**(6): 2238-48.
- Giorgino, F., L. Laviola, et al. (2005). "Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies." *Acta Physiol Scand* **183**(1): 13-30.
- Girard, J., D. Perdereau, et al. (1994). "Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones." *Faseb J* **8**(1): 36-42.
- Gomez-Ambrosi, J., C. Pastor, et al. (2007). "Influence of waist circumference on the metabolic risk associated with impaired fasting glucose: effect of weight loss after gastric bypass." *Obes Surg* **17**(5): 585-91.
- Gomez-Ambrosi, J., C. Silva, et al. "Body adiposity and type 2 diabetes: increased risk with a high body fat percentage even having a normal BMI." *Obesity (Silver Spring)* **19**(7): 1439-44.
- Granneman, J. G., H. P. Moore, et al. (2007). "Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes." *J Biol Chem* **282**(8): 5726-35.
- Graveley, B. R. (2000). "Sorting out the complexity of SR protein functions." *Rna* **6**(9): 1197-211.
- Grillasca, J. P., M. Gastaldi, et al. (1997). "Cloning and initial characterization of human and mouse Spot 14 genes." *FEBS Lett* **401**(1): 38-42.
- Grover, G. J., K. Mellstrom, et al. (2007). "Therapeutic potential for thyroid hormone receptor-beta selective agonists for treating obesity, hyperlipidemia and diabetes." *Curr Vasc Pharmacol* **5**(2): 141-54.
- Guichard, C., I. Dugail, et al. (1992). "Genetic regulation of fatty acid synthetase expression in adipose tissue: overtranscription of the gene in genetically obese rats." *J Lipid Res* **33**(5): 679-87.
- Guilherme, A., J. V. Virbasius, et al. (2008). "Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(5): 367-77.
- Haemmerle, G., A. Lass, et al. (2006). "Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase." *Science* **312**(5774): 734-7.
- Han, K., G. Yeo, et al. (2005). "A combinatorial code for splicing silencing: UAGG and GGGG motifs." *PLoS Biol* **3**(5): e158.
- Han, T. S., K. Williams, et al. (2002). "Analysis of obesity and hyperinsulinemia in the development of metabolic syndrome: San Antonio Heart Study." *Obes Res* **10**(9): 923-31.
- Harwood, H. J., Jr. (2005). "Treating the metabolic syndrome: acetyl-CoA carboxylase inhibition." *Expert Opin Ther Targets* **9**(2): 267-81.
- Hastings, M. L., C. Milcarek, et al. (1997). "Expression of the thyroid hormone receptor gene, *erbAalpha*, in B lymphocytes: alternative mRNA processing is independent of differentiation but correlates with antisense RNA levels." *Nucleic Acids Res* **25**(21): 4296-300.

- Hastings, M. L., C. M. Wilson, et al. (2001). "A purine-rich intronic element enhances alternative splicing of thyroid hormone receptor mRNA." *Rna* **7**(6): 859-74.
- Hausman, D. B., M. DiGirolamo, et al. (2001). "The biology of white adipocyte proliferation." *Obes Rev* **2**(4): 239-54.
- Heilbronn, L., S. R. Smith, et al. (2004). "Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus." *Int J Obes Relat Metab Disord* **28 Suppl 4**: S12-21.
- Hellmer, J., C. Marcus, et al. (1992). "Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells." *J Clin Endocrinol Metab* **75**(1): 15-20.
- Herrera, B. M. and C. M. Lindgren "The genetics of obesity." *Curr Diab Rep* **10**(6): 498-505.
- Hojgaard, B., K. R. Olsen, et al. (2008). "Economic costs of abdominal obesity." *Obes Facts* **1**(3): 146-54.
- Ismail-Beigi, F., R. S. Haber, et al. (1986). "Stimulation of active Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport by thyroid hormone in a rat liver cell line: role of enhanced Na<sup>+</sup> entry." *Endocrinology* **119**(6): 2527-36.
- Jiang, W., T. Miyamoto, et al. (2004). "Expression of thyroid hormone receptor alpha in 3T3-L1 adipocytes; triiodothyronine increases the expression of lipogenic enzyme and triglyceride accumulation." *J Endocrinol* **182**(2): 295-302.
- Jones, B. H., M. K. Standridge, et al. (1997). "Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells." *Endocrinology* **138**(4): 1512-9.
- Jump, D. B., A. Bell, et al. (1990). "Insulin rapidly induces rat liver S14 gene transcription." *Mol Endocrinol* **4**(11): 1655-60.
- Jump, D. B., A. Bell, et al. (1990). "Thyroid hormone and dietary carbohydrate interact to regulate rat liver S14 gene transcription and chromatin structure." *J Biol Chem* **265**(6): 3474-8.
- Jump, D. B., S. D. Clarke, et al. (1993). "Polyunsaturated fatty acids inhibit S14 gene transcription in rat liver and cultured hepatocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18): 8454-8.
- Kern, P. A., G. B. Di Gregorio, et al. (2003). "Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression." *Diabetes* **52**(7): 1779-85.
- Kershaw, E. E., J. K. Hamm, et al. (2006). "Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin." *Diabetes* **55**(1): 148-57.
- Kersten, S. (2001). "Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis." *EMBO Rep* **2**(4): 282-6.
- Kim, J. Y., K. Tillison, et al. (2006). "The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1

- adipocytes and is a target for transactivation by PPAR $\gamma$ ." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**(1): E115-27.
- Kim, K. H. (1997). "Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase." *Annu Rev Nutr* **17**: 77-99.
- Kinlaw, W. B., J. L. Church, et al. (1995). "Direct evidence for a role of the "spot 14" protein in the regulation of lipid synthesis." *J Biol Chem* **270**(28): 16615-8.
- Kinlaw, W. B., P. Tron, et al. (1992). "Nuclear localization and hepatic zonation of rat "spot 14" protein: immunohistochemical investigation employing anti-fusion protein antibodies." *Endocrinology* **131**(6): 3120-2.
- Kinlaw, W. B., P. Tron, et al. (1993). "Thyroid hormone and dietary carbohydrate induce different hepatic zonation of both "spot 14" and acetyl-coenzyme-A carboxylase: a novel mechanism of coregulation." *Endocrinology* **133**(2): 645-50.
- Koerner, A., J. Kratzsch, et al. (2005). "Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **19**(4): 525-46.
- Kolehmainen, M., H. Vidal, et al. (2001). "Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) expression in human obesity." *Obes Res* **9**(11): 706-12.
- Kopecky, J., L. Sigurdson, et al. (1986). "Thyroxine 5'-deiodinase in hamster and rat brown adipose tissue: effect of cold and diet." *Am J Physiol* **251**(1 Pt 1): E1-7.
- Kotani, G., M. Usami, et al. (1996). "The relationship of IL-6 to hormonal mediators, fuel utilization, and systemic hypermetabolism after surgical trauma." *Kobe J Med Sci* **42**(3): 187-205.
- Kovacs, P., I. Harper, et al. (2004). "A novel missense substitution (Val1483Ile) in the fatty acid synthase gene (FAS) is associated with percentage of body fat and substrate oxidation rates in nondiabetic Pima Indians." *Diabetes* **53**(7): 1915-9.
- Kralisch, S., J. Klein, et al. (2005). "Isoproterenol, TNF $\alpha$ , and insulin downregulate adipose triglyceride lipase in 3T3-L1 adipocytes." *Mol Cell Endocrinol* **240**(1-2): 43-9.
- Kuczmarski, R. J., K. M. Flegal, et al. (1994). "Increasing prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991." *Jama* **272**(3): 205-11.
- Kuhajda, F. P., L. E. Landree, et al. (2005). "The connections between C75 and obesity drug-target pathways." *Trends Pharmacol Sci* **26**(11): 541-4.
- Ladenson, P. W., P. A. Singer, et al. (2000). "American Thyroid Association guidelines for detection of thyroid dysfunction." *Arch Intern Med* **160**(11): 1573-5.
- LaFave, L. T., L. B. Augustin, et al. (2006). "S14: insights from knockout mice." *Endocrinology* **147**(9): 4044-7.
- Lafontan, M. (2005). "Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 119-46.

- Lago, F., R. Gomez, et al. "Cardiometabolic comorbidities and rheumatic diseases: Focus on the role of fat mass and adipokines." Arthritis Care Res (Hoboken).
- Lakka, H. M., J. T. Salonen, et al. (2002). "Obesity and weight gain are associated with increased incidence of hyperinsulinemia in non-diabetic men." Horm Metab Res **34**(9): 492-8.
- Langin, D. (2006). "Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome." Pharmacol Res **53**(6): 482-91.
- Langin, D., A. Dicker, et al. (2005). "Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity." Diabetes **54**(11): 3190-7.
- Lass, A., R. Zimmermann, et al. (2006). "Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome." Cell Metab **3**(5): 309-19.
- Lass, A., R. Zimmermann, et al. "Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores." Prog Lipid Res **50**(1): 14-27.
- Lazar, M. A. (1993). "Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities." Endocr Rev **14**(2): 184-93.
- Lefebvre, A. M., M. Laville, et al. (1998). "Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects." Diabetes **47**(1): 98-103.
- Leonard, J. L., S. A. Mellen, et al. (1983). "Thyroxine 5'-deiodinase activity in brown adipose tissue." Endocrinology **112**(3): 1153-5.
- Letexier, D., C. Pinteur, et al. (2003). "Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue." J Lipid Res **44**(11): 2127-34.
- Levine, R. and D. E. Haft (1970). "Carbohydrate homeostasis." N Engl J Med **283**(5): 237-46.
- Lin, F. T. and M. D. Lane (1994). "CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(19): 8757-61.
- Liu, H. C. and H. C. Towle (1994). "Functional synergism between multiple thyroid hormone response elements regulates hepatic expression of the rat S14 gene." Mol Endocrinol **8**(8): 1021-37.
- Liu, L. H., X. K. Wang, et al. (2004). "Effects of a fatty acid synthase inhibitor on adipocyte differentiation of mouse 3T3-L1 cells." Acta Pharmacol Sin **25**(8): 1052-7.
- Liu, Y. Y. and G. A. Brent "Thyroid hormone crosstalk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation." Trends Endocrinol Metab **21**(3): 166-73.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.



- Loeb, J. N., R. S. Haber, et al. (1987). "Thyroid hormone and Na,K transport." *Trans Am Clin Climatol Assoc* **98**: 176-86.
- Loftus, T. M., D. E. Jaworsky, et al. (2000). "Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors." *Science* **288**(5475): 2379-81.
- Lowell, B. B. (1999). "PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function." *Cell* **99**(3): 239-42.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* **193**(1): 265-75.
- MacDonald, M. L., R. R. Singaraja, et al. (2008). "Absence of stearoyl-CoA desaturase-1 ameliorates features of the metabolic syndrome in LDLR-deficient mice." *J Lipid Res* **49**(1): 217-29.
- Macek Jilkova, Z., S. Pavelka, et al. (2009). "Modulation of type I iodothyronine 5'-deiodinase activity in white adipose tissue by nutrition: possible involvement of leptin." *Physiol Res*.
- Maia, A. L., B. W. Kim, et al. (2005). "Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans." *J Clin Invest* **115**(9): 2524-33.
- Maier, T., S. Jenni, et al. (2006). "Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution." *Science* **311**(5765): 1258-62.
- Marcelin, G. and S. Chua, Jr. "Contributions of adipocyte lipid metabolism to body fat content and implications for the treatment of obesity." *Curr Opin Pharmacol* **10**(5): 588-93.
- Mariash, C. N., S. Seelig, et al. (1986). "Rapid synergistic interaction between thyroid hormone and carbohydrate on mRNAs14 induction." *J Biol Chem* **261**(21): 9583-6.
- Martel, P. M., C. M. Bingham, et al. (2006). "S14 protein in breast cancer cells: direct evidence of regulation by SREBP-1c, superinduction with progesterin, and effects on cell growth." *Exp Cell Res* **312**(3): 278-88.
- Marti, A., F. J. Novo, et al. (1998). "Leptin gene transfer into muscle increases lipolysis and oxygen consumption in white fat tissue in ob/ob mice." *Biochem Biophys Res Commun* **246**(3): 859-62.
- Mauriege, P., J. P. Despres, et al. (1991). "Regional variation in adipose tissue lipolysis in lean and obese men." *J Lipid Res* **32**(10): 1625-33.
- Mauvoisin, D. and C. Mounier "Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression." *Biochimie* **93**(1): 78-86.
- Mauvoisin, D., G. Rocque, et al. (2007). "Role of the PI3-kinase/mTor pathway in the regulation of the stearoyl CoA desaturase (SCD1) gene expression by insulin in liver." *J Cell Commun Signal* **1**(2): 113-25.
- McCormick, B. and I. Stone (2007). "Economic costs of obesity and the case for government intervention." *Obes Rev* **8 Suppl 1**: 161-4.
- Menendez, J. A., A. Vazquez-Martin, et al. (2009). "Fatty Acid Synthase: Association with Insulin Resistance, Type 2 Diabetes, and Cancer." *Clin Chem*.

- Meyers, D. A., A. P. Goldberg, et al. (1991). "Relationship of obesity and physical fitness to cardiopulmonary and metabolic function in healthy older men." *J Gerontol* **46**(2): M57-65.
- Minehira, K., N. Vega, et al. (2004). "Effect of carbohydrate overfeeding on whole body macronutrient metabolism and expression of lipogenic enzymes in adipose tissue of lean and overweight humans." *Int J Obes Relat Metab Disord* **28**(10): 1291-8.
- Minokoshi, Y., Y. B. Kim, et al. (2002). "Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." *Nature* **415**(6869): 339-43.
- Mobbs, C. V. and H. Makimura (2002). "Block the FAS, lose the fat." *Nat Med* **8**(4): 335-6.
- Moon, J. R., H. R. Hull, et al. (2007). "Percent body fat estimations in college women using field and laboratory methods: a three-compartment model approach." *J Int Soc Sports Nutr* **4**: 16.
- Moreno-Navarrete, J. M., P. Botas, et al. (2009). "Val1483Ile in FASN gene is linked to central obesity and insulin sensitivity in adult white men." *Obesity (Silver Spring)* **17**(9): 1755-61.
- Morton, G. J., D. E. Cummings, et al. (2006). "Central nervous system control of food intake and body weight." *Nature* **443**(7109): 289-95.
- Motoshima, H., X. Wu, et al. (2002). "Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: effects of insulin and rosiglitazone." *J Clin Endocrinol Metab* **87**(12): 5662-7.
- Moulin, K., N. Truel, et al. (2001). "Emergence during development of the white-adipocyte cell phenotype is independent of the brown-adipocyte cell phenotype." *Biochem J* **356**(Pt 2): 659-64.
- Nadler, S. T. and A. D. Attie (2001). "Please pass the chips: genomic insights into obesity and diabetes." *J Nutr* **131**(8): 2078-81.
- Nadler, S. T., J. P. Stoehr, et al. (2000). "The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(21): 11371-6.
- Narayan, P., C. W. Liaw, et al. (1984). "Rapid induction of a specific nuclear mRNA precursor by thyroid hormone." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(15): 4687-91.
- Nawrocki, A. R. and P. E. Scherer (2004). "The delicate balance between fat and muscle: adipokines in metabolic disease and musculoskeletal inflammation." *Curr Opin Pharmacol* **4**(3): 281-9.
- Nguyen, T. T., F. Chapa, et al. (1998). "Direct measurement of the contributions of type I and type II 5'-deiodinases to whole body steady state 3,5,3'-triiodothyronine production from thyroxine in the rat." *Endocrinology* **139**(11): 4626-33.
- Ntambi, J. M. and M. Miyazaki (2003). "Recent insights into stearoyl-CoA desaturase-1." *Curr Opin Lipidol* **14**(3): 255-61.

- Ntambi, J. M. and K. Young-Cheul (2000). "Adipocyte differentiation and gene expression." J Nutr **130**(12): 3122S-3126S.
- O'Rahilly, S. and I. S. Farooqi (2006). "Genetics of obesity." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1471): 1095-105.
- Obregon, M. J. (2008). "Thyroid hormone and adipocyte differentiation." Thyroid **18**(2): 185-95.
- Oetting, A. and P. M. Yen (2007). "New insights into thyroid hormone action." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **21**(2): 193-208.
- Oh, K. W., W. Y. Lee, et al. (2005). "The relationship between serum resistin, leptin, adiponectin, ghrelin levels and bone mineral density in middle-aged men." Clin Endocrinol (Oxf) **63**(2): 131-8.
- Ohkuma, A., I. Nonaka, et al. (2008). "Distal lipid storage myopathy due to PNPLA2 mutation." Neuromuscul Disord **18**(8): 671-4.
- Olufadi, R. and C. D. Byrne (2008). "Clinical and laboratory diagnosis of the metabolic syndrome." J Clin Pathol **61**(6): 697-706.
- Oppenheimer, J. H., H. L. Schwartz, et al. (1991). "Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat." J Clin Invest **87**(1): 125-32.
- Orci, L., W. S. Cook, et al. (2004). "Rapid transformation of white adipocytes into fat-oxidizing machines." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(7): 2058-63.
- Oren, S., E. Grossman, et al. (1996). "Arterial and venous compliance in obese and nonobese subjects." Am J Cardiol **77**(8): 665-7.
- Ortega, F. J., J. M. Moreno-Navarrete, et al. "Circulating glucagon is associated with inflammatory mediators in metabolically compromised subjects." Eur J Endocrinol **165**(4): 639-45.
- Ota, Y., A. Mariash, et al. (1997). "Cloning, expression and regulation of the human S14 gene." Mol Cell Endocrinol **126**(1): 75-81.
- Panarotto, D., J. Poisson, et al. (2000). "Lipoprotein lipase steady-state mRNA levels are lower in human omental versus subcutaneous abdominal adipose tissue." Metabolism **49**(9): 1224-7.
- Papanicolaou, D. A. and G. P. Chrousos (1995). "Interactions of the endocrine and immune systems in children and young adults." Curr Opin Pediatr **7**(4): 440-4.
- Paton, C. M. and J. M. Ntambi (2009). "Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(1): E28-37.
- Pavelka, S., P. Kopecky, et al. (1997). "Tissue metabolism and plasma levels of thyroid hormones in critically ill very premature infants." Pediatr Res **42**(6): 812-8.
- Peinado, J. R., Y. Jimenez-Gomez, et al. "The stromal-vascular fraction of adipose tissue contributes to major differences between subcutaneous and visceral fat depots." Proteomics **10**(18): 3356-66.



- Peng, X. D., H. Xie, et al. (2008). "Relationships between serum adiponectin, leptin, resistin, visfatin levels and bone mineral density, and bone biochemical markers in Chinese men." *Clin Chim Acta* **387**(1-2): 31-5.
- Penicaud, L., P. Ferre, et al. (1991). "Increased gene expression of lipogenic enzymes and glucose transporter in white adipose tissue of suckling and weaned obese Zucker rats." *Biochem J* **279** (Pt 1): 303-8.
- Peral, B., E. Camafeita, et al. (2009). "Tackling the human adipose tissue proteome to gain insight into obesity and related pathologies." *Expert Rev Proteomics* **6**(4): 353-61.
- Perez-Perez, R., E. Garcia-Santos, et al. "Attenuated metabolism is a hallmark of obesity as revealed by comparative proteomic analysis of human omental adipose tissue." *J Proteomics* **75**(3): 783-95.
- Perez-Perez, R., F. J. Ortega-Delgado, et al. (2009). "Differential proteomics of omental and subcutaneous adipose tissue reflects their unlike biochemical and metabolic properties." *J Proteome Res* **8**(4): 1682-93.
- Pickup, J. C. and M. A. Crook (1998). "Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system?" *Diabetologia* **41**(10): 1241-8.
- Qi, L., P. Kraft, et al. (2008). "The Common Obesity Variant near MC4R Gene Is Associated with Higher Intakes of Total Energy and Dietary Fat, Weight Change, and Diabetes Risk in Women." *Hum Mol Genet.*
- Rahman, S. M., A. Dobrzyn, et al. (2003). "Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency elevates insulin-signaling components and down-regulates protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(19): 11110-5.
- Rauch, U., J. I. Osende, et al. (2001). "Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences." *Ann Intern Med* **134**(3): 224-38.
- Reichlin, S. (1993). "Neuroendocrine-immune interactions." *N Engl J Med* **329**(17): 1246-53.
- Reinehr, T. "Obesity and thyroid function." *Mol Cell Endocrinol* **316**(2): 165-71.
- Reinehr, T. and W. Andler (2002). "Thyroid hormones before and after weight loss in obesity." *Arch Dis Child* **87**(4): 320-3.
- Reinehr, T., A. Isa, et al. (2008). "Thyroid hormones and their relation to weight status." *Horm Res* **70**(1): 51-7.
- Reinehr, T. and C. L. Roth "A new link between skeleton, obesity and insulin resistance: relationships between osteocalcin, leptin and insulin resistance in obese children before and after weight loss." *Int J Obes (Lond)* **34**(5): 852-8.
- Ridker, P. M., J. E. Buring, et al. (2003). "C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women." *Circulation* **107**(3): 391-7.
- Rorive, M., M. R. Letiexhe, et al. (2005). "[Obesity and type 2 diabetes]." *Rev Med Liege* **60**(5-6): 374-82.

- Roubenoff, R. (1997). "Inflammatory and hormonal mediators of cachexia." *J Nutr* **127**(5 Suppl): 1014S-1016S.
- Salas-Salvado, J., M. A. Rubio, et al. (2007). "[SEEDO 2007 Consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of therapeutic intervention criteria]." *Med Clin (Barc)* **128**(5): 184-96; quiz 1 p following 200.
- Sanchez-Rodriguez, J., J. P. Kaninda-Tshilumbu, et al. (2005). "The spot 14 protein inhibits growth and induces differentiation and cell death of human MCF-7 breast cancer cells." *Biochem J* **390**(Pt 1): 57-65.
- Scarborough, P., P. Bhatnagar, et al. "The economic burden of ill health due to diet, physical inactivity, smoking, alcohol and obesity in the UK: an update to 2006-07 NHS costs." *J Public Health (Oxf)*.
- Schaffler, A., U. Muller-Ladner, et al. (2006). "Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases." *Endocr Rev* **27**(5): 449-67.
- Schmid, B., J. F. Rippmann, et al. (2005). "Inhibition of fatty acid synthase prevents preadipocyte differentiation." *Biochem Biophys Res Commun* **328**(4): 1073-82.
- Schneider, M. J., S. N. Fiering, et al. (2006). "Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (Dio1) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice." *Endocrinology* **147**(1): 580-9.
- Schwartz, M. W., S. C. Woods, et al. (2000). "Central nervous system control of food intake." *Nature* **404**(6778): 661-71.
- Schweiger, M., R. Schreiber, et al. (2006). "Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism." *J Biol Chem* **281**(52): 40236-41.
- Serra, J., C. Castell, et al. (2003). "[Overweight and obesity. Evaluation of the objectives of the Health Plan for Catalonia for the year 2000]." *Med Clin (Barc)* **121** Suppl 1: 47-50.
- Sewter, C., D. Berger, et al. (2002). "Human obesity and type 2 diabetes are associated with alterations in SREBP1 isoform expression that are reproduced ex vivo by tumor necrosis factor-alpha." *Diabetes* **51**(4): 1035-41.
- Shih, H. M., Z. Liu, et al. (1995). "Two CACGTG motifs with proper spacing dictate the carbohydrate regulation of hepatic gene transcription." *J Biol Chem* **270**(37): 21991-7.
- Shintani, M., Y. Ogawa, et al. (2001). "Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway." *Diabetes* **50**(2): 227-32.
- Sisley, S. and D. Sandoval "Hypothalamic control of energy and glucose metabolism." *Rev Endocr Metab Disord* **12**(3): 219-33.
- Sniderman, A. D., R. Bhopal, et al. (2007). "Why might South Asians be so susceptible to central obesity and its atherogenic consequences? The adipose tissue overflow hypothesis." *Int J Epidemiol* **36**(1): 220-5.

- Spiegelman, B. M., M. Frank, et al. (1983). "Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development." *J Biol Chem* **258**(16): 10083-9.
- Stocker, C. J. and M. A. Cawthorne (2008). "The influence of leptin on early life programming of obesity." *Trends Biotechnol.*
- Streckfuss, F., I. Hamann, et al. (2005). "Hepatic deiodinase activity is dispensable for the maintenance of normal circulating thyroid hormone levels in mice." *Biochem Biophys Res Commun* **337**(2): 739-45.
- Sul, H. S. (2009). "Minireview: Pref-1: role in adipogenesis and mesenchymal cell fate." *Mol Endocrinol* **23**(11): 1717-25.
- Suryawan, A., L. V. Swanson, et al. (1997). "Insulin and hydrocortisone, but not triiodothyronine, are required for the differentiation of pig preadipocytes in primary culture." *J Anim Sci* **75**(1): 105-11.
- Swierczynski, J., E. Goyke, et al. (2000). "Comparative study of the lipogenic potential of human and rat adipose tissue." *Metabolism* **49**(5): 594-9.
- Tchernof, A., C. Belanger, et al. (2006). "Regional differences in adipose tissue metabolism in women: minor effect of obesity and body fat distribution." *Diabetes* **55**(5): 1353-60.
- Thupari, J. N., L. E. Landree, et al. (2002). "C75 increases peripheral energy utilization and fatty acid oxidation in diet-induced obesity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(14): 9498-502.
- Timmons, J. A. and C. J. Sundberg (2006). "Oligonucleotide microarray expression profiling: human skeletal muscle phenotype and aerobic exercise training." *IUBMB Life* **58**(1): 15-24.
- Tong, L. (2005). "Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery." *Cell Mol Life Sci* **62**(16): 1784-803.
- Trayhurn, P. and I. S. Wood (2004). "Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue." *Br J Nutr* **92**(3): 347-55.
- Tremblay, A., J. P. Despres, et al. (1991). "Normalization of the metabolic profile in obese women by exercise and a low fat diet." *Med Sci Sports Exerc* **23**(12): 1326-31.
- Trujillo, M. E., S. Sullivan, et al. (2004). "Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(11): 5577-82.
- Tsatsos, N. G., L. B. Augustin, et al. (2008). "Hepatic expression of the SPOT 14 (S14) paralog S14-related (Mid1 interacting protein) is regulated by dietary carbohydrate." *Endocrinology* **149**(10): 5155-61.
- Unger, R. H. (2003). "Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome." *Endocrinology* **144**(12): 5159-65.
- Vazzana, N., F. Santilli, et al. "Determinants of Increased Cardiovascular Disease in Obesity and Metabolic Syndrome." *Curr Med Chem.*

- Viguerie, N., L. Millet, et al. (2002). "Regulation of human adipocyte gene expression by thyroid hormone." *J Clin Endocrinol Metab* **87**(2): 630-4.
- Visser, T. J., E. Kaptein, et al. (1988). "Deiodination of thyroid hormone by human liver." *J Clin Endocrinol Metab* **67**(1): 17-24.
- Vohl, M. C., R. Sladek, et al. (2004). "A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men." *Obes Res* **12**(8): 1217-22.
- von Lengerke, T. and C. Krauth "Economic costs of adult obesity: a review of recent European studies with a focus on subgroup-specific costs." *Maturitas* **69**(3): 220-9.
- Wahrenberg, H., P. Engfeldt, et al. (1986). "Adrenergic regulation of lipolysis in human adipocytes: findings in hyper- and hypothyroidism." *J Clin Endocrinol Metab* **63**(3): 631-8.
- Wahrenberg, H., A. Wennlund, et al. (1994). "Adrenergic regulation of lipolysis in fat cells from hyperthyroid and hypothyroid patients." *J Clin Endocrinol Metab* **78**(4): 898-903.
- Wakil, S. J. and L. A. Abu-Elheiga (2009). "Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome." *J Lipid Res* **50** *Suppl*: S138-43.
- Wang, H. and R. H. Eckel (2009). "Lipoprotein lipase: from gene to obesity." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**(2): E271-88.
- Wang, M. Y., L. Orci, et al. (2005). "Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: implications for treatment of human obesity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(50): 18011-6.
- Wang, Y., B. Jones Voy, et al. (2004). "The human fatty acid synthase gene and de novo lipogenesis are coordinately regulated in human adipose tissue." *J Nutr* **134**(5): 1032-8.
- Waters, K. M., C. W. Miller, et al. (1997). "Localization of a negative thyroid hormone-response region in hepatic stearyl-CoA desaturase gene 1." *Biochem Biophys Res Commun* **233**(3): 838-43.
- Weisberg, S. P., D. McCann, et al. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." *J Clin Invest* **112**(12): 1796-808.
- Weyer, C., T. Funahashi, et al. (2001). "Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(5): 1930-5.
- Wickelgren, I. (1998). "Tracking insulin to the mind." *Science* **280**(5363): 517-9.
- Wilborn, C., J. Beckham, et al. (2005). "Obesity: prevalence, theories, medical consequences, management, and research directions." *J Int Soc Sports Nutr* **2**: 4-31.
- Williams, G. R., J. A. Franklyn, et al. (1989). "Thyroid hormone receptor expression in the "sick euthyroid" syndrome." *Lancet* **2**(8678-8679): 1477-81.
- Wong, R. H. and H. S. Sul "Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective." *Curr Opin Pharmacol* **10**(6): 684-91.

- Xiong, S., S. S. Chirala, et al. (1998). "Identification of thyroid hormone response elements in the human fatty acid synthase promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12260-5.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2001). "The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity." Nat Med **7**(8): 941-6.
- Yang, W. S., W. J. Lee, et al. (2001). "Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin." J Clin Endocrinol Metab **86**(8): 3815-9.
- Yang, X., X. Lu, et al. "The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase." Cell Metab **11**(3): 194-205.
- Zhang, H., H. Xie, et al. "Relationships between serum adiponectin, apelin, leptin, resistin, visfatin levels and bone mineral density, and bone biochemical markers in post-menopausal Chinese women." J Endocrinol Invest **33**(10): 707-11.
- Zhang, J. and M. A. Lazar (2000). "The mechanism of action of thyroid hormones." Annu Rev Physiol **62**: 439-66.
- Zhang, W., M. A. Della-Fera, et al. (2008). "Adipose tissue gene expression profiles in ob/ob mice treated with leptin." Life Sci **83**(1-2): 35-42.
- Zhang, W., W. Peng, et al. "Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of human thyroid hormone responsive protein." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun **67**(Pt 8): 941-6.
- Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-32.
- Zhu, Q., G. W. Anderson, et al. (2005). "The Spot 14 protein is required for de novo lipid synthesis in the lactating mammary gland." Endocrinology **146**(8): 3343-50.

