



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

## ANGPTL8 Y SU IMPLICACIÓN EN EL EMBARAZO, LA DIABETES Y LA OBESIDAD

Bruno Martínez Pérez

**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.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Bruno Martínez Pérez

---

**ANGPTL8 y su implicación en el embarazo, la diabetes  
y la obesidad**

TESIS DOCTORAL

Dirigida por

Dra. Sonia Fernández Veledo y Dra. Ana Megía Colet

2018





# UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI

Sonia Fernández Veledo, Dra. en Biomedicina por la Universidad de Barcelona, Co-directora del Grupo de Investigación en Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas del IISPV y Profesora Asociada de la URV, y Ana Megía Colet, Dra. en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid, especialista en Endocrinología y Nutrición y Profesora Asociada de la URV

## CERTIFICAN QUE:

La tesis titulada “**ANGPTL8 y su implicación en el embarazo, la diabetes y la obesidad**”, presentada por **Bruno Martínez Pérez** ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple con los requisitos necesarios para optar al título de Doctor.

Y para que así conste y tenga los efectos oportunos, firmamos el presente documento en Tarragona, a 1 de junio de 2018.

Fdo. Dra. Sonia Fernández Veledo

Fdo. Dra. Ana Megía Colet







## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral no hubiese sido posible sin la cooperación de todas y cada una de las personas que a continuación cito y a las que agradezco profundamente su ayuda.

Al Dr. Joan Vendrell que me abrió la puerta del grupo de investigación en Diabetes y Enfermedades Metabólicas (Diamet), donde me he integrado como uno más y me ha sido posible realizar este trabajo.

A la Dra. Cristina Gutiérrez, por su apoyo durante estos cuatro años y por animarme en su día a comenzar esta tesis doctoral.

A la Dra. Sonia Fernández Veledo por su inestimable ayuda y dedicación en el desarrollo de este trabajo, por todo lo que he aprendido a su lado, por su capacidad de liderazgo y porque su visión crítica y sus orientaciones a lo largo de estos años han sido esenciales para poder llevar a cabo estos estudios.

A la Dra. Ana Megía por haberme brindado la posibilidad de colaborar en la línea de diabetes y gestación, por su confianza y ayuda en la realización de este trabajo, y por todo el tiempo que ha invertido en mi formación.

A mis compañeros del laboratorio de investigación del grupo, donde me he sentido completamente integrado y tratado como uno más, especialmente



quiero a agradecer a Cati y Miriam toda su ayuda y colaboración en el trabajo diario.

Al servicio de Análisis Clínicos del Hospital Joan XXIII por facilitarme el compaginar mi formación como especialista en Análisis Clínicos con el desarrollo de esta tesis doctoral.

Y por último, gracias a toda la red institucional que ha permitido llevar a cabo esta tesis, el Instituto Catalán de la Salud (ICS), el Hospital Joan XXIII de Tarragona, el Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV) y el Instituto de Salud Carlos III.

Este trabajo va dedicado íntegramente a mis padres, Manuel y María Luisa, porque sin ellos, y sin todo el esfuerzo que han invertido en mi formación, esta tesis no hubiese sido nunca posible. Gracias.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>13</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>1. Tejido adiposo.....</b>	<b>21</b>
1.1. Tipos de tejido adiposo.....	22
1.1.1. Tejido adiposo blanco .....	23
1.1.2. Tejido adiposo marrón .....	27
1.1.3. Tejido adiposo <i>beige</i> .....	31
1.2. Desarrollo y diferenciación de los adipocitos .....	32
<b>2. Obesidad y co-morbilidades asociadas .....</b>	<b>36</b>
2.1. Fisiopatología de la obesidad .....	38
2.2. Tratamiento de la obesidad .....	41
2.2.1. Cirugía bariátrica .....	43
2.3. Alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad .....	46
2.3.1. Resistencia a la insulina y desarrollo de la T2D .....	47
2.4. Diabetes mellitus gestacional .....	54
<b>3. ANGPTL8 .....</b>	<b>58</b>
3.1. Familia de las <i>Angiopoietin-like proteins</i> .....	59
3.2. ANGPTL8 y su papel sobre la célula beta.....	62
3.3. ANGPTL8 en el tejido adiposo .....	63
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>71</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>75</b>

<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>105</b>
<b>1. ANGPTL8 en la gestación .....</b>	<b>106</b>
<b>2. ANGPTL8 en la regulación del tejido adiposo y <i>browning</i> .....</b>	<b>108</b>
<b>3. ANGPTL8 en la obesidad y en la T2D .....</b>	<b>111</b>
3.1. ANGPTL8 en la obesidad mórbida: efecto de la cirugía bariátrica.....	112
3.2. ANGPTL8 como predictor de remisión de DM .....	114
3.3. Discordancia entre niveles de expresión en WAT y niveles circulantes de ANGPTL8 .....	115
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>119</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>123</b>





## RESUMEN

Este trabajo estudia el papel de la ANGPTL8 en la obesidad y el embarazo. La ANGPTL8 es una proteína circulante producida principalmente por el hígado y que se ha vinculado con la adipogénesis y con la homeostasis del metabolismo lipídico e hidrocarbonado.

Dado que la obesidad y el embarazo son dos situaciones caracterizadas por la presencia de resistencia a la insulina, en las que se producen alteraciones en el metabolismo tanto de los lípidos como de los glúcidos y cambios en los depósitos grasos, consideramos que podría ser relevante conocer la dinámica de la ANGPTL8 en estas entidades.

En la gestación observamos que los niveles de ANGPTL8 se encuentran más elevados que fuera de la gestación, alcanzando el nivel máximo en el primer trimestre de gestación. En el momento del parto, los niveles de ANGPTL8 fetal son superiores a los observados en sangre materna y muestran una asociación con el peso al nacer y la adiposidad neonatal, siendo menores en los neonatos con peso adecuado para la edad gestacional y/o en el tercil medio de adiposidad.

Por este motivo, quisimos estudiar la posible implicación de ANGPTL8 en la regulación del tejido adiposo tanto en modelos animales como en líneas celulares. En modelos murinos, demostramos que la expresión de ANGPTL8 en tejido adiposo marrón de la madre y del feto fue paralela a la de UCP1, y en líneas celulares observamos que la expresión de esta proteína aumentaba durante el proceso de "*browning*". Además, al tratar al tejido adiposo con ANGPTL8, se promueve la expresión de marcadores de adipocitos marrones, sugiriendo un posible papel como promotor del "*browning*".

Todos estos datos, sugieren que ANGPTL8 podría ejercer un papel en la regulación del crecimiento fetal y la adipogénesis en la vida intrauterina.

Por otro lado, estudiamos los niveles de ANGPTL8 en pacientes con obesidad con y sin diabetes mellitus tipo 2, y observamos que los niveles

circulantes de ANGPTL8 se encontraban más bajos en aquellos pacientes obesos con diabetes mellitus tipo 2 en comparación con los obesos sin diabetes. Además, quisimos evaluar si los niveles de ANGPTL8 se modificaban tras el tratamiento con cirugía bariátrica y su relación con los cambios en la resistencia a la insulina y la remisión de diabetes. Observamos que al mes de la cirugía, se producía un aumento de los niveles de ANGPTL8 y que este incremento era capaz de predecir la remisión de la diabetes al año de la cirugía.

Por lo tanto, nuestros estudios sugieren que ANGPTL8 estaría implicada en la fisiología del embarazo y en la etiopatogenia de la de la diabetes y la obesidad.

## ABREVIATURAS

**AGA:** Adecuado para la edad gestacional, del inglés *appropriate for gestational age*.

**AMPK:** Proteína kinasa activada por AMP, del inglés *AMP-activated protein kinase*.

**ANGPTL:** Proteína de tipo angiopoyetina, del inglés *angiopoietin-like protein*.

**ANP:** Péptido natriurético atrial, del inglés *atrial natriuretic peptide*.

**ASCs:** Células madre derivadas del tejido adiposo, del inglés *adipose-derived stem cells*.

**AT:** Tejido adiposo, del inglés *adipose tissue*.

**ATGL:** Adipo-tiglicérido lipasa.

**ATP:** Adenosín trifosfato.

**BAT:** Tejido adiposo marrón, del inglés *brown adipose tissue*.

**BMAT:** Tejido adiposo de médula ósea, del inglés *bone marrow adipose tissue*.

**BMP:** Proteína morfológica ósea, del inglés *bone morphogenic proteins*.

**BNP:** Péptido natriurético ventricular, del inglés *brain natriuretic peptide*.

**C/EBP:** Proteínas de unión al potenciador CCAAT, del inglés *CCAAT/enhancer binding protein*.

**cAMP:** Adenosín monofosfato cíclico, del inglés *cyclic adenosine monophosphate*.

**DAG:** Diacilglicerol.

**DEXA:** Absorciometría de rayos X de dos energías, del inglés *dual-energy X-ray absorptiometry*.

**DH:** Densitometría hidrostática.

**Ebf2:** Factor de célula B temprano-2, del inglés *early B cell factor 2*.

**ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.

**FDG:** Fluorodesoxiglucosa.

**FFA:** Ácidos grasos libres, del inglés *free fatty acids*.

**FGF-19:** Factor de crecimiento fibroblástico 19, del inglés *fibroblast growth factor-19*.

**FGF-21:** Factor de crecimiento fibroblástico 21, del inglés *fibroblast growth factor-21*.

**G3P:** Glicerol-3-fosfato.

**GDM:** Diabetes mellitus gestacional, del inglés *gestational diabetes mellitus*.



**GIP:** Polipéptido gástrico inhibitorio, del inglés *gastric inhibitory polypeptide*.

**GLP1:** Péptido similar al glucagón tipo 1, del inglés *Glucagon like peptide 1*.

**GLUT-4:** Transportador de glucosa tipo 4, del inglés *glucose transporter type 4*.

**GPR131:** Receptor acoplado a proteína G 131, del inglés *G protein-coupled receptor 131*.

**HDL:** Lipoproteínas de alta densidad, del inglés *high density lipoprotein*.

**HOMA-IR:** Índice de resistencia a la insulina, del inglés *homeostatic model assessment – insulin resistance*.

**hPL:** Lactógeno placentario humano, del inglés *human placental lactogen*.

**HSL:** Lipasa sensible a hormonas, del inglés *hormone-sensitive lipase*.

**IB:** Impedancia bioeléctrica.

**IKK $\beta$ :** Inhibidor de la subunidad beta del factor nuclear kappa-beta quinasa, del inglés *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta*.

**IL:** Interleukina.

**IL1B-Ra:** antagonista del receptor IL-1 beta, del inglés *antagonist IL-1 beta receptor*.

**IMC:** Índice de masa corporal.

**IR:** Receptor de insulina, del inglés *insulin receptor*.

**IRS:** Sustratos del receptor de insulina, del inglés *insulin receptor substrates*.

**JNK1:** Kinasa aminoterminal c-Jun-1, del inglés *c-Jun N-terminal kinase 1*.

**LGA:** Grande para la edad gestacional, del inglés *large for gestational age*.

**LPL:** Lipoproteinlipasa.

**MAG:** monoacilglicerol.

**MCP1:** Proteína quimiotáctica monocítica 1, del inglés *monocyte chemotactic protein 1*.

**MGL:** Monoacilglicerol lipasa.

**MSCs:** Células madre mesenquimales, del inglés *mesenchymal stem cells*.

**NA:** Noradrenalina.

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear kappa beta, del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated beta-cells*.

**NIH:** Institutos nacionales de la salud, del inglés *National Institutes of Health*.

**OMS:** Organización mundial de la salud.

**PCR:** Proteína C reactiva.

**PET-CT:** Tomografía por emisión de positrones – tomografía computada, del inglés *positron emission tomography - computed tomography*.

**Pgc1 $\alpha$**  o **PPARGC1 $\alpha$** : coactivador 1 alpha del receptor de peroxisoma proliferador-activado gamma, del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*.

**PKA:** Proteína quinasa A, del inglés *protein kinase A*.

**PPAR:** Receptor de peroxisoma proliferador-activado alpha, del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor*.

**PRDM16:** Proteína 16 con dominio homólogo a PRD1-BF-RIZ1, del inglés *PRD1-BF-RIZ1 domain containing 16*.

**PTP1B:** Proteína tirosina fosfatasa 1B, del inglés *protein tyrosine phosphatase 1B*.

**SAT:** Tejido adiposo subcutáneo, del inglés *subcutaneous adipose tissue*.

**SGA:** Pequeño para la edad gestacional, del inglés *small for gestational age*.

**SNC:** Sistema nervioso central.

**SNP:** Polimorfismos de un solo nucleótido, del inglés *single nucleotide polymorphism*.

**SNS:** Sistema nervioso simpático.

**$\beta$ -AR:** Receptores beta-adrenérgicos, del inglés *beta-adrenergic receptors*.

**SVF:** Fracción estroma-vascular, del inglés *stromal vascular fraction*.

**T1D:** Diabetes mellitus tipo 1, del inglés *type 1 diabetes*.

**T2D:** Diabetes mellitus tipo 2, del inglés *type 2 diabetes*.

**T<sub>3</sub>:** Triyodotironina.

**T<sub>4</sub>:** Tiroxina

**TG:** Triglicéridos.

**TLR:** Receptores tipo Toll, del inglés *Toll-like receptor*.

**TNF:** Factor de necrosis tumoral, del inglés *tumor necrosis factor*.

**TNG:** Tolerancia normal a la glucosa.

**UCP-1:** Proteína desacopladora tipo 1, del inglés *uncoupling protein 1*.

**VAT:** Tejido adiposo visceral, del inglés *visceral adipose tissue*.

**VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad, del inglés *very low density lipoprotein*.

**WAT:** Tejido adiposo blanco, del inglés *white adipose tissue*.



# Introducción



## INTRODUCCIÓN

### 1. TEJIDO ADIPOSO

En los últimos 30 años, la evolución en el conocimiento de las características anatómicas, funcionales, moleculares y de la regulación del tejido adiposo (AT, del inglés *adipose tissue*) ha sido sorprendente [1-5]; no obstante, algunos aspectos todavía no son bien conocidos. Así, a lo largo de los años, y gracias a numerosos estudios se ha confirmado que el AT, formado principalmente por adipocitos, no sólo actúa como capa aislante, tejido protector de ciertos órganos internos y principal fuente de almacenaje de energía en forma de triglicéridos, sino que también juega un papel clave en la regulación de la homeostasis energética del organismo.

Tanto en humanos como en otros mamíferos, existen principalmente dos tipos de AT que se diferencian tanto a nivel morfológico y estructural, como a nivel funcional: el tejido adiposo blanco (WAT, del inglés *white adipose tissue*) y el tejido adiposo marrón (BAT, del inglés *brown adipose tissue*). Todos ellos formarían parte de lo que actualmente se conoce como órgano adiposo. En los adultos normales, el WAT constituye del 15 al 20% del peso corporal de los varones y del 20 al 25% de las mujeres [6]. No obstante, este porcentaje puede modificarse en función del balance energético del individuo, pudiendo llegar a ser significativamente mayor en situaciones de obesidad e inferior en la desnutrición o caquexia [7]. Clásicamente descrito como un órgano prácticamente inerte, hoy en día está totalmente aceptado que el órgano adiposo es un tejido metabólicamente muy activo y complejo, cuyas células secretan proteínas y metabolitos que van a participar en la regulación de diferentes procesos metabólicos a nivel local y sistémico. A pesar de que el BAT es mucho menos abundante y se consideraba específico de pequeños mamíferos y de la etapa fetal y neonatal en humanos, hace una década que se demostró su existencia en adultos [8-12]. Su función principal es la conversión de energía química en calor, y es el responsable del mantenimiento de la temperatura corporal, especialmente en los recién nacidos. No obstante, en los últimos años se han descrito nuevas funciones para este tejido, como es su

## Introducción

implicación en la regulación del metabolismo de la glucosa y los lípidos [13] o su posible papel como órgano endocrino [14].

A pesar de que los adipocitos son las células más específicas, abundantes y características del AT, en éste también podemos encontrar otros tipos celulares que componen la fracción estroma-vascular (SVF, del inglés *stromal vascular fraction*). Esta fracción no está bien definida, pero suele contener porcentajes variables de células madre mesenquimales (ASCs, del inglés *adipose-derived stem cells*), progenitores endoteliales, hematopoyéticos y pre-adipocitos, así como fibroblastos, células inmunes, musculares lisas, endoteliales y pericitos entre otras [15]. Estas células son determinantes para una correcta funcionalidad del tejido pero también juegan un papel muy importante en la etiopatogenia de la obesidad y sus co-morbilidades asociadas. Así por ejemplo, las ASCs (células precursoras de los adipocitos) se encargan de renovar la población de adipocitos en situaciones fisiológicas pero también participan y son determinantes en la expansión del AT en la obesidad y su disfuncionalidad [16, 17]. Por otro lado, diferentes células del sistema inmunitario como pueden ser los macrófagos y linfocitos participan directamente en la inflamación crónica de bajo grado y en el desarrollo de resistencia a la insulina asociada a la obesidad [18, 19]. Es por todo esto, que actualmente está completamente aceptada la implicación del AT en el metabolismo energético, la función neuroendocrina y la función inmune [20-22].

### 1.1. TIPOS DE TEJIDO ADIPOSO

En humanos se han descrito diferentes tipos de tejido adiposo en función de su localización y el tipo de adipocitos que lo constituyen. El tejido adiposo blanco [23] y el tejido adiposo marrón [24] son los dos más conocidos y mejor caracterizados (Figura 1), pero se han descrito otros tipos como el AT de la médula ósea (BMAT, del inglés *bone marrow adipose tissue*) y el tejido adiposo *beige/brite*, que a pesar de tener algunas características específicas no están tan bien caracterizados como los dos primeros. La principal función de los adipocitos del BMAT es participar en la regulación hematopoyética, aunque hay

evidencias de que su actividad repercute en el metabolismo sistémico y el recambio óseo [25].

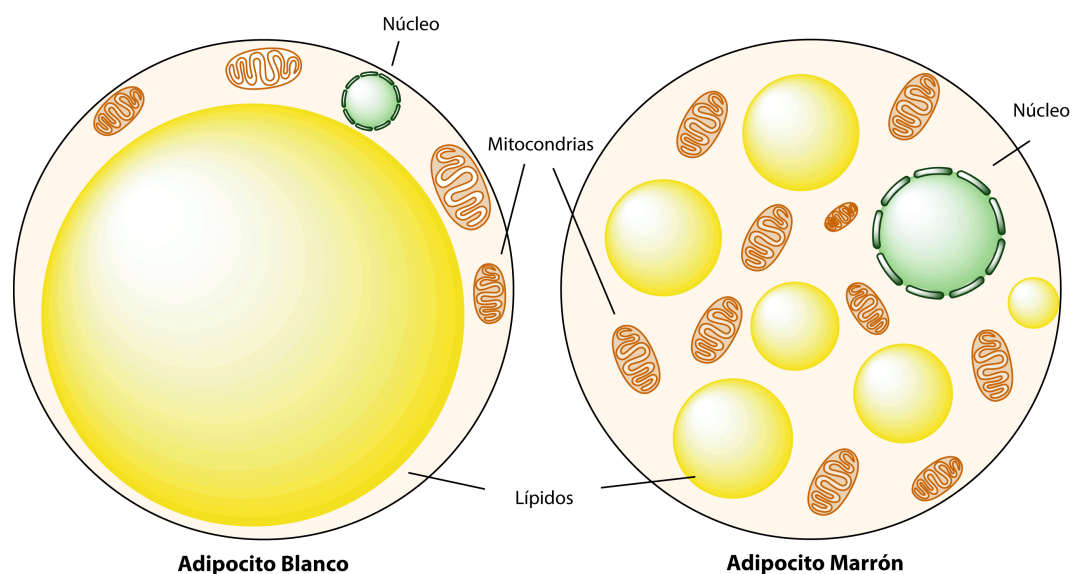


Figura 1. Esquema del adipocito blanco y adipocito marrón.

El tejido adiposo *beige/brite* podría clasificarse como un subtipo del WAT y/o BAT, ya que sus adipocitos presentan características intermedias entre el adipocito blanco y el adipocito marrón, cuya biología se explicara posteriormente.

### 1.1.1. Tejido Adiposo Blanco

Anatómicamente, el WAT [23] está distribuido a lo largo de todo el cuerpo humano, distinguiéndose dos subtipos de AT: el tejido adiposo subcutáneo (SAT, del inglés *subcutaneous adipose tissue*) situado bajo la piel, principalmente en la región abdominal y la región glúteo-femoral; y el tejido adiposo visceral (VAT, del inglés *visceral adipose tissue*), el cual se encuentra rodeando diversos órganos internos y según su localización, se conoce como mesentérico, omental, mediastinal y epicardial. En la figura 2 se muestra la distribución de los diferentes tipos de WAT.

La distribución anatómica del WAT determina diferentes características metabólicas y endocrinas [26, 27]. Los depósitos mamarios y aquellos



## Introducción

localizados en la zona glútea presentan mayor sensibilidad a estrógenos [28, 29] mientras que el WAT localizado en la espalda y el cuello parece ser más sensible a la acción de los glucocorticoides [30-32]. El VAT se caracteriza por tener un perfil de secreción de citoquinas pro-inflamatorio con una mayor producción de adipocinas inflamatorias que el tejido subcutáneo [33]. Un exceso de ácidos grasos libres (FFA, del inglés *free fatty acids*) y citoquinas pro-inflamatorias en el sistema portal produce una resistencia a la insulina en el hígado y aumenta la producción de glucosa y lipoproteínas, favoreciendo la aparición de dislipemia hiperglucemia e hiperinsulinismo [34].

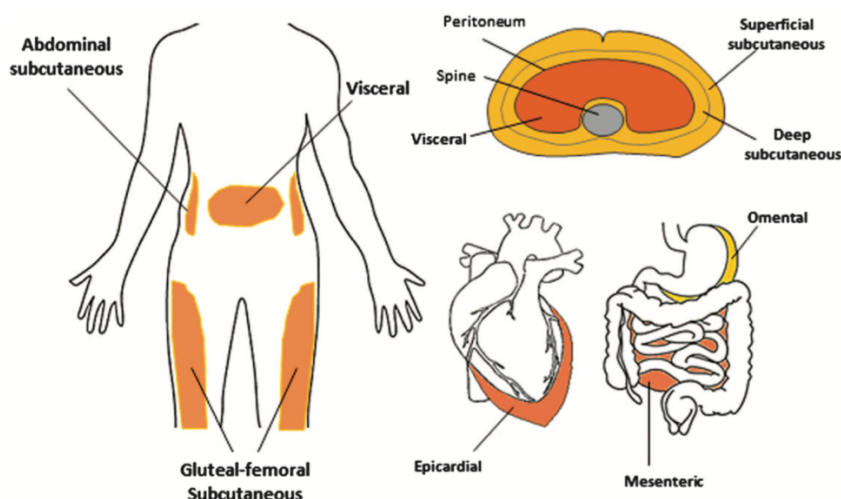


Figura 2. Distribución del TAB [35].

Tal y como se ha comentado anteriormente, una de las principales funciones del WAT es el almacenamiento de energía en forma de depósitos lipídicos, que contribuye al mantenimiento de la homeostasis energética. Cuando el balance energético es positivo, los excesos de lípidos se almacenan inicialmente en el WAT subcutáneo en forma de triglicéridos, previniendo depósitos ectópicos de lípidos y complicaciones metabólicas como la lipodistrofia [36].

La principal célula del WAT es el **adipocito blanco**, un tipo celular derivado de las ASCs cuya principal función es almacenar lípidos, principalmente triglicéridos [37]. Se caracterizan por presentar una única vesícula de lípidos que ocupa prácticamente el total del citoplasma, de forma que el núcleo y los

orgánulos quedan desplazados a una zona estrecha en la periferia. El tamaño de los adipocitos del WAT es variable, desde 25 a 200  $\mu\text{m}$ , y son capaces de aumentar o disminuir su tamaño, en función del balance energético y la necesidad de almacenar lípidos. En aquellas situaciones en las que de manera crónica el balance energético es positivo se produce una expansión del AT caracterizado en primera instancia por una hipertrofia, aumento del tamaño de los adipocitos, seguido de una hiperplasia (aumento del número de adipocitos). Actualmente se sabe que el tamaño de los adipocitos es un factor determinante para su funcionalidad. Así por ejemplo, se ha descrito que los adipocitos hipertróficos son metabólicamente disfuncionales y no responden de forma adecuada a la insulina, lo que favorece la acumulación de depósitos grasos de manera ectópica y el desarrollo de resistencia a la insulina [38-40].

La síntesis de TG [37] es un proceso altamente regulado que en situaciones fisiológicas se produce principalmente en los adipocitos que conforman el AT, pero también en el hígado, músculo, corazón y páncreas. Esta vía metabólica anabólica es crucial para mantener la homeostasis energética a través de una comunicación continua entre el AT y los tejidos oxidativos como el músculo. La captación de triglicéridos por parte de los adipocitos se lleva a cabo mediante el complejo enzimático de la lipoproteinlipasa (LPL) [41], el cual hidroliza ácidos grasos de quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, del inglés *very low density lipoprotein*) presentes en el torrente sanguíneo, permitiendo su utilización por parte del adipocito. El proceso de esterificación de los ácidos grasos en TG implica la conversión de los FFA en Acil-CoA, a través de la formación de monoacilglicerol (MAG) y diacilglicerol (DAG), y posterior reacción con el glicerol-3-fosfato (G3P) (Figura 3). Numerosas hormonas controlan la lipogénesis, por ejemplo, la insulina, además de estimular la adipogénesis (formación de nuevos adipocitos) favorece la síntesis lipídica, mientras que el glucagón y las catecolaminas promueven la fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa [42] e inhiben este proceso. Tanto el glicerol plasmático, como los FFA son las principales fuentes de G3P y Acil-CoA, no obstante, estos sustratos pueden ser también sintetizados de novo, aunque este proceso se produce principalmente en el hígado [43].

## Introducción

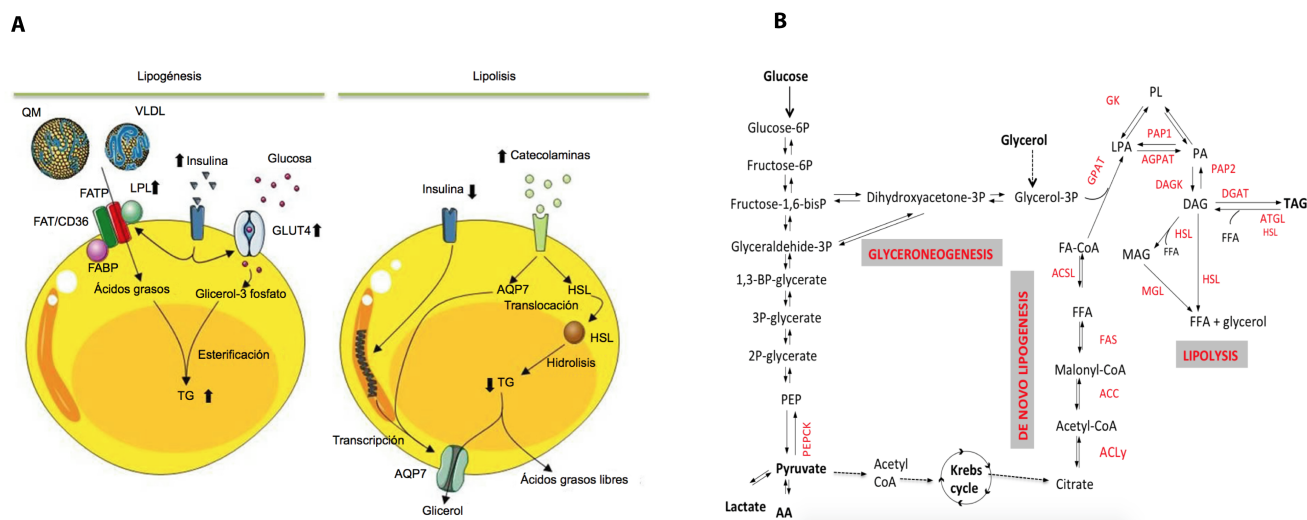


Figura 3. Bioquímica del adipocito blanco. (A) Representación de la bioquímica celular [6]. (B) Representación de las rutas lipolíticas y lipogénicas [43].

En situaciones de necesidad energética, los adipocitos liberan lípidos en forma de ácidos grasos y glicerol, mediante la activación de un proceso catabólico conocido como lipólisis, para ser posteriormente oxidados en tejidos periféricos como el músculo o el hígado.

La hidrólisis de TG requiere de la acción consecutiva de varias lipasas (Figura 3). En primer lugar, se produce la hidrólisis de los TG en DAG a través de la acción de la adipo-tiglicérido lipasa (ATGL) o se hidrolizan en DAG o MAG mediante la acción de la lipasa sensible a hormonas (HSL, del inglés *hormone-sensitive lipase*). En último término, la acción de la MGL y/o HSL producirán FFA que entrarán en el ciclo de Krebs como Acetil-Coa. De este modo la célula obtiene la energía necesaria [43].

Además de su papel en el almacenamiento de energía, hoy en día está totalmente aceptado que el WAT tiene también una importante función endocrina, ya que secreta diversos péptidos bioactivos llamados adipocinas [44, 45]. Estos factores son secretados tanto por los adipocitos como por la SVF y actúan de forma autocrina, endocrina y paracrina en el propio tejido adiposo y sobre otros órganos. Se han identificado una gran diversidad de adipocinas, entre las que se encuentran citoquinas clásicas, factores de

crecimiento así como proteínas implicadas en la homeostasis glucídica, la angiogénesis y reactantes de fase aguda. A continuación resumimos las características y las funciones de algunas de las adipocinas más conocidas [46]:

- **Adiponectina:** Aumenta la sensibilidad a la insulina, disminuye la producción hepática de glucosa y aumenta la oxidación de ácidos grasos. Es capaz de modular la actividad del factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B, del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated beta-cells*) e inhibir el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- $\alpha$ , del inglés *tumor necrosis factor alpha*). Se ha observado una relación inversa entre los niveles circulantes de adiponectina y el riesgo de obesidad, diabetes tipo 2 (T2D, del inglés *type 2 diabetes*) y enfermedad cardiovascular [1, 45, 47, 48].
- **Leptina:** La leptina actúa como una señal sobre el hipotálamo al que informa del estado de las reservas energéticas y su secreción reduce el apetito y aumenta el gasto energético [49]. Las concentraciones de leptina en plasma se encuentran elevadas en la obesidad, y se relacionan con los depósitos de energía, de forma que sus niveles aumentan de forma proporcional a la ganancia de peso y disminuyen con la pérdida de peso [50].
- Otras adipocinas: Resistina, Adipsina (estimula el almacenaje de triglicéridos en los adipocitos), interleuquina-6 (función proinflamatoria), omentina (potencia las acciones de la insulina). La desregulación en la secreción de adipocinas existente en la obesidad explica parte de la patología asociada a esta enfermedad [46].

### 1.1.2. Tejido Adiposo Marrón

El BAT [24] es un órgano capaz de disipar la energía química en forma de calor controlando así la temperatura corporal. El avance realizado en los últimos años en referencia a la fisiología de este tejido sugiere que su funcionalidad no sólo es clave en situaciones de hipotermia sino también en el desarrollo de patologías como la obesidad.

## Introducción

Los adipocitos marrones son de menor tamaño que los adipocitos blancos, y a diferencia de éstos, los lípidos están distribuidos en varias vacuolas de grasa y contienen un gran número de mitocondrias alargadas. Estas características morfológicas, junto con una importante red de vascularización son responsables del color oscuro característico de este tejido. En el BAT los lípidos contenidos en las vesículas se utilizan como sustrato para la fosforilación oxidativa y la producción de calor. Esta función depende de la actividad de la proteína desacopladora tipo 1 (UCP-1, del inglés *uncoupling protein 1*), que es característica de este tipo de adipocitos. La UCP-1 que se localiza en la membrana interna de la mitocondria actúa como un translocador de protones hacia dentro de la mitocondria, disipando el gradiente electroquímico que conduce a la síntesis de adenosín trifosfato (ATP, del inglés *adenosine triphosphate*), de forma que la energía se pierde en forma de calor, como se puede ver en la figura 4.

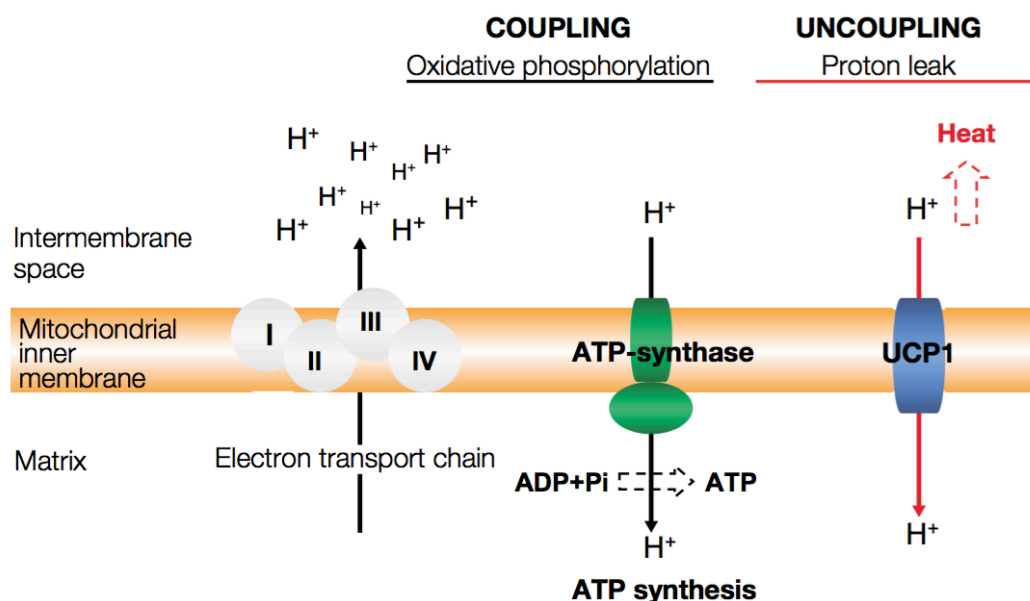


Figura 4. UCP1 en la membrana mitocondrial [51].

Hasta hace poco se creía que, en humanos, este tejido estaba presente solo en los neonatos y niños pequeños, desapareciendo a medida que se alcanzaba la edad adulta. Sin embargo, estudios recientes evidencian la

presencia de BAT en adultos. Utilizando técnicas de PET-CT (del inglés *positron emission tomography - computed tomography*), se ha demostrado la captación intensa de fluorodesoxiglucosa (FDG) por focos de tejido adiposo en localizaciones características, como la región supraclavicular, paravertebral, renal y nual, que una vez biopsiado ha demostrado presentar las características bioquímicas de BAT [11, 52, 53].

El tejido adiposo marrón, gracias a su capacidad de gastar energía en forma de calor, se correlaciona negativamente con el peso corporal, de forma que una cantidad elevada de BAT parece ejercer un papel protector contra todas las enfermedades derivadas de la obesidad [54]. La actividad y cantidad del BAT está regulada por diversos factores endocrinos, ambientales y nutricionales [55]. Uno de los estímulos más potentes del BAT es la **exposición al frío**. Utilizando pruebas de imagen se ha demostrado que hay una mayor cantidad de BAT en invierno que en verano [56-59]. Además, la captación de FDG por parte del BAT es mayor en aquellos individuos que han sido sometidos a bajas temperaturas antes del estudio que en aquellos que fueron sometidos a un ambiente templado, indicando una mayor actividad del BAT en los primeros [10, 60]. En el BAT, la capacidad de captar glucosa se acompaña con un aumento en la capacidad oxidativa [61], aumento del consumo de oxígeno y una mayor irrigación sanguínea [62]. Numerosos estudios en ratones demuestran que una exposición prolongada al frío aumenta la masa del BAT e induce la conversión de los adipocitos blancos del SAT a adipocitos morfológicamente y funcionalmente muy similares a los adipocitos marrones presentes en el BAT, un proceso conocido como "*browning*" [63, 64].

La estimulación del BAT en respuesta al frío se produce a través del **sistema nervioso simpático (SNS) y las catecolaminas**. El BAT está innervado por los nervios simpáticos, los cuales ejercen un papel regulador sobre los adipocitos liberando adrenalina y noradrenalina (NA) [65]. En esta regulación también participan otras catecolaminas circulantes. Diferentes estudios en pacientes con feocromocitoma (tumor de la médula suprarrenal) concluyen que los niveles de catecolaminas en sangre se relacionan con la actividad del BAT [66, 67]. La NA regula el adipocito marrón vía receptores  $\beta$ -

## Introducción

adrenérgicos ( $\beta$ -AR, del inglés *beta-adrenergic receptors*). La activación de estos receptores induce una cascada de reacciones intracelulares en las que participa la proteína quinasa A (PKA, del inglés *protein kinase A*), cuya actividad depende del AMPc (del inglés *cyclic adenosine monophosphate*). La consecuencia final de esta ruta celular será principalmente la activación transcripcional y expresión del gen UCP1 [68], el incremento de la captación de glucosa por parte de la célula y la lipólisis, aumentando así la capacidad termogénica del adipocito marrón [69].

Otras hormonas, como las tiroideas [11], la insulina [70, 71], la irisina [72], las hormonas sexuales [73], los mineralocorticoides [74], el factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF-21, del inglés *fibroblast growth factor-21*) [75], las proteínas morfológicas óseas (BMP, del inglés *bone morphogenic proteins*) [76] o los péptidos natriuréticos atriales (ANP, del inglés *atrial natriuretic peptide*) y ventriculares (BNP, del inglés *brain natriuretic peptide* o *B-type natriuretic peptide*) [77], entre otras, ejercen también un papel importante en la funcionalidad del BAT.

Recientemente, algunos estudios proponen que al igual que el WAT, el BAT podría tener también un importante papel endocrino [78]. A continuación se detallan algunos de sus productos:

- **Triyodotironina ( $T_3$ ):** los adipocitos marrones sintetizan  $T_3$  a partir de tiroxina ( $T_4$ ), hormona que de manera autocrina estimula la expresión de UCP1 y el aumento del número de mitocondrias, induciendo la actividad termogénica del BAT [79]. Actualmente se desconoce si la  $T_3$  secretada por el BAT podría tener también efectos paracrinos o endocrinos.
- **FGF-21:** Promueve la oxidación de la glucosa y ácidos grasos en diferentes tejidos, entre ellos el hígado o el WAT, en periodos de ayuno o de dieta cetogénica [80, 81]. En ratones, tiene un papel protector contra la obesidad y la T2D [82]. Aumenta la actividad termogénica del BAT e induce además su secreción por parte de los adipocitos marrones [83]. In vitro, el tratamiento de WAT con FGF-21 induce la expresión de genes termogénicos, como UCP-1,

induciendo un proceso de “*Browning*” sobre los adipocitos blancos [84]. El FGF-21 actúa además sobre otros tejidos como el sistema nervioso central, el páncreas o el corazón. Su función en estos órganos va dirigida a un mayor consumo metabólico y a la provisión de sustratos para la termogénesis [78].

- Otras moléculas secretadas por el BAT son, entre otras: Prostaglandinas, angiotensinógeno, interleukina-1- $\alpha$  (IL-1- $\alpha$ ), retinol-binding protein-4 o la interleukina-6 (IL-6).

### 1.1.3. Tejido Adiposo *Beige*

El adipocito *beige* (también conocido como *brite*), de forma similar al adipocito marrón, está especializado en disipar energía en forma de calor. Ambos comparten características similares; alto número de mitocondrias, fracciones diversas de lípidos y la expresión de la proteína UCP-1. Sin embargo, como se explicará en el siguiente apartado, el adipocito marrón y el adipocito *beige* parecen proceder de diferentes precursores mesodérmicos [85-87]. Este aspecto se comenta con más detalle en el punto 1.2. El adipocito *beige* es uno de los mayores ejemplos de la plasticidad del tejido adiposo, pudiendo almacenar energía o consumirla en base a las necesidades del organismo. Aun así, los factores que producen el desarrollo de estos adipocitos están aún por dilucidar. A día de hoy se considera que el inductor más potente del adipocito *beige* es el frío, el cual actuaría sobre el sistema nervioso simpático produciendo elevadas cantidades de catecolaminas, que inducirían la aparición de estos adipocitos en el tejido adiposo subcutáneo y por tanto activaría el proceso termogénico por parte del tejido adiposo. Tanto la adaptación al frío como al calor parecen tener un efecto sobre la morfología y funcionalidad de los adipocitos *beige* [63, 88].



## 1.2. DESARROLLO Y DIFERENCIACIÓN DE LOS ADIPOCITOS

Durante el desarrollo embrionario se ha postulado que los adipocitos provienen de células madre mesenquimales (MSCs, del inglés *mesenchymal stem cells*). Sin embargo, hay una gran diversidad entre ellos durante el proceso de diferenciación, de hecho, el adipocito marrón comparte más características funcionales y biológicas con las células musculares que con el adipocito blanco [85, 89].

El proceso de diferenciación de los adipocitos ha sido ampliamente estudiado gracias a diferentes modelos celulares murinos de preadipocitos blancos (principalmente 3T3-L1 y 3T3-F442A) y preadipocitos marrones [90]. El proceso se inicia con la diferenciación inicial de las MSCs a preadipocitos, células predeterminadas que proliferarán hasta alcanzar un determinado nivel de confluencia, de forma que el contacto entre ellas produce una parada en la proliferación, iniciándose la diferenciación a adipocitos [91]. Este proceso está controlado por diversos factores de transcripción, entre los que destaca el receptor de peroxisoma proliferador-activado gamma (PPAR- $\gamma$ , del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) cuya expresión es inducida por la familia de las proteínas de unión al potenciador CCAAT (C/EBP, del inglés *CCAAT/enhancer binding protein*), unos factores que se expresan desde etapas tempranas de la diferenciación. El papel tanto de PPAR- $\gamma$  como de los C/EBP es indispensable para el desarrollo del adipocito blanco y marrón, y actúan de forma cooperativa induciendo la expresión de genes involucrados en el almacenamiento de lípidos, el metabolismo lipídico y la secreción de citoquinas [92].

Hasta hace poco se creía que los precursores mesenquimales que expresaban la proteína myf-5 estaban predeterminados a diferenciarse a adipocitos marrones o células musculares, y que aquellos que eran myf-5 negativos, se diferenciaban a adipocitos blancos. Hoy en día se sabe que esto no es así; los adipocitos presentan una enorme plasticidad durante su desarrollo, y el hecho de que un preadipocito se desarrolle a adipocito blanco o marrón parece depender de factores como la localización del tejido o los

efectos de diversas citoquinas, estímulos u hormonas como la insulina [93]. De esta forma, según datos procedentes de estudios en modelos animales, los adipocitos presentes en la zona dorso anterior provienen de un precursor *myf5+*, mientras que los presentes en la región ventral posterior provienen de un precursor *myf5-*, desarrollándose en ambas zonas los diferentes tipos de adipocitos independientemente de la expresión de *myf5* por parte del precursor [93].

En el **adipocito blanco** el proceso de diferenciación ocurre mediante la interacción de numerosas proteínas y factores de transcripción. A modo de resumen, se sabe que en fases iniciales de la diferenciación, C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  activan C/EBP $\alpha$  y PPAR-gamma, este último factor clave para promover la diferenciación del adipocito [94]. C/EBP $\alpha$  aparece en las etapas finales de la diferenciación, siendo un factor crítico para la captación de glucosa y actúa junto a PPAR- $\gamma$  en un proceso de retroalimentación positiva, manteniendo el estado de célula diferenciada [95, 96].

En el caso de desarrollo del **adipocito marrón** también es requerida la activación de PPAR- $\gamma$ , el cual actuará junto al factor de célula B temprano 2 (Ebf2, del inglés *early B cell factor 2*) promoviendo la expresión de la proteína 16 con dominio homólogo a PRD1-BF-RIZ1 (PRDM16, del inglés *PRD1-BF-RIZ1 domain containing 16*) [97]. PRDM16 se unirá a PPAR- $\gamma$ , siendo esto el factor clave que diferencia el desarrollo del adipocito marrón respecto al blanco. Se considera que PRDM16 es uno de los principales responsables de la expresión de la mayoría de los genes implicados en la termogénesis característica del adipocito marrón, entre ellos UCP-1 [85, 97].

La diferenciación, desarrollo y función de las células adiposas marrones se ve favorecida por factores ya mencionados como la exposición al frío [53], la hormona T3 [98], catecolaminas [99] o FGF-21 [84]. Una característica de los adipocitos marrones activos es la expresión de factores de transcripción como PPAR- $\alpha$  y el coactivador 1 alpha del receptor de peroxisoma proliferador-activado gamma (Pgc1 $\alpha$ , del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) [89].

## Introducción

La diferenciación de los denominados **adipocitos *beige*** también requiere de la activación de PPAR- $\gamma$ . A día de hoy se considera que el adipocito *beige* proviene del mismo precursor celular que el adipocito blanco. Además, se ha demostrado que algunos adipocitos maduros blancos pueden adquirir características propias de adipocitos *beige* mediante un proceso conocido como de transdiferenciación [100]. Así, se ha demostrado que estas células son capaces de reprogramar su maquinaria ante diversos estímulos, de forma que aumentan el número de mitocondrias y se expresa la proteína UCP1. *In vivo* por ejemplo, el tratamiento con rosiglitazone produce adipocitos *beige* a partir de adipocitos blancos en el WAT epididimal e inguinal de ratón [101, 102]. Por otro lado, la exposición al frío o el tratamiento de receptores  $\beta$ -AR por agonistas como la NA estimula la formación de adipocitos *beige* activos a partir de depósitos de WAT inguinal e epididimal de ratón [103]. Al igual que sucede durante el desarrollo del adipocito marrón, en el caso del adipocito *beige* también se ha demostrado que aumenta la estabilidad de PRDM16 y se produce la desacetilación de PPAR- $\gamma$ , de forma que ambos actúan activando genes imprescindibles para el desarrollo del fenotipo termogénico de estas células [89].

A pesar de que los adipocitos *beige* comparten factores de transcripción importantes con los adipocitos marrones (PPAR- $\gamma$ , PRDM16, Pgc1 $\alpha$  y C/BEPs), se comportan de manera diferente ante algunos estímulos. Por un lado, los agonistas  $\beta$ -AR y la exposición al frío activan el WAT y también favorecen la aparición de adipocitos *beige* a través de la activación de Pgc1 $\alpha$ , que como se ha explicado previamente, es un factor de transcripción característico del adipocito marrón maduro. Otros factores con efectos similares serían la rosiglitazone, irisina, FGF-21 y los péptidos natriuréticos [103]. No obstante, existen estímulos como la hormona T3 o el tratamiento agudo con NA, que activan el desarrollo de adipocitos marrones pero no estimulan el desarrollo de adipocitos *beige* a partir de adipocitos blancos [104, 105].

En resumen, el desarrollo de cualquier tipo de adipocito requiere de la expresión de PPAR- $\gamma$ . A partir de aquí el proceso diverge en función del tipo de adipocito. En los adipocitos blancos, PPAR- $\gamma$  actúa junto C/EBP $\alpha$  para finalizar

y mantener la diferenciación. En los adipocitos marrones, PPAR- $\gamma$  actúa junto a PRDM16, induciendo la expresión de UCP1 y del resto de la maquinaria termogénica. En el caso de los adipocitos *beige*, el proceso no está del todo definido ya que pueden proceder de un precursor de adipocito blanco pero también de un adipocito maduro. En ambos casos parece existir un cambio en el patrón de expresión factores de transcripción como PRDM16 o Pgc1 $\alpha$ .

## 2. OBESIDAD Y CO-MORBIDADES ASOCIADAS

La obesidad se define como un acúmulo excesivo de grasa corporal que puede ser perjudicial para la salud [106], independientemente de cuál sea su localización. Sin embargo, tal y como ya se ha comentado, debido a las diferencias funcionales del tejido adiposo dependiendo de su localización y origen embrionario, la distribución de la grasa puede determinar un mayor riesgo de aparición de enfermedades relacionadas. La obesidad es uno de los mayores problemas de salud y entre las diez principales causas de mortalidad observadas entre los años 2000 y 2012 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [107] se encontraban 3 enfermedades cuyo riesgo está directamente relacionado con la obesidad como son la cardiopatía isquémica, el accidente cerebrovascular y la diabetes mellitus.

La forma más utilizada de medir este exceso de adiposidad en adultos se conoce como índice de masa corporal (IMC), definido como el cociente del peso en kilogramos y la talla en metros al cuadrado ( $\text{Kg/m}^2$ ), que se correlaciona con la grasa corporal [108]. Un IMC superior a 25 determina sobrepeso y uno superior a 30 obesidad. La tabla 1 muestra la clasificación de los distintos grados de obesidad y sobrepeso según la OMS [109].

Si bien el IMC puede ser muy útil para la clasificación de pacientes de forma epidemiológica por su simplicidad, hay que señalar que la utilización del IMC como medida de exceso de acumulo de grasa tiene una serie de limitaciones. A nivel individual, no distingue la diferente contribución al peso total del individuo de la masa magra y de la masa grasa. Además, el IMC no refleja los cambios que se producen con la edad ni las diferencias entre distintos grupos étnicos o entre sexos [110]. Por este motivo, en la edad pediátrica se han establecido unos puntos de corte ajustados para la edad y el sexo para definir la obesidad en función del IMC [111], y se recomienda su utilización como método de cribado en niños de 5 años o más, utilizándose otros métodos más específicos para la cuantificación de la grasa corporal, siendo la medición de los pliegues cutáneos la de mayor implantación. Otras técnicas utilizadas son

densitometría hidrostática (DH), absorciometría de rayos X de dos energías (DEXA, del inglés *dual-energy X-ray absorptiometry*) e impedancia bioeléctrica (IB).

Clasificación	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	Riesgo de comorbilidades
<b>Bajo peso</b>	<b>&lt;18,50</b>	<b>Bajo</b>
Delgadez severa	<16,00	
Delgadez moderada	16,0 - 16,90	
Delgadez leve	17,00 - 18,49	
<b>Normal</b>	<b>18,50 - 24,99</b>	
<b>Sobrepeso</b>	<b>&gt;=25,00</b>	<b>Elevado</b>
Pre-obeso	25,00 - 29,99	
<b>Obesidad</b>	<b>&gt;=30,00</b>	<b>Alto</b>
Obesidad leve	30,00 - 34,99	
Obesidad media	35,00 - 39,99	
Obesidad mórbida	>=40,00	

Tabla 1. Clasificación del IMC según la OMS [112].

En los últimos años, y según datos de la OMS [109], la prevalencia de la obesidad en personas adultas ha aumentado progresivamente. El número de obesos se ha multiplicado por más de dos desde el año 1980. En 2014 más de 1900 millones de personas mayores de 18 años padecían sobrepeso y 600 millones eran obesos, lo que representa alrededor del 39% y 13% de la población mundial, respectivamente.

Las cifras registradas en menores de 18 años son igualmente preocupantes. El número de niños con obesidad no ha dejado de incrementar, y aunque se suele asociar esta patología a los países desarrollados, su mayor crecimiento se da en áreas urbanas de países en vías de desarrollo. En el año 2013 más de 42 millones de niños menores de 5 años padecían sobrepeso, de los cuales más de 35 vivían en países de ingresos medios o bajos.

## Introducción

Es por todo esto que hoy en día se considera que la obesidad tiene un comportamiento epidémico y su aumento progresivo puede llevar a causar una disminución de la esperanza de vida [113].

### **2.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD**

La obesidad es una enfermedad caracterizada por una desregulación hormonal y metabólica, cuya etiología y fisiopatología todavía no está bien establecida. Sabemos que el peso corporal está determinado por la interacción de factores genéticos, fisiológicos, psicosociales y ambientales que afectan a la disponibilidad de los alimentos y al gasto energético. Cuando una ingesta calórica es excesiva y no se compensa con un incremento del gasto energético, el exceso de energía se acumula en forma de depósito de grasa [114].

El sistema nervioso central (SNC), en especial el hipotálamo, es responsable de regular el balance energético. En función de las señales que recibe de la periferia, desencadena respuestas encaminadas a regular la ingesta y el gasto energético. A nivel periférico, las hormonas gastrointestinales, el SNS y algunos mediadores del AT son capaces de actuar a nivel del SNC para regular la saciedad y la adiposidad a través de la secreción de péptidos orexigénicos y anorexigénicos [115].

Se ha estimado que hasta el 70% de la variación inter-individual del peso corporal puede ser debido a causas genéticas [116]. Algunas formas monogénicas de obesidad afectan a genes que codifican proteínas como la leptina y su receptor, el receptor de melanocortina 4 y la pro-opiomelanocortina, entre otros. Estos genes se expresan principalmente en el SNC y están implicados en la homeostasis energética, sin embargo, sólo un porcentaje pequeño de las obesidades severas infantiles son de origen monogénico en humanos [117]. La epigenética entendida como la interacción entre genes y ambiente, capaz de provocar modificaciones en la transcripción y la traslación

de genes sin cambiar la secuencia de nucleótidos, también podría determinar diferencias interindividuales y en los factores fenotípicos de la obesidad.

Entre los factores que favorecen el aumento de la prevalencia de la obesidad también están factores socioculturales, como el cambio en los patrones de ingesta y en la actividad física asociados al desarrollo tecnológico. La mayor disponibilidad de alimentos junto a una disminución de la actividad física facilitan un balance energético positivo.

A nivel celular, son numerosas las moléculas descritas que controlan la homeostasis energética. Hoy en día se sabe que el balance energético a corto y largo plazo se controla a través de una maraña de señales que se producen por numerosos tejidos (ej. Tejido adiposo, tracto gastrointestinal, etc) así como por el microbioma, y que son capaces de actuar localmente y/o a distancia regulando la ingesta y el gasto energético [118]. Además del hipotálamo, otras regiones corticales pueden regular el balance energético a través de estímulos neurosensitivos y procesos cognitivos más difíciles de evaluar y que están relacionados con el efecto hedónico de los alimentos.

En condiciones normales, la secreción de insulina por parte de la célula beta pancreática en respuesta a la ingesta de nutrientes, favorece la acumulación de glucosa en forma de glucógeno en el músculo y el hígado, y el almacenaje de lípidos en el tejido adiposo [119]. En el caso de éste último, se ha descrito que los adipocitos, para intentar mantener el equilibrio energético, secretan hormonas como la leptina que tiene una acción supresora de la ingesta y activa el SNS [120, 121]. Esto último produce la liberación de adrenalina y NA que actúan sobre el BAT y son responsables de la activación de la termogénesis asociada a estados post-pandriales [122], pero estos mecanismos reguladores se desequilibran en situaciones en las que el balance energético positivo es sostenido en el tiempo. Existen varias teorías, no excluyentes entre ellas, que tratan de conectar la obesidad con el desarrollo de resistencia a la insulina y T2D. Por un lado tendríamos la teoría de la “expansibilidad del tejido adiposo”, según la cual a pesar de su gran plasticidad, el adipocito tiene una capacidad de expansión limitada por lo que



## Introducción

un balance energético positivo crónico puede producir la acumulación ectópica de lípidos, principalmente a nivel visceral, lo que está altamente asociado con procesos lipotóxicos [123]. Por otro lado, el estrés que sufre el adipocito al verse superado por la presión anabólica, está directamente relacionado con la alteración de su función endocrina y el desarrollo de una respuesta proinflamatoria a nivel local en el tejido adiposo [124], situación que tal y como se detallará más adelante, y al igual que la lipotoxicidad está directamente relacionado con el desarrollo de resistencia a la insulina y T2D.

La figura 5 resume los mecanismos celulares involucrados en el desarrollo del estado inflamatorio en la obesidad.

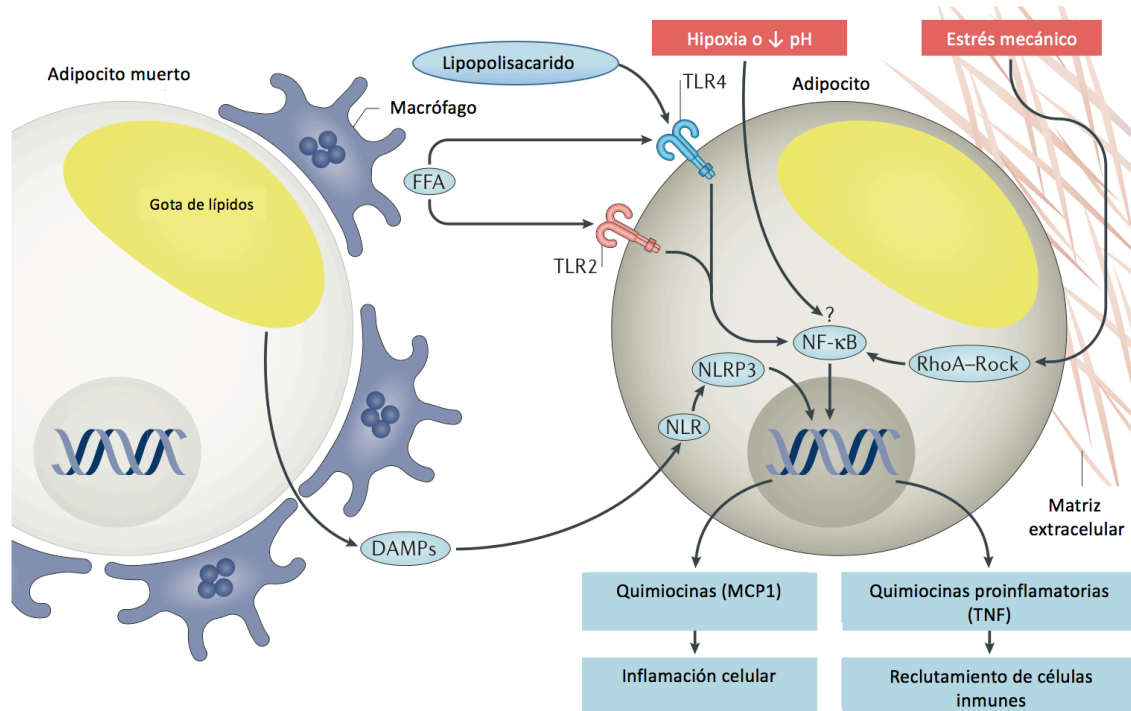


Figura 5. Vías proinflamatorias en la obesidad. Adaptado de [124]. Tanto los lipopolisacáridos como los FFA de la dieta activan receptores de tipo TLR (del inglés, Toll-like receptor), desencadenando la cascada de señalización celular de NF-κB, que resulta en la síntesis y secreción de quimiocinas como MCP1 (del inglés, monocyte chemoattractant protein 1) que atrae a macrófagos proinflamatorios [125]. De hecho, en los individuos obesos la expresión de TLR2 y TLR4 está aumentada, indicando la asociación de estos receptores con el estado inflamatorio de la obesidad [126].

Otros mecanismos implicados en la inflamación y disfuncionalidad del AT en situaciones de obesidad son la hipoxia y el estrés mecánico [127, 128], así como la alteración de la composición de células inmunes característica del tejido en un contexto no patológico.

El tejido adiposo en situaciones fisiológicas normales contiene células inmunes que colaboran en mantener la integridad celular y en la sensibilidad hormonal de los adipocitos. Sin embargo, en la obesidad se produce una alteración de diferentes poblaciones de células inmunes[129]. Así por ejemplo, estudios en humanos y ratones concluyen que se produce un reclutamiento de macrófagos de tipo M1 (proinflamatorios), que secretan citoquinas como el TNF o la interleukina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) [130]. La combinación del aumento de macrófagos y del ratio de macrófagos tipo M1 respecto al tipo M2 (de perfil antiinflamatorio) que se produce en la obesidad se asocia con el desarrollo de resistencia a la insulina y de otras enfermedades metabólicas [131].

## **2.2. TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD**

El tratamiento de la obesidad tiene como objetivo reducir el depósito de grasa, y la estrategia va a depender del grado de obesidad y de las comorbilidades asociadas. Actualmente, las opciones terapéuticas se pueden clasificar en tres grandes grupos: cambios en estilo de vida, farmacoterapia y cirugía bariátrica.

La primera línea terapéutica consiste en la introducción de cambios en estilo de vida con la modificación de la dieta y la actividad física [114]. El objetivo es conseguir una pérdida moderada y mantenida de peso con mejoría de la calidad de vida del paciente. La efectividad del tratamiento generalmente depende de la intensidad de la intervención, siendo mayor si la frecuencia de visitas es alta y mantenida en el tiempo, e impartida por personal especializado. Desafortunadamente, frecuentemente se produce una recuperación del peso perdido cuando se finalizan los periodos de intervención, que esta relacionado con una disminución en la adherencia a las recomendaciones y a mecanismos compensatorios endógenos [132].

El segundo escalón terapéutico es el tratamiento farmacológico, adyuvante a la dieta y el ejercicio físico, para conseguir una pérdida mayor de peso y de

## Introducción

forma mantenida. A pesar de que la pérdida de peso asociada a la utilización de fármacos suele ir acompañada de mejoría en el perfil metabólico y de la calidad de vida [133], hay que tener en cuenta que en algunos casos puede ir acompañada de efectos secundarios como aumento de la frecuencia cardíaca [134, 135]. La utilización de fármacos suele ser inferior a la esperada ante la prevalencia alta de obesidad en la población, y esto es debido diversos factores entre los que se encuentran por un lado, la decepción de los pacientes ante una pérdida de peso que consideran insuficiente, ya que la pérdida media de peso que se observa no supera en términos generales el 10%. Por otro lado, el alto coste de los fármacos hace que se puedan utilizar sólo durante periodos cortos de tiempo. Y por último, la recuperación del peso es frecuente tras su suspensión. En la actualidad se disponen de dos tipos de fármacos para el tratamiento de la obesidad; aquellos que actúan disminuyendo la absorción de nutrientes como el Orlistat, un inhibidor de la lipasa pancreática; y aquellos que actúan a nivel del SNC disminuyendo la ingesta de alimentos como la fentermina, la fentermina con topiramato, la naltrexona-bupropion, la lorcaserina y la liraglutida [136].

La figura 6, muestra los resultados obtenidos con cambios en estilo de vida y la utilización de fármacos, y observamos que pérdidas de al menos un 10% del peso corporal se observa en aproximadamente un 30-40% de los pacientes tratados, mientras que los que pierden al menos el 5% del peso rondan el 70-80% de pacientes [133]. Sin embargo, estas pérdidas son insuficientes en la mayoría de pacientes con obesidad mórbida, motivo por el cual la utilización de la cirugía bariátrica se ha introducido como una técnica más exitosa para conseguir mejores resultados terapéuticos

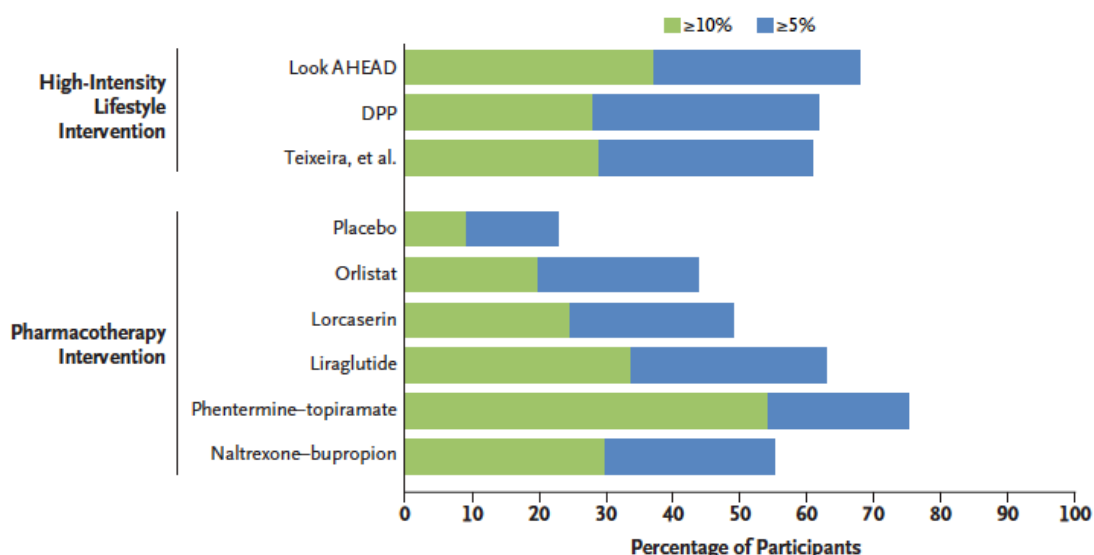


Figura 6. Resultados de la farmacoterapia y el estilo de vida en el tratamiento de la obesidad. Extraída de [133].

### 2.2.1. Cirugía bariátrica

Los objetivos de la cirugía bariátrica son conseguir y mantener pérdidas de peso significativas en pacientes con obesidad mórbida y prevenir la aparición de co-morbilidades asociadas a la obesidad. No obstante, no todos los pacientes obesos son candidatos a realizar cirugía bariátrica y han de cumplir una serie de criterios (especificados en la tabla 2) para intentar optimizar los resultados.

BMI $\geq 40$ kg/m <sup>2</sup> .
BMI $\geq 35$ kg/m <sup>2</sup> con comorbilidades relacionadas con la obesidad.
Edad entre 16 y 65 años.
Riesgo quirúrgico aceptable.
Ineficacia de medidas no quirúrgicas para perder peso a largo plazo.
Paciente psicológicamente estable y sin esquizofrenia o depresión severa.
El paciente esta informado sobre su enfermedad y recibe apoyo social y/o familiar.
El paciente esta comprometido a modificar su estilo de vida y a abandonar el consumo de alcohol o cualquier sustancia de abuso.

Tabla 2. Criterios de cirugía bariátrica. Adaptado de [137].

## Introducción

Desde que en 1991 la NIH (del inglés, *National Institutes of Health*) [138] estableció su consenso sobre las guías clínicas del tratamiento quirúrgico de la obesidad en pacientes con obesidad extrema, estas técnicas han evolucionado mucho en los últimos años. En la figura 7 se representan las técnicas más utilizadas. Hoy en día se distinguen tres tipos de cirugía:

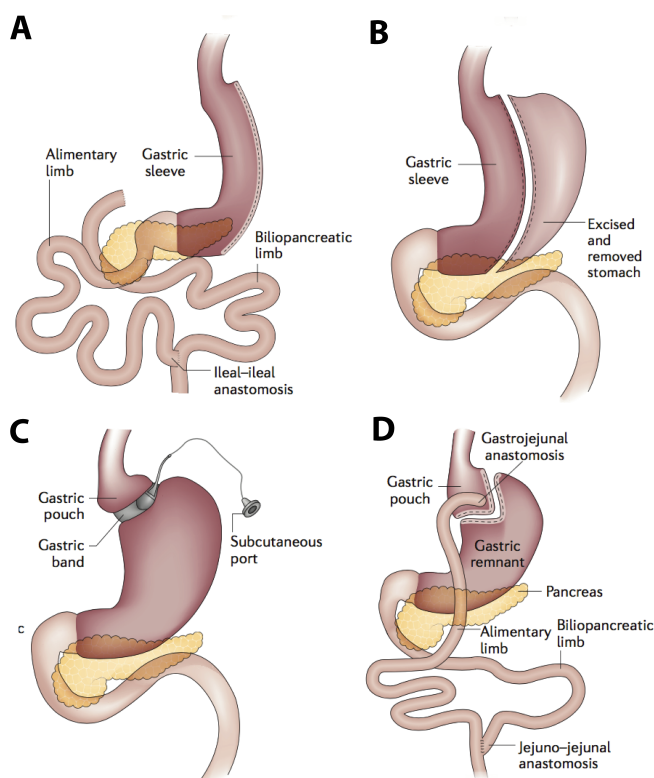


Figura 7. Diferentes tipos de cirugía bariátrica [139].

### 1. Técnicas malabsortivas.

Su finalidad es disminuir la absorción de nutrientes por parte del aparato digestivo mediante la exclusión o derivación de una parte del intestino. Se incluyen en este grupo:

- Bypass o derivación yeyunal:** Fue la primera técnica quirúrgica descrita para tratar la obesidad [140]. Esta técnica consiste en excluir el duodeno y el yeyuno, de forma que el estómago queda directamente conectado al íleon. Debido a las complicaciones que presentaba esta técnica, actualmente está en desuso.

- b) Diversión biliopancreática. En esta técnica se realiza una pequeña bolsa a partir del estómago, la cual queda conectada directamente a la porción final del intestino delgado, sorteando el duodeno y el yeyuno. Existe una modalidad de esta técnica llamada “cambio de duodeno”, en la cual se deja una mayor cantidad de estómago intacto y una pequeña proporción de duodeno en el tracto digestivo. La pérdida de peso es exitosa, habiéndose objetivado pérdidas de peso de hasta el 70% en dos años post-intervención [141], aunque por otro lado las deficiencias nutricionales en estos pacientes son elevadas [142]. Ver figura 7-A.

## 2. Técnicas restrictivas.

Estas técnicas tienen como objetivo limitar la ingesta de alimentos de forma mecánica y no tienen ningún efecto en el proceso de absorción de nutrientes.

- a) Gastroplastia en banda vertical. Se elimina el 80% del lateral del estómago con un corte en dirección vertical, dejando el estómago remanente en forma de un tubo largo [143]. En muchos casos la pérdida de peso es excesivamente rápida, de tal forma que en 1 año post-intervención se puede llegar a perder entre el 51-70% de la masa corporal [144]. Ver figura 7-B.
- b) Banda gástrica ajustable. En esta técnica se coloca una banda alrededor del estómago cerca del extremo superior de éste, de forma que se crea una pequeña bolsa y se estrecha el paso hacia el resto del estómago. Esta banda se hincha con una solución salina de tal manera que se puede regular la cantidad de alimento que puede pasar de la nueva bolsa estomacal al

## Introducción

resto del estómago. La pérdida de peso en 1 año post-intervención es de alrededor del 34% [144]. Ver figura 7-C.

### 3. Técnicas mixtas:

Bypass gástrico [145] o cirugía de derivación gástrica: Esta técnica también se conoce como Bypass en Y de Roux. Es la técnica más utilizada, considerada el “*gold standard*”, debido a sus buenos resultados a largo plazo y a su escasa morbilidad. Los pacientes con obesidad mórbida son los que tienen mayor indicación quirúrgica de esta técnica, estando también indicada en pacientes con fracaso de una técnica restrictiva. A partir del estómago se crea una pequeña bolsa, la cual actuará como un nuevo y pequeño estómago. A continuación, esta bolsa estomacal se une a la sección media del intestino delgado, quedando el tubo digestivo en forma de Y, de manera que los alimentos pasan por esta bolsa estomacal y de ahí se dirigen a la sección media del intestino delgado. Por otro lado, los líquidos secretados por el resto del estómago pasarán por el duodeno y la primera porción del yeyuno encontrándose con los alimentos en la sección media del intestino delgado. Se puede alcanzar una pérdida de peso del 70% en un año tras la intervención [146]. Ver figura 7-D.

## 2.3. ALTERACIONES METABÓLICAS ASOCIADAS A LA OBESIDAD

El sobrepeso y la obesidad son factores de riesgo de aparición de patologías asociadas a las que llamamos “comorbilidades” entre las que se incluyen la enfermedad cardiovascular, hipertensión arterial, accidente cerebrovascular, resistencia a la insulina, T2D, hiperlipemia, síndrome metabólico, cáncer, artropatía degenerativa, apnea del sueño, infertilidad, enfermedades hepáticas y trastornos psíquicos.

### **2.3.1. Resistencia a la insulina y desarrollo de la T2D**

La resistencia a la insulina ha sido considerado el vínculo que relaciona la obesidad y la aparición de la T2D, pero también de otras enfermedades relacionadas, tal y como se esquematiza en la figura 8. La resistencia a la insulina es un proceso patológico por el cual el organismo responde de forma inferior a lo normal, a la acción de la insulina. Si bien, inicialmente esta alteración había sido considerada como la piedra angular en el mecanismo patogénico de la T2D, ahora está claro que para que esta enfermedad aparezca debe coexistir una disfunción de la célula beta. En las etapas iniciales de la resistencia a la insulina el organismo desarrolla un mecanismo compensatorio aumentando la secreción de esta hormona por el páncreas (hiperinsulinismo), para intentar mantener los valores de glucosa dentro de la normalidad [147]. Esta fase es difícil de detectar clínicamente, pero si se mantiene en el tiempo y se produce un fracaso de la capacidad de la célula beta para mantener la hipersecreción de insulina, es cuando aparecen las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado y la T2D [148].

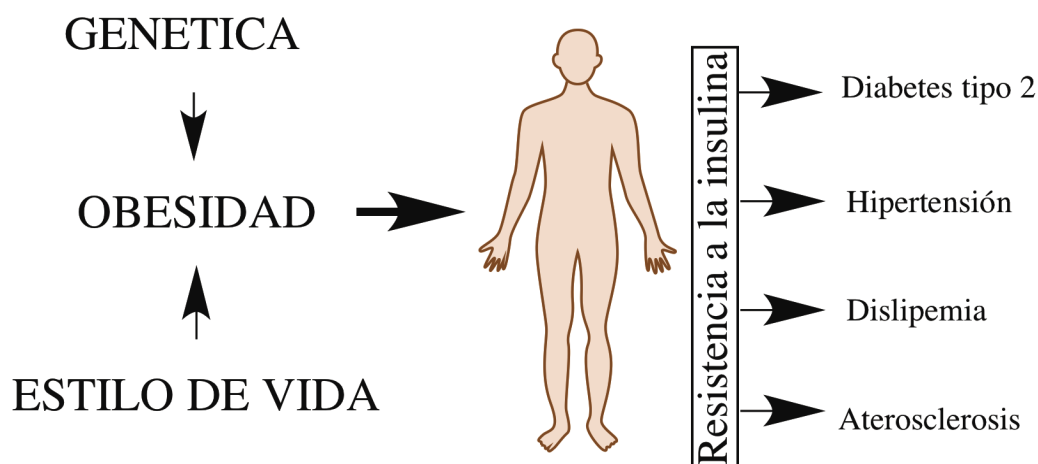


Figura 8. Obesidad y resistencia a la insulina.

Este mecanismo de compensación depende de la interrelación entre la célula beta y los tejidos sensibles a la insulina. La liberación de insulina como respuesta a la estimulación de la célula beta, favorece la captación de glucosa, aminoácidos y FFA por los tejidos sensibles a la insulina. Por otro lado, a través



## Introducción

de mecanismos humorales y centrales, los tejidos periféricos son capaces de interactuar con la célula beta para mantener la tolerancia a la glucosa. La historia natural de la T2D viene marcada por una progresiva alteración de la tolerancia a la glucosa, que es paralela al deterioro de la célula beta [149, 150].

A pesar de que existen otros tipos de diabetes, la T2D es la forma más prevalente y responsable del 90% de pacientes que presentan esta enfermedad [151] y dado el aumento de la incidencia, se considera que su evolución tiene un comportamiento epidémico. La T2D es una enfermedad heterogénea en la que múltiples factores, genéticos y ambientales, están implicados en mayor o menor grado. Si bien la obesidad como explicaremos más adelante es determinante de la aparición y mantenimiento de la resistencia a la insulina, así como de la aparición de la disfunción de la célula beta, no podemos olvidarnos de otros agentes involucrados. Desde el punto de vista genético, se han detectado más de 50 locus ligados a las concentraciones de insulina y glucosa, de los cuales, más de la mitad se han relacionado con la T2D [152]. No obstante, aunque algunos se han asociado a la obesidad y a la resistencia a la insulina, la mayoría se han relacionado con disfunción en la célula beta [153] y además su detección aporta poca información adicional a los factores de riesgo tradicionales para la predicción de la aparición de T2D [154, 155]. Alteraciones en la secreción hormonal, como la desregulación de la secreción de glucagón y de las hormonas gastrointestinales conocidas como incretinas, el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP1, del inglés *glucagon like peptide 1*) y el polipéptido inhibidor gástrico (GIP, del inglés *gastric inhibitory polypeptide*), también parecen jugar un papel importante en la patogenia de esta entidad [109, 156]. El tubo digestivo también ha sido involucrado por otros motivos, al observarse por un lado, que los ácidos biliares son capaces de aumentar el factor de crecimiento de los fibroblastos 19 (FGF-19, del inglés *fibroblast growth factor*) [157] y estimular la liberación de GLP1 tras su unión al receptor acoplado a proteína G 131 (GPR131, del inglés *G protein-coupled receptor 131*) a nivel intestinal [158]; y por otro, por que la composición de la microbiota intestinal, se ha relacionado con la aparición de T2D [159, 160]. El sistema nervioso también juega un papel clave en la regulación de procesos metabólicos. A nivel periférico controla la secreción de glucagón e insulina, así

como la captación hepática de glucosa a través de los sistemas nerviosos simpático y parasimpático. A nivel central, el hipotálamo es capaz de regular el metabolismo energético y la acción de la insulina. Dentro de los factores ambientales, además del balance energético, la composición de la dieta también parece determinante en la aparición de obesidad, resistencia a la insulina y disfunción de la célula beta [161]. Por otro lado, la edad [162] y la exposición intraútero a un ambiente adverso son factores que también se han relacionado con su aparición [163].

Factores relacionados con un mayor riesgo de diabetes	Factores relacionados con un menor riesgo de diabetes
Edad	Lactancia materna
Etnia	Dieta baja en grasas saturadas Dieta rica en fibras
Antecedentes familiares o de diabetes gestacional	Consumo de nueces
Obesidad	Consumo de café y té verde
Tabaco	Consumo moderado de alcohol
Síndrome del ovario poliquístico	Actividad física
Determinados fármacos	

Tabla 3. Factores relacionados con la incidencia de diabetes [164].

La obesidad se caracteriza por una inflamación sistémica preclínica, que se ha relacionado con la aparición de una disfunción de la célula beta [165, 166]. Algunos marcadores de inflamación sistémica, como la proteína C reactiva (PCR) y su regulador, la IL-6, muestran relación tanto con la sensibilidad a la insulina como con la disfunción de la célula beta [167, 168]. Además, la mejoría de los marcadores de inflamación [168-170] se ha asociado a una mejora de la función de la célula beta en pacientes con T2D [171, 172]. La resistencia a la insulina asociada a la obesidad es por tanto un factor de riesgo de T2D [150], pero también de hiperlipidemia, enfermedad cardiovascular y algunos tipos de cáncer [173-175]. A pesar de que los mecanismos implicados en la aparición

## Introducción

de resistencia a la insulina no están claros, la inflamación se ha vinculado con su aparición, especialmente cuando afecta al WAT.

Los efectos directos de la inflamación en la célula beta, se deben a la activación de una respuesta inmune intrainsular, que se ha atribuido a la IL-1 beta [176], entre otros factores. La glucosa y los ácidos grasos libres incrementan la secreción de IL-1 beta en los islotes [37, 177], y algunos antagonistas naturales, como el antagonista del receptor IL-1 beta (IL1B-Ra, del inglés *antagonist IL-1 beta receptor*), son capaces de regular y equilibrar su acción tanto en los islotes como en otros tejidos [178]. Los niveles circulantes de IL-1 beta y IL1B-Ra se encuentran elevados en la T2D [179, 180] y los niveles más bajos de IL1B-Ra serían capaces de predecir quien mantiene o no la función de la célula beta tras una intervención dirigida a disminuir la inflamación [172].

La expansión del tejido adiposo se asocia también, como ya hemos indicado antes, a un aumento de macrófagos activados que expresan un gran número de genes proinflamatorios entre las que se incluyen citoquinas como el TNF-alfa [181, 182], los FFA [183], el DAG, las ceramidas o especies reactivas de oxígeno, así como mayor hipoxia tisular. Esta situación, conduce a una activación de diferentes vías de señalización intracelulares que inhiben la cascada de señalización de la insulina a través de la activación de fosfatasa como la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B, del inglés *protein tyrosine phosphatase 1B*) [184] o la activación de vías inflamatorias como el inhibidor de la subunidad beta del factor nuclear kappa-beta kinasa (IKK $\beta$ , del inglés *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta*), el NF- $\kappa$ B, o la kinasa aminoterminal c-Jun-1 (JNK1, del inglés *c-Jun N-terminal kinase 1*) [24, 185, 186], entre otras.

El mantenimiento de esta situación inflamatoria acaba aumentando la activación de factores de transcripción que producen más citoquinas proinflamatoria [187]. Cuando la cantidad de citoquinas es suficiente, se liberan a la circulación donde pueden actuar a distancia en lugares como el hígado y el músculo esquelético, empeorando la resistencia a la insulina. La acumulación

ectópica de grasa también produce una activación de las cascadas de inflamación en otros tejidos periféricos como el hígado [188, 189]. Por otro lado, la inflamación hipotalámica también produce resistencia central a la leptina que podría contribuir a la ganancia de peso. Además, tanto la hiperglucemia como el aumento de los ácidos grasos libres tienen un efecto tóxico metabólico sobre la célula beta disminuyendo su función, que cronifica esta situación [190, 191]. En la figura 9 se esquematiza el efecto tóxico de la hiperglucemia sobre diferentes órganos y su influencia sobre la insulina.

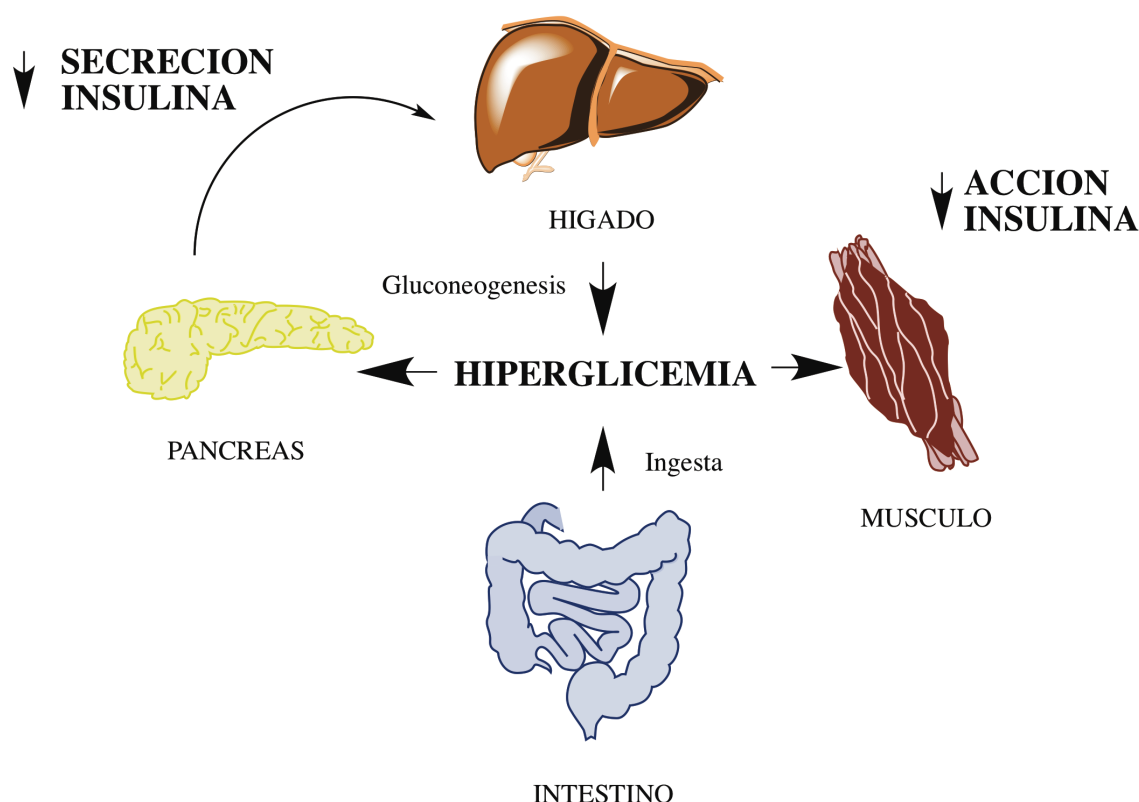


Figura 9. Glucotoxicidad. Hiperglicemia por disminución en la secreción y acción de la insulina [192].

El receptor celular de insulina es una proteína tetramérica transmembrana (IR, del inglés *insulin receptor*) con dos subunidades alfa y otras dos beta. Las subunidades alfa son extracelulares, y están implicadas en el reconocimiento de la insulina, mientras que las subunidades beta son intracelulares y tienen actividad tirosin-quinasa, de forma que al unirse la insulina a las subunidades alfa, las subunidades beta se autofosforilarán, activándose, y fosforilando a su vez a los sustratos del receptor de insulina (IRS, del inglés *insulin receptor substrates*). Los IRS transmitirán la señal al resto de la célula, la cual

## Introducción

responderá de manera específica en función del tejido y del entorno celular. En órganos periféricos como el tejido adiposo o el músculo esquelético esto producirá la expresión en la membrana celular de transportadores de glucosa como el transportador de glucosa tipo 4 (GLUT-4 del inglés *glucose transporter type 4*), facilitando que ésta entre al interior celular.

Esta cascada de señalización de la insulina está controlada por una serie de procesos de retroalimentación negativa que tienen como objetivo evitar la hiperestimulación de esta vía. Un ejemplo es la fosforilación de residuos de serina o treonina de las proteínas IRS, que disminuyen la capacidad del IR para activarlas.

La falta de respuesta a la insulina es consecuencia de algún defecto en la transducción de la señal de la hormona, existiendo numerosas moléculas que interfieren en el correcto funcionamiento de la misma. Tal y como se ha comentado anteriormente en una situación de obesidad existe un aumento de citoquinas proinflamatorias, ácidos grasos libres o señales generadas por el estrés celular que pueden inhibir la cascada de señalización de la insulina. Un ejemplo es la activación de las cascadas intracelulares JNK1 y NF- $\kappa$ B por parte del TNF- $\alpha$ , las cuales inducen fosforilación inhibitoria del IRS-1[193].

Se estima que la diabetes afecta a más de 347 millones de personas en el mundo. En el año 2012 fue la causa directa de 1,5 millones de muertes, de las cuales el 80% se registró en países de ingresos bajos y medios. La combinación de la falta de concienciación acerca de esta enfermedad y del acceso a los medicamentos puede producir importantes complicaciones, como la ceguera, la insuficiencia renal o la amputación de miembros [112].

El tratamiento de la T2D debe ser individualizado y depende en gran parte del estilo de vida del paciente. Por este motivo, el tratamiento debe ir enfocado a abordar los distintos mecanismos fisiopatológicos implicados en la aparición de la enfermedad. Además de los cambios en el estilo de vida enfocados a aumentar la actividad física y la realización de una dieta saludable con el objetivo de perder peso en aquellos pacientes con obesidad y sobrepeso,

disponemos también diferentes tipos de fármacos. El arsenal terapéutico de la T2D se ha incrementado de forma notable en los últimos años, como podemos ver en la figura 10-A, y uno de los objetivos de los nuevos fármacos es abordar distintos mecanismos fisiopatológicos. Contamos en la actualidad con fármacos que actúan estimulando la secreción de insulina por el páncreas en mayor o menor grado o que sustituyen la acción de la insulina endógena, fármacos que actúan reduciendo la resistencia a la insulina, fármacos que actúan a nivel gastrointestinal modificando la absorción de nutrientes y que aumentan la eliminación renal de glucosa (figura 10-B).

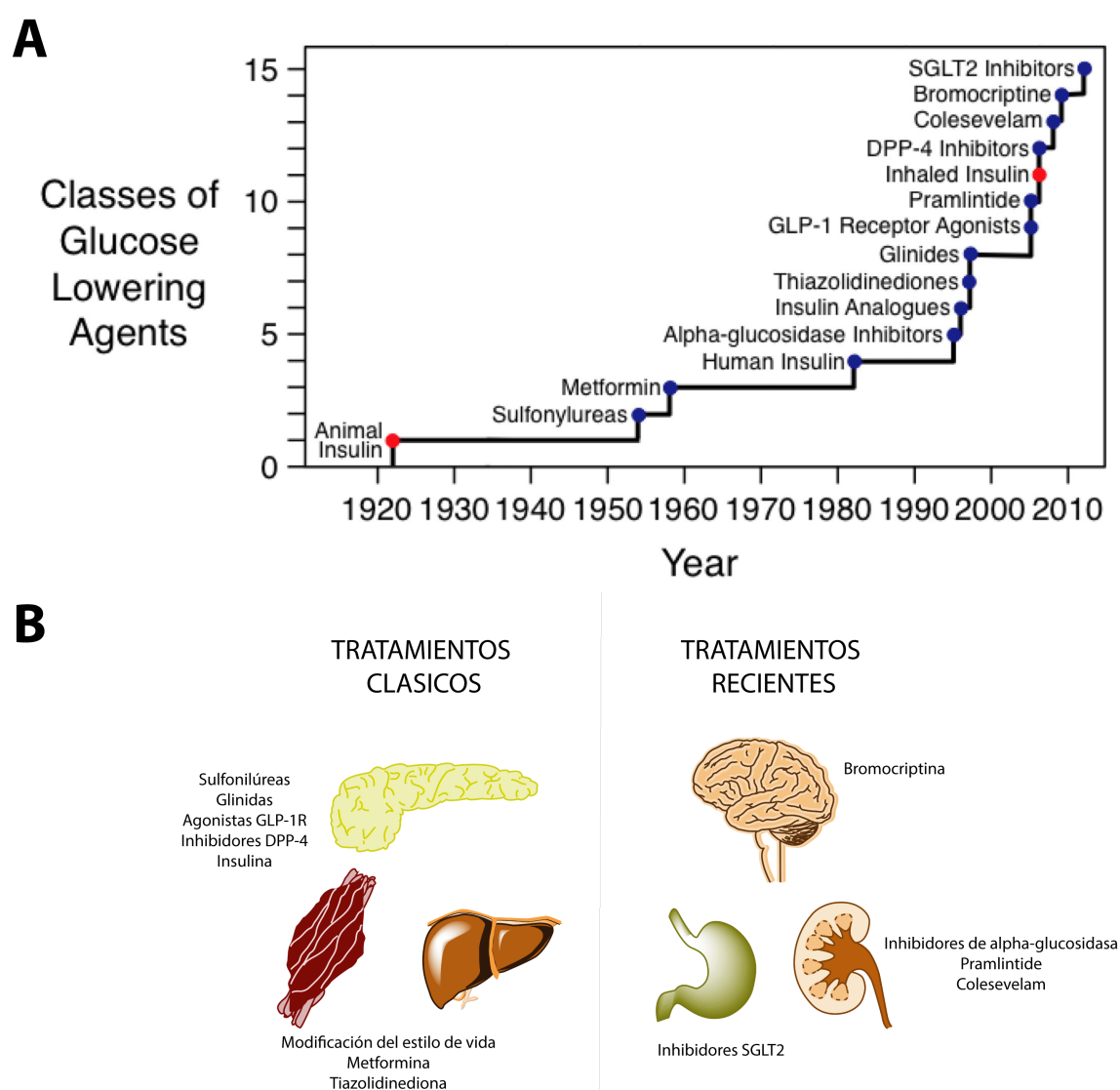


Figura 10. A) Nuevos tratamientos frente a la diabetes a lo largo del tiempo. B) Órgano diana de los diferentes tratamientos. Los tratamientos clásicos se centran principalmente en el páncreas, músculo, hígado o el tejido adiposo. Sin embargo, fármacos recientes también actúan sobre otros órganos como el cerebro, el intestino o el riñón [194].

## Introducción

Sin embargo, a pesar de que algunos de estos fármacos consiguen mejoras importantes del control glucémico, se acompañan de pérdida de peso y han demostrado beneficios cardiovasculares, hoy en día se han demostrado insuficientes a largo plazo para el tratamiento de muchos pacientes con T2D y obesidad [194]. Por este motivo, a día de hoy se considera que uno de los tratamientos más exitosos en la T2D asociada a la obesidad es la cirugía metabólica [139].

Se entiende por **cirugía metabólica** a la utilización de técnicas de cirugía bariátrica para el tratamiento de pacientes con T2D y obesidad no mórbida, ya que el objetivo es conseguir una mejoría del control glucémico [195]. Actualmente está aprobado el uso de cirugía bariátrica en pacientes con IMC  $<35\text{kg/m}^2$  que padecen T2D. Estos pacientes presentan una historia de T2D que no ha podido ser controlada por un tratamiento médico previo (medicamentos, dieta y ejercicio físico). Diversos estudios han demostrado que se produce una mejoría metabólica tras la intervención, pudiendo ser debido, entre otras causas, a la pérdida de peso [196].

## 2.4. DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

El embarazo es un estado inflamatorio natural, reflejado en los niveles altos de reactantes de fase aguda, citoquinas y leucocitos maternos [197, 198], pero una adecuada modulación del grado de inflamación y del sistema inmune a lo largo de las distintas fases de la gestación es esencial para el éxito de la reproducción [199]. En el primer trimestre se produce una hiperplasia en las células betas y un aumento en la secreción de insulina, que facilita la utilización de la glucosa, inhibe la lipólisis y neoglucogenesis hepática [200]. Esta es una fase claramente anabólica que favorece el acúmulo de reservas energéticas en la madre. Durante el segundo trimestre de embarazo se desarrolla una resistencia fisiológica a la insulina, en la que se implican, entre otros factores, las hormonas placentarias como el lactógeno placentario humano (hPL, del inglés *human placental lactogen*), la progesterona o los estrógenos. El hPL

tiene un efecto lipolítico que permite orientar el metabolismo materno hacia la utilización preferente de grasas, de modo que la glucosa disponible se dirige en gran medida hacia el feto, estimulando la secreción de insulina pancreática fetal y actuando como un estimulador del crecimiento fetal [201]. Otro factor involucrado en este proceso es el TNF- $\alpha$ , cuyos niveles placentarios se asocian a una mayor resistencia a la insulina, independientemente del grado de obesidad materno [202]. Esto es necesario para dirigir los nutrientes maternos a través de la unidad feto-placentaria y permitir un adecuado crecimiento del feto. Cuando esta situación se desequilibra y la secreción de insulina no es suficiente como para compensar la resistencia a la insulina, aparece la diabetes gestacional (GDM, del inglés *gestational diabetes mellitus*) [203].

La GDM es una alteración en el metabolismo hidrocarbonado de intensidad variable que se diagnostica por primera vez durante el embarazo [204]. Es una de las complicaciones metabólicas más frecuentes en la gestación, con una prevalencia que varía ampliamente en función de los criterios diagnósticos y la población estudiada [205], pero que se ha incrementado en los últimos años de forma paralela al incremento de la obesidad [206, 207], con las que comparte algunos de los efectos adversos en la gestación [208, 209]. Se ha descrito, que la mayoría de mujeres que desarrollan GDM presentan previamente al inicio del embarazo defectos en la función de la célula beta y/o una menor sensibilidad a la insulina [210]. Por este motivo, el incremento de la resistencia a la insulina que se produce en la gestación normal, pone de manifiesto la falta de adaptación de la célula beta, y es por ello que se considera la gestación es un test fisiológico de la función endocrina pancreática [211]. De hecho, las mujeres diagnosticadas de GDM durante la gestación presentan una predisposición al desarrollo de T2D a largo plazo.

La GDM se asocia a un mayor riesgo de aparición de complicaciones perinatales y a largo plazo, tanto en la madre como en la descendencia [212]. La prevalencia de pre-eclampsia, cesárea, parto instrumental y trauma obstétrico [213-215], así como también el riesgo de enfermedad cardiovascular y diabetes en el futuro es mayor en las mujeres con GDM [109]. En el neonato,



## Introducción

se ha descrito una mayor frecuencia de macrosomía y niños grandes para la edad gestacional (LGA, del inglés: *large for gestational age*), que se asocian con un mayor riesgo de trauma obstétrico y justificaría la mayor tasa de cesáreas, y de aparición de hipoglucemia en el periodo perinatal.

La hiperglucemia materna durante la gestación y el mayor gradiente de paso de glucosa y otros nutrientes (aminoácidos y ácidos grasos no esterificados) a través de la placenta estimulan la secreción de insulina por el páncreas fetal, facilitando la aparición de una hiperinsulinemia fetal [213] que es responsable del hipercrecimiento de los tejidos sensibles a la insulina, un aumento de la adiposidad del neonato y por consiguiente de un crecimiento excesivo del feto [216]. En la figura 11 se resumen los factores predisponentes a la aparición de GDM y los mecanismo implicados en el crecimiento fetal excesivo.

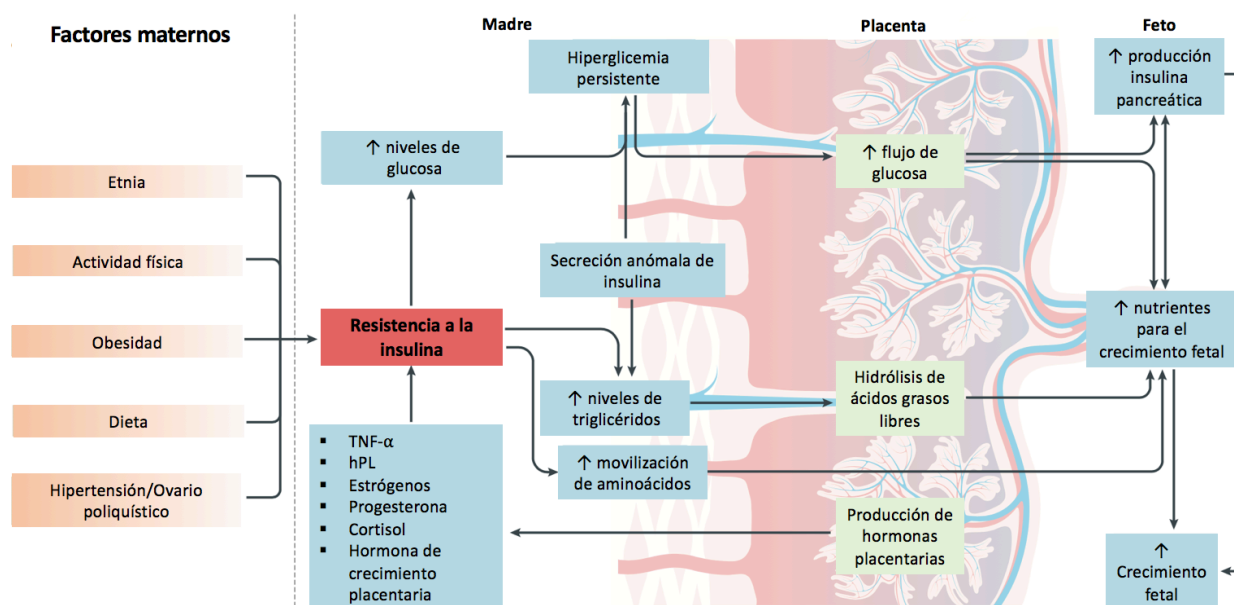


Figura 11. Desarrollo de la resistencia materna a la insulina y crecimiento fetal. Adaptado de [217].

El tejido adiposo es el componente que determina mayor variabilidad en el peso del recién nacido. Hacia mitad de la gestación empiezan a aparecer los primeros vestigios del tejido adiposo, tanto de WAT como BAT, que se incrementa de forma exponencial hasta el momento del nacimiento. Si bien el

BAT es esencial para la adaptación postnatal a la temperatura, de forma que el feto al nacer presenta mayores niveles de BAT que en la vida adulta [218], el WAT tiene también un papel como sustrato energético y aislante. Dado que tanto el bajo peso como el peso excesivo al nacer se han asociado con un mayor riesgo de obesidad y alteraciones metabólicas a largo plazo en la vida adulta, se ha postulado que tanto el exceso como el defecto de nutrientes durante la vida intrauterina podrían inducir modificaciones en la regulación metabólica que tuvieran consecuencias a más largo plazo. De hecho, se ha descrito un aumento del riesgo de padecer obesidad y alteraciones en el metabolismo hidrocarbonado de forma más precoz en hijos de madres con diabetes durante la gestación [217, 219].

Por este motivo, las alteraciones metabólicas que se hayan presentes en las gestaciones complicadas con diabetes, y que condicionan un aumento de la adiposidad neonatal, podrían ser responsables de alteraciones en la regulación del metabolismo energético durante la gestación pero que podrían tener consecuencias a largo plazo.

### 3. ANGPTL8

La proteína 8 del tipo angiopoyetina (ANGPTL8, del inglés *angiopoietin-like protein 8*) [220] también conocida como Lipasin [221], RIFL (del inglés *refeeding induced fat and liver*)[222] o Betatrophin [223], es una molécula perteneciente a la familia de las proteínas *angiopoietin-like*. El símbolo aprobado por el comité de nomenclatura Gene HUGO es ANGPTL8. El gen codificante se encuentra en el brazo corto del cromosoma 19 (región 19p13.2) y codifica una proteína de 198 aminoácidos (22,105 KDa). La secuencia de aminoácidos humana comparte un 72,7% de similitudes con la secuencia de *Mus musculus*. El gen de esta proteína fue identificado en el año 2002 dentro del grupo de trabajo de la “*Mammalian Gene Collection Program Team*”, el cual identificó más de 15.000 secuencias codificadoras del genoma humano y murino [224]. Posteriormente, varios grupos de investigación iniciaron diversos trabajos enfocados a estudiar ANGPTL8 y su papel en la homeostasis de la glucosa y los lípidos.

ANGPTL8 se ha detectado en una amplia diversidad de tejidos. La mayor expresión tiene lugar en el hígado, seguido a distancia por el tejido adiposo y otros órganos como el cerebro, el páncreas, el músculo esquelético o el corazón [220], sin embargo su función en estos órganos está en proceso de estudio. En el hígado se ha postulado por ejemplo que ANGPTL8 podría actuar como hormona sensibilizadora a la acción de la insulina [225].

El hecho de que hasta la fecha, su expresión únicamente se haya demostrado en mamíferos, sugiere que el papel fisiológico de esta proteína ha de estar relacionado con las funciones exclusivas de estos, es decir, la lactancia, el embarazo y/o la homotermia.

### 3.1. FAMILIA DE LAS ANGIOPOIETIN-LIKE PROTEINS

Las *angiopoietin-like proteins* (ANGPTLs) son un grupo de proteínas similares en estructura a las angiopoyetinas. Hasta la fecha se han descubierto ocho proteínas diferentes (de la ANGPTL1 a la ANGPTL8) cuya estructura se basa en tres regiones características; una región amino terminal seguida de un dominio tipo hélice superenrollada y finalmente un dominio de tipo fibrinógeno en el extremo carboxiterminal (excepto ANGPTL8).

La principal diferencia entre las angiopoyetinas y las ANGPTLs radica en los receptores de estas moléculas. Las angiopoyetinas se unen a receptores tirosina quinasa (Tie-1 o Tie-2) mientras que a las ANGPTLs se las consideran ligandos huérfanos [226]. No obstante, se ha postulado que podrían jugar un papel en la función inmunitaria, ya que recientemente se ha identificado en leucocitos receptores de tipo inmunoglobulinas para ANGPTL1, ANGPTL2, ANGPTL5 y ANGPTL7 [227].

Aunque algunas ANGPTLs comparten con las angiopoyetinas un papel en la regulación de la angiogénesis [228], la mayoría de ANGPTLs presentan múltiples efectos biológicos.

El primer miembro de la familia de las ANGPTLs en descubrirse fue **ANGPTL1** [226]. Se expresa principalmente en hígado y musculo, siendo un potente regulador de la angiogénesis que además inhibe la proliferación, migración y adhesión de las células endoteliales [229]. Otros estudios sugieren una función en el desarrollo de tumores, ya que su transcrito se encuentra disminuido en células tumorales de diferentes canceres como pulmón, próstata, riñón, tiroides o vejiga [229].

**ANGPTL2** es una glicoproteína circulante expresada principalmente en el corazón, tejido adiposo y en el endotelio. Su expresión se estimula por la hipoxia induciendo migración sobre las células endoteliales y angiogénesis [227]. Recientemente se ha demostrado en ratones que ANGPTL2 esta

## Introducción

implicada en el desarrollo de inflamación crónica del endotelio contribuyendo a la aparición de aterosclerosis [230]. También en ratones se ha demostrado que ANGPTL2 estimula la sensibilidad a la insulina y mejora el estado diabético [231]. Todo esto sugiere un papel para ANGPTL2 en la relación entre resistencia a la insulina y aterosclerosis [232].

**ANGPTL3** es un regulador del metabolismo de las lipoproteínas. Se expresa principalmente en el hígado y a su vez se detecta de forma completa en sangre. ANGPTL3 viajará en el torrente circulatorio a los tejidos donde sufrirá una escisión para pasar a su forma activa y ejercer su función correspondiente [233]. ANGPTL3 inhibe la actividad de la LPL y aumenta la concentración de triglicéridos circulantes [233]. Pacientes con déficit en ANGPTL3 presentan un aumento de la actividad de la LPL y a su vez una disminución de triglicéridos y de colesterol en todas las diversas fracciones de lipoproteínas [234]. Se han identificado mutaciones de tipo pérdida de función de ANGPTL3 que causan dislipemia familiar combinada [235], lo cual reafirma el importante papel que tiene esta proteína en el tejido adiposo. La regulación de esta proteína se explicará mas adelante, ya que esta implicada en ello la ANGPTL8.

**ANGPTL4** es un regulador del metabolismo lípido. Se expresa en tejido adiposo blanco y marrón, y en menor cantidad en otros tejidos como hígado, corazón o musculo esquelético [236]. Experimentos de sobreexpresión con adenovirus de ANGPTL4 en tejido adiposo o inyección de ANGPTL4 recombinante en ratones demostraron una disminución de la actividad de la LPL y una consecuente elevación de triglicéridos circulantes [237, 238], si bien esta elevación se produce de forma mas drástica que en el caso de ANGPTL3 [237]. El hecho de que ANGPTL3 se exprese solo en el hígado mientras que ANGPTL4 tenga una expresión mas amplia a lo largo del organismo sugiere que el papel inhibitor de la LPL por ANGPTL3 se realice en el periodo postprandial. Por otro lado, dado que ANGPTL4 inhibe la LPL a nivel periférico regulando así la liberación de ácidos grasos de los tejidos a la sangre periférica apunta a un papel tanto en estado de ayuno como en el postprandial.

ANGPTL4 parece tener también un papel en la homeostasis de la glucosa, ya que en los experimentos de sobreexpresión con adenovirus realizados en ratones se observó una mejora de la tolerancia a la glucosa tanto en ratones diabéticos como en ratones control [238].

**ANGPTL5** se expresa principalmente en el corazón [239]. Recientemente se ha descubierto su implicación en la proliferación de células madre hematopoyéticas en sangre de cordón fetal [240].

**ANGPTL6** es una proteína de expresión fundamentalmente hepática. Se ha relacionado con el síndrome metabólico, ya que las concentraciones de ANGPTL6 de estos pacientes respecto a los controles están aumentadas, y se relaciona con una menor concentración de colesterol HDL (del inglés, *high density lipoprotein*) y una mayor circunferencia de cintura [241]. Se han identificado diferentes polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*) de ANGPTL6, pero solo uno de ellos se ha asociado a un mayor riesgo de síndrome metabólico, y su presencia en pacientes obesos se acompañaba de mayores niveles de insulina [242].

**ANGPTL7** se expresa en tejido neuronal, en la cornea, en la malla trabecular y en diversos tipos de tumores [243]. Actualmente su función es desconocida. En pacientes con glaucoma, las concentraciones de ANGPTL7 se encuentran elevadas en el humor acuoso [244]. En otro estudio, se observó que la sobreexpresión de ANGPTL7 en células humanas de la malla trabecular era capaz de alterar la expresión de proteínas de la matriz extracelular, disminuyendo la expresión de fibronectina, como ocurre en pacientes con glaucoma [245].

La última ANGPTL descubierta es la betatrophin o **ANGPTL8**, molécula de la cual es objeto esta tesis. Estructuralmente, ANGPTL8 es un caso especial dentro de la familia de las ANGPTLs, al ser la molécula más simple del grupo ya que no expresa la región carboxiterminal de tipo fibrinógeno (ver figura 12) [246].

## Introducción

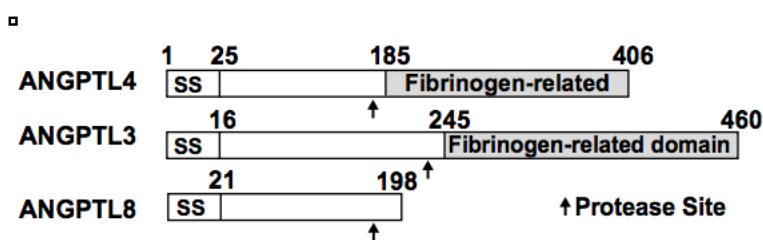


Figura 12. Estructura de ANGPTL8 en comparación con ANGPTL3 y 4[220].

### 3.2. ANGPTL8 Y SU PAPEL SOBRE LA CÉLULA BETA

ANGPTL8 fue propuesta inicialmente como una proteína capaz de estimular la proliferación de las células beta del páncreas, de ahí el nombre de Betatrophin. Yi y col. indujeron resistencia a la insulina en ratones tratándoles con un péptido con alta afinidad por los receptores de insulina, S961, observando una proliferación de las células beta del páncreas que no podía ser atribuido a S961. Análisis de expresión por *microarrays* apuntaron que el causante podría ser ANGPTL8, cuyos niveles estaban aumentados en estos ratones y se atribuyó a esta molécula un papel inductor de la proliferación de la célula beta del páncreas y en consecuencia un efecto beneficioso sobre la tolerancia a la glucosa [223]. Estos resultados sugirieron que ANGPTL8 en situaciones de resistencia a la insulina ejercía un papel compensatorio estimulando la proliferación de las células beta del páncreas. Un efecto similar se observó posteriormente en ratas diabéticas en las que se inducía una sobreexpresión de ANGPTL8 [247]. No obstante, estos datos no pudieron ser reproducidos por otros grupos de investigación, motivo por el que se cuestionó el efecto de ANGPTL8 sobre la célula beta [248]. Ratones deficientes para el gen de ANGPTL8 no muestran una alteración significativa del metabolismo de la glucosa [249]. Además, ANGPTL8 no parece incrementar la replicación de las células beta en ratones trasplantados con células beta humanas [250]. De hecho, los autores del primer artículo se han retractado recientemente del estudio [251] y actualmente no se considera ANGPTL8 un inductor determinante de la proliferación de la célula beta. Cabe destacar no obstante, que los experimentos de Yi y col. en modelos de ratón durante la gestación

demonstraron niveles aumentados de ANGPTL8, posiblemente debido a la resistencia fisiológica a la insulina [223]. Durante el desarrollo de esta tesis varios estudios en humanos demostraron que los niveles circulantes de ANGPTL8 están aumentados en las embarazadas y, entre ellas, las que padecen GDM presentan mayores niveles de ANGPTL8 [252-254]. La ANGPTL8 se ha estudiado también en la vida fetal, detectándose mayores niveles de ANGPTL8 en sangre de cordón que en el suero materno [253], sugiriendo un posible papel de esta proteína en el crecimiento y desarrollo fetal.

### **3.3. ANGPTL8 EN EL TEJIDO ADIPOSO**

Ren y col. fueron los primeros en relacionar la adipogénesis con ANGPTL8. Estudios en la línea celular murina 3T3-L1 demostraron que durante la diferenciación adipocitaria aumenta la expresión del gen ANGPTL8, mientras que una disminución de su expresión bloquea la adipogénesis [222]. La expresión génica de ANGPTL8 se induce en respuesta a estímulos como la insulina, el frío y la ingesta. Por otro lado, su expresión se reduce durante el ayuno y ante agentes que inducen lipólisis [220-222, 246]. Estudios en modelos animales demostraron que la mayor expresión de ANGPTL8 tiene lugar en el hígado y el tejido adiposo [221] y que los ratones obesos expresan mayores niveles de ANGPTL8 que los normales [255].

Ante estas evidencias se ha propuesto que ANGPTL8 actúa junto a ANGPTL3 y ANGPTL4 regulando el metabolismo lipídico. ANGPTL8 activa ANGPTL3 para inhibir la actividad de la LPL en el corazón y en el músculo esquelético, mientras que ANGPTL4 inhibe la LPL en el TAB. De esta forma durante el ayuno aumenta la expresión de ANGPTL4 y disminuye la expresión de ANGPTL8, por lo que la actividad de LPL en el tejido adiposo disminuye y los triglicéridos circulantes son dirigidos al músculo. Al ingerir alimentos ocurre lo contrario, aumentando la actividad de la LPL en el TA y los triglicéridos se dirigen a los adipocitos [256].



## Introducción

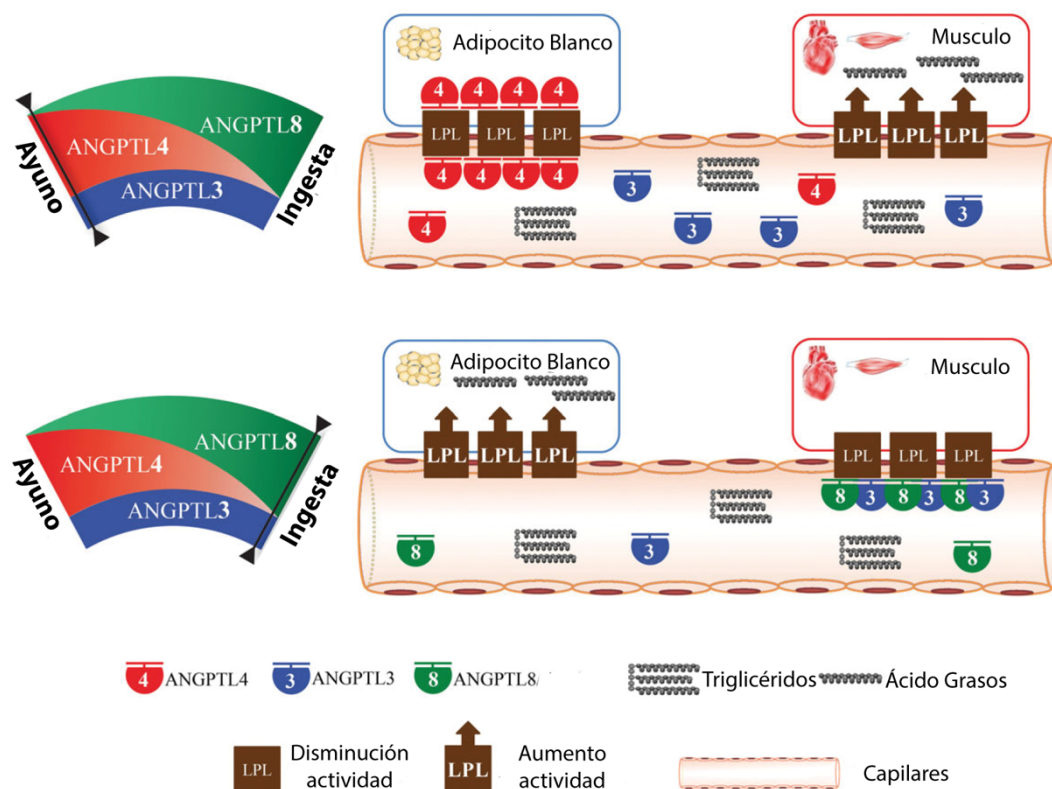


Figura 13. ANGPTL3-4-8 en el metabolismo lipídico [256].

En resumen, tal como se muestra en la figura 13, el papel de ANGPTL8 en el tejido adiposo podría ser regular la actividad de la LPL en tejidos periféricos, de forma que los niveles de triglicéridos circulantes se dirijan a donde sean necesarios.

La asociación de ANGPTL8 con diferentes perfiles lipídicos, el hecho de que pueda jugar un papel en la fisiología de la resistencia a la insulina y la función de la célula beta o su papel en la adipogénesis y el metabolismo lipídico, ha motivado el estudio de un posible papel de esta molécula en la obesidad, el síndrome metabólico y en la diabetes mellitus. Durante el desarrollo de esta tesis son varios los estudios que han analizado los niveles circulantes de ANGPTL8 en diferentes cohortes de sujetos obesos con o sin diabetes mellitus 1 (T1D, del inglés *type 1 diabetes*) o T2D, delgados o embarazadas con y sin GDM, presentando resultados no concluyentes (ver tabla 4, donde se resume los diferentes estudios de ANGPTL8 en diferentes cohortes).

<b>Autores</b>	<b>Patología</b>	<b>Sujetos (n)</b>	<b>ELISA</b>	<b>OBSERVACIONES</b>
<b>Espes, D. y col. 2014 [257]</b>	DM 2	Controles: 18 DM 2: 27	Wuhan Eiaab Science	<b>ANGPTL8 aumenta en DM 2</b>
<b>Espes, D. y col. 2014 [258]</b>	DM 1	Controles: 24 T1D: 33	Wuhan Eiaab Science	<b>ANGPTL8 aumenta en DM 1</b>
<b>Fu, Z. y col. 2014 [259]</b>	T2D y obesidad	Controles no DM: 15 T2D: 14 Delgados: 24 Obesos: 29	Phoenix Pharmaceuticals	<b>ANGPTL8 aumenta en DM 2 y obesidad</b>
<b>Fenzl, A. y col. 2014 [260]</b>	T2D y obesidad	Controles no DM: 19 T2D: 18 Delgados: 20 Obesos: 19	Wuhan Eiaab Science	<b>ANGPTL8 sin cambios en T2D y obesidad</b>
<b>Gomez-Ambrosi, J. y col. 2014 [261]</b>	T2D y obesidad	Obesos no DM: 75 Obesos intolerantes: 30 Obesos con T2D: 15	Cusabio	<b>ANGPTL8 disminuye en DM 2 y obesidad</b>
<b>Hu, H. y col. 2014 [262]</b>	T2D	Controles: 83 T2D: 83	Wuhan Eiaab Science	<b>ANGPTL8 aumenta en DM 2</b>
<b>Ebert, T. y col. 2014 [263]</b>	T2D	Controles: 58 T2D: 62	Phoenix Pharmaceuticals	<b>ANGPTL8 aumenta en T2D</b>
<b>Chen, X. y col. 2015 [264]</b>	T2D	Controles: 137 T2D: 112	Wuhan Eiaab Science	<b>ANGPTL8 aumenta en DM 2 y se asocia a resistencia a insulina</b>
<b>Yi, M. y col. 2015 [265]</b>	T2D	Controles: 58 T2D: 73	Wuhan Eiaab Science	<b>ANGPTL8 disminuye en DM 2</b>
<b>Erol, O. y col. 2015 [266]</b>	GDM	Controles: 45 GDM: 45	Sunred Biological Technology	<b>ANGPTL8 aumenta en GDM</b>
<b>Yamada, H. y col. 2015 [267]</b>	T1D y T2D	Controles: 12 T1D: 34 T2D: 30	Wuhan Eiaab Science	<b>ANGPTL8 aumenta en T1D y T2D.</b>
<b>Xie, X. y col. 2015 [268]</b>	T2D	Controles: 50 T2D: 50	Wuhan Eiaab Science	<b>ANGPTL8 disminuye en DM 2</b>
<b>Guo, K. y col. 2015 [269]</b>	T2D y obesidad	Controles: 17 delgados, 23 sobrepeso y 20 obesos. T2D: 14 delgados, 23 sobrepeso y 19 obesos.	Aviscera Bioscience	<b>ANGPTL8 aumenta en sobrepeso pero no en obesos ni en T2D.</b>
<b>Ebert, T. y col. 2015 [263]</b>	GDM	Controles: 41 GDM: 44	Phoenix Pharmaceuticals	<b>ANGPTL8 aumenta en GDM</b>
<b>Trebotic, L.K. y col. 2015 [254]</b>	GDM	Controles no embarazo: 10 Embarazadas: 40, 21 con GDM	Wuhan Eiaab Science	<b>ANGPTL8 aumenta en embarazo y GDM</b>
<b>Wang, L. [270]</b>	T2D	Controles: 20 T2D: 120	Wuhan Eiaab Science	<b>ANGPTL8 aumenta en T2D</b>

Tabla 4. Niveles circulantes de ANGPTL8 en GDM, T2D y obesidad.

## Introducción

Una posible explicación a esta variedad de resultados podría residir en los diferentes inmunoensayos (ELISA, del inglés *Enzyme-linked immunoabsorbent assay*) utilizados por los diferentes laboratorios. De hecho, los ELISAs de la casa comercial EIAAB y de la casa comercial Phoenix Pharmaceuticals, dos de los más utilizados, difieren en las isoformas de ANGPTL8 que detectan (ver figura 14)

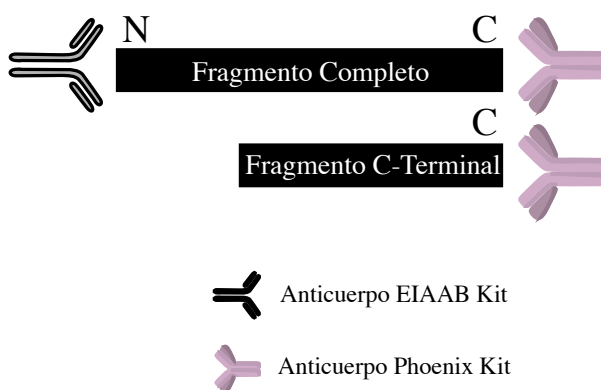


Figura 14. Diferencias entre Elisas de EIAAB y Phoenix [271].

De esta forma, el anticuerpo de EIAAB detecta a ANGPTL8 por el extremo N-terminal, mientras que el anticuerpo de Phoenix lo hace por el extremo C-terminal. Durante la formación de ANGPTL8 se produce una regulación proteolítica sobre ella, perdiendo el extremo N-terminal, por lo que el ELISA de EIAAB solo detecta la forma mas madura de esta proteína. Esto podría explicar los diferentes valores circulantes que se han encontrado en determinadas cohortes, aunque no explicaría el porqué diferentes grupos llegan a diferentes conclusiones con el mismo ELISA, sobre todo en el campo de la T2D. Si bien, la mayoría de los grupos concluyen que ANGPTL8 esta aumentada en T1D y T2D, así como en individuos con resistencia a la insulina [257-259, 262-264, 267, 270].

En el embarazo, existe un mayor coincidencia entre los diferentes estudios realizados hasta la fecha, llegando a la conclusión de que las embarazadas presentan mayores niveles circulantes de ANGPTL8, y entre ellas se han encontrado mayores niveles entre las diabéticas gestacionales. Durante la

redacción de esta memoria, un meta-análisis de las publicaciones sobre GDM y ANGPTL8, ha concluido que hay un aumento de los niveles circulantes de ANGPTL8 en situaciones de GDM [272].



# Hipótesis y objetivos



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La función de ANGTL8 ha sido relacionada con el homeostasis lipídica y de carbohidratos. Además, debido a su efecto sobre la adipogénesis parece también regular la plasticidad del tejido adiposo. Curiosamente, ANGPTL8 se expresa únicamente en mamíferos, lo que sugiere un papel en aquellos procesos exclusivos de estos como el embarazo o la homotermia.

En base a estos antecedentes, postulamos que ANGPTL8 estaría involucrada en la homeóstasis específica del embarazo y en el metabolismo energético. El **objetivo general** de la presente tesis doctoral es estudiar el papel de ANGPTL8 en el contexto del embarazo, la obesidad y la diabetes asociada a ambas.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL ESTUDIO 1:

Explorar el papel de la ANGPTL8 en la gestación normal y en gestaciones complicadas con GDM y su relación con adiposidad en el neonato.

### Objetivos intermedios:

- Establecer la dinámica de los niveles circulantes de ANGPTL8 en la gestación normal y su relación con los cambios metabólicos en el metabolismo hidrocarbonado y lipídico.
- Estudiar los niveles circulantes de ANGPTL8 maternos y fetales en la gestación normal y en la gestación complicada, y su relación con el crecimiento fetal.
- Examinar la capacidad de ANGPTL8 de actuar como factor endocrino inductor del “*browning*”



## Hipótesis y objetivos

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL ESTUDIO 2:**

Estudiar los niveles circulantes y la expresión de ANGPTL8 en obesidad y su asociación con la pérdida de peso y mejora metabólica tras cirugía bariátrica.

### **Objetivos intermedios:**

- Evaluar los niveles circulantes de ANGPTL8 y su expresión en WAT en pacientes con diferentes grados de obesidad con y sin T2D.
- Explorar la relación entre el perfil metabólico, niveles circulantes y expresión de ANGPTL8 en WAT.
- Estudiar la dinámica de ANGPTL8 tras cirugía bariátrica en pacientes obesos con y sin T2D.
- Analizar la relación entre ANGPTL8, control metabólico y/o remisión de T2D en pacientes sometidos a cirugía bariátrica.

# Resultados



## Resultados

# RESULTADOS

### Artículo 1

*Angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8) in pregnancy: a brown adipose tissue-derived endocrine factor with a potential role in fetal growth.*

**Martinez-Perez B**, Ejarque M, Gutierrez C, Nuñez-Roa C, Roche K, Vila-Bedmar R, Ballesteros M, Redondo-Angulo I, Planavila A, Villarroya F, Vendrell J, Fernández-Veledo S, Megía A.

Transl Res. 2016 Dec;178:1-12. doi: 10.1016/j.trsl.2016.06.012. Epub 2016 Jul 9.

### Artículo 2

*Angiopoietin-like protein 8/betatrophin as a new determinant of type 2 diabetes remission after bariatric surgery.*

Ejarque M, Borlaug M, Vilarrasa N, **Martinez-Perez B**, Llauradó G, Megía A, Helland T, Gutierrez C, Serena C, Folkestad O, Nuñez-Roa C, Roche K, Casajoana A, Fradera R, González-Clemente JM, López M, Mohn AC, Nedrebø BG, Nogueiras R, Mellgren G, Fernø J, Fernández-Veledo S, Vendrell J.

Transl Res. 2017 Jun;184:35-44.e4. doi: 10.1016/j.trsl.2017.03.001. Epub 2017 Mar 9.



# ORIGINAL ARTICLES

## Angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8) in pregnancy: a brown adipose tissue-derived endocrine factor with a potential role in fetal growth



**BRUNO MARTINEZ-PEREZ, MIRIAM EJARQUE, CRISTINA GUTIERREZ, CATALINA NUÑEZ-ROA, KELLY ROCHE, ROCIO VILA-BEDMAR, MÓNICA BALLESTEROS, IBON REDONDO-ANGULO, ANNA PLANAVILA, FRANCESC VILLARROYA, JOAN VENDRELL, SONIA FERNÁNDEZ-VELEDO, and ANA MEGÍA**

TARRAGONA, MADRID, AND BARCELONA, SPAIN

**Angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8), a protein implicated in lipid and glucose homeostasis, is present only in mammals, suggesting that it is involved in processes unique to these vertebrates such as pregnancy and homeothermy. We explored the role of ANGPTL8 in maternal-fetal crosstalk and its relationship with newborn adiposity. In a longitudinal analysis of healthy pregnant women, ANGPTL8 levels decreased progressively during pregnancy although remained higher than levels in the postpartum period. In a cross-sectional observational study of women with or without gestational diabetes mellitus (GDM), and their offspring, ANGPTL8 levels were higher in venous cord blood than those in maternal blood and were significantly lower in GDM patients than those in healthy women. Infants small for gestational age and with low-fat mass had the highest ANGPTL8 cord blood levels. Studies in vitro revealed that ANGPTL8 was secreted by brown adipocytes and its expression was increased in experimental models of white-to-brown fat conversion. In addition, ANGPTL8 induced the expression of markers of brown adipocytes. The high levels of ANGPTL8 found in fetal life together with its relationship with newborn adiposity and brown adipose tissue point to ANGPTL8 as a potential new player in the modulation of the thermogenic machinery during the fetal-neonatal transition. (Translational Research 2016;178:1–12)**

**Abbreviations:** ANGPTL8 = angiopoietin-like protein 8; GDM = gestational diabetes mellitus; WAT = white adipose tissue; BAT = brown adipose tissue; OGTT = oral glucose tolerance test;

From the Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Institut Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain; CIBER Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERdem), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; Departamento de Biología Molecular and Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (UAM-CSIC), Madrid, Spain; Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa, Madrid, Spain; Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Biomedicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

Bruno Martínez-Perez and Miriam Ejarque contributed equally to this work.

Submitted for publication May 18, 2016; revision submitted June 27, 2016; accepted for publication June 30, 2016.

Reprint requests: Sonia Fernández-Veledo and Ana Megía, Research Unit Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, C/ Dr. Mallafré Guasch, 4, 43007 Tarragona, Spain; e-mail: [sonia.fernandezveledo@gmail.com](mailto:sonia.fernandezveledo@gmail.com), [ana.megia@gmail.com](mailto:ana.megia@gmail.com).

1931-5244/\$ - see front matter

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2016.06.012>

BMI = body mass index; LGA = large for gestational age; AGA = adequate for gestational age; SGA = small for gestational age; SSF = sum of 3 skinfolds; HOMA-IR = insulin resistance homeostatic model assessment; HOMA-B = beta cell function—homeostatic model assessment; hWA = human white adipocytes; hBA = human brown adipocytes; mBA = murine brown adipocytes; hASCS = adipose-derived stem cells; UCP1 = uncoupling protein 1

## AT A GLANCE COMMENTARY

Martinez-Perez B, et al.

### Background

Angiopietin-like protein 8 (ANGPTL8), a protein implicated in lipid and glucose homeostasis, is present only in mammals, suggesting a role in processes unique to these vertebrates such as pregnancy and homeothermy.

### Translational Significance

We have studied ANGPTL8 levels in both maternal and cord blood during normal pregnancy and gestational diabetes, and its potential relationship with newborn adiposity. In addition, we have explored the connection between ANGPTL8 and brown fat using in vivo and in vitro experimental models of white-to-brown fat conversion (browning). Our study suggests that ANGPTL8 might be involved in fetal growth by acting on the thermogenic machinery during the fetal–neonatal transition.

## INTRODUCTION

Angiopietin-like protein 8 (ANGPTL8),<sup>1</sup> also known as lipasin,<sup>2</sup> betatrophin,<sup>3</sup> and refeeding induced in fat and liver,<sup>4</sup> is a novel but atypical member of the angiopietin-like protein family that is implicated in lipid and glucose homeostasis via its ability to inhibit lipoprotein lipase activity<sup>1</sup> and to induce pancreatic  $\beta$ -cell proliferation in insulin resistance states.<sup>3</sup> In humans, the highest expression levels of *ANGPTL8* are found in the liver,<sup>2</sup> and this organ seems to be the main source of circulating ANGPTL8, although other potential sources have been proposed.<sup>4,5</sup> Circulating ANGPTL8 concentrations are increased in obesity and type 2 diabetes<sup>6–9</sup>; however, this finding is contentious.<sup>10–12</sup> Intriguingly, although *ANGPTL8* expression has been detected in mammals, neither the transcript nor its polypeptide homologs are present in other vertebrate species, suggesting that ANGPTL8 may be implicated in physiologic functions that are unique to mammals such as homeothermy, pregnancy, and lactation.<sup>13</sup>

Pregnancy is characterized by increased insulin secretion and marked insulin resistance. This physiologic adaptation facilitates a constant net flow of glucose (and other nutrients) to the growing fetus. The morphologic basis for this hyperinsulinism is pronounced  $\beta$ -cell hypertrophy and hyperplasia, and hyperactivity of individual  $\beta$ -cells.<sup>14</sup> In murine models, liver *ANGPTL8* expression increases as pregnancy progresses,<sup>3</sup> but data on ANGPTL8 regulation in human pregnancy are scarce and inconclusive.<sup>15–17</sup> Circulating ANGPTL8 concentrations are reported to be higher in gestational diabetes mellitus (GDM) than those in normal pregnancy,<sup>15–17</sup> but there is no consensus on ANGPTL8 concentrations between pregnancy and postpartum<sup>15,16</sup> and nothing is known about the evolution of ANGPTL8 concentrations during pregnancy.

ANGPTL8 is also present in fetal life, and higher ANGPTL8 levels have been found in umbilical cord blood than those in maternal serum,<sup>16</sup> suggesting a role in fetal growth and development. In the fetus, total adipose tissue mass increases through late gestation and comprises a mixture of white and brown adipocytes. Fetal nutrient supply during late gestation determines white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT) depots. BAT is essential for postnatal adaptation to temperature and the onset of nonshivering thermogenesis after birth and, in humans, comparatively greater amounts of BAT are present in the newborn than those in other mammals.<sup>18</sup> ANGPTL8 is expressed in both WAT and BAT depots,<sup>1,4</sup> and its regulation depends on nutritional and environmental factors.<sup>1,2,4,19</sup> Specifically, *ANGPTL8* messenger RNA is upregulated during white and brown adipocyte differentiation,<sup>4</sup> suppressed by starving and agents that induce lipolysis,<sup>1,2</sup> and induced by insulin,<sup>4</sup> a cold environment<sup>19</sup> and feeding.<sup>1,2</sup>

Because pregnancy and homeothermy are situations unique to mammals, we hypothesized that ANGPTL8 may be involved in mother–fetus crosstalk, to maintain metabolic homeostasis during pregnancy, and may be an inductor of adipose tissue browning. We evaluated ANGPTL8 concentrations during normal pregnancy and explored the relationship between maternal and cord blood ANGPTL8 with newborn adiposity in normal pregnancy and GDM. We also evaluated circulating levels and BAT expression of ANGPTL8 during pregnancy in mice. Finally, we assessed the ability of ANGPTL8 to act as an endocrine factor secreted by

brown adipocytes, among others, which might facilitate white-to-brown fat conversion.

## RESEARCH DESIGN AND METHODS

**Study population.** The study was undertaken at the Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII and was carried out according to the code of ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki). Participants were women with singleton term births with no major birth defects, with an accurate gestational age confirmed by an ultrasound examination before 20 weeks of gestation and a gestational age at delivery of 37 weeks or more. The study protocol was reviewed and approved by the research ethics board of the center, and all participants provided written informed consent before inclusion. To assess the effects of pregnancy on ANGPTL8 concentrations and its relationship with insulin secretion, 15 pregnant women were enrolled in the first prenatal visit, before the 12th week of pregnancy, and followed up until the end of pregnancy (cohort 1). A blood sample was collected in each trimester of pregnancy and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. None of the women included in the longitudinal study had diabetes or any other chronic disease.

To analyze the relationship of ANGPTL8 to GDM, whether it was present in fetal life and its relationship with fetal development, we included 46 GDM and 37 control pregnant women, matched for age and body mass index (BMI), enrolled in a prospective prebirth cohort, and their children (cohort 2). The participants were recruited at the time of the antenatal oral glucose tolerance test (OGTT) before the 30th week of pregnancy and were monitored from the time of inclusion until delivery. All participants underwent a 3-hour, 100-g OGTT, and those with 2 or more values above the threshold proposed by the *National Diabetes Data Group* were considered GDM. Those with values below the threshold were classified as control. Umbilical cord blood was obtained at the time of delivery, and a complete anthropometric evaluation was performed in 64 neonates (33 born to control women and 31 born to GDM women). Fifteen control and 29 GDM women were re-evaluated 12–20 weeks after pregnancy. The following three exclusion criteria were applied before 36 weeks of pregnancy: identified fetal anomalies, inflammatory diseases, or preeclampsia.

**Clinical and demographic data.** On inclusion, demographic and historical information of participants was collected using an interviewer-administered questionnaire focused on personal medical and obstetrical history, and also information regarding the current pregnancy with particular attention to risk factors for GDM. Maternal anthropometry was

recorded as follows: height, prepregnancy weight, and weight at the end of pregnancy in all pregnancies. In the longitudinal study, weight was also recorded at each evaluation, in the first, second, and third trimester of pregnancy. Prepregnancy BMI was calculated using the formula: prepregnancy weight (kg)/(height [m])<sup>2</sup>. The same procedure was used to calculate BMI in first, second, and third trimester and postpartum evaluations. Increased BMI was calculated by the formula BMI gain = final BMI – prepregnancy BMI.

Neonatal length and weight were determined in all participants within 48 hours after delivery using a measuring board to the nearest 0.1 cm and a calibrated scale to the nearest 10 g. Infant size was defined according to gestational age and sex population-specific growth charts<sup>20</sup> as large for gestational age (LGA) if the infants were >90th percentile birth weight at each gestational age for fetal sex, and small for gestational age (SGA) when they were <10th percentile. Those with birth weights  $\geq 10$ th and  $\leq 90$ th percentiles were considered adequate for gestational age (AGA). Tricipital, subscapular, and suprailiac skinfold thickness were measured within the first 48 hours of life. The sum of the 3 skinfolds (SSF) was used as a surrogate marker of neonatal fat mass.<sup>21</sup> SSF showed a normal distribution without significant differences between infants born to GDM and those born to control mothers. The cutoff points used to establish the 3 subgroups were the 25th percentile (10.84 mm) and the 75th percentile (12.46 mm). Subgroup 1 included pregnant women and their infants with SSF below 10.84 mm, subgroup 2 included those with SSF between 10.84 and 12.46 mm, and subgroup 3 included those with neonatal SSF above 12.46 mm.

**Laboratory analysis.** Maternal blood samples were obtained after an overnight fast and during pregnancy at the time of OGTT. Cord blood samples were obtained from the umbilical vein at delivery. Serum was immediately separated by centrifugation and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until laboratory determinations. Circulating ANGPTL8 levels in human samples were determined using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Wuhan EIAab Science, Wuhan, China; catalog no. E11644h), with an intra-assay coefficient of variation (CV) <6.5%, interassay CV <9.2%, and spike average recovery of 102%. ELISA validation was performed by Western blotting, and a good correlation between both methods was observed ([Supplementary Figure 1](#)). In mouse samples, ANGPTL8 levels were determined using the Mouse ANGPTL8 ELISA Kit (Aviscera Bioscience, Santa Clara, Calif; catalog no. SK00528-16), with an intra-CV 4%–6% and inter-CV 8%–12%. To avoid the



influence of interassay variations between maternal and fetal concentrations, ANGPTL8 levels in the same maternal–fetal pair were assayed in the same experiment. Serum fasting glucose, insulin, triglycerides, total cholesterol, and high-density lipoprotein were determined by standard enzymatic methods. Insulin resistance and  $\beta$ -cell function were estimated using homeostatic model assessment (HOMA) IR and HOMA- $\beta$  as described.<sup>22</sup>

**In vitro cell culture.** The Simpson-Golabi-Behmel Syndrome (SGBS) preadipocyte cell line, provided by Dr Wabitsch (University of Ulm, Germany), was used as a cellular model of human subcutaneous white adipocytes (hWA) and was differentiated as described.<sup>23</sup> PAZ6 cells, kindly provided by Dr Tarik Issad (Institut Cochin, France), were used as a cellular model of human brown adipocytes (hBA).<sup>24</sup> An immortalized brown preadipocyte cell line<sup>25</sup> was used as a cellular model of murine brown adipocytes (mBA). To analyze ANGPTL8 secretion, cell culture medium was collected from the last 2 days of differentiation (between 10 and 14 days). Medium was concentrated using Amicom ultra columns (Millipore, Bilerica, Mass) before Western blotting. Adipose-derived stem cells (hASCs) were isolated from the subcutaneous adipose tissue of lean patients and differentiated following a published protocol.<sup>26</sup> During differentiation, hASCs cells were treated every second day with ANGPTL8 (20 ng/mL; Aviscera Biosciences, Santa Clara, Calif) or FGF21 (100 nM; PeproTech, Rocky Hill, NJ).

**Animal studies.** Chronic 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activation in vivo was used as an induction model of browning.<sup>25</sup> Eight-week-old mice were treated with 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) (0.5 mg/g; intraperitoneal) 3 times weekly for 2 weeks. Mice in the control group received an equivalent volume of vehicle. At the end of the treatment period, animals were sacrificed and adipose tissue was harvested. The study was approved by the local ethics committee, and all procedures were performed in accordance with the Federation of European Laboratory Animal Science Association.

For studies in pregnant mice and fetuses, C57/B16 female mice were mated overnight with male mice. The male was removed from the cage the next morning. When pregnant, the night after mating was considered day 0. At day 18, pregnant mice and age-matched nonpregnant female mice (controls, n = 5–6 animals per group) were sacrificed by decapitation and blood was obtained for plasma preparation. Fetuses were removed by caesarean section. Interscapular BAT from pregnant mice, female

controls, and fetuses was dissected and frozen for subsequent analysis.

**Gene expression analysis.** Total RNA was extracted from adipose cells using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Two micrograms of RNA was retrotranscribed with random primers using the Reverse Transcription System (Applied Biosystems, Foster City, Calif). Quantitative gene expression was analyzed using the TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) on a 7900HT fast real-time polymerase chain reaction system. The following genes were evaluated: *ADRB3* (Hs 00609046\_m1), *COX4I1* (Hs00971639\_m1), *COX7A1* (Hs03045102\_g1), *CPT1a* (Hs00912671\_m1), *CTBP1* (Hs00972284\_m1), *ELOVL3* (Hs00537016\_m1), *FOXC2* (Hs00270951\_s1), *PPARGC1A* (Hs01016719\_m1), *PPARGC1B* (Hs00991677\_m1), *PRDM16* (Hs00922674\_m1), *ANGPTL8* (Mm01175863\_g1), *B2M* (Mm00437762\_m1), *TMEM26* (Hs00415619\_m1), *TBX1* (Hs00271949\_m1), *UCP1* (Hs00218820\_m1 and Mm01244861\_m1), and *18S* (Hs03928985\_g1).

**Western blot analysis.** Equal amounts of protein were subjected to SDS-PAGE, transferred to immobilon membranes and blocked.<sup>27</sup> Immunoreactive bands were visualized using SuperSignal West Femto chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, Ill), and images were captured using the VersaDoc Imaging System and Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, Calif). The following antibodies were used: ANGPTL8 (Aviscera Biosciences, catalog no. SAB3501080), UCP1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif; catalog no. sc-6528), and GAPDH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; catalog no. GW22763). For all the experiments, antibody dilutions were 1/1000, and incubation was carried out at 4°C overnight.

**Statistical analysis.** Data were analyzed with SPSS software version 17.0 (IBM, Armonk, NY). The 1-sample Kolmogorov–Smirnov test was performed to verify the normal distribution of the quantitative variables. Normally distributed data are expressed as mean  $\pm$  SD, whereas variables with a skewed distribution are represented as the median [Q25–Q75]. Categorical variables are reported as number (percentages), and chi-squared test was used to analyze differences between groups. Student's *t*-test and the paired *t*-test were used to compare the mean values of continuous variables normally distributed between independent groups. Mann–Whitney U and Wilcoxon tests were used for variables with skewed distributions. One-way analysis of variance, Kruskal–Wallis test, and the repeated measures analysis of variance with post hoc analysis were used to test

differences between more than 2 variables as required. The Pearson correlation coefficient was used to assess univariate relationships. Variables with skewed distribution were log-transformed before analysis. A 2-sided *P* value <0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

**Circulating levels of ANGPTL8 are regulated during pregnancy.** We first measured ANGPTL8 levels from the first to third trimester in a longitudinal cohort of pregnant women. **Table I** summarizes clinical and metabolic data of this group (cohort 1). Serum ANGPTL8 levels progressively decreased across pregnancy (**Fig 1A**), whereas BMI, insulin resistance homeostatic model assessment (HOMA-IR) index, total cholesterol, triglycerides, and insulin concentrations increased. ANGPTL8 levels in each trimester were positively correlated between each other (data not shown), but no other association was observed.

We next measured maternal, cord blood, and postpartum ANGPTL8 concentrations in a larger cohort of GDM and control women and their offspring to assess differences according to the maternal glucose tolerance status, and to investigate possible implications for fetal growth (cohort 2). Mother and child clinical metabolic data are presented in **Table II**. The HOMA-IR index and triglycerides concentrations were higher in the GDM group than those in the control group (*P* = 0.019 and *P* = 0.006, respectively). No differences were observed in pregnancy or postpartum maternal ANGPTL8 levels between both groups, whereas cord blood ANGPTL8 levels were lower in GDM women than those in control women (*P* = 0.033). GDM women

gained less weight at the end of pregnancy, mainly because of a lower weight increase in the third trimester.

In the whole group, ANGPTL8 concentrations were significantly lower in maternal serum than those in cord blood (2887.47 ± 1195.62 vs 3593.74 ± 628.12 pg/mL; *P* = 0.003; **Fig 1B**); however, this difference disappeared when the groups were considered separately (**Fig 1C**). ANGPTL8 concentrations were significantly lower in postpartum than those in pregnancy (2221.98 ± 1143.00 vs 321.52 ± 175.39 pg/mL; *P* < 0.001) when the whole group was analyzed and remained significant when the groups were considered separately (**Fig 1B** and **C**, respectively). This increase in ANGPTL8 concentrations associated with pregnancy was also observed in mice (**Supplementary Figure 2**). Similar cord blood ANGPTL8 concentrations were observed according to offspring sex (3089.57 ± 978.65 in males vs 3093.97 ± 783.97 pg/mL in females; *P* = NS). Maternal ANGPTL8 and cord blood ANGPTL8 levels were positively correlated (*r* = 0.426; *P* < 0.001; **Fig 1D**), but no other significant associations were detected between ANGPTL8 levels and other maternal or neonatal parameters.

**Cord blood ANGPTL8 and fetal growth.** To investigate whether cord blood ANGPTL8 levels associated with fetal growth, we compared cord blood concentrations according to birth weight (SGA, AGA, and LGA). ANGPTL8 concentrations were significantly different among the 3 groups (SGA: 3128 ± 1074.02, AGA: 2251.80 ± 1017.64, and LGA: 2906.35 ± 1240.25 pg/mL; *P* = 0.020; **Fig 1E**). To assess whether this distribution was related to differences in the amount of fat mass, we analyzed neonates according to the sum of skinfolds. We observed a U-shaped curve, with the highest values in the first and third tertile, and the lowest in the second tertile. (1st tertile:

**Table I.** ANGPTL8 concentrations, clinical, and metabolic parameters of the population studied during pregnancy

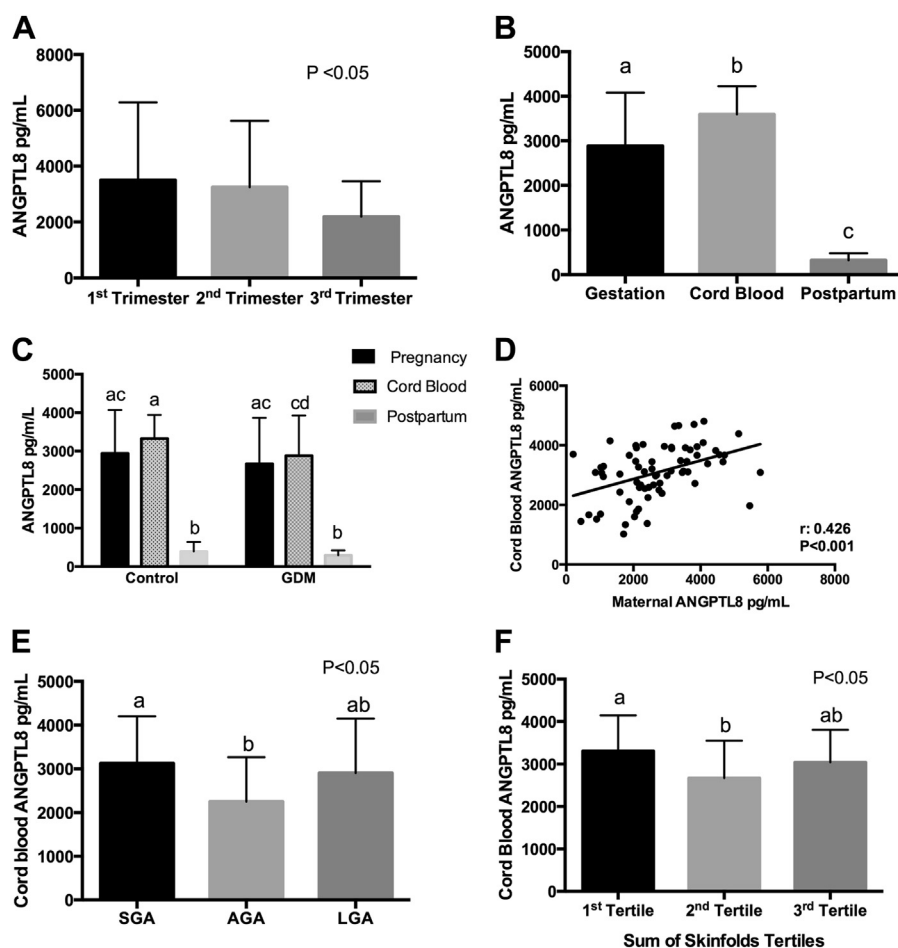
	1st trimester (evaluation)	2nd trimester (evaluation)	3rd trimester (evaluation)	<i>P</i> value
Gestational week (weeks)	10.09 ± 1.38	25.64 ± 1.63	33.27 ± 1.56	—
BMI (kg/m <sup>2</sup> )* <sup>††</sup>	24.91.00 ± 4.77	26.97 ± 4.46	28.12 ± 4.55	<0.001
Glucose (mg/dL)*	83.67 ± 5.73	78.07 ± 7.00	81.04 ± 6.78	0.003
Insulin (mcU/mL) <sup>††</sup>	6.83 (4.80–11.37)	9.34 (7.62–10.67)	11.94 (7.01–16.09)	0.023
HOMA-IR <sup>††</sup>	1.37 [1.07–2.25]	1.78 [1.42–2.19]	2.56 [1.33–3.47]	0.036
HOMA-β <sup>†</sup>	126.00 (70.38–227.70)	213.90 (152.16–552.15)	244.40 (184.35–297.56)	0.002
Total cholesterol (mg/dL) <sup>††</sup>	173.24 ± 27.83	236.98 ± 27.98	264.42 ± 33.05	<0.001
HDL cholesterol (mg/dL)*	61.28 ± 8.07	70.06 ± 12.27	69.96 ± 13.99	0.014
Triglycerides (mg/dL) <sup>*††</sup>	75.27 ± 36.28	161.18 ± 62.16	201.27 ± 74.12	<0.001
ANGPTL8 (pg/mL)	3540.15 ± 2782.54	3247.54 ± 2374.89	2191.16 ± 1274.57	0.031

*Abbreviations:* BMI, body mass index; HDL, high density lipoprotein; HOMA-IR, insulin resistance homeostatic model assessment; HOMA-β, beta cell function—homeostatic model assessment.

\**P* < 0.05 between 1st trimester and 2nd trimester.

<sup>†</sup>*P* < 0.05 between 1st trimester and 3rd trimester.

<sup>††</sup>*P* < 0.05 between 2nd trimester and 3rd trimester.



**Fig 1.** ANGPTL8 concentrations in pregnancy, postpartum, and cord blood. (A) Maternal serum ANGPTL8 concentrations in each trimester of normal pregnancy were compared with repeated measures ANOVA ( $P = 0.011$ ), (B) Paired  $t$ -test between ANGPTL8 concentrations in gestation and in cord blood, between ANGPTL8 in gestation and postpartum, and between ANGPTL8 concentrations in cord blood and postpartum in the whole group, and (C) in the control and GDM group analyzed separately. (D) The Pearson correlation between maternal (27 weeks of pregnancy) and cord blood ANGPTL8 concentrations. (E) Cord blood ANGPTL8 concentrations in newborns according to birth weight and (F) to sum of skinfolds tertiles analyzed by ANOVA ( $P < 0.05$  for both). For all graphics, groups with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). AGA, adequate for gestational age; ANGPTL8, angiopoietin-like protein 8; ANOVA, analysis of variance; GDM, gestational diabetes mellitus; LGA, large for gestational age; SGA, small for gestational age.

$3305.03 \pm 840.70$ , 2nd tertile:  $2670.27 \pm 883.55$ , and 3rd tertile:  $3039.76 \pm 764.59$  pg/mL;  $P = 0.047$ ; Fig 1F). These differences remained after adjusting for GDM diagnosis. No differences in ANGPTL8 concentrations were observed according to the type of birth (vaginal, scheduled or unplanned cesarean).

**ANGPTL8 is secreted by brown adipocytes in vitro and is related to a browning phenotype in mice and humans.** Given the high levels of cord blood ANGPTL8 and its relationship with neonatal fat mass, we next examined the potential effect of this protein on adipose tissue metabolism. Furthermore, considering the relevance of BAT in fetal life and in pregnancy together with the high levels of ANGPTL8 observed in both

settings, we also explored whether this protein may be involved in the regulation of BAT and browning.

Analysis of several adipocyte cell lines revealed the presence of ANGPTL8 in the culture medium as determined by Western blotting of concentrated supernatants (Fig 2A), suggesting a process of secretion. Moreover, higher amounts of ANGPTL8 were found in supernatants from human and murine brown adipocytes (hBA and mBA) than those in the white adipose cell line (hWA; Fig 2A). To investigate the relationship between ANGPTL8 and browning of WAT in vivo, we used prolonged AICAR-induced AMPK activation as a browning stimulus in mice.<sup>24</sup> Consistent with previous findings observed in gonadal

**Table II.** Clinical and metabolic characteristics of the mother and infants pairs

	Control (N = 37)	GDM (N = 46)	P value
<b>Maternal characteristics in pregnancy</b>			
Age (years)	31.49 ± 5.44	32.11 ± 4.92	NS
Gestational week (weeks)	27.24 ± 1.30	27.55 ± 1.89	NS
Prepregnancy BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.75 ± 4.14	25.66 ± 4.89	NS
ΔBMI (kg/m <sup>2</sup> )	4.80 ± 1.76	3.57 ± 2.08	0.005
ΔBMI in third trimester (kg/m <sup>2</sup> )	2.13 ± 1.18	0.80 ± 1.12	<0.001
Fasting glucose (mg/dL)	80.30 ± 7.24	85.38 ± 11.03	0.018
Total cholesterol (mg/dL)	254.64 ± 36.52	254.06 ± 41.63	NS
HDL cholesterol (mg/dL)	76.19 ± 13.48	71.50 ± 13.98	NS
Triglycerides (mg/dL)	159.92 ± 39.55	193.06 ± 65.98	0.006
Fasting insulin (mUI/L)	7.39 (5.46–11.20)	9.86 (6.01–14.72)	0.033
HOMA-IR	1.48 (1.05–2.24)	2.08 (1.39–3.37)	0.019
HOMA-β Pregnancy	184.99 (127.69–249.75)	157.15 (128.73–279.14)	NS
mANGPTL8 (pg/mL)	2941.28 ± 1128.46	2667.30 ± 1198.11	NS
<b>Newborn characteristics*</b>			
Gestational week delivery (week)	39.32 ± 1.56	39.09 ± 1.23	NS
Male sex, n (%)	17 (45.95%)	27 (57.45%)	NS
Birth weight (g)	3320.65 ± 530.08	3283.40 ± 434.19	NS
Birth weight Z-Score	0.48 ± 0.92	0.36 ± 0.91	NS
Sum skinfolds (mm)	12.37 ± 2.67	11.35 ± 1.79	NS
Cord blood Insulin (mUI/L)	4.37 (2.66–8.48)	4.89 (3.17–11.05)	NS
Cord blood ANGPTL8 (pg/mL)	3325.02 ± 617.44	2883.26 ± 1043.79	0.033
<b>Postpartum<sup>†</sup></b>			
Postpartum evaluation (months)	5.04 ± 7.54	3.90 ± 5.63	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.27 ± 4.94	26.25 ± 5.24	NS
Glucose (mg/dL)	91.927 ± 7.42	91.93 ± 9.40	NS
Insulin (mUI/L)	6.17 [5.34–10.48]	5.73 [4.98–10.79]	NS
Total cholesterol (mg/dL)	204.41 ± 33.35	211.41 ± 31.89	NS
HDL cholesterol (mg/dL)	69.03 ± 14.20	62.82 ± 15.03	NS
Triglycerides (mg/dL)	76.07 ± 34.04	81.46 ± 34.09	NS
HOMA-IR	1.45 (1.08–2.12)	1.35 (1.06–2.47)	NS
HOMA-β	87.87 (72.33–138.00)	82.92 (167.38–110.91)	NS
ANGPTL8 (pg/mL)	394.10 ± 245.97	294.98 ± 129.30	NS

Abbreviations: BMI, body mass index; GDM, gestational diabetes mellitus; HOMA-IR, insulin resistance homeostatic model assessment; HOMA-β, beta cell function—homeostatic model assessment.

\*Newborn evaluation: 33 born to control women and 31 born to GDM women.

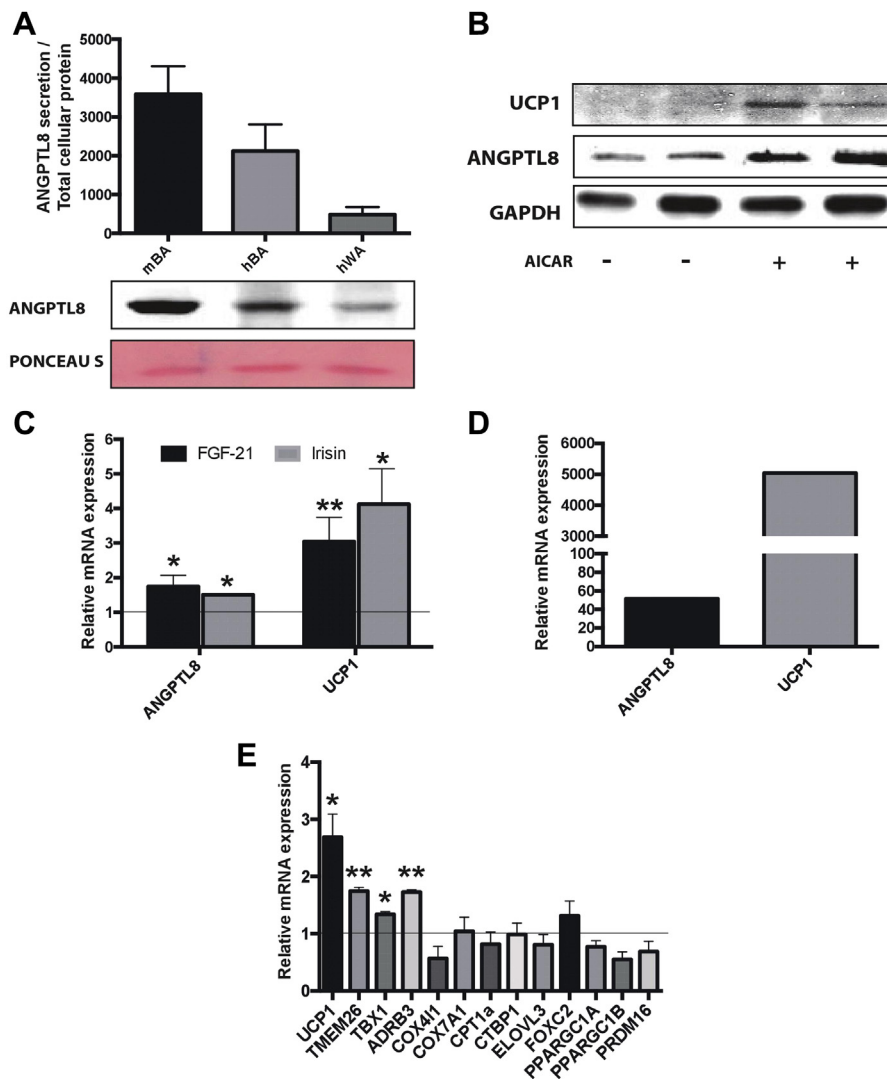
<sup>†</sup>Postpartum evaluation: 15 control and 29 GDM women.

fat,<sup>28</sup> an increase in protein expression of the BAT marker Uncoupling protein 1 (UCP1) was detected in subcutaneous WAT of mice after pharmacologic activation of AMPK (Fig 2B). Notably, this increase in browning correlated with a significant increase in ANGPTL8 protein levels (Fig 2B). Alternative browning agents, such as FGF21<sup>29,30</sup> and irisin,<sup>31,32</sup> also increased ANGPTL8 levels of in vitro differentiated hASCs (Fig 2C). A unique browning model in adulthood is pheochromocytoma, as this adrenal tumor has an excess of catecholamine secretion that induces BAT markers in peritumoral adipose tissue. Remarkably, a significant increase of ANGPTL8 levels in visceral adipose tissue of pheochromocytoma patients was also found (Fig 2D), confirming that the expression of ANGPTL8 is particularly high in inducible beige/brite adipose tissue.<sup>33</sup> Finally, chronic ANGPTL8 exposure during hASC differenti-

ation in vitro induced a BAT expression profile as illustrated by a significant increase in the messenger RNA levels of brown adipocyte markers such as UCP1, TMEM26, TBX1, and β3-AR (Fig 2D). Overall, our results point to ANGPTL8 as a new factor released by both classic and inducible BAT, with a significant browning effect on precursor cells derived from human WAT.

## DISCUSSION

Pregnancy is associated with changes in maternal metabolic homeostasis that induce modifications in the fetal and maternal hormonal milieu. In the present study, we show that serum ANGPTL8 levels fluctuate dramatically during this period, with peak levels found during the first trimester and thereafter decreasing as pregnancy progresses. Furthermore, we confirm that ANGPTL8 is present during fetal life with high



**Fig 2.** ANGPTL8 is secreted by brown adipocytes and stimulates browning. **(A)** Brown adipocytes secrete ANGPTL8. Cells were differentiated as described, and conditioned medium was collected after 12 days of differentiation. Secreted ANGPTL8 was analyzed by Western blotting of concentrated medium obtained from murine and human brown adipocytes (mBA and hBA, respectively) and human white adipocytes (hWA). Ponceau S staining was used to verify equal loading of proteins from the conditioned media. A representative experiment is shown together with densitometric analysis ( $n = 3$ ). **(B)** Prolonged AICAR-induced AMPK activation in vivo increases ANGPTL8 protein levels in inguinal adipose tissue. UCP1 expression was used as a positive control of browning. GAPDH was used as a loading control. **(C)** Browning of hASCs is related to increased ANGPTL8 expression. hASCs were treated with FGF21 (100 nM) or irisin (10 nM) every second day during differentiation, and mRNA ANGPTL8 levels were analyzed by qPCR. Gene expression of ribosomal 18s was used for normalization. Mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Student's  $t$ -test. **(D)** ANGPTL8 is increased in pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue. The expression of UCP1 and ANGPTL8 were determined by qPCR in visceral AT from healthy and pheochromocytoma subjects. Gene expression of PPIA was used for normalization. Mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , Student's  $t$ -test. **(E)** ANGPTL8 induces UCP1 expression in hASCs. Cells were treated with ANGPTL8 (20 ng/mL) every second day during differentiation, and mRNA levels of several browning markers were studied. Gene expression of ribosomal 18s was used for normalization. Mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Student's  $t$ -test. AT, adipose tissue; ANGPTL8, angiopoietin-like protein 8; hASCs, adipose-derived stem cells; mRNA, messenger RNA; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; SEM, standard error of the mean; UCP1, uncoupling protein 1.

circulating levels in cord blood and exhibits a U-shaped relationship with neonatal fat mass. Interestingly, we also show for the first time that ANGPTL8 is secreted

by brown adipocytes, suggesting that BAT may be an alternative source of the peptide. Intriguingly, ANGPTL8 also induces a browning effect on WAT.

Few studies have explored the regulation of ANGPTL8 during pregnancy and, to the best of our knowledge, changes in ANGPTL8 concentrations along pregnancy have not previously been investigated. We found that during normal pregnancy, maternal circulating ANGPTL8 levels are approximately 10-fold higher than those in the nonpregnant state, and decrease progressively from the first to the third trimester. Our results are in accord with recent reports from Ebert et al.<sup>15</sup> and Trebotic et al.,<sup>17</sup> who observed increased ANGPTL8 concentrations in pregnancy. Contrastingly, Wawrusiewicz-Kurylonek et al.<sup>16</sup> failed to find differences in ANGPTL8 concentrations during pregnancy, although in this study pregnancy blood samples were obtained at a later timepoint, close to the peripartum period. The role of ANGPTL8 in glucose homeostasis, as a promoting factor for  $\beta$ -cell proliferation in insulin resistance states,<sup>3</sup> has been recently questioned.<sup>34,35</sup> In line with this controversy and in agreement with other reports,<sup>15,16</sup> we were unable to demonstrate a relationship between insulin secretion markers and ANGPTL8 concentrations in a physiological environment of marked insulin resistance. Indeed, we found that as maternal weight, insulin concentrations and HOMA-IR index increased, ANGPTL8 concentrations decreased but not in a synchronous manner because no inverse relationship was found. Supporting this observation, similar ANGPTL8 concentrations were found in GDM and control women during pregnancy, unlinking this protein to glucose metabolism in pregnancy. These data conflict with previous reports that describe increased ANGPTL8 levels in GDM women,<sup>15,16</sup> which could be attributed to differences in the sampling times or to the ELISA used.<sup>36</sup> However, no clear relationship with insulin sensitivity or insulin-secretion variables was found in these studies and only an inverse correlation with C-peptide was described, both in normal and in GDM pregnant women. These data reinforce the lack of association between ANGPTL8 and glucose metabolism during pregnancy. Outwith pregnancy, data for type 2 diabetes and obesity has also yielded equivocal results,<sup>8,10,11,37</sup> and assay-dependent variability because of differences in proteolytic degradation of ANGPTL8 have been proposed.<sup>36</sup> Full length ANGPTL8 is cleaved at a proprotein convertase consensus site, releasing the N-terminal domain. The ELISA kit used in the present study (EIAab) detects the N terminus and measures full-length ANGPTL8 concentrations. By contrast, other assays such as those from Phoenix Pharmaceuticals detect an epitope from the C-terminal domain, measuring all ANGPTL8 species including full-length and C-terminal fragments. In pregnancy, a recent report showed that ANGPTL8 concentrations measured by 2 methods, despite corre-

lating significantly with one another, yielded contrasting results.<sup>17</sup> Moreover, given that ANGPTL8 expression is regulated by cold exposure,<sup>19</sup> fasting and feeding,<sup>1,2</sup> and that pregnancy is characterized by changes in the regulation of postprandial and postabsorptive glucose and lipid metabolism, differences in diet composition and sampling time might also explain these discrepancies.

We show that ANGPTL8 is present during fetal life and its concentrations are much higher in umbilical cord blood than that in maternal serum. Some authors have suggested a role for ANGPTL8 in  $\beta$ -cell proliferation during fetal life<sup>16</sup>; however, the lack of a relationship of ANGPTL8 with insulin-secretory markers together with the recent doubts raised concerning its capacity to induce  $\beta$ -cell expansion,<sup>34,35</sup> lead us to propose a potential involvement of ANGPTL8 in fetal growth and development. *ANGPTL8* is known to be highly expressed in the liver,<sup>3</sup> WAT, and BAT<sup>4</sup> and to a lesser extent in placenta.<sup>16</sup> *ANGPTL8* expression is induced by environmental and nutritional factors<sup>1,2,19</sup> and also by stimuli known to induce browning.<sup>31</sup> Indeed, we demonstrate for the first time that BAT *ANGPTL8* expression in both pregnant mice and fetuses follows the same pattern as *UCP1* ([Supplementary Figure 3](#)). Thus, a downregulation of *ANGPTL8* is detected in BAT of pregnant mice, in line with the decrease in the thermogenic activity of BAT during pregnancy.<sup>38,39</sup> Conversely, higher expression levels of *ANGPTL8* were detected in BAT from fetuses at term than those in adult mice.

Until now, no data have been published on BAT as an alternative source of ANGPTL8. We show here that murine and human brown adipocyte cell lines express this protein. The protein characteristics of ANGPTL8 suggest that it might function as a secreted factor because it lacks features indicative of enzymatic activity<sup>3,5</sup>; however, until now, no study had reported ANGPTL8 expression in adipocyte cultures. In addition, we also show that ANGPTL8 has a browning effect on WAT and induces brownish characteristics in differentiated hASCs as demonstrated by an increase in UCP1 expression. Moreover, and in a manner similar to that proposed for irisin,<sup>31</sup> we found that FGF21, a well-known brown fat thermogenic effector in murine models,<sup>30</sup> induces ANGPTL8 and UCP1 expression in hASCs. Collectively, our results imply a possible role for ANGPTL8 in regulating browning.

BAT is visible in fetuses from around mid-gestation, when fetal adipose tissue first appears. BAT mass increases through late gestation<sup>40</sup> to a maximum just before birth, providing the newborn with protection against cold exposure. This process requires the orchestration of several endocrine stimulatory factors, which

act to maximize both the amount and the thermogenic potential of UCP1.<sup>41</sup> However, *UCP1* gene expression up to term is susceptible to changes in the maternal nutritional and endocrine environment, which can result in either an increase in the total amount of fat and/or a change in UCP1 abundance and therefore BAT. It is proposed that reduced maternal food intake through late gestation in normal pregnancies is accompanied by a decrease in fetal WAT and normal amounts of BAT.<sup>41</sup> On the other hand, increased maternal nutrient supply to the fetus induces an increase in the amount of BAT and WAT adipose tissue depots, although changes due to GDM remain unknown.<sup>41</sup>

Interestingly, in our cohort, cord blood ANGPTL8 concentrations were higher in SGA newborns and also in those with the lowest amount of fat mass, and this association was independent of the maternal glucose tolerance status. ANGPTL8 concentrations were lowest in AGA and in those in the second tertile of fat mass. Considering that BAT can secrete ANGPTL8, which can then stimulate browning, we are tempted to speculate that in fetuses with low amounts of fat mass, and therefore low protective insulator capacity, the high ANGPTL8 concentrations observed are a compensatory mechanism to a condition of low BAT mass. ANGPTL8 concentrations exhibited a trend to be higher in newborns with the highest amount of fat mass and LGA. Considering that emerging evidence suggests that the association between birth weight and metabolic disorders may not be linear,<sup>42</sup> the U-shaped relationship observed in our study with cord blood ANGPTL8 concentrations point to a potential role for ANGPTL8 in the modulation of energy metabolism later in life.

In contrast to a recent report,<sup>16</sup> we observed lower cord blood ANGPTL8 concentrations in offspring of GDM mothers than in those born to control mothers, despite the finding that newborns had similar birth weights and neonatal adiposity. In our cohort, BMI gain was lower in GDM than that in control women, resulting from a reduction in food intake that may be accompanied by a reduction in the nutrient supply to the fetus. It is well-known that treated GDM is associated with deceleration of fetal growth velocity and normalization of birth weight and fetal adiposity.<sup>43,44</sup> In animal models, a reduction in food consumption in the final months of gestation is accompanied by a reduction in WAT rather than in brown adipocyte number.<sup>41</sup> Considering this and the fact that the reduced amount of fat present in the newborn has a greater capacity to retain UCP1, indicative of a protective mechanism against cold exposure after birth, we believe that offspring of GDM women might have more efficient BAT, and therefore, the compensatory increase in ANGPTL8 is not needed.

We are aware that this work has some limitations. The observational design of the study does not allow for causal inference between the analyzed variables, and so we cannot establish a direct relationship between cord blood ANGPTL8 and brown adipose homeostasis in the setting of pregnancy. Nevertheless, in support of our hypothesis 2 recent reports have proposed that cord blood irisin, a myokine involved in browning, is also a marker of the BAT depot in early life, suggesting that in low birth weight infants, it might be a biomarker for the appearance of insulin resistance in later life.<sup>45,46</sup>

In summary, we show that maternal ANGPTL8 concentrations are increased in pregnancy and in fetal life and, in the latter situation, seem to be regulated by nutritional factors. We propose that ANGPTL8 might function to activate and expand the thermogenic machinery during the fetal–neonatal transition, thereby providing a robust defense against hypothermia.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Conflicts of Interest: All authors have read the journal's policy on disclosure of potential conflicts of interest and no potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

This study was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the European Regional Development Fund (ERDF) (PI 12/0717 and PI 15/01562 to A. Megía; BFU2015-70454-REDT to F. Villarroya; SAF2012-36186 and SAF2015-65019-R to S. Fernández-Veledo, and PI14/00228 to J. Vendrell). The Spanish Biomedical Research Center in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM) (CB07708/0012) is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III. SF-V acknowledges support from the *Miguel Servet* tenure-track program (CP10/00438) from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) co-financed by the ERDF.

The authors are grateful to Miriam Campos and Lluís Gallart from the Biobank at Joan XXIII hospital for their help in laboratory work. All authors have read the journal's authorship agreement and that the article has been reviewed by and approved by all named authors.

#### Supplementary Data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2016.06.012>.

#### REFERENCES

1. Quagliarini F, Wang Y, Kozlitina J, et al. Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:19751–6.

- Zhang R. Lipasin, a novel nutritionally-regulated liver-enriched factor that regulates serum triglyceride levels. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;424:786–92.
- Yi P, Park JS, Melton DA. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic  $\beta$  cell proliferation. *Cell* 2013;153:747–58.
- Ren G, Kim JY, Smas CM. Identification of RIFL, a novel adipocyte-enriched insulin target gene with a role in lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;303:E334–51.
- Stephens JM. RIFL aims to be a new player in lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;303:E332–3.
- Espes D, Martinell M, Carlsson PO. Increased circulating betatrophin concentrations in patients with type 2 diabetes. *Int J Endocrinol* 2014;2014:323407.
- Hu H, Sun W, Yu S, et al. Increased circulating levels of betatrophin in newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2014;37:2718–22.
- Chen X, Lu P, He W, et al. Circulating betatrophin levels are increased in patients with type 2 diabetes and associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:E96–100.
- Ebert T, Kralisch S, Hoffmann A, et al. Circulating angiopoietin-like protein 8 is independently associated with fasting plasma glucose and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E2510–7.
- Gómez-Ambrosi J, Pascual E, Catalán V, et al. Circulating betatrophin concentrations are decreased in human obesity and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E2004–9.
- Fenzl A, Itariu BK, Kosi L, et al. Circulating betatrophin correlates with atherogenic lipid profiles but not with glucose and insulin levels in insulin-resistant individuals. *Diabetologia* 2014;57:1204–8.
- Barja-Fernández S, Folgueira C, Seoane LM, et al. Circulating betatrophin levels are increased in anorexia and decreased in morbid obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:E1188–96.
- Tseng YH, Yeh YH, Chen WJ, Lin KH. Emerging regulation and function of betatrophin. *Int J Mol Sci* 2014;15:23640–57.
- Guelinckx I, Devlieger R, Beckers K, Vansant G. Maternal obesity: pregnancy complications, gestational weight gain and nutrition. *Obes Rev* 2008;9:140–50.
- Ebert T, Kralisch S, Wurst U, et al. Betatrophin levels are increased in women with gestational diabetes mellitus compared to healthy pregnant controls. *Eur J Endocrinol* 2015;173:1–7.
- Wawrusiewicz-Kurylonek N, Telejko B, Kuzmicki M, et al. Increased maternal and cord blood betatrophin in gestational diabetes. *PLoS One* 2015;10:e0131171.
- Trebotic LK, Klimek P, Thomas A, et al. Circulating betatrophin is strongly increased in pregnancy and gestational diabetes mellitus. *PLoS One* 2015;10:e0136701.
- Symonds ME. Brown adipose tissue growth and development. *Scientifica (Cairo)* 2013;2013:305763.
- Fu Z, Yao F, Abou-Samra AB, Zhang R. Lipasin, thermoregulated in brown fat, is a novel but atypical member of the angiopoietin-like protein family. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;430:1126–31.
- Direcció General de Salut Pública. Generalitat de Catalunya, . Corbes de Referència de Pes, Perímetre Cranial I Longitud En Néixer de Nounats D' Embarassos Únics, de Bessons I de Trigemins a Catalunya. Available at: [http://canalsalut.gencat.cat/web/content/home\\_canal\\_salut/professionals/temes\\_de\\_salut/salut\\_maternoinfantil/documentacio/arxius/corbesdef3.pdf](http://canalsalut.gencat.cat/web/content/home_canal_salut/professionals/temes_de_salut/salut_maternoinfantil/documentacio/arxius/corbesdef3.pdf); 2008. Accessed March 10, 2015.
- Schmelzle HR, Fusch C. Body fat in neonates and young infants: validation of skinfold thickness versus dual-energy X-ray absorptiometry. *Am J Clin Nutr* 2002;76:1096–100.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–9.
- Ceperuelo-Mallafre V, Duran X, Pachón G, et al. Disruption of GIP/GIPR axis in human adipose tissue is linked to obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E908–19.
- Kazantzis M, Takahashi V, Hinkle J, et al. PAZ6 cells constitute a representative model for human brown pre-adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012;3:13.
- Vila-Bedmar R, Lorenzo M, Fernández-Veledo S. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase-mammalian target of rapamycin cross talk regulates brown adipocyte differentiation. *Endocrinology* 2010;151:980–92.
- Pachón-Peña G, Yu G, Tucker A, et al. Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles. *J Cell Physiol* 2011;226:843–51.
- Fernández-Veledo S, Nieto-Vazquez I, Rondinone CM, Lorenzo M. Liver X receptor agonists ameliorate TNF $\alpha$ -induced insulin resistance in murine brown adipocytes by down-regulating protein tyrosine phosphatase-1B gene expression. *Diabetologia* 2006;49:3038–48.
- Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, Nieto-Vazquez I, et al. GRK2 contribution to the regulation of energy expenditure and brown fat function. *FASEB J* 2012;26:3503–14.
- Fisher M, Kleiner S, Douris N, et al. FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev* 2012;26:271–81.
- Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ, et al. Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPAR $\alpha$  in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab* 2010;11:206–12.
- Zhang Y, Li R, Meng Y, et al. Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling. *Diabetes* 2014;63:514–25.
- Sanchis-Gomar F, Perez-Quilis C. The p38-PGC-1 $\alpha$ -irisin-betatrophin axis: exploring new pathways in insulin resistance. *Adipocyte* 2014;3:67–8.
- Hondares E, Gallego-Escuredo JM, Flachs P, et al. Fibroblast growth factor-21 is expressed in neonatal and pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue. *Metabolism* 2014;63:312–7.
- Gusarova V, Alexa CA, Na E, et al. ANGPTL8/betatrophin does not control pancreatic beta cell expansion. *Cell* 2014;159:691–6.
- Cox AR, Lam CJ, Bonnyman CW, Chavez J, Rios JS, Kushner JA. Angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8)/betatrophin overexpression does not increase beta cell proliferation in mice. *Diabetologia* 2015;58:1523–31.
- Fu Z, Abou-Samra AB, Zhang R. An explanation for recent discrepancies in levels of human circulating betatrophin. *Diabetologia* 2014;57:2232–4.
- Fu Z, Berhane F, Fite A, Seyoum B, Abou-Samra AB, Zhang R. Elevated circulating lipasin/betatrophin in human type 2 diabetes and obesity. *Sci Rep* 2014;4:5013.
- Martin I, Giralt M, Viñas O, Iglesias R, Mampel T, Villarroya F. Adaptive decrease in expression of the mRNA for uncoupling protein and subunit II of cytochrome c oxidase in rat brown adipose tissue during pregnancy and lactation. *Biochem J* 1989;263:965–8.
- Martínez de Morentin PB, Lage R, González-García I, et al. Pregnancy induces resistance to the anorectic effect of hypothalamic malonyl-CoA and the thermogenic effect of hypothalamic



- AMPK inhibition in female rats. *Endocrinology* 2015;156:947–60.
40. Clarke L, Bryant MJ, Lomax MA, Symonds ME. Maternal manipulation of brown adipose tissue and liver development in the ovine fetus during late gestation. *Br J Nutr* 1997;77:871–83.
  41. Symonds ME, Pope M, Sharkey D, Budge H. Adipose tissue and fetal programming. *Diabetologia* 2012;55:1597–606.
  42. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Spiegelman D, Ascherio AL, Stampfer MJ. Birth weight and adult hypertension, diabetes mellitus, and obesity in US men. *Circulation* 1996;94:3246–50.
  43. Au CP, Raynes-Greenow CH, Turner RM, Carberry AE, Jeffery HE. Body composition is normal in term infants born to mothers with well-controlled gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2013;36:562–4.
  44. Bahado-Singh RO, Mele L, Landon MB, et al. Fetal male gender and the benefits of treatment of mild gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 2012;206:422.e1–e5.
  45. Baka S, Malamitsi-Puchner A, Boutsikou T, et al. Cord blood irisin at the extremes of fetal growth. *Metabolism* 2015;64:1515–20.
  46. Joung KE, Park KH, Filippaios A, Dincer F, Christou H, Mantzoros CS. Cord blood irisin levels are positively correlated with birth weight in newborn infants. *Metabolism* 2015;64:1507–14.



# Angiopoietin-like protein 8/betatrophin as a new determinant of type 2 diabetes remission after bariatric surgery

MIRIAM EJARQUE<sup>1</sup>, MARIANNE BORLAUG<sup>1</sup>, NURIA VILARRASA<sup>1</sup>, BRUNO MARTINEZ-PEREZ, GEMMA LLAURADÓ, ANA MEGÍA, THOMAS HELLAND, CRISTINA GUTIERREZ, CAROLINA SERENA, ODDRY FOLKESTAD, CATALINA NUÑEZ-ROA, KELLY ROCHE, ANA CASAJOANA, ROSA FRADERA, JOSÉ MIGUEL GONZÁLEZ-CLEMENTE, MIGUEL LÓPEZ, ARNE C. MOHN, BJØRN G. NEDREBØ, RUBEN NOGUEIRAS, GUNNAR MELLGREN, JOHAN FERNØ, SONIA FERNÁNDEZ-VELEDO, and JOAN VENDRELL

TARRAGONA, MADRID, L'HOSPITALET DE LLOBREGAT, BARCELONA, SABADELL, AND SANTIAGO DE COMPOSTELA, SPAIN, AND BERGEN, AND HAUGESUND, NORWAY

This work aimed to explore the link between angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8) and weight loss after metabolic surgery. In the cross-sectional study (n = 100), circulating ANGPTL8 concentrations were significantly lower in morbidly obese than in lean subjects, and strikingly lower in morbidly obese patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). Conversely, ANGPTL8 expression in subcutaneous adipose tissue (SAT) was higher in morbidly obese patients, particularly in those with T2DM, whereas its expression in visceral adipose tissue was unchanged. The main predictors for circulating levels of ANGPTL8 were BMI and T2DM, whereas ANGPTL8 expression in SAT was determined by the presence of T2DM. The prospective cohort studies before and 1 year after bariatric surgery in morbidly obese patients with (n = 45) and without (n = 30) T2DM, revealed a significant increase of circulating ANGPTL8 levels 1 year after the bariatric surgery. Intriguingly, this increment, which was predicted by basal ANGPTL8 concentrations, appeared as a determinant of T2DM remission. In conclusion, circulating ANGPTL8 levels have an inverse relationship with SAT expression. Low basal levels of ANGPTL8 rebound after bariatric surgery. The increment in ANGPTL8 concentrations at 1 month of follow-up after weight loss emerged as a significant predictor of the T2DM remission at 1 year of follow-up. (Translational Research 2017;184:35–44)

<sup>1</sup>All authors contributed equally.

From the Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Institut Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain; CIBER Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERdem), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; Hormone Laboratory, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway; Obesity Unit and Endocrinology and Nutrition Departments, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Spain; Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital del Mar, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain; Department of Medicine, Haugesund Hospital, Haugesund, Norway; Hospital St. Pau i Sta Tecla, Tarragona, Spain; Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital de Sabadell, Corporació Sanitària i Universitària Parc Taulí (Universitat Autònoma de Barcelona), Sabadell, Spain; Department of Physiology, CIMUS, University of Santiago de Compostela-Instituto de Investigación Sanitaria, Santiago de Compostela, Spain; CIBER Fisiopatología de la Obesidad y

Nutrición (CIBERobn), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; KG Jebsen Center for Diabetes Research, Department of Clinical Science, University of Bergen, Bergen, Norway.

Submitted for publication November 7, 2016; revision submitted February 6, 2017; accepted for publication March 2, 2017.

Reprint requests: Joan Vendrell, and Sonia Fernández-Veledo, Pere Virgili Research Institute-Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, C/Dr. Mallafré Guasch, 4, 43007 Tarragona, Spain; e-mail: [sonia.fernandezveledo@gmail.com](mailto:sonia.fernandezveledo@gmail.com), [jvortega2002@gmail.com](mailto:jvortega2002@gmail.com) or Johan Fernø, KG Jebsen Center for Diabetes Research, Department of Clinical Science, University of Bergen, Laboratoriebygget, 8. etg, Haukeland Universitetssykehus, Jonas Lies vei 65, Bergen 5021, Norway; e-mail: [Johan.Ferno@uib.no](mailto:Johan.Ferno@uib.no).

1931-5244/\$ - see front matter

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2017.03.001>

**Abbreviations:** ANGPTL8 = Angiopoietin-like protein 8; SAT = Subcutaneous adipose Tissue; VAT = Visceral adipose Tissue; WAT = White adipose tissue; T2DM = Type 2 diabetes mellitus; ANGPTL3 = Angiopoietin-like protein 3; TG = Triglycerides; HDL = High-density lipoprotein; LDL = Low-density lipoprotein; RYGB = Roux-en-Y gastric bypass surgery; SG = Sleeve gastrectomy; LGCP = Laparoscopic greater curvature plication; BMI = Body mass index; HOMA-IR = Insulin resistance homeostatic model assessment; EWL = Excess weight loss; WL = Total weight loss; AWL = Alterable weight loss; WHR = Waist-hip ratio

## AT A GLANCE COMMENTARY

Ejarque M, et al.

### Background

Angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8) is associated with lipid and glucose homeostasis, suggesting that it may be directly related to bariatric surgery outcomes, specifically with T2DM.

### Translational Significance

We compared ANGPTL8 levels in lean and obese patients, with and without T2DM; as well as changes in a prospective manner following bariatric surgery, an intervention considered the most effective treatment for morbid obesity and obesity-associated T2DM. Our study shows that ANGPTL8 circulating levels are down-regulated in morbidly obese patients with T2DM. We demonstrate that massive weight loss but also metabolic status are important regulators of ANGPTL8 levels. Remarkably, ANGPTL8 enhancement after bariatric surgery is one of the main predictors of T2DM remission independently of weight loss.

## INTRODUCTION

Angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8; also known under a number of different aliases<sup>1-5</sup>) is a secreted protein initially reported to be highly expressed in liver but is also widely distributed in a variety of tissues. The finding that ANGPTL8 promoted  $\beta$ -cell proliferation and expansion of the  $\beta$ -cell mass suggested that it may be a promising agent in the treatment of metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus (T2DM)<sup>4</sup>; however, follow-up studies have questioned its role in  $\beta$ -cell function.<sup>3,6-8</sup> Indeed, given the controversy surrounding the original article and the problems regarding the reproducibility of data,<sup>4</sup> it has been voluntarily retracted<sup>9</sup> and ANGPTL8 is not currently considered a proven inducer of  $\beta$ -cell proliferation. Consequently, its physiological function is unclear and its molecular targets remain largely unknown.<sup>10,11</sup>

Circulating levels of ANGPTL8 is associated with intrinsic energy intake and expenditure, and in addition to its potential importance in glucose homeostasis, a role in lipid metabolism has been demonstrated.<sup>1,2,12</sup> The interaction of ANGPTL8 with angiopoietin-like protein 3 promotes the inhibition of lipoprotein lipase activity and ultimately modulates serum levels of triglycerides (TGs), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-cholesterol).<sup>1,13</sup>

There are conflicting reports regarding the concentration of circulating ANGPTL8 in obesity or T2DM.<sup>14-18</sup> Moreover, results obtained on the relationship between ANGPTL8 and lipid profile or insulin sensitivity are ambiguous and inconclusive. One animal model study reported that ANGPTL8 does not have a role in glucose metabolism,<sup>3</sup> although a recently published study points to a potential role for this protein in the amelioration of insulin resistance by increasing the insulin-mediated phosphorylation of several components of the insulin-signaling cascade.<sup>19</sup> Differences in the degree of insulin-resistance as well as different methodological approaches used to detect ANGPTL8<sup>20</sup> have been claimed as possible explanations for the discrepancies between previous studies that have measured circulating concentrations of ANGPTL8 in patients with obesity or T2DM.

In addition to the liver, white adipose tissue (WAT) is a substantial source of ANGPTL8. Studies in murine models of obesity suggest that ANGPTL8 is exclusively expressed in mature adipocytes<sup>2</sup>; however, data on human WAT are scarce. A previous study suggested that *ANGPTL8* expression in human adipose tissue (AT) is induced by insulin but also reported a paradoxical decrease in circulating plasma concentrations of ANGPTL8 during insulin infusion in a euglycemic-hyperinsulinemic clamp study.<sup>21</sup> Few studies have explored the regulation of ANGPTL8 in the context of metabolic disease and, to date, ANGPTL8 expression in AT in obese or T2D individuals and its regulation after bariatric surgery in T2D patients is not well understood.

Given the potential key role of ANGPTL8 as a regulatory factor for glucose and lipid metabolism, we hypothesized that ANGPTL8 levels might be directly related to bariatric surgery outcomes, specifically with T2D remission. In the present study, we compared

circulating ANGPTL8 levels in lean and obese patients, with and without T2DM. We also investigated changes in ANGPTL8 levels in a prospective manner following bariatric surgery, the intervention currently considered as the most effective treatment for morbid obesity and obesity-associated T2DM.<sup>22,23</sup> We analyzed the impact of surgery on ANGPTL8 concentrations in patients with morbid obesity, both with and without T2DM at the time of admission. In addition, we explored WAT expression of ANGPTL8 and its relationship with circulating levels in lean and morbidly obese individuals.

## MATERIAL AND METHODS

**Study design and patients.** The study comprised three different clinical sub-studies: 1) a cross-sectional study with lean and morbidly obese patients, with and without T2DM, undergoing bariatric surgery; 2) a prospective randomized controlled trial of patients with T2DM undergoing metabolic surgery, and 3) a confirmatory prospective study with morbidly obese patients undergoing bariatric surgery without T2DM. All studies were conducted in accordance to The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki).

**Cross-sectional study—cohort 1. Design.** Observational single point study.

**Participants.** One hundred subjects (60 women and 40 men) were included in the cross-sectional study (20 lean, 35 morbidly obese patients without T2DM, and 45 morbidly obese patients with T2DM). The obese subjects were recruited from patients scheduled for bariatric surgery for weight loss at the Endocrinology Departments at the University Hospital Joan XXIII (Tarragona, Spain) and University Hospital Bellvitge (Barcelona, Spain). Lean subjects were selected from an adipose tissue biobank registry at the University Hospital Joan XXIII. Subjects with signs of infection were excluded.

**Intervention.** All patients had fasted overnight before the collection of blood and AT samples. Visceral AT (VAT) and subcutaneous (SAT) samples from the same individuals were obtained during the bariatric surgical procedure. Control (lean) samples were obtained from the biobank from patients undergoing laparoscopy surgery for hiatus hernia repair or cholecystectomy. The study was approved by the respective local Ethics Committees review boards of the participating Hospitals. All participants gave their written informed consent to participate in the study.

**Prospective study—cohort 2. Design.** Prospective single center, non-blinded, randomized controlled trial, including morbidly obese patients with T2DM (This

trial was registered at [www.controlledtrials.com](http://www.controlledtrials.com) as ISRCTN 14104758 [completed 25/01/2016]).

**Participants.** Forty-five patients (30 women and 15 men) were consecutively recruited among patients undergoing bariatric surgery at the Department of Endocrinology, Bellvitge University Hospital, Spain. The inclusion criteria were age 18–60 years, T2DM, and BMI 35–42 kg/m<sup>2</sup>. Clinical and anthropometric data and blood samples were collected before surgery and at 1 month and 1 year after the bariatric surgery. The study was approved by the local Ethics Committee of Bellvitge University Hospital. All subjects gave written informed consent before study entry (the basal data of this cohort was used for the analysis of the cross-sectional study included in cohort 1 for T2DM patients).

**Randomization.** Patients were randomly assigned (1:1:1) to undergo either Roux-en-Y gastric bypass surgery (RYGB), sleeve gastrectomy (SG), or laparoscopic greater curvature plication (LGCP). Allocation of patients was assigned by simple randomization using envelopes, with stratification according to baseline levels of HbA<sub>1c</sub> (greater or lower than 7%) to avoid differences in metabolic control across the groups during randomization.

**Sample size.** It was calculated to detect a 20% difference in ANGPTL8 concentration before and 1 month after surgery and accepted a ( $\alpha$  error of 0.05, a power of 0.80). We calculated a minimum of 10 subjects per arm, but taking into account the possibility of loss at follow-up, 15 patients were finally assigned.

**Interventions.** From May 2012 to February 2014, patients were consecutively randomized to RYGB (n = 15), SG (n = 15), and LGCP (n = 15). The procedures were performed by the same surgeon at the same center.

**Outcomes.** To evaluate the rate of T2DM remission after surgery, we used the American Diabetes Association criteria, considering complete T2DM remission if HbA<sub>1c</sub> <5.7% without treatment, partial remission if HbA<sub>1c</sub> 5.7–6.5% with withdrawal of treatment and non-remission if HbA<sub>1c</sub> >6.5%, and/or still under treatment 1 year after surgery.<sup>24</sup>

**Prospective study—cohort 3. Design.** Prospective single center study including morbidly obese patients without T2DM.

**Participants.** Thirty subjects (22 women and 8 men) with age ranging from 23 to 59 years that met the criteria for surgical treatment of obesity at the time of inclusion (BMI >40 kg/m<sup>2</sup> or BMI >35 kg/m<sup>2</sup> and obesity-related illness) were consecutively recruited among patients undergoing bariatric surgery who attended at the Department of Surgery, Haugesund Hospital, Norway.

**Intervention.** Standardized laparoscopic bypass surgery (RYGB) was performed on all the patients by the same team of surgeons at Hugesund Hospital. Anthropometric measurements and collection of fasting venous blood samples were performed the day before and 1 year after bariatric surgery. SAT was obtained by surgical excision both pre- and post-operatively during local anesthesia. The study was approved by the Western Norway Regional Ethics Committee. All subjects gave written informed consent before study entry.

**Sample size.** Sample size was calculated to detect a 30% difference in ANGPTL8 concentration before and 1 year after surgery, with an error of 0.05 and power of 0.20.

**Study Procedures. Analytical determinations.** *ANGPTL8.* Circulating plasma levels of ANGPTL8 in cohorts 1 and 2 (Spain) were measured using a commercially available ELISA kit (Wuhan Eiaab Science, Wuhan, China; catalog no. E11644h) with an intra-assay coefficient of variation (CV) < 6.5% and an inter-assay (CV) < 9.2% (provided by the manufacturer).<sup>25-27</sup> ELISA validation was previously carried out in our laboratory by Western blotting and a good correlation was observed between both the methods.<sup>27</sup> Measurement of plasma ANGPTL8 in cohort 3 (Norway) was performed using the Human ANGPTL8 ELISA kit (CSB-EL028107HU; Cusabio, Wuhan, China) with an intra-assay CV < 8% and an inter-assay CV < 10% (provided by the manufacturer).<sup>28</sup>

**Gene expression analysis.** Total RNA was extracted from SAT and VAT using the RNeasy lipid tissue mini kit (QIAGEN Science). One microgram of RNA was reverse transcribed with random primers using the reverse transcription system high capacity cDNA kit (Applied Biosystems). Quantitative ANGPTL8 (Hs00218820\_m1) gene expression was evaluated with Taqman low-density arrays (Applied Biosystems; microfluidic cards) on a 7900HT fast real-time PCR system. The relative expression of each transcript was measured using the  $2^{-ddCt}$  method. Peptidylprolyl isomerase A (PPIA, cyclophilin A, Hs04194521\_s1) was used for normalization of gene expression levels and calculation of ddCt values.<sup>29</sup>

**Immunoblot analysis.** Human biopsies were lysed and homogenized in RIPA buffer containing protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St Louis, MI), and protein concentration was determined with the BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Equal amounts of total protein were separated on SDS-PAGE gels, transferred to Immobilon membranes (Millipore, Bedford, MA) and blocked. Immunoreactive bands (Anti-Betatrophin [SAB3501080; Sigma-Aldrich] and Anti-Fumarylacetoacetase [sc-66223; Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA]) were visualized with

SuperSignal West Femto chemiluminescent substrate (Pierce, ThermoFisher, MA) and images were captured using the VersaDoc imaging system with Quantity one software (Bio-Rad, Richmond, CA).<sup>30</sup>

**Statistical analyses.** All data were tested for normality (Shapiro-Wilk test). Data are shown as mean (SD; normally distributed) and median (25th–75th quartiles; non-normally distributed). One-way analysis of variance was used to compare groups in the cross-sectional study. The least square difference test was used for *post hoc* analyses. Paired *t*-test, Wilcoxon signed-rank test, or paired-one-way analysis of variance were used for paired analysis in the 2 prospective cohorts as appropriate. Pearson's and Spearman's correlation coefficients were used to analyze the relationship between parameters as described. To determine which variables were associated with circulating ANGPTL8 and *ANGPTL8* WAT gene expression (cohort 1) and with changes of circulating ANGPTL8 after bariatric surgery (prospective studies: cohorts 2 and 3), multiple linear regression analyses were employed (stepwise backward selection procedures). All variables associated in the univariate analysis with ANGPTL8 were included in their respective models. To determine if ANGPTL8 was associated with T2DM remission after bariatric surgery (prospective cohort 2), logistic regression analysis was employed (stepwise backward selection procedures). Two-tailed *P*-values < 0.05 were considered statistically significant. The calculations were made using STATA v.13.1 for Mac (StataCorp LP, College Station, Tex).

## RESULTS

**Circulating levels and WAT expression of ANGPTL8 are differentially regulated in obesity: cross-sectional study.** A total of 100 subjects were included in cohort 1 (clinical characteristics are shown in [Table 1](#)). Circulating levels of ANGPTL8 decreased across the three groups, with morbidly obese patients with T2DM having the lowest concentrations ( $101.6 \pm 18.8$  pg/mL), significantly different to lean controls ( $892.7 \pm 183.1$  pg/mL;  $P < 0.001$ ), and to morbidly obese patients without T2DM ( $548.0 \pm 63.3$  pg/mL;  $P < 0.001$ ). The difference between lean patients and obese patients without T2DM did not reach statistical significance ( $P = 0.244$ ; [Fig 1 A](#)). Univariate analysis is depicted in [Supplementary Table 1](#).

*ANGPTL8* gene expression was analyzed in SAT and VAT from the same patients. In contrast to our observations for serum levels, *ANGPTL8* mRNA expression was higher in SAT from morbidly obese patients with T2DM than in equivalent samples from morbidly obese patients without T2DM ( $2.00 \pm 0.47$  vs  $0.54 \pm 0.10$ ;  $P = 0.008$ ) and from lean subjects ( $2.00 \pm 0.47$  vs  $0.07 \pm 0.02$ ;

**Table I.** Clinical and laboratory data for the patients included in the cross-sectional study (cohort 1)

	Lean	Morbidly obese without T2DM	Morbidly obese with T2DM	<i>P for trend</i>
n	20	35	45	
Age (y)	49.5 (12.1)	43.1 (9.9)	49.9 (8.0) <sup>‡</sup>	0.008
Sex (M/F)	13/7	12/23	15/30	0.038
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.2 (2.5)	41.1 (3.2)*	39.5 (1.9) <sup>‡,‡</sup>	<0.001
Glucose (mmol/L)	5.0 (4.2–5.4)	5.0 (4.8–5.4)	8.5 (6.4–11.6) <sup>‡,‡</sup>	<0.001
Insulin (mIU/L)	6.1 (3.8–7.7)	14.2 (11.8–19.2)*	16.0 (11.1–19.0) <sup>‡</sup>	<0.001
HOMA-IR	1.2 (0.8–1.6)	3.2 (2.5–4.7)*	5.6 (3.6–9.1) <sup>‡,‡</sup>	<0.001
HbA1c (%)	-	-	7.2 (6.3–9.3)	-
Total cholesterol (mmol/L)	5.0 (4.3–5.2)	3.1 (2.9–3.5)*	4.8 (4.3–5.4) <sup>‡</sup>	<0.001
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.5 (1.4–1.7)	0.8 (0.6–1.0)*	1.1 (1.0–1.3) <sup>‡,‡</sup>	<0.001
LDL-cholesterol (mmol/L)	2.9 (2.3–3.2)	2.0 (1.7–2.3)*	2.8 (2.3–3.3) <sup>‡</sup>	<0.001
Triglycerides (mmol/L)	1.1 (0.8–1.2)	0.9 (0.6–1.1)	1.7 (1.2–2.0) <sup>‡,‡</sup>	<0.001

Abbreviations: T2DM, type 2 diabetes; BMI, body mass index; HOMA-IR, insulin resistance homeostatic model assessment; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein.

Data are presented as mean (SD) or median (25th–75th) quartiles as appropriate.

\**P* < 0.05 for LSD post hoc test comparing lean vs morbidly obese without T2DM. <sup>‡</sup>*P* < 0.05 for LSD post hoc test comparing lean vs morbidly obese with T2DM. <sup>‡‡</sup>*P* < 0.05 for LSD post hoc test comparing morbidly obese without T2DM vs morbidly obese with T2DM.

*P* < 0.001). Morbidly obese patients without T2DM also exhibited higher *ANGPTL8* expression than lean subjects ( $0.54 \pm 0.10$  vs  $0.07 \pm 0.02$ ; *P* < 0.001). No differences in *ANGPTL8* were observed in VAT between the 3 groups (Fig 1B). Of note, the differences observed between lean and morbidly obese patients with T2DM at the mRNA level were confirmed by western blotting with an antibody to *ANGPTL8* (Fig 1C).

In univariate analyses, *ANGPTL8* expression in SAT was positively associated with female gender ( $r = 0.406$ ; *P* < 0.001), BMI ( $r = 0.430$ ; *P* < 0.001), T2DM ( $r = 0.493$ ; *P* < 0.001), fasting plasma glucose concentrations ( $r = 0.418$ , *P* < 0.001), insulin ( $r = 0.416$ , *P* < 0.001), and HOMA-IR ( $r = 0.539$ ; *P* < 0.001; Fig 1D). *ANGPTL8* expression in SAT was negatively correlated with circulating *ANGPTL8* concentrations ( $r = -0.283$ ; *P* = 0.013; Fig 1D). *ANGPTL8* expression in VAT was positively associated with age ( $r = 0.256$ ; *P* = 0.015) and total cholesterol ( $r = 0.269$ , *P* = 0.013).

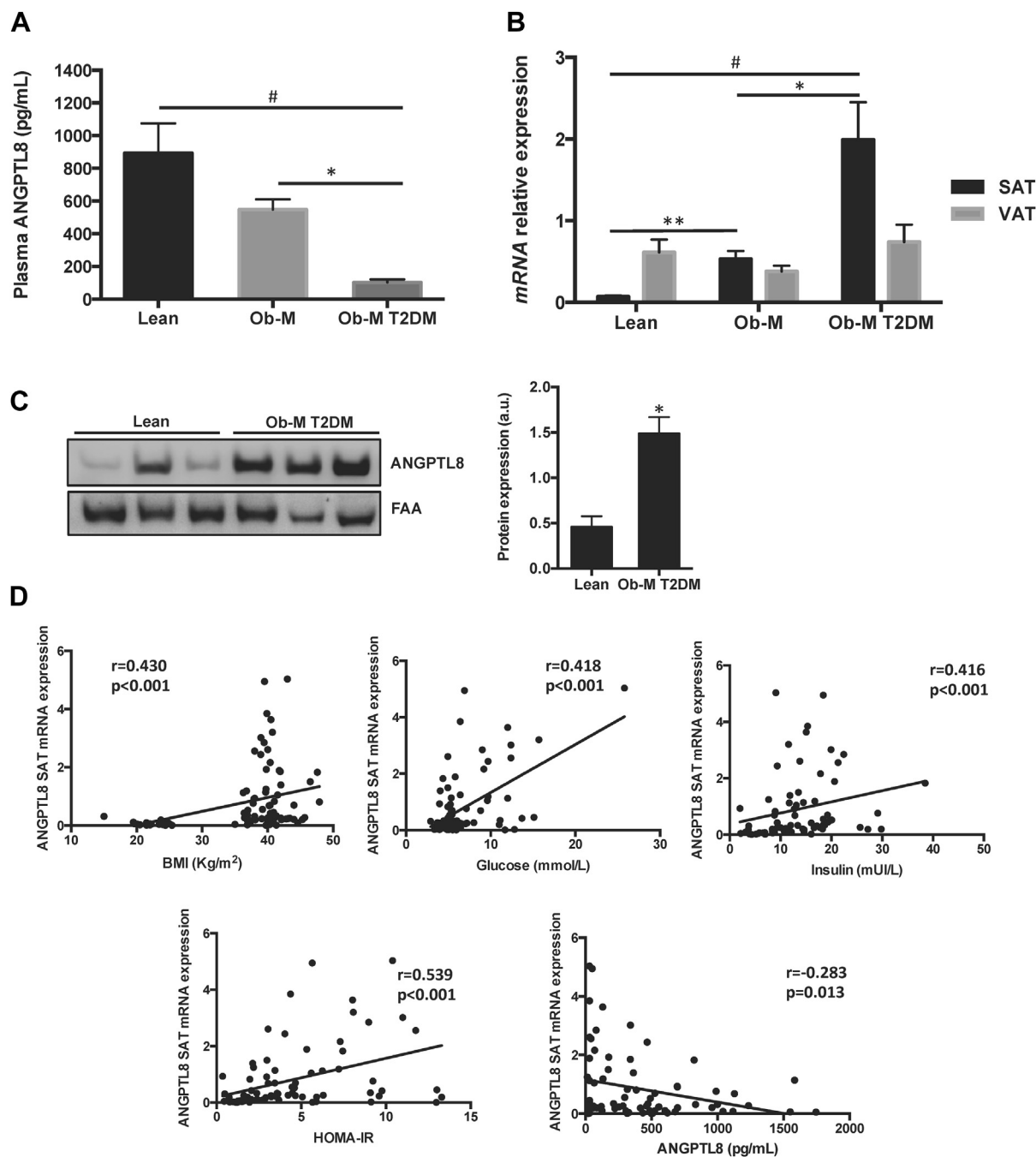
To find the best model to predict circulating changes in *ANGPTL8* concentrations, we design a multiple linear regression analysis (including all of the univariate associations described above and adjusted by gender, age, and the presence of T2DM). Only BMI ( $\beta = -0.262$ ; *P* = 0.006) and the presence of T2DM ( $\beta = -0.64$ ; *P* < 0.001) appear as significant variables influencing circulating levels of *ANGPTL8*. Moreover, the model that best predicted *ANGPTL8* expression in SAT was the presence of T2DM ( $\beta = 0.327$ ; *P* = 0.005).

**Circulating *ANGPTL8* increases after bariatric surgery and predicts T2DM remission.** A total of 45 morbidly obese patients with T2DM were included in a 1-year

follow-up prospective study (cohort 2). Patients were randomly assigned to RYGB, SG, or LGCP (Supplementary Fig 1), and their clinical characteristics were evaluated at baseline and at 1 month and 1 year after bariatric surgery Table II. Baseline characteristics were similar between the 3 surgery groups. As expected, weight, BMI, waist, and WHR were all decreased after bariatric surgery. The BMI-related changes %EWL, %WL, and the %AWL at 1 month and 1 year after bariatric surgery are shown in Supplementary Fig 2. Fasting plasma glucose, insulin concentrations, HOMA-IR, C-peptide, and HbA1c were also improved.

Circulating concentrations of *ANGPTL8* were increased at 1 month and at 1 year after bariatric surgery ( $101.6 \pm 18.8$  pg/mL vs  $177.0 \pm 30.5$  pg/mL vs  $160.6 \pm 30.4$  pg/mL, respectively; *P for trend* = 0.046) (Supplementary Fig 3). No differences were found between the three types of surgery for *ANGPTL8* concentration at baseline, one month or one year after surgery (data not shown). *ANGPTL8* concentrations at 1 year after bariatric surgery were inversely associated with BMI ( $r = -0.366$ ; *P* = 0.016). Positive associations with weight loss metrics %EWL ( $r = 0.364$ ; *P* = 0.017), %WL ( $r = 0.345$ ; *P* = 0.023), and %AWL ( $r = 0.349$ ; *P* = 0.022) were also observed at 1 year after bariatric surgery.

To understand how circulating *ANGPTL8* concentrations were regulated after bariatric surgery, and the potential role of the different types of surgery, we tested by multiple lineal regression the influence of the change of different clinical and analytical parameters evaluated and found that the %AWL at 1 year after bariatric surgery was the main predictor of its increase ( $\beta = -0.467$ ; *P* = 0.012).



**Fig 1.** Circulating, mRNA and protein ANGPTL8 levels change with BMI. (A) ANGPTL8 plasma circulating levels are significantly lower in morbidly obese patients (Ob-M) with and without T2DM than in lean subjects. (B) *ANGPTL8* expression in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissue exhibits distinctive profiles. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. (C) Equal amounts of SAT from lean and Ob-M T2DM were subjected to immunoblotting against ANGPTL8 protein. Fumarylacetoacetase (FAA) was used as a loading control. A representative blot is shown together with densitometric analysis ( $n = 5$ ). (D) Associations between *ANGPTL8* SAT expression and BMI, fasting plasma glucose, insulin, HOMA-IR, and ANGPTL8 circulating levels.  $\#P < 0.001$  for post hoc test (lean vs morbid-obese with T2DM).  $*P < 0.01$  for post hoc test (morbid-obese without T2DM vs morbid-obese with T2DM).  $**P < 0.001$  for post hoc test (lean vs morbid-obese without T2DM). SEM, standard error of the mean; HOMA-IR, insulin resistance homeostatic model assessment; BMI, body mass index; T2DM, type 2 diabetes; ANGPTL8, angiotensin-like protein 8.

**Table II.** Clinical characteristics of the whole population before, 1 month and 1 year after bariatric surgery (cohort 2)

	Baseline	1 month	1 year	P for trend
n	45	45	44	-
Age (y)	49.4 (8.0)	-	-	-
Gender (M/F)	15/30	-	-	-
Hypertension (n, %)	30 (66.7)	21 (46.7)*	21 (46.7) <sup>†</sup>	0.005
Antihypertensive drugs (n, %)	30 (66.7)	21 (46.7)*	21 (46.7) <sup>†</sup>	0.005
Dyslipidemia (n, %)	33 (73.3)	14 (31.1)*	13 (28.9) <sup>†</sup>	<0.001
Lipid lowering drugs (n, %)	32 (71.1)	10 (22.2)*	14 (31.1) <sup>†</sup>	<0.001
Type 2 diabetes				
T2DM (n, %)	45 (100.0)	30 (66.7)*	15 (33.3) <sup>†,‡</sup>	<0.001
T2DM treatment (n, %)	45 (100.0)	19 (42.2)*	13 (28.9) <sup>†</sup>	<0.001
Insulin (n, %)	17 (37.8)	10 (22.2)*	5 (11.1) <sup>†</sup>	<0.001
Anthropometric measurements				
Weight (kg)	103.6 (11.0)	89.8 (11.3)*	75.1 (13.4) <sup>†,‡</sup>	<0.001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	39.5 (1.9)	34.2 (2.3)*	28.6 (4.1) <sup>†,‡</sup>	<0.001
Waist (cm)	117.9 (7.9)	108.8 (7.6)*	96.0 (9.9) <sup>†,‡</sup>	<0.001
WHR	0.96 (0.91–1.02)	0.96 (0.91–1.0)	0.91 (0.86–0.97) <sup>†,‡</sup>	<0.001
Blood pressure				
SBP (mmHg)	134.0 (18.5)	128.4 (17.9)	129.0 (19.4)	0.261
DBP (mmHg)	81.1 (14.3)	81.4 (13.4)	77.2 (13.0)	0.216
Lipid profile				
Total cholesterol (mmol/L)	4.76 (4.27–5.38)	4.39 (3.66–5.16)*	4.61 (3.95–5.26)	0.032
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.13 (1.01–1.33)	1.02 (0.90–1.15)*	1.46 (1.23–1.60) <sup>†,‡</sup>	<0.001
LDL-cholesterol (mmol/L)	2.75 (2.28–3.32)	2.72 (1.90–3.38)	2.60 (2.05–3.26)	0.230
Triglycerides (mmol/L)	1.70 (1.17–1.99)	1.42 (1.13–1.79)*	0.96 (0.73–1.38) <sup>†,‡</sup>	<0.001

Abbreviations: T2DM, type 2 diabetes; BMI, body mass index; WHR, waist-to-hip ratio; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; HOMA-IR, insulin resistance homeostatic model assessment; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein. Data are presented as mean (SD) or median (25th–75th) quartiles as appropriate.

\* $P < 0.05$  for LSD post hoc test comparing basal measurements vs 1 month after surgery. <sup>†</sup> $P < 0.05$  for LSD post hoc test comparing baseline measurements vs 1 year after surgery. <sup>‡</sup> $P < 0.05$  for LSD post hoc test comparing variables 1 month after surgery vs 1 year after surgery.

Finally, to assess the potential role of circulating ANGPTL8 concentrations for T2DM remission, multiple ordered logistic regression models were performed. The total remission rate of T2DM at 1 year after bariatric surgery was 42.2%. All the models were adjusted for the different types of surgery and for those variables that were previously described to be associated with T2DM remission (Supplementary Table 2). Of note, bivariate analysis showed a positive correlation between diabetes remission and type of surgery (RYGB), shorter diabetes duration, good pre-surgical metabolic control and no insulin treatment at baseline. These findings are typically reported as determinants of diabetes remission. Regarding postoperative factors, higher total weight loss and %EWL after bariatric surgery showed a positive correlation with diabetes remission at 12 months independently of baseline BMI. The best models showed that the type of surgery (RYGB), baseline C-peptide, the T2DM duration and the increase of ANGPTL8 concentration one month after surgery were the main predictors of T2DM remission at one year of follow-up. Despite the fact that classical variables associated with T2DM remission were maintained, the inclusion of ANGPTL8 improved the predictive value.

**Circulating concentrations of ANGPTL8 are increased after bariatric surgery: 1-year follow-up of morbidly obese patients without T2DM.** A total of 30 morbidly obese patients without T2DM were included in the prospective study (cohort 3). Patients were evaluated at baseline and at 1 year after bariatric surgery (clinical characteristics and laboratory data are shown in Table III). As expected weight, BMI, fasting plasma glucose, insulin concentrations, HOMA-IR, C-peptide, HbA1c, and lipid concentrations were all decreased after bariatric surgery. Similar to the patients with T2DM in cohort 2, circulating concentrations of ANGPTL8 were also increased at 1 year after bariatric surgery. Remarkably, an increase in the mRNA levels of ANGPTL8 was also detected in follow-up SAT biopsies at one year after bariatric surgery (Table III).

The increase of circulating ANGPTL8 concentrations after 1 year was positively associated with %EWL ( $r = 0.422$ ;  $P = 0.020$ ), %WL ( $r = 0.369$ ,  $P = 0.045$ ), and %AWL ( $r = 0.388$ ;  $P = 0.034$ ), and similar to the finding in cohort 2, a multiple linear regression analysis revealed that higher %AWL, and also male gender were the main predictors of its increase (Supplementary Tables 3 and 4).



**Table III.** Clinical and laboratory data for morbidly obese patients without T2DM before and 1 year after bariatric surgery (cohort 3)

	Before	1 year	P
n	30	30	-
Age (y)	41.9 (9.5)	-	-
Sex (M/F)	8/22	-	-
Weight (kg)	117.6 (18.0)	82.1 (13.4)	<0.001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	40.1 (4.1)	28.1 (3.8)	<0.001
%EWL (%)	-	84.3 (66.4–97.9)	-
%WL (%)	-	31.5 (26.9–33.0)	-
%AWL (%)	-	46.3 (41.1–50.2)	-
Glucose (mmol/L)	5.3 (5.0–5.5)	4.7 (4.6–4.9)	<0.001
Insulin (mIU/mL)	13.1 (9.9–18.8)	4.2 (3.1–6.0)	<0.001
HOMA-IR	3.0 (2.5–4.1)	0.8 (0.6–1.3)	<0.001
C-peptide	1.2 (1.0–1.3)	0.6 (0.5–0.8)	<0.001
HbA1c (%)	5.2 (5.1–5.3)	5.1 (5.0–5.3)	0.002
Total cholesterol (mmol/L)	4.74 (0.97)	4.27 (0.82)	0.002
HDL-cholesterol (mmol/L)	0.89 (0.76–1.01)	1.24 (1.11–1.45)	<0.001
LDL-cholesterol (mmol/L)	3.10 (2.80–3.80)	2.65 (2.09–3.30)	<0.001
Triglycerides (mmol/L)	1.40 (1.19–1.66)	0.86 (0.63–1.25)	<0.001
Circulating ANGPTL8 (ng/mL)	6.76 (3.83–10.80)	10.55 (7.47–14.38)	<0.001
mRNA ANGPTL8 (a.u.)	1.92 (1.44–2.40)	4.50 (3.63–5.37)	<0.001

Abbreviations: BMI, body mass index; %EWL, percentage excess weight loss; %WL, percentage total weight loss; %AWL, percentage alterable weight loss; HOMA-IR, insulin resistance homeostatic model assessment; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein. Data are presented as mean (SD) or median (25th–75th) quartiles, as appropriate.

## DISCUSSION

In this study, we determined the circulating levels and WAT expression of ANGPTL8 in lean and morbidly obese patients and examined how massive weight loss after bariatric surgery might alter its levels. In particular, we assessed whether ANGPTL8 was likely to be relevant for T2DM.

In a cross-sectional analysis, we found that circulating ANGPTL8 concentrations were lower in morbidly obese patients with T2DM than in obese counterparts without T2DM and in lean subjects. Accordingly, we found an inverse relationship between plasma ANGPTL8 levels and markers associated with impaired glucose metabolism. Because these findings do not provide information about the dynamics of the alterations of ANGPTL8 during the processes that lead to obesity or T2DM, we examined the changes in ANGPTL8 levels in 2 patient cohorts of morbid obesity (with and without T2DM) that underwent bariatric surgery. Interestingly, circulating ANGPTL8 concentrations were significantly increased in both cohorts after a 1-year follow-up. These results are in accordance with a previous case-control study showing that ANGPTL8 levels are significantly lower in extremely obese patients than in lean subjects.<sup>17</sup> Moreover, this study reported a decrease in circulating levels of ANGPTL8 with increasing BMI, which, in agreement with our data, was more evident in subjects with glucose derangement. Our results also fit with a

very recent report showing that circulating ANGPTL8 levels increase after bariatric surgery.<sup>31</sup> However, in our study, we included an additional lean control group, enabling direct comparison of ANGPTL8 levels in the plasma of morbidly obese and lean subjects, which was not possible in the other study.<sup>31</sup> Taken together, the data support that circulating ANGPTL8 are high in lean and low in obese patients, especially in those with T2DM. Accordingly, we observed that the lower the basal concentrations of ANGPTL8 the greater the increase after weight loss at 1-year follow-up, and ANGPTL8 changes were independent of the type of surgery.

A previous study examined ANGPTL8 in obese subjects with metabolic syndrome after diet-induced weight loss. In this 8-week diet intervention study, subjects with lower ANGPTL8 preintervention levels had the greatest reduction in fat mass after dietary modification despite no differences in ANGPTL8 levels were observed after follow up.<sup>32</sup> In contrast to the findings of our study, basal levels of ANGPTL8 were higher in patients with metabolic syndrome than in lean controls; however, these patients were not in the range of massive obesity. Nonetheless, Pascual-Corrales et al. only found changes in plasma ANGPTL8 after surgery but not when weight was lost after hypocaloric diet.<sup>31</sup> Likewise, the majority of patients in the diet-arm of this study were not in the range of massive obesity. Still, the basal levels of ANGPTL8 were not different to those in the surgery group, making it difficult

to draw clear conclusions when comparing both groups. Some authors have attributed these discrepancies in circulating levels of ANGPTL8 in the context of T2D and obesity to differences in the epitopes recognized by commercial assays.<sup>20</sup> ANGPTL8 undergoes proteolytic cleavage before secretion, leading to different circulating levels of the C- or the N-terminal end of the protein. We considered this possibility in our study, but irrespective of the different detection methods used in the studied cohorts, we observed the same trend and relationship with metabolic parameters, particularly evident for the elevated levels of ANGPTL8 after bariatric surgery. The EIAAB kit applied in cohort 2 is widely used<sup>33</sup> and the results were validated on a Western blot, and the Cusabio kit used in cohort 3 has been also previously used.<sup>31</sup>

Gathering the trends observed in these studies, it seems plausible that low preintervention ANGPTL8 levels may be associated with a better response in metabolic profile after weight loss mainly in T2DM patients or in those with metabolic syndrome. In line with this hypothesis, the increment of circulating ANGPTL8, as early as at 1 month of follow-up in the cohort 3, appeared as one of the main determinants of diabetes remission (independent of weight loss) in association with other well-known predictors, such as the type of bariatric surgery, the prior  $\beta$ -cell function (higher C-peptide), and the duration of T2DM (Supplementary Table 2).<sup>34,35</sup> This observation strengthens the potential role of ANGPTL8 in the glucose homeostasis. Supporting this observation, a recent study characterized the molecular mechanisms underlying the regulation of glucose metabolism by ANGPTL8 in a human hepatic cell line.<sup>19</sup> The authors suggested that differences in circulating levels observed in clinical studies might be due to the different capacity of the insulin-responsive target tissues depending on the stage of the insulin-resistance process. Accordingly, at early stages the liver might respond to the increment of insulin flux by increasing ANGPTL8 production, but at more advanced stages associated with an inadequate  $\beta$ -cell function the concentration of ANGPTL8 progressively decreases. This hypothesis may explain the behavior of ANGPTL8 observed in our T2DM cohort. Thus, the improvement in insulin-resistance observed after weight loss would facilitate a better response to insulin in the liver, increasing circulating ANGPTL8 concentrations early in the first month after surgery.

Regarding the relationship between WAT expression and circulating levels of ANGPTL8, we observed a significant inverse association in SAT of obese T2D patients as compared with lean subjects in basal conditions, which suggests that AT is not the primary source of ANGPTL8 secretion. Of note, this inverse correlation is lost after bariatric surgery, where we detected an increase in both

circulating and expression levels of ANGPTL8. A previous study performed in healthy subjects showed that insulin infusion induces a paradoxical response of ANGPTL8. Thus, *in vivo* hyperinsulinemia significantly decreases plasma ANGPTL8 but increases its expression in AT, implying that insulin action on circulating ANGPTL8 does not reflect its action in AT.<sup>21</sup> Our results provide new information regarding ANGPTL8 expression and secretion, which is more complex than expected, and other factors beyond insulin sensitivity status might be participating in its regulation. Moreover, our results also point to a local effect of ANGPTL8 on AT, independent of obesity. Of note, in contrast to murine WAT, where ANGPTL8 has been detected exclusively in adipocytes, ANGPTL8 is expressed both in mature adipocytes and in the stroma-vascular fraction in human WAT (Supplementary Fig 4). Preliminary experiments from our laboratory indicate that macrophages express and secrete ANGPTL8, pointing to a possible paracrine role for ANGPTL8 in AT that warrants further investigation. Along these lines, ANGPTL8 has been recently described as a stress-response protein that downregulates adipose triglyceride lipase in mammalian cells.<sup>36</sup> This novel role for ANGPTL8, linking lipid homeostasis and metabolic stress, might underscore its elevated expression in AT from obese and T2DM patients, opening a new field of investigation.

In summary, the present study shows that plasma ANGPTL8 concentrations are highest in lean subjects and lowest in morbidly obese patients with T2DM. ANGPTL8 is expressed in all the components of the WAT and its expression correlates negatively with its circulating levels, and positively with T2DM as its main determinant factor. Finally, our results suggest that massive weight loss but also metabolic status are important regulators of ANGPTL8 levels being their increment after bariatric surgery one of the main predictors of T2DM remission independent of weight loss.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Conflicts of Interest: All authors have read the journal's policy on disclosure of potential conflicts of interest and have none to declare.

This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the European Regional Development Fund (ERDF) (JV: PI14/00228; AM: PI15/01562; SF-V: SAF2015-65019R; BFU2015-70454-REDT for SF-V and ML), the Western Norway Regional Health Authority, the European Community Seventh Framework Programme (RN: ERC stG-2011-Obesity53-281408). The Spanish Biomedical Research Center in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERdem) (CB07708/0012) and the

Spanish Biomedical Research Centre in Physiopathology of Obesity and Nutrition (CIBERObn), an initiative of the Instituto de Salud Carlos III. SF-V acknowledges support from the *Miguel Cervet* tenure-track program (CP10/00438 and CPII16/00008) from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) co-financed by the ERDF. JV, SF-V. and JF are the guarantors of this work.

All authors have read the journal's authorship agreement and that the manuscript has been reviewed by and approved by all named authors.

## REFERENCES

1. Zhang R, Abou-Samra AB. Emerging roles of lipasin as a critical lipid regulator. *Biochem Biophysical Res Commun* 2013;432:401–5.
2. Ren G, Kim JY, Smas CM. Identification of RIFL, a novel adipocyte-enriched insulin target gene with a role in lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;303:E334–41.
3. Wang Y, Quagliarini F, Gusarova V, et al. Mice lacking ANGPTL8 (betatrophin) manifest disrupted triglyceride metabolism without impaired glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:16109–14.
4. Yi P, Park JS, Melton DA. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic beta cell proliferation. *Cell* 2013;153:747–58.
5. Dong XY, Pang XW, Yu ST, et al. Identification of genes differentially expressed in human hepatocellular carcinoma by a modified suppression subtractive hybridization method. *Int J Cancer J Int du Cancer* 2004;112:239–48.
6. Gusarova V, Alexa CA, Na E, et al. ANGPTL8/betatrophin does not control pancreatic beta cell expansion. *Cell* 2014;159:691–6.
7. Jiao Y, Le Lay J, Yu M, Najj A, Kaestner KH. Elevated mouse hepatic betatrophin expression does not increase human beta-cell replication in the transplant setting. *Diabetes* 2014;63:1283–8.
8. Abu-Farha M, Al Madhoun A, Abubaker J. The rise and the fall of betatrophin/ANGPTL8 as an inducer of beta-cell proliferation. *J Diabetes Res* 2016;2016:4860595.
9. Yi P, Park JS, Melton DA. Retraction Notice to: Betatrophin: a hormone that controls pancreatic  $\beta$  cell proliferation. *Cell* 2017;168:326.
10. Kaestner KH. Betatrophin—promises fading and lessons learned. *Cell Metab* 2014;20:932–3.
11. Stewart AF. Betatrophin versus bitter-trophin and the elephant in the room: time for a new normal in beta-cell regeneration research. *Diabetes* 2014;63:1198–9.
12. Tseng YH, Yeh YH, Chen WJ, Lin KH. Emerging regulation and function of betatrophin. *Int J Mol Sci* 2014;15:23640–57.
13. Quagliarini F, Wang Y, Kozlitina J, et al. Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:19751–6.
14. Chen X, Lu P, He W, et al. Circulating betatrophin levels are increased in patients with type 2 diabetes and associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:E96–100.
15. Espes D, Martinell M, Carlsson PO. Increased circulating betatrophin concentrations in patients with type 2 diabetes. *Int J Endocrinol* 2014;2014:323407.
16. Fu Z, Berhane F, Fite A, Seyoum B, Abou-Samra AB, Zhang R. Elevated circulating lipasin/betatrophin in human type 2 diabetes and obesity. *Scientific Rep* 2014;4:5013.
17. Gomez-Ambrosi J, Pascual E, Catalan V, et al. Circulating betatrophin concentrations are decreased in human obesity and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E2004–9.
18. Abu-Farha M, Al-Khairi I, Cherian P, et al. Increased ANGPTL3, 4 and ANGPTL8/betatrophin expression levels in obesity and T2D. *Lipids Health Dis* 2016;15:181.
19. Rong Guo X, Li Wang X, Chen Y, et al. ANGPTL8/betatrophin alleviates insulin resistance via the Akt-GSK3beta or Akt-FoxO1 pathway in HepG2 cells. *Exp Cel Res* 2016;345:158–67.
20. Fu Z, Abou-Samra AB, Zhang R. An explanation for recent discrepancies in levels of human circulating betatrophin. *Diabetologia* 2014;57:2232–4.
21. Nidhina Haridas PA, Soronen J, Sadevirta S, et al. Regulation of angiopoietin-like proteins (ANGPTLs) 3 and 8 by insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:E1299–307.
22. Vage V, Sande VA, Mellgren G, Laukeland C, Behme J, Andersen JR. Changes in obesity-related diseases and biochemical variables after laparoscopic sleeve gastrectomy: a two-year follow-up study. *BMC Surg* 2014;14:8.
23. Sjostrom L. Bariatric surgery and reduction in morbidity and mortality: experiences from the SOS study. *Int J Obes* 2008;32:S93–7.
24. Ramos-Levi AM, Cabrerizo L, Matia P, Sanchez-Pernaute A, Torres AJ, Rubio MA. Which criteria should be used to define type 2 diabetes remission after bariatric surgery? *BMC Surg* 2013;13:8.
25. Espes D, Lau J, Carlsson PO. Increased circulating levels of betatrophin in individuals with long-standing type 1 diabetes. *Diabetologia* 2014;57:50–3.
26. Chung HS, Lee MJ, Hwang SY, et al. Circulating angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8) and ANGPTL3 concentrations in relation to anthropometric and metabolic profiles in Korean children: a prospective cohort study. *Cardiovasc Diabetol* 2016;15:1.
27. Martínez-Pérez B, Ejarque M, Gutierrez C, et al. Angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8) in pregnancy: a brown adipose tissue-derived endocrine factor with a potential role in fetal growth. *Transl Res* 2016;178:1–12.
28. Barja-Fernandez S, Folgueira C, Seoane LM, et al. Circulating betatrophin levels are increased in anorexia and decreased in morbid obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:E1188–96.
29. Ceperuelo-Mallafre V, Duran X, Pachon G, et al. Disruption of GIP/GIPR axis in human adipose tissue is linked to obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E908–19.
30. Ceperuelo-Mallafre V, Ejarque M, Serena C, et al. Adipose tissue glycogen accumulation is associated with obesity-linked inflammation in humans. *Mol Metab* 2016;5:5–18.
31. Pascual-Corrales E, Gomez-Ambrosi J, Moncada R, et al. Circulating ANGPTL8/betatrophin concentrations are increased after surgically induced weight loss, but not after diet-induced weight loss. *Obes Surg* 2016;26:1881–9.
32. Crujeiras AB, Zulet MA, Abete I, et al. Interplay of atherogenic factors, protein intake and betatrophin levels in obese-metabolic syndrome patients treated with hypocaloric diets. *Int J Obes* 2016;40:403–10.
33. Abu-Farha M, Sriraman D, Cherian P, et al. Circulating ANGPTL8/betatrophin is increased in obesity and reduced after exercise training. *PLoS One* 2016;11:e0147367.
34. Dixon JB, Chuang LM, Chong K, et al. Predicting the glycemic response to gastric bypass surgery in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care* 2013;36:20–6.
35. Panunzi S, Carlsson L, De Gaetano A, et al. Determinants of diabetes remission and glycemic control after bariatric surgery. *Diabetes care* 2016;39:166–74.
36. Zhang Y, Li S, Donelan W, et al. Angiopoietin-like protein 8 (betatrophin) is a stress-response protein that down-regulates expression of adipocyte triglyceride lipase. *Biochim Biophys Acta* 2015;1861:130–7.

## Appendix

### Study Design and Patients

**Prospective study—cohort 2. Participants.** Exclusion criteria were as follows: type 1 diabetes mellitus, positive auto antibodies, secondary T2DM after injury, or hormonal diseases (Cushing's syndrome or acromegaly); acute metabolic complications, ketosis, ketoacidosis, or hyperosmolar state over the last 6 months; serious infection that could affect blood glucose control during the 4 weeks before inclusion; cardiovascular events (episode of heart failure, angina pectoris, myocardial infarction, or stroke) within 6 months before the study; history of liver disease (chronic active hepatitis or cirrhosis), and/or abnormal liver function (ALT and/or AST 3 times above the upper normal value); altered renal function (creatinine greater than 1.4 mg/dl in women and 1.5 mg/dl in men); anticoagulant therapy; congenital or acquired abnormalities of the digestive tract (atresia, stenosis, and so forth); pregnancy, nursing, or desired pregnancy in the 12 months following the inclusion; recent history of neoplasm (<5 years) except basal cell skin cancer; glucocorticoid use by oral or intravenous route for more than 14 consecutive days in the last three months; alcoholism, drug addiction, or major psychiatric disorders; refusal to participate in the study.

### Study Procedures

**Anthropometric measurements and weight loss after bariatric surgery.** Body weight and height were measured. BMI was calculated with the Quetelet index (weight in kg/height in meters squared). Body circumference was measured with a nonstretchable band for the waist midway between the lower rib margin and the iliac crest and, for the hip circumference, over the greater trochanters and recorded to the nearest 0.5 cm. Blood pressure (the average of two measurements) was determined by sphygmomanometer aneroid (Omron) with the patient seated after 5 minutes of rest.

To evaluate weight loss after bariatric surgery in the 2 prospective cohorts, we used 3 different formulas: the percentage excess of weight loss (%EWL =  $100 * [\text{baseline BMI} - \text{final BMI}] / [\text{baseline BMI} - 25]$ ), the percentage (total) weight loss (%WL =  $100 * [\text{baseline BMI} - \text{final BMI}] / \text{baseline BMI}$ ), and the percentage alterable weight loss (%AWL =  $100 * [\text{baseline BMI} - \text{final BMI}] / [\text{baseline BMI} - 13]$ ).

**Analytical determinations. Cross-sectional study—cohort 1 (Spain).** Fasting plasma glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, and TG were determined by standard enzymatic methods (ADVIA 2400 Chemistry autoanalyzer, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). Insulin was determined by immune assay using an AVDIA Centaur XP autoanalyzer (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany).

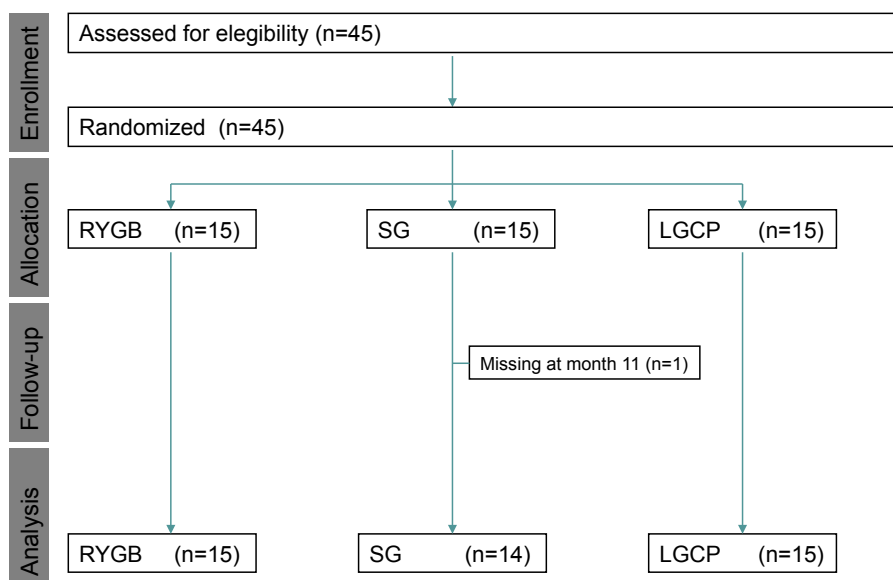
**Prospective study—cohort 2 (Spain).** Blood samples were collected after overnight fasting, before bariatric surgery, 1 month and 1 year later. Fasting plasma glucose, total cholesterol, and TG were determined on a Hitachi 737 autoanalyzer (Boehringer Mannheim, Marburg, Germany) using standard enzymatic methods. HDL-cholesterol concentrations were determined by the standard enzymatic methods after precipitation with PEG-6000. Plasma insulin was analyzed by immunoassay (Coat-A-Count Insulin; Diagnostic Products Corp., Los Angeles, Calif).

The homeostatic model assessment (HOMA)-IR index was used to evaluate insulin resistance in all the sub-studies and was calculated as the product of fasting plasma insulin (mIU/mL) and fasting plasma glucose (mmol/L) divided by 22.5.<sup>1</sup>

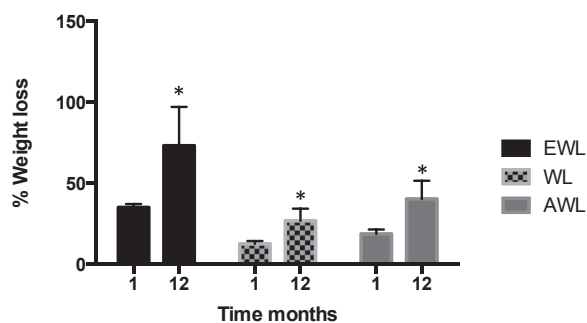
**Prospective study—cohort 3 (Norway).** Blood samples were collected after overnight fasting the day before bariatric surgery and 1 year later. Fasting plasma glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, and TG were analyzed at the Department of Clinical Chemistry, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway. Serum lipid levels and fasting glucose were assayed using an Architect 1600 chemistry analyzer (Abbott, Chicago, Ill). HbA1c levels were measured using high-performance liquid chromatography (HPLC) with a Tosoh G8 HPLC autoanalyzer (Tosoh Bioscience, Tessenderlo, Belgium). Fasting serum insulin and C-peptide levels were analyzed using a chemiluminescence assay on the Siemens immulite 2000 Immunoassay system (Siemens AG, Erlangen, Germany) at the Hormone Laboratory, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway.

## REFERENCE

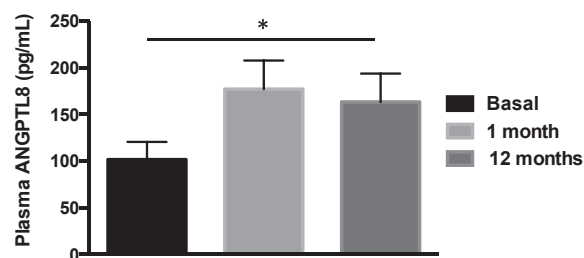
1. Jager J, Gremaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 2007;148:241–51.



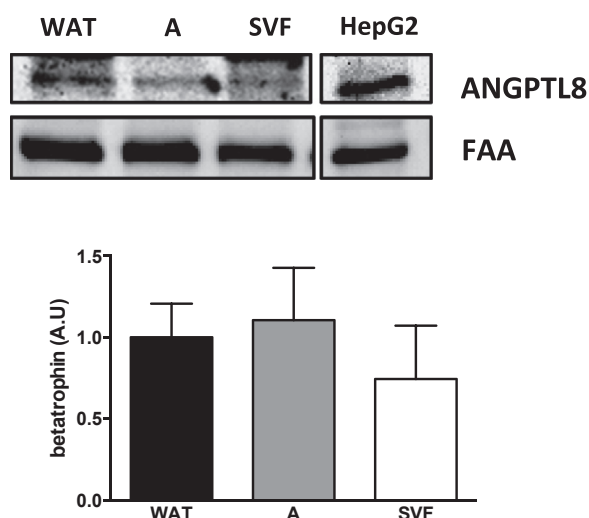
**Supplementary Figure 1.** One-year follow-up study. The patients were randomly assigned and evaluated at baseline, 1 month and 1 year after bariatric surgery. One SG patient voluntarily withdrew from the study at 11 months. Follow-up compliance was 97.78% and 44 patients completed the 1-year follow-up. SG, sleeve gastrectomy.



**Supplementary Figure 2.** Percent EWL, the %WL, and the %AWL were 34.9 (28.8–37.9)%, 12.3 (10.7–14.3), and 18.5 (16.3–21.3)% at 1 month after bariatric surgery and 73.1 (56.7–97.1)%, 26.6 (22.9–34.1)%, and 40.2 (33.7–51.4)% at 1 year after bariatric surgery, respectively. Data are represented as median (25th–75th quartiles). \* $P < 0.001$  (1 year vs 1 month). %EWL, percentage excess weight loss; %WL, percentage total weight loss; %AWL, percentage alterable weight loss.



**Supplementary Figure 3.** ANGPTL8 circulating levels were increased 1 month after surgery and were maintained after 1-year follow-up (101.6 ± 18.8 pg/mL vs 177.0 ± 30.5 pg/mL vs 160.6 ± 30.4 pg/mL respectively;  $P$  for trend = 0.046). Data are represented as mean ± SEM. SEM, standard error of the mean; ANGPTL8, angiotensin-like protein 8.



**Supplementary Figure 4.** ANGPTL8 protein expression was examined in total white adipose tissue (WAT), adipocytes (A), and stromal-vascular fractions (SVFs) of a total of 8 individuals. A representative Western blot is shown. Fumarylacetonacetase (FAA) was used as a loading control. HepG2, a liver-derived cell line, was used as a positive control. Quantification is shown vs WAT. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. SEM, standard error of the mean; WAT, white adipose tissue.

**Supplementary Table 1.** Univariate analysis between ANGPTL8 circulating levels and biochemical parameters and presence of T2DM in cohort 1

	Circulating ANGPTL8	
	r	P
T2DM	-0.724	<0.001
Fasting glucose	-0.637	<0.001
HOMA-IR	-0.448	<0.001
Total cholesterol	-0.427	<0.001
LDL-cholesterol	-0.363	0.002
TG	-0.297	0.007

Abbreviations: T2DM, type 2 diabetes mellitus; ANGPTL3, angiotensin-like protein 3; HOMA-IR, insulin resistance homeostatic model assessment; TG, triglycerides; LDL, low-density lipoprotein.

**Supplementary Table 2.** Ordered logistic regression models for T2DM remission prediction (prospective study—cohort 2)

	OR (95% CI)	P
Model 1: LR $\chi^2 = 62.38$ ; P < 0.001		
Type of surgery		
Sleeve gastrectomy (vs. gastric bypass)	0.001 (0.001–0.125)	0.005
Gastric plication (vs. gastric bypass)	0.001 (0.001–0.029)	0.003
Duration of T2DM	0.966 (0.943–0.990)	0.006
Baseline C-peptide	18.292 (1.947–171.9)	0.011
$\Delta$ ANGPTL8 at 1 mo	1.870 (1.152–2.035)	0.011
Previous insulin treatment	0.017 (0.001–0.436)	0.014

Abbreviations: T2DM, type 2 diabetes mellitus; ANGPTL8, angiotensin-like protein 8; OR, odds ratio; CI, confidence interval. Variables included in the models were: age, sex, type of surgery, % AWL at 1 mo, duration of T2DM, previous insulin treatment, and baseline C-peptide.

**Supplementary Table 3.** Univariate analysis between basal and 1 year after bariatric surgery ANGPTL8 circulating levels and biochemical parameters in cohort 3

	Basal circulating ANGPTL8	
	r	P
Insulin	-0.503	0.005
Fasting glucose	-0.516	0.004
HOMA-IR	-0.435	0.013
		1 year circulating ANGPTL8
		r
BMI	-0.356	0.050
Insulin	-0.392	0.032

Abbreviations: ANGPTL8, angiotensin-like protein 8; HOMA-IR, insulin resistance homeostatic model assessment; BMI, body mass index.

**Supplementary Table 4.** Clinical and analytical changes after bariatric surgery associated with the increment of circulating ANGPTL8 concentrations (prospective study—cohort 3)

$\Delta$ ANGPTL8 ( $R^2 = 0.384$ ; $P = 0.014$ )					
	<b>B (unstandardized)</b>	<b>SE</b>	<b>95% CI</b>	<b>Beta (standardized)</b>	<b>P</b>
%AWL	0.265	0.127	0.005–0.525	0.489	0.046
Gender	–5.647	2.103	–9.957–1.338	–0.416	0.012
Constant	5192	5.741	–6.567–16.951	-	0.373

*Abbreviations:* CI, confidence interval; AWL, alterable weight loss; ANGPTL8, angiotensin-like protein 8; SE, standard error.  
Variables included in the model: age, gender, %AWL, and the differences 1 year-baseline (total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, fasting plasma glucose, HbA1c, C-peptide, and HOMA-IR).

# Discusión





## DISCUSIÓN

La ANGPTL8 es una proteína que ha sido implicada en la adipogénesis así como en el metabolismo hidrocarbonado y lipídico [222, 223]. Por ello, nos propusimos estudiar el papel de esta molécula en el ámbito del embarazo y en la diabetes asociada a obesidad. Además, tal como se ha comentado previamente, ANGPTL8 se expresa únicamente en mamíferos, lo que sugiere que podría tener un papel en aquellos procesos exclusivos de éstos como el embarazo o la homotermia. Hemos trabajado con la hipótesis general de que ANGPTL8 podría estar involucrado en la homeostasis metabólica del embarazo y en el metabolismo energético, de aquí nuestro interés por evaluar su implicación en estas dos entidades.

La GDM es una alteración del metabolismo carbonado generalmente reversible en el postparto y en la que coexisten un aumento de la resistencia a la insulina, junto a defectos en la secreción de insulina. La GDM se asocia a un hipercrecimiento y aumento de la adiposidad fetal, que podría inducir desregulación del tejido adiposo fetal y que en caso de mantenerse a largo plazo podría ser responsable de alteraciones en la homeostasis energética en la vida adulta. Por otro lado, la T2D asociada a la obesidad mórbida es una situación extrema, pero que puede ser reversible tras la cirugía bariátrica. Sin embargo, existen pocos factores predictivos capaces de identificar antes de la intervención qué individuos pueden beneficiarse más de este tipo de tratamiento. Nosotros hemos investigado la dinámica de ANGPTL8 tras la cirugía bariátrica y hemos podido determinar que aquellos pacientes con niveles más bajos precirugía, podrían ser los que presentan más posibilidades de remisión de la diabetes.

Como primer objetivo de esta tesis doctoral nos propusimos estudiar el papel de la ANGPTL8 en la gestación normal y en gestaciones complicadas con GDM. Para llevar a cabo este objetivo, hemos estudiado dos cohortes: una primera cohorte longitudinal, en la que evaluamos las concentraciones de ANGPTL8 a lo largo de la gestación normal (1er, 2º, 3er trimestre); y una

## Discusión

segunda cohorte de pacientes con GDM y con tolerancia normal a la glucosa (TNG), en la que comparamos los niveles de ANGPTL8 durante la gestación, en sangre de cordón y en el postparto.

### 1. ANGPTL8 EN LA GESTACIÓN

En la primera parte del estudio, observamos que los niveles circulantes de ANGPTL8 en el primer trimestre de gestación son hasta 10 veces más altos que los observados en la población no gestante, disminuyendo sus concentraciones a partir del segundo trimestre. Si bien estudios previos habían observado que ANGPTL8 se elevaba durante el embarazo, independientemente de la presencia de GDM [252, 254], nuestro trabajo fue el primero en mostrar la dinámica de la ANGPTL8 en la gestación normal, y una ausencia de relación de estos niveles con parámetros de secreción y resistencia a la insulina. El descenso de los niveles de ANGPTL8 en tercer trimestre ha sido corroborado posteriormente por Zielińska, A. y col en mujeres gestantes [273]. Estos hallazgos estarían en contra del artículo inicial que había propuesto a ANGPTL8 en modelos murinos como un factor promotor de la proliferación de la célula beta en situaciones de resistencia [223]. De hecho, tal y como se ha comentado previamente, estudios posteriores no han podido confirmar dicho efecto sobre la funcionalidad del páncreas y durante la redacción de la presente memoria el trabajo de Yi, y col. fue retractado [248, 274]. En línea con esto, y con el trabajo de otros autores [252], no encontramos ninguna relación entre los marcadores de secreción de insulina y las concentraciones de ANGPTL8 en un estado fisiológico de resistencia a la insulina como es el embarazo. De hecho, nuestros resultados muestran que mientras que el peso materno, las concentraciones de insulina y el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR, del inglés *homeostatic model assessment – insulin resistance*) aumentan a medida que progresa la gestación, las concentraciones de ANGPTL8 disminuyen, detectándose por lo tanto una relación inversa entre estos parámetros.

Los niveles de ANGPTL8 se encuentran elevados en gestaciones complicadas con GDM, especialmente en aquellas mujeres con IMC > 28 kg/m<sup>2</sup>, según muestra un meta-análisis reciente [272]. Destacar que un estudio reciente muestra que los niveles altos de ANGPTL8 en primer trimestre son predictores de la aparición de GDM en segundo trimestre [275]. No obstante, y en contra de estos resultados, nosotros no observamos diferencias entre ambos grupos. Esta discrepancia podría ser debida al momento en que se realizó la extracción analítica (final 2º trimestre de gestación) y/o a que el IMC entre el grupo GDM y TNG fue similar y el porcentaje de pacientes con obesidad fue pequeño. Sin embargo, de forma similar a lo que se había observado en estudios previos, no se encontraron relaciones entre ANGPTL8 y la secreción de insulina o la sensibilidad a la insulina (únicamente observaron una correlación inversa con el péptido C, tanto en embarazadas controles como en GDM). Por todo ello, y a pesar de la existencia de ciertas discrepancias entre algunos estudios, podemos concluir que existe una asociación sólida entre ANGPTL8 y el metabolismo de la glucosa en la gestación.

Uno de los hallazgos más interesantes fueron los niveles marcadamente elevados de ANGPTL8 en sangre de cordón con respecto a los observados en sangre materna durante la gestación, que corroboran los resultados de un estudio previo realizado por Wawrusiewicz-Kurylonek y col. [253], y que sugieren un papel de la ANGPTL8 en el crecimiento y desarrollo del feto durante la vida intrauterina. De hecho, observamos que la distribución de los niveles de ANGPTL8 presenta una forma U o J invertida, en relación con el peso y la adiposidad del neonato. Así, los niños pequeños para edad gestacional (SGA, del inglés *small for gestational age*) y aquellos incluidos en el primer tercil de adiposidad cuantificada por la suma de pliegues subcutáneos, eran los que presentaban niveles más altos de ANGPTL8. Esta diferencia era significativa con respecto a los de peso adecuado para la edad gestacional (AGA, del inglés *appropriate for gestational age*) y a los del segundo tercil de adiposidad, respectivamente. Los niveles de ANGPTL8 en sangre de cordón también estaban incrementados en niños LGA y en los

## Discusión

incluidos en el tercer tercil de adiposidad, pero la diferencia no llegó a ser significativa.

## **2. ANGPTL8 EN LA REGULACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO Y BROWNING**

Ante estos hallazgos, nos planteamos un posible papel de la ANGPTL8 en el crecimiento y en la regulación del tejido adiposo durante la vida intrauterina. Sabemos que la ANGPTL8 se expresa principalmente en hígado [223], WAT y BAT [222]; y también, aunque en menor grado, en otros tejidos como la placenta [253]. Diversos factores nutricionales, hormonales y ambientales promueven la expresión de ANPGTL8 [276]. En el feto, la masa del tejido adiposo aumenta en las últimas etapas de la gestación, originándose los depósitos de WAT y BAT. El BAT es esencial para la adaptación postnatal a la temperatura después del nacimiento. De hecho en humanos, la cantidad de BAT es comparativamente mayor que en otros mamíferos [218]. Se ha observado que la expresión de mRNA de ANGPTL8 aumenta durante la diferenciación de adipocitos blancos y marrones [222]. En este sentido, se ha detectado un aumento de su expresión en el WAT en respuesta a insulina [173], factores nutricionales [220, 221] y a la exposición al frío [246]. Por el contrario, se ha detectado una disminución de su expresión en respuesta a agentes lipolíticos o durante el ayuno [220, 221].

Con el objetivo de profundizar en el posible papel de ANGPTL8 en el BAT, en el contexto de la gestación, evaluamos su expresión durante el embarazo en ratones. Hemos demostrado por primera vez que la expresión en BAT fetal y materno de ANGPTL8 sigue el mismo patrón que UCP1, marcador de actividad del BAT. De hecho, la expresión de ANGPTL8 en BAT de ratonas embarazadas disminuye de la misma manera que la actividad termogénica de las mismas. De forma opuesta, en los fetos se observa una mayor expresión de ANGPTL8 en BAT que en los ratones adultos. Todos estos datos demuestran la estrecha relación entre ANGPTL8 y BAT.

Al igual que otras ANGPTLs [233], las características de ANGPTL8 sugieren que podría actuar como un factor secretado, ya que no se ha encontrado ninguna actividad enzimática en esta proteína [222, 223]. En este contexto, nuestros estudios demuestran la secreción de ANGPTL8 por parte de adipocitos marrones. Además, comprobamos que la expresión de ANGPTL8 se encuentra incrementada en diferentes modelos de activación del *browning* como es la activación *in vivo* de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK, del inglés *AMP-activated protein kinase*) [277], o el tratamiento de ASCs con FGF-21 o irisina, dos potentes estímulos de este proceso [75]. De hecho, hemos comprobado que la expresión de ANGPTL8 se encuentra también elevada en el tejido adiposo asociado al feocromocitoma, un tejido que en humanos se considera BAT inducible.

La cantidad proporcional de BAT en el feto y en el recién nacido es mucho mayor que en el adulto. De hecho, al final de la gestación se consiguen los máximos niveles de BAT, cuyo objetivo es proporcionar un efecto termoprotector al feto tras el parto [278]. La asociación observada entre ANGPTL8 y BAT, así como los niveles elevados observados en la vida fetal, hizo que nos cuestionáramos si podría favorecer procesos termogénicos como el *browning*. De hecho, no sólo detectamos un aumento específico de ANGPTL8 en BAT, tanto en modelos animales como en humanos, si no que demostramos que de manera similar a otros estímulos, ANGPTL8 es capaz también también de activar el *browning* en ASCs.

El proceso de *browning* requiere de la actuación de diferentes factores que actúan maximizando tanto la cantidad mitocondrial como el potencial termogénico de UCP1 [279]. Sin embargo, el ambiente nutricional y endocrino en el entorno materno va a influir en las cantidades finales tanto de UCP1 como de WAT y BAT en el feto. Esto causa que, por ejemplo, los fetos de embarazadas sanas cuya ingesta se reduce en la fase final de gestación presenten menores cantidades de WAT y cantidades adecuadas de BAT [279]. Por otro lado, los fetos cuyas madres aumentan la ingesta en el final de gestación presentan cantidades aumentadas tanto de WAT como de BAT [279]. Los efectos de la GDM en esto último está por dilucidar [279]. En nuestra

## Discusión

cohorte, como ya hemos comentado previamente, las concentraciones de ANGPTL8 fueron más elevadas en los neonatos SGA y, además, esta asociación fue independiente del estado glucémico de la gestante. Las concentraciones más bajas de ANGPTL8 se obtuvieron en los neonatos AGA y en aquellos que se encontraban en el segundo tercil de cantidad de grasa. Considerando que, tal y como hemos demostrado en nuestros estudios, el BAT secreta ANGPTL8, la cual puede estimular el *browning*, en fetos con baja cantidad de grasa (y por lo tanto, una baja protección contra el frío), la elevación de las concentraciones de ANGPTL8 actuarían como un mecanismo compensatorio en condiciones de baja cantidad de BAT. Por el contrario, la tendencia a tener niveles más elevados de ANGPTL8 en neonatos LGA y con mayor cantidad de grasa, podría deberse a un aumento la contribución en la secreción por parte del tejido adiposo. Considerando todo lo anterior, y el hecho de que las asociaciones entre el peso de nacimiento y los desordenes metabólicos pueden no ser lineales [279], la relación con “forma de U” (*U-shaped*) que muestran las concentraciones de ANGPTL8 en nuestra cohorte de sangre de cordón apuntan que ANGPTL8 podría tener un papel en el control del metabolismo energético en la vida fetal tardía.

Al contrario que lo observado en un estudio reciente [253], nuestros resultados muestran unas concentraciones más bajas de ANGPTL8 en hijos de madres con GDM en comparación con aquellos hijos de madres controles, a pesar de que ambos grupos de neonatos tenían un peso y adiposidad neonatal similar. En nuestra cohorte la ganancia de IMC fue menor en embarazadas con GDM que en embarazadas controles, que podemos atribuir a los ajustes en la ingesta y a una disminución del aporte nutricional excesivo al feto. De hecho, el tratamiento en la GDM se asocia con una disminución del crecimiento acelerado y con la normalización de la adiposidad y peso fetal [280, 281]. En modelos animales, una reducción en la ingesta alimentaria al final de la gestación se asocia a una reducción en el WAT, pero no en el BAT [279]. Considerando todo esto y el hecho de que la reducida cantidad de grasa en el neonato sigue teniendo una elevada capacidad de conservar UCP1 (lo cual indica un mecanismo de protección frente al frío tras el nacimiento), creemos que los nacidos de embarazadas GDM podrían tener un BAT más eficiente y

por lo tanto no precisarían un aumento compensador de ANGPTL8 por encima de los valores normales.

A pesar de que el diseño observacional de este estudio no permite analizar variables interferentes y por lo tanto no se puede establecer una asociación directa entre ANGPTL8 y la homeostasis del BAT en el embarazo, existen estudios similares que apoyan nuestra teoría. De hecho, se ha propuesto que la irisina, un marcador de BAT, actuaría en las primeras etapas de la vida, sugiriendo que un bajo peso en los neonatos podría ser un indicador del desarrollo de resistencia a la insulina en la vida adulta [282].

En base a lo anteriormente expuesto, proponemos un modelo por el cual ANGPTL8 aumentaría sus concentraciones en el embarazo y en la vida fetal, por un mecanismo a día de hoy desconocido. En este contexto, ANGPTL8 no sólo tendría un efecto sobre el balance nutricional, sino que además podría actuar activando y expandiendo la maquinaria termogénica durante la transición de la vida fetal a la neonatal, aportando una robusta defensa contra la hipotermia.

### **3. ANGPTL8 EN LA OBESIDAD Y EN LA T2D**

Teniendo en cuenta el papel regulador de la ANGPTL8 en la plasticidad del tejido adiposo, y su relación con estados de resistencia a la insulina como la GDM, nos pareció relevante estudiar también el papel de ANGPTL8 en la diabetes asociada a la obesidad. Concretamente, nos propusimos comparar los niveles de ANGPTL8 en pacientes delgados y obesos, con o sin T2D. Además, evaluamos de forma longitudinal los cambios de los niveles de ANGPTL8 en dos cohortes de obesos mórbidos sometidos a cirugía bariátrica y estudiamos su posible relación con la mejora del control metabólico que tienen estos pacientes tras la intervención.

Las concentraciones de ANGPTL8 en los pacientes con obesidad y T2D muestran resultados contradictorios [247, 257, 259, 261, 264]. Asimismo, los



## Discusión

resultados sobre ANGPTL8 y el perfil lipídico o la sensibilidad a la insulina también son ambiguos. Si bien algunas diferencias observadas en las concentraciones plasmáticas en humanos podrían ser debidas al uso de diferentes kits ELISA para detectar ANGPTL8 [271], tampoco en estudios experimentales los resultados están claros. Un estudio realizado en ratones deficientes para ANGPTL8 demuestra su papel en el metabolismo lipídico pero no en el de los glúcidos [249], mientras que otro estudio en cultivos celulares apunta que ANGPTL8 podría mejorar la resistencia a la insulina incrementando la fosforilación de diversos factores de la cascada de señalización de la insulina [225]. Por otro lado, sabemos que la expresión de ANGPTL8 en el AT es inducida por la insulina [283], lo que sugiere que en situaciones de hiperinsulinismo y resistencia a la insulina, podría estar aumentada su expresión en AT.

### **3.1. ANGPTL8 EN LA OBESIDAD MÓRBIDA: EFECTO DE LA CIRUGÍA BARIÁTRICA**

En un primer análisis transversal observamos que las concentraciones circulantes de ANGPTL8 eran menores en los sujetos obesos mórbidos con T2D que en los sujetos obesos sin T2D o en los delgados. Además, observamos una relación inversa entre las concentraciones plasmáticas de ANGPTL8 y los marcadores asociados a alteraciones en el metabolismo de la glucosa.

Para determinar la posible implicación de ANGPTL8 en la etiopatogenia de la obesidad y/o T2D, quisimos investigar también los cambios en las concentraciones circulantes de ANGPTL8 en el seguimiento postquirúrgico de dos cohortes de obesos sometidos a cirugía bariátrica (con y sin T2D). La cirugía bariátrica esta considerada como el mejor método para el tratamiento de la obesidad mórbida y la T2D asociada a obesidad [284, 285]. En ambas cohortes observamos un incremento de las concentraciones de ANGPTL8 al año de la cirugía y tras la consiguiente pérdida de peso. Estos resultados concuerdan con estudios previos de casos y controles que muestran

concentraciones mucho más bajas en obesos mórbidos que en sujetos delgados [261]. Es decir, los niveles circulantes de ANGPTL8 disminuyen al aumentar el IMC, y teniendo en cuenta los datos del estudio transversal, este descenso es mucho más evidente en pacientes que presentan algún grado de alteración del metabolismo hidrocarbonado, como es el caso de pacientes con T2D. Además, un dato que nos pareció interesante fue que cuanto más baja era la concentración prequirúrgica de ANGPTL8, mayor era su aumento tras la pérdida de peso un año postcirugía y que los niveles de ANGPTL8 al mes de la cirugía era un buen predictor de la resolución de la T2D, de forma independiente a la pérdida de peso. Si bien, previamente se había observado un incremento en los valores de ANGPTL8 tras la cirugía bariátrica y la pérdida de peso [286], el hecho de disponer de un grupo control de sujetos delgados sanos, nos ha permitido establecer: (a) si había diferencias en los niveles circulantes de ANGPTL8 en los pacientes obesos con o sin diabetes, y (b) si tras la cirugía había una normalización o no de las concentraciones.

Un estudio previo en obesos con síndrome metabólico tras una dieta hipocalórica de ocho semanas no objetivó diferencias en los niveles de ANGPTL8. No obstante, sus concentraciones circulantes fueron marcadores de la disminución de la grasa corporal, de manera que aquellos sujetos con menores niveles de ANGPTL8 pre-intervención, tuvieron una mayor reducción de grasa [287]. Sin embargo, en contra de lo que nosotros hemos observado, los niveles basales de ANGPTL8 fueron mayores en pacientes con síndrome metabólico que en los controles. Si bien, hay que señalar que en este estudio los pacientes obesos no estaban en rangos de obesidad mórbida. Por otro lado, un estudio adicional realizado en pacientes no mórbidos en los que se analizó los niveles circulantes de ANGPTL8 tras cirugía bariátrica y tras pérdida de peso con dieta hipocalórica, demostró diferencias únicamente en aquellos sujetos sometidos a cirugía [286].

La discrepancia en las concentraciones de ANGPTL8 que se han observado en los distintos estudios se ha atribuido a la utilización de diferentes tipos del ELISA. Tal y como se ha explicado anteriormente, los anticuerpos de cada ELISA reconocen epítomos diferentes [271], y por lo tanto podrían estar

## Discusión

midiendo distintas fracciones de la ANGPTL8. Si bien, en nuestro caso, el kit ELISA utilizado (EIAAB) es uno de los más utilizados en la mayoría de estudios realizados hasta la fecha. Además, fue validado por nuestro grupo mediante Western Blot [288].

### **3.2. ANGPTL8 COMO PREDICTOR DE REMISIÓN DE DM**

Nuestros resultados demuestran que el incremento de los niveles circulantes de ANGPTL8 parecen ser predictores de la remisión de la T2D en los pacientes intervenidos de cirugía bariátrica. Este efecto es independiente de la pérdida de peso, y similar al de otros predictores conocidos como el tipo de cirugía bariátrica, la función de la célula beta (mayores niveles de péptido C) y la duración de la T2D. Estos datos, junto con los valores más bajos de ANGPTL8 pre-intervención en los pacientes en los que coexiste la obesidad mórbida y la T2D parecen sugerir un posible papel de ANGPTL8 en la regulación del metabolismo hidrocarbonado. De hecho, recientemente se han caracterizado los efectos moleculares de ANGPTL8 sobre el metabolismo de la glucosa en líneas celulares hepáticas, sugiriendo que la variabilidad entre los diferentes niveles circulantes de ANGPTL8 observados en los diferentes estudios podría ser debido a diferencias en la capacidad de respuesta a la insulina según el estado insulino-resistente de los sujetos estudiados [225]. En base a todo esto, se ha propuesto que en estadios iniciales de resistencia a la insulina, el hígado podría responder al hiperinsulinismo aumentando la producción de ANGPTL8, pero en estadios avanzados en los que ya existiría una inadecuada función de la célula beta la concentración de ANGPTL8 disminuiría. Esta hipótesis explicaría el comportamiento de ANGPTL8 observado en nuestra cohorte de sujetos con T2D. En resumen, nosotros pensamos que la mejoría en el estado de resistencia a la insulina observado tras la pérdida de peso, facilitaría que el hígado respondiera mejor a las todavía altas concentraciones de insulina incrementando la producción de ANGPTL8.

### **3.3.DISCORDANCIA ENTRE NIVELES DE EXPRESIÓN EN WAT Y NIVELES CIRCULANTES DE ANGPTL8**

Nuestro estudio demuestra que en pacientes obesos diabéticos existe una asociación inversa entre la expresión de ANGPTL8 en SAT y sus niveles circulantes, lo que sugiere que el WAT no sería la fuente primaria de secreción de ANGPTL8. Teniendo en cuenta que la infusión de insulina produce una respuesta paradójica en los niveles de ANGPTL8 en sujetos sanos[283], creemos que este hallazgo podría sugerir un efecto local de ANGPTL8 en el AT, independientemente de la obesidad. De hecho, en el WAT de humanos, al contrario que en el WAT de ratones donde ANGPTL8 se ha detectado exclusivamente en adipocitos, la ANGPTL8 se expresa tanto en adipocitos maduros como en la SVF. En este sentido, resultados no publicados de nuestro grupo sugieren que los macrófagos podrían expresar y secretar ANGPTL8, lo que podría estar apuntando hacia una posible regulación paracrina de ANGPTL8 actualmente desconocida

En resumen, hemos observado que ANGPTL8 aumenta de forma notable en el primer trimestre de gestación, que los niveles disminuyen a lo largo de la gestación, pero manteniéndose por encima de los valores observados fuera de la gestación y el postparto. No hemos podido establecer una relación con la resistencia a la insulina durante la gestación, pero si hemos observado que los niveles de ANGPTL8 se relacionan con el estado nutricional del feto. Estos datos, junto con el hallazgo de la relación entre ANGPTL8 y el *browning*, sugiere que esta proteína podría ser clave en la regulación del metabolismo energético durante la vida intrauterina.

El hecho de que ANGPTL8 pueda ser un factor implicado en el metabolismo energético, nos puede ayudar a entender cómo los niveles de bajos de ANGPTL8 pre-cirugía bariátrica y el grado de incremento tras el mes de la cirugía, se relacionan con una mejor respuesta. En este contexto, creemos que el organismo produciría mayores aumentos de ANGPTL8 en etapas iniciales de obesidad o resistencia a la insulina, como un mecanismo compensatorio para

## Discusión

evitar la progresión de la patología. De manera similar, en situaciones de un balance energético positivo existe una estimulación del BAT y del browning, como mecanismo protector ante el sobrepeso [289]. De hecho, según nuestros estudios, ANGPTL8 es un predictor de la remisión de T2D tras la pérdida de peso experimentada gracias a la cirugía bariátrica, asociando de nuevo mayores niveles de ANGPTL8 a mejores estados de resistencia a la insulina.

Por todo lo anteriormente expuesto, y a pesar de las limitaciones propias de los estudios observacionales en los cuales no es posible establecer causalidad, nuestros resultados sugieren que ANGPTL8 estaría implicada en la fisiología del embarazo y en la etiopatogenia de la de la diabetes y la obesidad.

# Conclusiones



## CONCLUSIONES

### 1. ANGPTL8 Y EMBARAZO

- Los niveles circulantes de ANGPTL8 se encuentran elevados en la gestación, alcanzando su nivel más alto en primer trimestre y disminuyendo posteriormente a lo largo del embarazo.
- Los niveles circulantes de ANGPTL8 en sangre de cordón son más elevados que en sangre materna y, en humanos, se relacionan con el peso y el grado de adiposidad al nacer.
- En modelos animales se ha observado una mayor expresión de ANGPTL8 en tejido adiposo marrón fetal que en ratones adulto.
- ANGPTL8 es una proteína secretada por los adipocitos marrones capaz de regular la conversión de tejido adiposo blanco a marrón.
- Los niveles elevados de ANGPTL8 en la vida fetal, su relación con la adiposidad neonatal y su efecto sobre la plasticidad del tejido adiposo apuntan a ANGPTL8 como posible nuevo elemento regulador de la maquinaria termogénica durante la transición fetal-neonatal.

### 2. ANGPTL8, OBESIDAD Y DIABETES

- Los niveles circulantes de ANGPTL8 se encuentran disminuidos en la obesidad y de forma más marcada en los pacientes obesos con diabetes.
- La expresión de ANGPTL8 en tejido adiposo subcutáneo se correlaciona negativamente con los niveles circulantes y positivamente con la presencia de diabetes.



- Los niveles circulantes de ANGPTL8 en obesos (con o sin diabetes) aumentan de forma precoz tras cirugía bariátrica y el grado de incremento se relaciona con una mayor pérdida de peso.
- El grado de incremento precoz de ANGPTL8 es un predictor de la remisión de T2D al año de la cirugía.
- La pérdida masiva de peso y el estado metabólico son reguladores importantes de los niveles circulantes de ANGPTL8, siendo su incremento tras cirugía bariátrica uno de los principales elementos predictores de remisión de diabetes, independientemente de la pérdida de peso.

# Bibliografía



## Bibliografía

## BIBLIOGRAFIA

1. Galic, S., J.S. Oakhill, and G.R. Steinberg, *Adipose tissue as an endocrine organ*. Mol Cell Endocrinol, 2010. 316: p. 129-139.
2. Romacho, T., et al., *Adipose tissue and its role in organ crosstalk*. Acta Physiol (Oxf). 2014. 210: p. 733-753.
3. Tran, T.T. and C.R. Kahn, *Transplantation of adipose tissue and stem cells: Role in metabolism and disease*. Nat Rev, 2010. 6: p. 195-213.
4. Vila-Bedmar, R. and S. Fernandez-Veledo, *A new era for brown adipose tissue: New insights into brown adipocyte function and differentiation*. Arch Physiol Biochem., 2011. 117(3): p. 195-208.
5. Rosen, E.D. and B.M. Spiegelman, *What we talk about when we talk about fat*. Cell, 2014. 156: p. 20-24.
6. Badimon, L., B. Oñate, and G. Vilahur, *Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y su potencial reparador en la enfermedad isquémica coronaria*. Rev Esp Cardiol., 2015. 68(7): p. 599-611.
7. Guglielmi, V. and P. Sbraccia, *Obesity phenotypes: depot-differences in adipose tissue and their clinical implications*. Eat Weight Disord, 2018. 23(1): p. 3-14.
8. Nedergaard, J., T. Bengtsson, and B. Cannon, *Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. 293: p. E444-452.
9. Cypess, A.M., et al., *Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans*. N Engl J Med, 2009. 360(15): p. 1509-1517.
10. Saito, M., et al., *High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity*. Diabetes, 2009. 58(7): p. 1526-31.
11. Virtanen, K., et al., *Functional brown adipose tissue in healthy adults*. N Engl J Med, 2009. 360(15): p. 1518-25.
12. Zingaretti, M., et al., *The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue*. FASEB J., 2009. 23(9): p. 3113-3120.
13. Stanford, K.I., et al., *Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity*. J Clin Invest, 2013. 123(1): p. 215-223.
14. Giralt, M., R. Cereijo, and F. Villarroya, *Adipokines and the endocrine role of adipose tissues*. Handb Exp Pharmacol., 2016. 233: p. 265-282.
15. Dykstra, J.A., et al., *Concise review: Fat and Furious: Harnessing the full potential of adipose-derived stromal vascular fraction*. Stem Cells Transl Med., 2017. 6(4): p. 1096-1108.
16. Pachón-Peña, G., et al., *Obesity determinates the immunophenotypic profile and functional characteristics of human mesenchymal stem cells from adipose tissue*. Stem Cells Transl Med., 2016. 5(4): p. 464-475.
17. Serena, C., et al., *Obesity and type 2 diabetes alters the immune properties of human adipose derived stem cells*. Stem Cells., 2016. 34(10): p. 2559-2573.
18. Alexander, R.W., *Understanding Adipose-derived Stromal Vascular Fraction (AD-SVF) Cell Biology and Use on the Basis of Cellular, Chemical, Structural and Paracrine Components: A Concise Review*. J Prolotherapy, 2012: p. 4855-69.

## Bibliografía

19. Elgazar-Carmon, V., et al., *Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding*. J Lipid Res, 2008. 49(9): p. 1894-1903.
20. Townsend, K.L. and Y.H. Tseng, *Brown fat fue utilization and thermogenesis*. Trends Endocrinol Metab, 2014. 25(4): p. 168-177.
21. Abella, V., et al., *Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders*. Nat Rev Rheumatol., 2017. 13(2): p. 100-109.
22. Trim, W., J.E. Turner, and D. Thompson, *Parallels in immunometabolic adipose tissue dysfunction with ageing and obesity*. Front Immunol., 2018. 9: p. 9:169.
23. Kalantidis, K., et al., *The occurrence of CMV-specific short Rnas in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus*. Mol Plant Microbe Interact, 2002. 15(8): p. 826-33.
24. Hirosumi, J., et al., *A central role for JNK in obesity and insulin resistance*. Nature, 2002. 420(333-336).
25. Rendina-Ruedy, E. and C.J. Rosen, *Bone-Fat interaction*. Endocrinol Metab Clin North Am., 2017. 46: p. 41-50.
26. Tchkonina, T., et al., *Fat depot origin affects adipogenesis in primary cultured and cloned human preadipocytes*. Am J Physiol Regul Integr Com Physiol., 2002. 282: p. 1286-1296.
27. Romero, M., et al., *Site-retaled white adipose tissue lipid-handling response to oleoyl-estrone treatment in overweight male rats*. Eur J Nutr., 2009. 48: p. 291-299.
28. Manolopoulos, K.N., F. Karpe, and K.N. Frayn, *Gluteofemoral body fat as a determinant of metabolic health*. Int J Obes (Lond), 2010. 34(6): p. 949-959.
29. Gavin, K.M., E.E. Cooper, and R.C. Hickner, *Estrogen receptor protein content is different in abdominal than gluteal subcutaneous adipose tissue of overweight-to-obese premenopausal women*. Metabolism, 2013. 62(8): p. 1180-1188.
30. de Kloet, A.D. and J.P. Herman, *Fat-brain connections: Adipocyte glucocorticoid control of stress and metabolism*. Front Neuroendocrinol., 2018. 48: p. 50-57.
31. Staab, C.A. and E. Maser, *11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an important regulator at the interface of obesity and inflammation*. J Steroid Biochem, 2010. 119: p. 56-72.
32. Lee, M.J., et al., *Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity*. Biochim Biophys Acta, 2014. 1842: p. 473-481.
33. Magnuson, A.M., et al., *Adipose tissue extrinsic factor: Obesity-induced inflammation and the role of the visceral lymph node*. Physiol Behav, 2018. S0031-9384(18): p. 30105-7.
34. Ray, I., S.K. Mahata, and R.K. De, *Obesity: An immunometabolic perspective*. Front Endocrinol (Lausanne), 2016. 7: p. 157.
35. Kwok, K.H., K.S. Lam, and A. Xu, *Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications*. Exp Mol Med., 2016. 11;48: p. e215.
36. Fiorenza, C., S. Chou, and C. Mantzoros, *Lipodystrophy: pathophysiology and advances in treatment*. Nat Rev Endocrinol, 2011. 7: p. 137-150.
37. Maedler, K., et al., *Glucose-induced  $\beta$  cell production of IL-1 $\beta$  contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets*. Journal of Clinical Investigation, 2002. 110(6): p. 851-860.
38. Laforest, S., et al., *Adipocyte size as a determinant of metabolic disease and adipose*

- tissue dysfunction*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2015. 52(6): p. 301-313.
39. Heinson, S., et al., *Adipocyte morphology and implications for metabolic derangements in acquired obesity*. Int J Obes (Lond), 2014. 38(11): p. 1423-1431.
  40. Haczeyni, F., K.S. Bell-Anderson, and G.C. Farrel, *Causes and mechanisms of adipocyte enlargement and adipose expansion*. Obes Rev, 2018. 19(3): p. 406-420.
  41. Goldberg, I., *Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis*. J Lipid Res, 1996. 37: p. 693-707.
  42. Camargo, A.A., et al., *The contribution of 700,000 ORF sequence tags to the definition of the human transcriptome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(21): p. 12103-8.
  43. Saponaro, C., et al., *The subtle balance between lipolysis and lipogenesis: A critical point in metabolic homeostasis*. Nutrients, 2015. 7(11): p. 9453-9474.
  44. Kim, S. and N. Moustaid-Moussa, *Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte*. J Nutr, 2000. 130: p. 3110-5.
  45. Ronti, T., G. Lupattelli, and E. Mannarino, *The endocrine function of the adipose tissue: an update*. Clin Endocrinol, 2006. 64: p. 355-65.
  46. Harwood, J.H., *The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis*. Neuropharmacology, 2011. 63: p. 57-75.
  47. Fonseca-Alcaniz, M.H., et al., *Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice*. J. Pediatría, 2007. 83 (Suppl.5): p. S192-S203.
  48. Trujillo, M.E. and P.E. Scherer, *Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease*. Endocr. Rev., 2006. 27: p. 762-778.
  49. Friedman, J.M. and J.L. Halaas, *Leptin and the regulation of body weight in mammals*. Nature, 1998. 395: p. 763-770.
  50. Havel, P.J., et al., *Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. 81: p. 4406-4413.
  51. Brondani, L., et al., *The role of uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus*. Arg Brass Endocrinol Metabol., 2012. 56(4): p. 215-25.
  52. Lee, P., et al., *High prevalence of brown adipose tissue in adult humans*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2011. 96(2450-2455).
  53. van Marken Lichtenbelt, W., et al., *Cold-activated brown adipose tissue in healthy men*. New England Journal of Medicine, 2009. 360: p. 1500-1508.
  54. Prodhomme, H., et al., *Imaging and identification of brown adipose tissue on CT scan*. Clin Physiol Funct Imaging, 2016.
  55. Moe, T. and H. Ken KY, *Brown adipose tissue in humans: regulation and metabolic significance*. European Journal of Endocrinology, 2015. 175: p. 11-25.
  56. Au-Yong, I., et al., *Brown adipose tissue and seasonal variation in humans*. Diabetes, 2009. 58: p. 2583-2587.
  57. Huang, Y., et al., *Review analysis of the association between the prevalence of activated brown and adipose tissue and outdoor temperature*. Diabetes, 2012: p. 793039.
  58. Ouellet, V., et al., *Outdoor temperature, age, sex, body mass index, and diabetic status determinate the prevalence, mass, and glucose-uptake activity of 18F-FDG-detected BAT in humans*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2011. 96: p. 192-199.

## Bibliografía

59. Persichetti, A., et al., *Prevalence, mass, and glucose-uptake activity of (1)(8)F-FDG-detected brown adipose tissue in humans living in a temperate zone of Italy*. PLoS One, 2013. 8: p. e63391.
60. Garcia, C., et al., *Reduction of brown fat 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose uptake by controlling environmental temperature prior to positron emission tomography scan*. Molecular imaging and Biology, 2006. 8: p. 24-29.
61. Blondin, D., et al., *Increased brown adipose tissue oxidative capacity in cold-acclimated humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. 99(3): p. 438-46.
62. Muzik, O., et al., *15O PET measurement of blood flow and oxygen consumption in cold-activated human brown fat*. Journal of Nuclear Medicine, 2013. 54: p. 523-531.
63. Barbatelli, G., et al., *The emergence cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation*. American Journal of Physiology. Endocrinology, and Metabolism, 2010. 298: p. 1244-1253.
64. Walden, T., et al., *Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite", and white adipose tissues*. American Journal of Physiology. Endocrinology, and Metabolism, 2012. 302: p. 19-31.
65. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Brown adipose tissue: function and physiological significance*. Physiological Reviews, 2004. 84: p. 277-359.
66. Hadi, M., et al., *Brown fat imaging with (18)F-6-fluorodopamine PET/CT, (18)F-FDG PET/CT, and (123)I-MIBG SPECT: a study of patients being evaluated for pheochromocytoma*. Journal of Nuclear Medicine, 2007. 48: p. 1077-1083.
67. Wang, Q., et al., *Brown adipose tissue in humans is activated by elevated plasma catecholamines levels and is inversely related to central obesity*. PLoS One, 2011: p. e21006.
68. Collins, S., E. Yehuda-Shnaidman, and H. Wang, *Positive and negative control of UCP1 gene transcription and the role of  $\beta$ -adrenergic signaling networks*. International Journal of Obesity, 2010. 34: p. 28-33.
69. Shimizu, Y., H. Nikami, and M. Saito, *Sympathetic activation of glucose utilization in brown adipose tissue in rats*. Journal of Biochemistry, 1991. 110: p. 688-692.
70. Marette, A. and L. Bukowiecki, *Stimulation of glucose transport by insulin and norepinephrine in isolated rat brown adipocytes*. American Journal of Physiology., 1989. 257: p. 714-721.
71. Guerra, C., et al., *Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance*. Journal of Clinical Investigation, 2001. 108: p. 1205-1213.
72. Bostrom, P., et al., *A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis*. Nature, 2012. 481: p. 463-468.
73. Martínez de Morentin, P.B., et al., *Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK*. Cell Metab, 2014. 20(1): p. 41-53.
74. Pisani, D.F., et al., *The K<sup>+</sup> channel TASK1 modulates  $\beta$ -adrenergic response in brown adipose tissue through the mineralocorticoid receptor pathway*. FASEB J., 2016. 30(2): p. 909-922.
75. Lee, P., et al., *Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans*. Cell Metab, 2014. 19: p. 302-309.

76. Whittle, A.J., et al., *BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions*. Cell, 2012. 149: p. 871-885.
77. Bordicchia, M., et al., *Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes*. J Clin Invest, 2012. 122(3): p. 1022-1036.
78. Villarroya, J., R. Cereijo, and F. Villarroya, *An endocrine role for brown adipose tissue?* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013. 305: p. E567-E572.
79. Lee, J., et al., *Triiodothyronine induces UCP-1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes*. American Journal of Physiology. Cell Physiology, 2012. 302: p. 463-472.
80. Badman, M.K., et al., *Fibroblast growth factor 21-deficient mice demonstrate impaired adaptation to ketosis*. Endocrinology, 2009. 150: p. 4931-4940.
81. Inagaki, T., et al., *Endocrine regulation of the fasting response by PPAR $\alpha$ -mediated induction of fibroblast growth factor 21*. Cell Metab, 2007. 5: p. 415-425.
82. Sarruf, D.A., et al., *Fibroblast growth factor 21 action in the brain increases energy expenditure and insulin sensitivity in obese rats*. Diabetes, 2010. 59: p. 1817-1824.
83. Hondares, E., et al., *Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue*. J Biol Chem, 2011. 286: p. 12983-12990.
84. Fisher, F.M., et al., *FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis*. Genes Dev, 2012. 26: p. 271-281.
85. Seale, P., et al., *PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch*. Nature, 2008. 454: p. 961-967.
86. Lee, Y.H., et al., *In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by  $\beta$ 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding*. Cell Metab, 2012. 15(480-491).
87. Berry, R. and M.S. Rodeheffer, *Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo*. Nat Cell Biol., 2013. 15: p. 302-308.
88. Rosenwald, M., et al., *Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes*. Nat Cell Biol., 2013. 15(6): p. 659-667.
89. Harms, M. and P. Seale, *Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential*. Nature Medicine, 2013. 19: p. 1252-1263.
90. Rosen, E.D. and B.M. Spiegelman, *Molecular regulation of adipogenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. 16: p. 145-71.
91. Esteve, M., *Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional*. Endocrinol Nutr, 2014. 61: p. 100-112.
92. Jean, Z. and R.S. Farmer, *Morphogenetics in brown, beige and white fat development*. Adipocyte, 2016. 5: p. 130-135.
93. Sanchez-Gurmaches, J. and D. Guertin, *Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed*. Nat Commun., 2014. 19;5: p. 4009.
94. Brey, C.W., et al., *Kruppel-like family of transcription factors: an emerging new frontier in fat biology*. Int J Biol Sci, 2009. 5(6): p. 622-636.
95. Rosen, E.D., et al., *C/EBP $\alpha$  induces adipogenesis through PPAR $\gamma$ : a unified pathway*. Genes Dev, 2002. 16: p. 22-26.
96. Lefterova, M.I. and M.A. Lazar, *New developments in adipogenesis*. Trends Endocrinol Metab, 2009. 20: p. 107-114.



## Bibliografía

97. Seale, P., et al., *Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16*. Cell Metab, 2007. 6: p. 38-54.
98. Weiner, J., et al., *Thyroid hormones and browning of adipose tissue*. Mol Cell Endocrinol, 2017. 458(156-159).
99. Nguyen, K.D., et al., *Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis*. Nature, 2011. 480(7375): p. 104-108.
100. Rosenwald, M. and C. Wolfrum, *The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes*. Adipocyte, 2014. 3: p. 4-9.
101. Petrovic, N., et al., *Chronic peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes*. J. Biol. Chem., 2010. 285(7153-7164).
102. Chu, D.T., et al., *Expression of adipocyte biomarkers in a primary cell culture models reflects preweaning adipobiology*. J. Biol. Chem. , 2014. 289: p. 18478-18488.
103. Chu, D.T. and B. Gawronska-Kozak, *Brown and brite adipocytes: Same function, but different origin and response*. Biochimie, 2017. 138: p. 102-105.
104. Klaus, S., et al., *Functional assessment of white and brown adipocyte development and energy metabolism in cell culture. Dissociation of terminal differentiation and thermogenesis in brown adipocytes*. J. Cell Sci. , 1995. 108: p. 3171-3180.
105. Jespersen, N.Z., et al., *A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans*. Cell Metab, 2013. 17(5): p. 798-805.
106. (OMS)., O.M.d.I.S.
107. Wall, P.K., et al., *Comparison of next generation sequencing technologies for transcriptome characterization*. BMC Genomics, 2009. 10: p. 347.
108. Gallagher, D., et al., *Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index*. Am J Clin Nutr, 2000. 72(3): p. 694-701.
109. Practice, C.o. and Bulletins--Obstetrics., *Practice Bulletin No. 137: Gestational diabetes mellitus*. Obstet Gynecol, 2013. 122: p. 406-416.
110. Nuttall, F.Q., *Body Mass Index*. Nutr Today, 2015. 50(3): p. 117-128.
111. T.J., C., et al., *Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey*. BMJ, 2000. 320(7244): p. 1240-1243.
112. Organización Mundial de la Salud.
113. Olshansky, S., et al., *A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century*. N Engl J Med, 2005. 352: p. 1138-1145.
114. Gonzalez-Muniesa, P., et al., *Obesity*. Nature Reviews Disease Primers, 2017.
115. Sobrino Crespo, C., et al., *Peptides and food intake*. Front Endocrinol (Lausanne), 2014. 5: p. 58.
116. Elks, C.E., et al., *Variability in the heritability of body mass index: a systematic review and meta-regression*. Front Endocrinol (Lausanne), 2012. 3: p. 29.
117. van der Klaauw, A.A. and I.S. Farooqi, *The hunger genes: pathways to obesity*. Cell, 2015. 161: p. 119-132.
118. Kim, K.S., R.J. Seeley, and D.A. Sandoval, *Signalling from the periphery to the brain that regulates energy homeostasis*. Nat Rev Neurosci, 2018.

119. Saltiel, A.R. and C. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. 414: p. 799-806.
120. Buettner, C., et al., *Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms*. Nat Med, 2008. 14(6): p. 667-675.
121. Shen, J., et al., *In vivo effects of leptin on autonomic nerve activity and lipolysis in rats*. Neurosci. Lett., 2007. 416: p. 193-197.
122. Saito, M., *Brown adipose tissue as a regulator of energy expenditure and body fat in humans*. Diabetes Metab J, 2013. 37(1): p. 22-29.
123. Pellegrinelli, V., S. Carobbio, and A. Vidal-Puig, *Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues*. Diabetologia, 2016. 59(6): p. 1075-1088.
124. Reilly, S.M. and A.R. Saltiel, *Adapting to obesity with adipose tissue inflammation*. Nat Rev Endocrinol, 2017. 13(11): p. 633-643.
125. Saad, M.J., A. Santos, and P.O. Prada, *Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance*. Physiology (Bethesda), 2016. 31: p. 283-293.
126. Vitseva, O.I., et al., *Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue*. Obesity (Silver Spring), 2008. 16(5): p. 932-937.
127. Paul, N.E., et al., *The effect of mechanical stress on the proliferation, adipogenic differentiation and gene expression of human adipose-derived stem cells*. J Tissue Eng Regen Med, 2017.
128. Choi, J.R., K.W. Yong, and W.K.Z. Wan Safwani, *Effect of hypoxia on human adipose-derived mesenchymal stem cells and its potential clinical applications*. Cell Mol Life Sci, 2017. 74(14): p. 2587-2600.
129. Huh, J.Y., et al., *Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity*. Mol Cells, 2014. 37(5): p. 365-71.
130. Lumeng, C.N., et al., *Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity*. Diabetes, 2007. 56: p. 562-571.
131. Lackey, D.E. and J. Olefsky, *Regulation of metabolism by the innate immune system*. Nat Rev Endocrinol, 2016. 12: p. 15-28.
132. Burgess, E., P. Hassmen, and K.L. Pumpa, *Determinants of adherence to lifestyle intervention in adults with obesity: a systematic review*. Clin Obes, 2017. 7(3): p. 123-135.
133. Steven, B., M.D. Heymsfield, and T.A. Wadden, *Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity*. N Engl J Med, 2017. 376: p. 254-266.
134. Bays, H., et al., *Liraglutide 3.0 mg for weight management: weight-loss dependent and independent effects*. Curr Med Res Opin, 2017. 33(2): p. 225-229.
135. Gadde, K.M., et al., *Effects of low-dose, controlled-release, phentermine plus topiramate combination on weight and associated comorbidities in overweight and obese adults (CONQUER): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial*. The Lancet, 2011. 377(9774): p. 1341-1352.
136. Gadde, K.M., et al., *Obesity: Pathophysiology and management*. J Am Coll Cardiol., 2018. 71(1): p. 69-84.
137. Schneider, B. and E. Mun, *Surgical management of morbid obesity*. Diabetes Care, 2005. 28: p. 475-80.

## Bibliografía

138. *Gastrointestinal Surgery for Severe Obesity*. . Consens Statement, 1991. 9(1): p. 1-20.
139. Nguyen, N.T. and J.E. Varela, *Bariatric surgery for obesity and metabolic disorders: state of the art*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. 14(3): p. 160-169.
140. Payne, J. and L. DeWind, *Surgical treatment of obesity*. Am J Surg, 1969. 118: p. 141-147.
141. Mingrone, G., et al., *Bariatric surgery versus conventional medical therapy for type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2012. 366(17): p. 1577-1585.
142. Ponce, J., et al., *American Society for Metabolic and Bariatric Surgery estimation of bariatric surgery procedures in the United States, 2011-2014*. Surg Obes Relat Dis, 2015. 11: p. 1199-2000.
143. Regan, J.P., et al., *Early experience with two-stage laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass as an alternative in the super-super obese patient*. Obes Surg, 2003. 13: p. 861-864.
144. Chang, S.H., et al., *The effectiveness and risks of bariatric surgery: an updated systematic review and meta-analysis, 2003-2012*. JAMA Surg, 2014. 149: p. 275-287.
145. Mason, E. and C. Ito, *Gastric bypass*. Ann Surg, 1969. 170: p. 329-339.
146. Buchwald, H., et al., *Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis*. JAMA, 2004. 292(14): p. 1724-1737.
147. Reaven, G., *The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment*. Annu Rev Nutr, 2005. 25: p. 391-406.
148. Prentki, M. and C.J. Nolan, *Islet beta cell failure in type 2 diabetes*. J Clin Invest, 2006. 116(7): p. 1802-12.
149. Weyer, C., et al., *The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1999. 104(6): p. 787-794.
150. Kahn, S.E., et al., *Effects of rosiglitazone, glyburide, and metformin on  $\beta$ -cell function and insulin sensitivity in ADOPT*. Diabetes, 2011. 60(5): p. 1552-1560.
151. Salud, O.M.d.l., *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. 1999.
152. Morris, A.P., et al., *Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes*. Nat Genet, 2012. 44(9): p. 981-90.
153. McCarthy, M.I., *Genomics, type 2 diabetes, and obesity*. N Engl J Med, 2010. 363(24): p. 2339-2350.
154. Meigs, J.B., et al., *Genotype score in addition to common risk factors for prediction of type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2008. 359(21): p. 2208-19.
155. Lyssenko, V., et al., *Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2008. 359(1): p. 2220-2232.
156. Drucker, D.J., *The biology of incretin hormones*. Cell Metab, 2006. 3(3): p. 153-165.
157. Potthoff, M.J., S.A. Kliewer, and D.J. Mangelsdorf, *Endocrine fibroblast growth factors 15/19 and 21: from feast to famine*. Genes Dev, 2012. 26(4): p. 312-24.
158. Pols, T.W., et al., *The bile acid membrane receptor TGR5: a valuable metabolic target*. Dig Dis, 2011. 29(1): p. 37-44.
159. Qin, J., et al., *A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes*. Nature, 2012. 490(7418): p. 55-60.

160. Karlsson, F.H., et al., *Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control*. *Nature*, 2013. 498(7452): p. 99-103.
161. Hu, F.B., R.M. van Dam, and S. Liu, *Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate*. *Diabetologia*, 2001. 44(7): p. 805-817.
162. Chen, M., R.N. Bergman, and D. Porte, *Insulin resistance and beta-cell dysfunction in aging: the importance of dietary carbohydrate*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1988. 67(5): p. 951-957.
163. Guenard, F., et al., *Differential methylation in gluco regulatory genes of offspring born before vs. after maternal gastrointestinal bypass surgery*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(28): p. 11439-11444.
164. *Guía de práctica clínica sobre Diabetes Mellitus Tipo 2*. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2008.
165. Dula, S.B., et al., *Evidence that low-grade systemic inflammation can induce islet dysfunction as measured by impaired calcium handling*. *Cell Calcium*, 2010. 48(2-3): p. 133-42.
166. Nicol, L.E., et al., *Pancreatic inflammation and increased islet macrophages in insulin-resistant juvenile primates*. *J Endocrinol*, 2013. 217(2): p. 207-13.
167. Barbarroja, N., et al., *Progression from high insulin resistance to type 2 diabetes does not entail additional visceral adipose tissue inflammation*. *PLoS One*, 2012. 7(10): p. e48155.
168. Haffner, S., et al., *Intensive lifestyle intervention or metformin on inflammation and coagulation in participants with impaired glucose tolerance*. *Diabetes*, 2005. 54(5): p. 1566-1572.
169. Pfützner, A., et al., *High-sensitivity c-reactive protein predicts cardiovascular risk in diabetic and nondiabetic patients: effects of insulin-sensitizing treatment with pioglitazone*. *J Diabetes Sci Technol*, 2010. 4(3): p. 706-716.
170. Ridker, P.M., et al., *Effects of interleukin-1beta inhibition with canakinumab on hemoglobin A1c, lipids, C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen: a phase IIb randomized, placebo-controlled trial*. *Circulation*, 2012. 126(23): p. 2739-48.
171. Cavelti-Weder, C., et al., *Effects of gevokizumab on glycemia and inflammatory markers in type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 2012. 35(8): p. 1654-62.
172. Larsen, C.M., et al., *Sustained effects of interleukin-1 receptor antagonist treatment in type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 2009. 32(9): p. 1663-8.
173. Odegaard, J.I. and A. Chawla, *Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis*. *Science*, 2013. 339(6116): p. 172-7.
174. Park, J., et al., *Obesity and cancer--mechanisms underlying tumour progression and recurrence*. *Nat Rev Endocrinol*, 2014. 10(8): p. 455-465.
175. Rocha, V.Z. and P. Libby, *Obesity, inflammation, and atherosclerosis*. *Nat Rev Cardiol*, 2009. 6(6): p. 399-409.
176. Donath, M.Y., et al., *nflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes*. *J Mol Med (Berl)*, 2003. 81(8): p. 455-470.
177. Boni-Schnetzler, M., et al., *Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I*. *Endocrinology*, 2009. 150(12): p. 5218-29.
178. Dinarello, C.A., *Reduction of inflammation by decreasing production of interleukin-1 or by specific receptor antagonism*. *Int J Tissue React*, 1992. 14(2): p. 65-75.

## Bibliografía

179. Herder, C., et al., *Elevated levels of the anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist precede the onset of type 2 diabetes: the Whitehall II study*. *Diabetes Care*, 2009. 32(3): p. 421-3.
180. Luotola, K., et al., *Associations between interleukin-1 (IL-1) gene variations or IL-1 receptor antagonist levels and the development of type 2 diabetes*. *J Intern Med*, 2011. 269(3): p. 322-32.
181. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. *J Clin Invest*, 2007. 117(1): p. 175-84.
182. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance*. *Science*, 1993. 259(5091): p. 87-91.
183. Al-Goblan, A.S., M.A. Al-Alfi, and M.Z. Khan, *Mechanism linking diabetes mellitus and obesity*. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2014. 7: p. 587-91.
184. González-Rodríguez, A., et al., *Essential role of protein tyrosine phosphatase 1B in obesity-induced inflammation and peripheral insulin resistance during aging*. *Aging Cell*, 2012. 11(2): p. 284-296.
185. Yuan, M., et al., *Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk $\beta$* . *Science*, 2001. 293: p. 1673-1677.
186. Ros Perez, M. and G. Medina-Gomez, *Obesidad, adipogénesis y resistencia a la insulina*. *Endocrinol Nutr*, 2011. 58: p. 360-369.
187. Johnson, A.M. and J.M. Olefsky, *The origins and drivers of insulin resistance*. *Cell*, 2013. 152(4): p. 673-84.
188. Pi-Sunyer, X., et al., *A Randomized, Controlled Trial of 3.0 mg of Liraglutide in Weight Management*. *N Engl J Med*, 2015. 373(1): p. 11-22.
189. Gregor, M.F. and G.S. Hotamisligil, *Inflammatory mechanisms in obesity*. *Annu Rev Immunol*, 2011. 29: p. 415-45.
190. Arner, P., et al., *Genetic predisposition for type 2 diabetes, but not for overweight/obesity, is associated with a restricted adipogenesis*. *PLoS One*, 2011. 6: p. e18284.
191. Lu, Q., et al., *Induction of adipocyte hyperplasia in subcutaneous fat depot alleviated type 2 diabetes symptoms in obese mice*. *Obesity (Silver Spring)*, 2014. 22: p. 1623-1631.
192. Durruty, P. and A. Garcia de los Rios, *Glucose and lipid toxicity in the pathogenesis and evolution of type 2 diabetes*. *Rev med Chile*, 2001. 129.
193. Nakamura, T., et al., *Double-stranded RNA- dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis*. *Cell*, 2010. 140(3): p. 338-348.
194. Kahn, S.E., M.E. Cooper, and S. Del Prato, *Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future*. *The Lancet*, 2014. 383(9922): p. 1068-1083.
195. Lhasen, M.R. and V.A. Kuzmanic, *Cirugía metabólica 10 años después: una mirada desde la diabetología*. *Rev Med Clin Condes*, 2016. 27(2): p. 188-194.
196. Fried, M., et al., *Metabolic surgery for the treatment of type 2 diabetes in patients with BMI <35 kg/m<sup>2</sup>: an integrative review of early studies*. *Obes Surg*, 2010. 20: p. 776-790.
197. Challis, J.R., et al., *Inflammation and pregnancy*. *Reprod Sci*, 2009. 16(2): p. 206-15.

198. Romero, R., et al., *Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury*. Nutr Rev, 2007. 65: p. S194-202.
199. Mor, G., et al., *Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site*. Ann N Y Acad Sci, 2011. 1221: p. 80-7.
200. Herrera, E. and H. Ortega-Senovilla, *Lipid metabolism during pregnancy and its implications for fetal growth*. Curr Pharm Biotechnol, 2014. 15: p. 24-31.
201. Farrar, D., *Hyperglycemia in pregnancy: prevalence, impact, and management challenges*. International Journal of Women's Health, 2016. 8: p. 519-527.
202. Kirwan, J., et al., *TNF- $\alpha$  is a predictor of insulin resistance in human pregnancy*. Diabetes, 2002. 51: p. 2207-2213.
203. Leipold, H., et al., *Gestational diabetes mellitus is associated with increased C-reactive protein concentrations in the third but not second trimester*. Eur J Clin Invest, 2005. 35(12): p. 752-757.
204. Metzger, B. and D. Coustan, *Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus*. Diabetes Care, 1998. 21: p. B161-B167.
205. Buckley, B.S., et al., *Gestational diabetes mellitus in Europe: prevalence, current screening practice and barriers to screening. A review*. Diabet Med, 2012. 29(7): p. 844-854.
206. Jenum, A., et al., *Impact of ethnicity on gestational diabetes identified with the WHO and the modified International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups criteria: a population-based cohort study*. Endocr J, 2012. 166: p. 317-324.
207. O'Sullivan, E., et al., *Atlantic diabetes in pregnancy (DIP): the prevalence and outcomes of gestational diabetes mellitus using new diagnostic criteria*. Diabetologia, 2011. 54: p. 1670-1675.
208. Aune, D., et al., *Maternal body mass index and the risk of fetal death, stillbirth, and infant death: a systematic review and meta-analysis*. JAMA, 2014. 311(15): p. 1536-1546.
209. Dixit, A. and J.C. Girling, *Obesity and pregnancy*. J Obstet Gynaecol, 2008. 28(1): p. 14-23.
210. Buchanan, T.A., A.H. Xiang, and K.A. Page, *Gestational diabetes mellitus: risks and management during and after pregnancy*. Nat Rev Endocrinol, 2012. 8(639-649).
211. Catalano, P., *Obesity, insulin resistance, and pregnancy outcome*. Reproduction, 2010. 140: p. 365-371.
212. Association, A.D., *Standards of medical care in diabetes*. Diabetes Care, 2016. 39: p. 1-119.
213. Group, T.H.S.C.R., *Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes*. N Engl J Med, 2008. 358: p. 1991-2002.
214. Yang, X., et al., *Women with impaired glucose tolerance during pregnancy have significantly poor pregnancy outcomes*. Diabetes Care, 2002. 25(9): p. 1619-1624.
215. Hillier, T.A., et al., *Childhood obesity and metabolic imprinting: the ongoing effects of maternal hyperglycemia*. Diabetes Care, 2007. 30(9): p. 2287-2292.
216. McLachlan, K.A., R. Boston, and F.P. Alford, *Impaired non-esterified fatty acid suppression to intravenous glucose during late pregnancy persists postpartum in gestational diabetes: a dominant role for decreased insulin secretion rather than insulin resistance*. Diabetologia, 2005. 48: p. 1373-1379.

## Bibliografía

217. Agha-Jaffar, R., et al., *Gestational diabetes mellitus: does an effective prevention strategy exist?* Nat Rev Endocrinol, 2016. 12(9): p. 533-546.
218. Symonds, M., *Brown adipose tissue growth and development*. Scientifica (Cairo), 2013. 2013: p. 305763.
219. Zhao, P., et al., *Maternal gestational diabetes and childhood obesity at age 9-11: results of a multinational study*. Diabetologia, 2016. 59(11): p. 2339-2348.
220. Quagliarini, F., et al., *Atypical angiotensin-like protein that regulates ANGPTL3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. 109(48): p. 19751-6.
221. Zhang, R., *Lipasin, a novel nutritionally-regulated liver-enriched factor that regulates serum triglyceride levels*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. 424(4): p. 786-92.
222. Ren, G., J.Y. Kim, and C.M. Smas, *Identification of RIFL, a novel adipocyte-enriched insulin target gene with a role in lipid metabolism*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. 303(3): p. E334-51.
223. Yi, P., J.S. Park, and D.A. Melton, *Betatrophin: a hormone that controls pancreatic beta cell proliferation*. Cell, 2013. 153(4): p. 747-58.
224. Strausberg, R.L., et al., *Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(26): p. 16899-903.
225. Rong Guo, X., et al., *ANGPTL8/betatrophin Alleviates insulin resistance via the Akt-GSK3beta or Akt-FoxO1 pathway in HepG2 Cells*. Exp Cell Res, 2015.
226. Kim, I., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel angiotensin family protein, angiotensin-3*. FEBS Lett, 1999. 443(3): p. 353-6.
227. Zheng, J., et al., *Inhibitory receptors bind ANGPTLs and support blood stem cells and leukaemia development*. Nature, 2012. 485(7400): p. 656-60.
228. Oike, Y., K. Yasunaga, and T. Suda, *Angiotensin-related/angiotensin-like proteins regulate angiogenesis*. Int J Hematol, 2004. 80(1): p. 21-8.
229. Dhanabal, M., et al., *Angioarrestin: an antiangiogenic protein with tumor-inhibiting properties*. Cancer Res, 2002. 62(13): p. 3834-41.
230. Farhat, N., et al., *Angiotensin-like 2 promotes atherogenesis in mice*. J Am Heart Assoc, 2013. 2(3): p. e000201.
231. Kitazawa, M., et al., *Angiotensin-like 2, a circadian gene, improves type 2 diabetes through potentiation of insulin sensitivity in mice adipocytes*. Endocrinology, 2011. 152(7): p. 2558-67.
232. Santulli, G., *Angiotensin-like proteins: a comprehensive look*. Front Endocrinol (Lausanne), 2014. 5: p. 4.
233. Ono, M., et al., *Protein region important for regulation of lipid metabolism in angiotensin-like 3 (ANGPTL3): ANGPTL3 is cleaved and activated in vivo*. J Biol Chem, 2003. 278(43): p. 41804-9.
234. Robciuc, M.R., et al., *Angptl3 deficiency is associated with increased insulin sensitivity, lipoprotein lipase activity, and decreased serum free fatty acids*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. 33(7): p. 1706-13.
235. Musunuru, K., et al., *Exome sequencing, ANGPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia*. N Engl J Med, 2010. 363(23): p. 2220-7.
236. Kersten, S., et al., *Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene*. J Biol Chem, 2000. 275(37): p. 28488-93.

237. Yoshida, K., et al., *Angiopoietin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase*. J Lipid Res, 2002. 43(11): p. 1770-2.
238. Xu, A., et al., *Angiopoietin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(17): p. 6086-91.
239. Zeng, L., et al., *Identification of a novel human angiopoietin-like gene expressed mainly in heart*. J Hum Genet, 2003. 48(3): p. 159-62.
240. Zhang, C.C., et al., *Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation*. Blood, 2008. 111(7): p. 3415-23.
241. Namkung, J., et al., *Serum levels of angiopoietin-related growth factor are increased in metabolic syndrome*. Metabolism, 2011. 60(4): p. 564-8.
242. Legry, V., et al., *Association between angiopoietin-like 6 (ANGPTL6) gene polymorphisms and metabolic syndrome-related phenotypes in the French MONICA Study*. Diabetes Metab, 2009. 35(4): p. 287-92.
243. Katoh, Y. and M. Katoh, *Comparative integromics on Angiopoietin family members*. Int J Mol Med, 2006. 17(6): p. 1145-9.
244. Kuchtey, J., et al., *Angiopoietin-like 7 secretion is induced by glaucoma stimuli and its concentration is elevated in glaucomatous aqueous humor*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. 49(8): p. 3438-48.
245. Rozsa, F.W., et al., *Gene expression profile of human trabecular meshwork cells in response to long-term dexamethasone exposure*. Mol Vis, 2006. 12: p. 125-41.
246. Fu, Z., et al., *Lipasin, thermoregulated in brown fat, is a novel but atypical member of the angiopoietin-like protein family*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. 430(3): p. 1126-31.
247. Abu-Farha, M., et al., *Increased ANGPTL3, 4 and ANGPTL8/betatrophin expression levels in obesity and T2D*. Lipids Health Dis, 2016. 15(1): p. 181.
248. Gusarova, V., et al., *ANGPTL8/betatrophin does not control pancreatic beta cell expansion*. Cell, 2014. 159(3): p. 691-6.
249. Wang, Y., et al., *Mice lacking ANGPTL8 (Betatrophin) manifest disrupted triglyceride metabolism without impaired glucose homeostasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(40): p. 16109-14.
250. Jiao, Y., et al., *Elevated mouse hepatic betatrophin expression does not increase human beta-cell replication in the transplant setting*. Diabetes, 2014. 63(4): p. 1283-8.
251. Cox, A.R., et al., *Resolving discrepant findings on ANGPTL8 in  $\beta$ -cell proliferation: a collaborative approach to resolving the betatrophin controversy*. PLoS One, 2016. 11(7).
252. Ebert, T., et al., *Betatrophin levels are increased in women with gestational diabetes mellitus compared to healthy pregnant controls*. Eur J Endocrinol, 2015. 173(1): p. 1-7.
253. Wawrusiewicz-Kurylonek, N., et al., *Increased Maternal and Cord Blood Betatrophin in Gestational Diabetes*. PLoS One, 2015. 10(6): p. e0131171.
254. Trebotic, L.K., et al., *Circulating Betatrophin Is Strongly Increased in Pregnancy and Gestational Diabetes Mellitus*. PLoS One, 2015. 10(9): p. e0136701.
255. Li, E., et al., *Betatrophin expression is promoted in obese hyperinsulinemic type 2 but not type 1 diabetic mice*. Endocr J, 2016. 63(7): p. 611-619.



## Bibliografía

256. Zhang, R., *The ANGPTL3-4-8 model, a molecular mechanism for triglyceride trafficking*. Open Biol., 2016. 6: p. 150272.
257. Espes, D., M. Martinell, and P.O. Carlsson, *Increased circulating betatrophin concentrations in patients with type 2 diabetes*. Int J Endocrinol, 2014. 2014: p. 323407.
258. Espes, D., J. Lau, and P.O. Carlsson, *Increased circulating levels of betatrophin in individuals with long-standing type 1 diabetes*. Diabetologia, 2014. 57(1): p. 50-3.
259. Fu, Z., et al., *Elevated circulating lipasin/betatrophin in human type 2 diabetes and obesity*. Sci Rep, 2014. 4: p. 5013.
260. Fenzl, A., et al., *Circulating betatrophin correlates with atherogenic lipid profiles but not with glucose and insulin levels in insulin-resistant individuals*. Diabetologia, 2014. 57(6): p. 1204-8.
261. Gomez-Ambrosi, J., et al., *Circulating betatrophin concentrations are decreased in human obesity and type 2 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. 99(10): p. E2004-9.
262. Hu, H., et al., *Increased circulating levels of betatrophin in newly diagnosed type 2 diabetic patients*. Diabetes Care, 2014. 37(10): p. 2718-22.
263. Ebert, T., et al., *Circulating angiopoietin-like protein 8 is independently associated with fasting plasma glucose and type 2 diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. 99(12): p. E2510-7.
264. Chen, X., et al., *Circulating betatrophin levels are increased in patients with type 2 diabetes and associated with insulin resistance*. J Clin Endocrinol Metab, 2015. 100(1): p. E96-100.
265. Yi, M., et al., *Betatrophin Acts as a Diagnostic Biomarker in Type 2 Diabetes Mellitus and Is Negatively Associated with HDL-Cholesterol*. Int J Endocrinol, 2015. 2015: p. 479157.
266. Erol, O., et al., *Evaluation of circulating betatrophin levels in gestational diabetes mellitus*. Gynecol Endocrinol, 2015. 31(8): p. 652-6.
267. Yamada, H., et al., *Circulating betatrophin is elevated in patients with type 1 and type 2 diabetes*. Endocr J, 2015. 62(5): p. 417-21.
268. Xie, X., et al., *Associations of betatrophin levels with irisin in Chinese women with normal glucose tolerance*. Diabetol Metab Syndr, 2015. 7: p. 26.
269. Guo, K., et al., *Serum betatrophin concentrations are significantly increased in overweight but not in obese or type 2 diabetic individuals*. Obesity (Silver Spring), 2015. 23(4): p. 793-7.
270. Wang, L., et al., *Circulating Levels of Betatrophin and Irisin Are Not Associated with Pancreatic beta-Cell Function in Previously Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus Patients*. J Diabetes Res, 2016. 2016: p. 2616539.
271. Fu, Z., A.B. Abou-Samra, and R. Zhang, *An explanation for recent discrepancies in levels of human circulating betatrophin*. Diabetologia, 2014. 57(10): p. 2232-4.
272. Kong, F.J., et al., *Circulating betatrophin levels and gestational diabetes mellitus: a systematic review and a meta-analysis*. PLoS One, 2017. 12.
273. Zielińska, A., et al., *Levels of betatrophin decrease during pregnancy despite increased insulin resistance, beta-cell function and triglyceride levels*. Diabetes Metab, 2016. 42(6): p. 409-415.

274. Cox, A.R., et al., *Angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8)/betatrophin overexpression does not increase beta cell proliferation in mice*. *Diabetologia*, 2015. 58(7): p. 1523-31.
275. Huang, Y., et al., *Angiopoietin-like protein 8 in early pregnancy improves the prediction of gestational diabetes*. *Diabetologia*, 2018. 61(3): p. 574-580.
276. Zhang, Y., et al., *Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling*. *Diabetes*, 2014. 63(2): p. 514-25.
277. Vila-Bedmar, R., M. Lorenzo, and S. Fernandez-Veledo, *Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase-mammalian target of rapamycin cross talk regulates brown adipocyte differentiation*. *Endocrinology*, 2010. 151(3): p. 980-992.
278. Clarke, L., et al., *Maternal manipulation of brown adipose tissue and liver development in the ovine fetus during late gestation*. *Br J Nutr*, 1997. 77(6): p. 871-883.
279. Symonds, M., et al., *Adipose tissue and fetal programming*. *Diabetologia*, 2012. 55: p. 1597-1606.
280. Au, C.P., et al., *Body composition is normal in term infants born to mothers with well-controlled gestational diabetes mellitus*. *Diabetes Care*, 2013. 36(3): p. 562-564.
281. Bahado-Singh, R.O., et al., *Fetal male gender and the benefits of treatment of mild gestational diabetes mellitus*. *Am J Obstet Gynecol*, 2012. 206(5): p. 422.e1-5.
282. Baka, S., et al., *Cord blood irisin at the extremes of fetal growth*. *Metabolism*, 2015. 64(11): p. 1515-1520.
283. Nidhina Haridas, P.A., et al., *Regulation of Angiopoietin-Like Proteins (ANGPTLs) 3 and 8 by Insulin*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015. 100(10): p. E1299-307.
284. Vage, V., et al., *Changes in obesity-related diseases and biochemical variables after laparoscopic sleeve gastrectomy: a two-year follow-up study*. *BMC Surgery*, 2014. 14: p. 8.
285. Sjostrom, L., *Bariatric surgery and reduction in morbidity and mortality: experiences from the SOS study*. *International Journal of Obesity*, 2008. 32 Suppl 7: p. S93-97.
286. Pascual-Corrales, E., et al., *Circulating ANGPTL8/Betatrophin Concentrations Are Increased After Surgically Induced Weight Loss, but Not After Diet-Induced Weight Loss*. *Obes Surg*, 2016.
287. Crujeiras, A.B., et al., *Interplay of atherogenic factors, protein intake and betatrophin levels in obese-metabolic syndrome patients treated with hypocaloric diets*. *Int J Obes (Lond)*, 2015.
288. Abu-Farha, M., et al., *Circulating ANGPTL8/Betatrophin Is Increased in Obesity and Reduced after Exercise Training*. *PLoS One*, 2016. 11(1): p. e0147367.
289. Chechi, K., J. Nedergaard, and D. Richard, *Brown adipose tissue as an anti-obesity tissue in humans*. *Obes Rev*, 2014. 15(2): p. 92-106.