



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

Efecto de los glucocorticoides en la expresión de *AQP7* en el tejido adiposo *in vitro*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

MARIANA FRIDA ÁLVAREZ PÉREZ

ASESORA:

DRA. MARÍA OFELIA MORA IZAGUIRRE

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Efecto de los glucocorticoides en la expresión de AQP7 en el tejido adiposo in vitro.

Que presenta la pasante: MARIANA FRIDA ÁLVAREZ PÉREZ
Con número de cuenta: 31004747-8 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de junio de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Armando Sadajiko Shimada Miyasaka	
VOCAL	Dra. María Ofelia Mora Izaguirre	
SECRETARIO	M. en C. César Garzón Pérez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Jehieli Girela Álvarez	
2do. SUPLENTE	M. en C. Bricia Plata Anaya	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/ntm*

La esencia precede a la existencia.

-Jean-Paul Sartre

Agradecimientos

A mi familia, por apoyarme siempre, creer en mí y darme tanto cariño. Gracias madre, por apoyarme y enseñarme a seguir adelante pese a las vicisitudes, por no dejar que me rindiera. A José Luis Pérez por darme su apoyo y estar siempre presente, te llevo siempre en mí. A Anastasia Olmos por ser ejemplo de una gran persona, te admiro y amo demasiado.

A los académicos que me han guiado por este camino de la veterinaria, compartiendo su conocimiento y experiencia, en especial al Dr. Ismael Ávalos por apoyarme cuando más lo necesitaba, tanto académica como personalmente.

A la Dra. Ofelia Mora, por integrarme a su gran equipo en el laboratorio, creer en mí y corregir mis errores.

A la M. en C. Laura Gonzáles por sus enseñanzas e inmensa paciencia. Por recibirme con una gran sonrisa en el laboratorio.

Al Dr. Armando Shimada por sus lecciones académicas y personales, por su apoyo y recomendaciones.

Al laboratorio A-03 del Instituto de Neurobiología y al Dr. Alfredo Varela por permitir la realización del trabajo en su laboratorio.

A la unidad de Proteogenómica y a la M. en C. Adriana González por su apoyo en la realización de este proyecto.

Al bioterio del INB por la aportación del material biológico.

Al jurado académico por su paciencia, tiempo y apoyo brindado para este trabajo escrito.

Al SNI y al CONACyT por la beca otorgada para realizar este trabajo de investigación.

A la UNAM por los conocimientos adquiridos y experiencias inolvidables y a la FES-Cuautitlán.

A los Xhalalienses (Yuly, Edwin, Compí, Monse, Adrián, Jorge, David, Grecia y Andy), cada uno ha contribuido de diversas maneras hacia mi persona durante la carrera, todas tan lindas e inolvidables; por su apoyo dentro y fuera de lo académico, sus enseñanzas y su gran cariño, gracias. Los quiero mucho colegas 😊.

A Guillermo por estar aquí, siempre conmigo desde hace 12 años. Te adoro amigo.

A mis amigos que me reciben con sonrisas y abrazos, los aprecio de verdad, que nunca me dejan sola; a Manuel por ser mi acompañante del último semestre; a Lugo que siempre me levanta el ánimo, a Toledo por compartir conmigo las experiencias en la tesis y un poco de todo lo que sabe, a Sara por escucharme y hacer locuras juntas.

A Lucero Hernández por su apoyo y amistad, ¡Que alegría haberte conocido!

A Lady Pérez por su gran apoyo en mi estancia en Querétaro.

A Joshua, por toda su paciencia, alegría, enseñanzas, charlas, secretos y apoyo. Gracias por todo tu amor.

Índice general

Índice general.....	1
II. Índice de figuras.....	3
III. Índice de Cuadros.....	4
IV. Glosario de abreviaturas.....	5
Resumen.....	6
1. Marco de referencia.....	7
2. Marco teórico.....	8
2.1 Tejido adiposo.....	8
2.1.1 Tejido adiposo blanco.....	9
2.1.2 Tejido adiposo café.....	11
2.2 Glucocorticoides.....	12
2.2.1 Síntesis de glucocorticoides.....	13
2.2.2 Regulación de glucocorticoides.....	14
2.3 Acuaporinas.....	16
2.3.1 Acuagliceroporina 7.....	18
2.4 Glicerol cinasa.....	18
2.5 11 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa.....	19
3. Justificación.....	21
4. Objetivos.....	22
4.1 Objetivo general.....	22
4.2 Objetivos específicos.....	22
5. Metodología.....	23

5.1 Aislamiento de células de tejido adiposo café y blanco.....	23
5.2 Tripsinizado de células.....	23
5.3 Diferenciación de células	24
5.4 Tratamientos con cortisona	25
5.5 Extracción de ARN total con TRizol	25
5.5.1 Visualización de ARN	26
5.6 Síntesis de ADN complementario	26
5.6.1 Visualización de ADNc.....	27
5.7 PCR en tiempo real	27
5.8 Cuantificación de glicerol	30
5.9 Modelo experimental	31
5.10 Análisis estadístico	31
6. Resultados	32
7. Discusión.....	42
8. Conclusiones.....	45
9. Artículo: Glucocorticoid Gene Regulation of Aquaporin-7.....	46
10. Referencias citadas.....	77

II. Índice de figuras

Figura 1. Tejido adiposo blanco.....	9
Figura 2. Tejido adiposo café	9
Figura 3. Síntesis e hidrólisis de triglicéridos.....	10
Figura 4. Síntesis de glucocorticoides	14
Figura 5. Regulación central de glucocorticoides	15
Figura 6. Estructura de Acuaporina	17
Figura 7. Representación de la activación de 11 β -HSD1 en la célula	20
Figura 8. Muestras de ARN corridas en gel.....	26
Figura 9. Muestras de ADNc corridas en gel.....	27
Figura 10. Efecto de la cortisona sobre la expresión de ARNm de <i>AQP7</i> en AB de ratón.....	32
Figura 11. Efecto de la cortisona sobre la expresión de ARNm de <i>AQP7</i> en AC de ratón.....	33
Figura 12. Efecto de la cortisona en la concentración del glicerol en el medio de AB de ratón	34
Figura 13. Efecto de la cortisona en la concentración del glicerol en el medio de AC de ratón	35
Figura 14. Efecto de la cortisona sobre la expresión de ARNm de <i>GK</i> en AB de ratón.	36

Figura 15. Efecto de la cortisona sobre la expresión de ARNm de GK en AC de ratón 37

Figura 16. Relación entre la expresión de ARNm de AQP7 en AB y AC, Δ Ct ARNm a -5 min 38

Figura 17. Relación entre la expresión de ARNm de AQP7 en AB y AC..... 39

Figura 18. Efecto de la cortisona en la expresión de ARNm de *11 β -HSD1* en AB de ratón 40

Figura 19. Efecto de la cortisona en el ARNm de *11 β -HSD1* en AC de ratón 41

III. Índice de Cuadros

Cuadro 1. Primers usados en qPCR 29

IV. Glosario de abreviaturas

AB	Adipocitos blancos
AC	Adipocitos cafés
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AQPs	Acuaporinas
AQP3	Acuaporina 3
AQP7	Acuaporina 7
AQP9	Acuaporina 9
AQP10	Acuaporina 10
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNseq	Ácido ribonucléico secuenciado
DMEM	Medio Dulbecco's Modified Eagle
ERGs	Elementos de respuesta a glucocorticoides
GCs	Glucocorticoides
Gk	Glicerol cinasa
MnSOD	Superóxido dismutasa manganesa
NPA	Asparagina-prolina—alanina
PPAR γ	Activador proliferador peroxisoma receptor gamma
PPIA	Peptidilpropil Isomerasa A
TAB	Tejido adiposo blanco
TAC	Tejido adiposo café
11 β -HSD	11 β - Hidroxisteroidea dehidrogenasa
11 β -HSD1	11 β - Hidroxisteroidea dehidrogenasa tipo 1
11 β -HSD2	11 β - Hidroxisteroidea dehidrogenasa tipo 2

Resumen

La regulación por hormonas esteroides endógenas es esencial en los procesos biológicos, tales como el desarrollo, la inmunidad y el metabolismo energético; lo cual influye en la expresión de diversas proteínas como la acuagliceroporina-7 (AQP7), la enzima glicerol quinasa (GK) y la 11 β -hidroxisteroidea dehidrogenasa tipo 1 (11 β -HSD1), todas ellas involucradas en la lipólisis y lipogénesis. El experimento se realizó a partir de células de cultivo primario de adipocitos diferenciados blancos (AB) y cafés (AC) de ratones (*Mus musculus*), para conocer la relación de reacción entre ambos tejidos y el tiempo de expresión relativa de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de *AQP7*, *Gk* y *11 β -HSD1* a diferentes concentraciones de cortisona (0, 0.1, 1 y 10 μ M), durante 6 diferentes lapsos de incubación (0, 5, 10, 15 y 20 minutos y 48 horas) usando como control el mismo cultivo celular 5 minutos antes de los tratamientos. La cuantificación de esta expresión se realizó extrayendo el ARN total de las células con TRIzol y posteriormente se realizó PCR cuantificable, la abundancia relativa de ARNm fue calculada por la normalización con el de RPLP0 usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los resultados se analizaron con el programa estadístico SAS. Se obtuvieron los siguientes resultados: aumento en la expresión de *AQP7* desde los primeros 10 minutos a partir de la concentración de 10 μ M en ambos tipos celulares, disminuyendo a las 48 horas para todas las concentraciones, *Gk* en AB hubo aumento a partir de 10 minutos con concentraciones de 10 μ M y disminución a las 48 horas; a diferencia de *Gk* en AC que se mantuvo estable hasta su disminución a las 48 horas; en el caso de *11 β -HSD1* se expresó con un ligero y constante aumento durante los primeros minutos, siendo hasta las 48 horas donde se observó un aumento mayor. La estimulación de los genes involucrados en los procesos metabólicos por los glucocorticoides (GCs) aún necesita ser mejor comprendida, para que su entendimiento se refleje en la comprensión y tratamiento de las enfermedades metabólicas, tanto en humanos como en los animales, particularmente en perros y gatos.

Palabras clave: *AQP7*, *GK*, *11 β -HSD1*, glicerol, cortisona, adipocitos murinos.

1. Marco de referencia

Las acuaporinas (AQPs) son una familia de proteínas estructurales de canales de agua, se encuentran ampliamente distribuidas desde organismo unicelulares, invertebrados, plantas, hasta vertebrados. Las AQPs desempeñan un papel importante en la homeostasis del agua. Cuentan con una clasificación en donde se agrupan las que sólo son permeables al agua y las acuagliceroporinas, las cuales son permeables al agua y al glicerol (Agre y Kozono, 2003; MacDougald y Burant, 2005; Rodríguez *et al.*, 2006), involucrándose también en el metabolismo energético, pues el glicerol es de los principales sustratos gluconeogénicos. La AQP7 forma parte de esta segunda clasificación, sirve como canal de glicerol en el tejido adiposo, se ha demostrado que su deficiencia tiene como resultado el desarrollo de obesidad de los individuos y alteraciones en diversos compuestos como la enzima glicerol cinasa (Hibuse *et al.*, 2005). Los glucocorticoides endógenos juegan un papel importante en el metabolismo energético al estimular rutas metabólicas como son lipólisis, gluconeogénesis y sirve como inductor de la expresión de ciertos genes, se ha reportado que la estimulación con glucocorticoides en tejido adiposo murino provoca aumento de la expresión relativa de acuaporina 7, tomando en cuenta que ambos juegan un papel importante en el metabolismo energético, el poder identificar estos procesos fisiológicos podrán ser útil para entender los procesos patológicos de las enfermedades metabólicas.

2. Marco teórico

2.1 Tejido adiposo

El tejido adiposo (TA) deriva de la capa mesodérmica del embrión y tiene un desarrollo pre y post natal. El adipocito, su célula funcional, contiene abundante retículo endoplásmico, un alto índice núcleo/citoplasma, localización perinuclear de la mitocondria y presencia de vacuolas lipídicas. Su secuencia de diferenciación celular es adipoblasto-preadipocitos-adipocito inmaduro-adipocito maduro (Meruane y Rojas, 2010).

Las funciones del adipocito se pueden clasificar de acuerdo a tres aspectos: en primer lugar, su contribución al metabolismo lipídico, que incluye el almacenamiento de triglicéridos y la liberación de ácidos grasos; en segundo lugar, el adipocito cataboliza triglicéridos para así poder liberar glicerol y ácidos grasos que participan en el metabolismo de la glucosa en el hígado y otros tejidos, y por último, los adipocitos segregan adipocinas, que incluyen hormonas, citocinas y otros factores bioactivos con funciones biológicas específicas (Shapiro y Wertheimer, 1943; Qiang *et al.*, 2007; Medina-Gómez y Vidal-Puig, 2009). Estas funciones hacen que el tejido adiposo tenga un papel importante en procesos fisiológicos, tales como el desarrollo, el crecimiento y la homeostasis energética. A esto se suma que los adipocitos participan activamente en otros procesos metabólicos, como angiogénesis, disolución y formación de la matriz extracelular, metabolismo de esteroides y la respuesta inmune (Medina-Gómez y Vidal-Puig, 2009).

Hay evidencia de dos tipos de tejido adiposo: el tejido adiposo blanco (TAB) y tejido adiposo café (TAC). El TAB en mamíferos, aves, reptiles y anfibios contiene células de almacén de triglicéridos (TG) (figura 1) en grandes gotas lipídicas y los moviliza para cubrir los requerimientos energéticos del organismo en periodos de escasez.

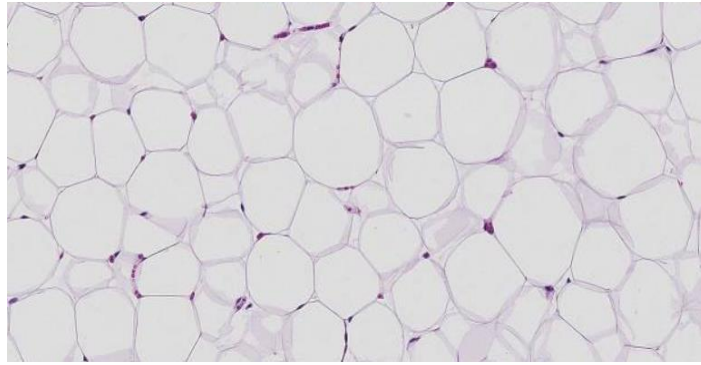


Figura 1. Tejido adiposo blanco. Tomado de Verma, *et al.*, (2016).

Está dividido en compartimientos distintos por todo el cuerpo como TAB subcutáneo y TAB visceral. También existen depósitos de TAC (figura 2), morfológicamente distinto a TAB, contiene gran cantidad de mitocondrias, almacena lípidos en pequeñas gotas y es altamente especializado en la conversión de energía química a energía calórica (Meruane y Rojas, 2010).

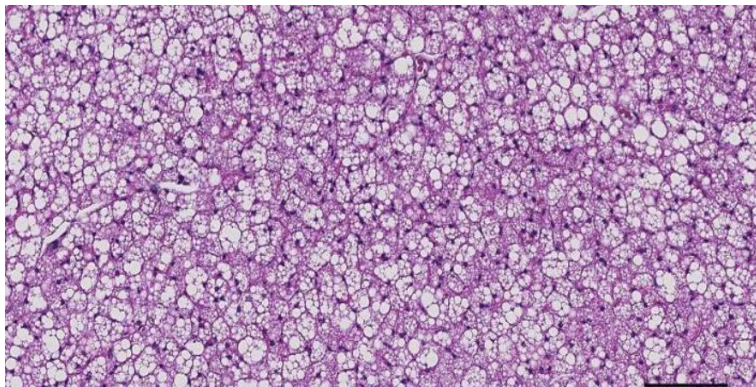


Figura 2. Tejido adiposo café. Tomado de Verma, *et al.*, (2016).

2.1.1 Tejido adiposo blanco

En adipocitos diferenciados, la síntesis de TG y su hidrólisis se estimulan de acuerdo con el estado energético. Durante periodos de exceso de calorías, los adipocitos absorben los ácidos grasos libres (AGL) los cuales se almacenan como TG (figura 3). El glicerol-3-fosfato es un metabolito requerido para la biosíntesis de TG, el cual procede de tres fuentes metabólicas: glucosa, glicerol derivado de

lipólisis, fosforilado por la Glicerol cinasa (Gk, por sus siglas en inglés) y piruvato, que se convierte en glicerol por la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) (Rodríguez *et al.*, 2006).

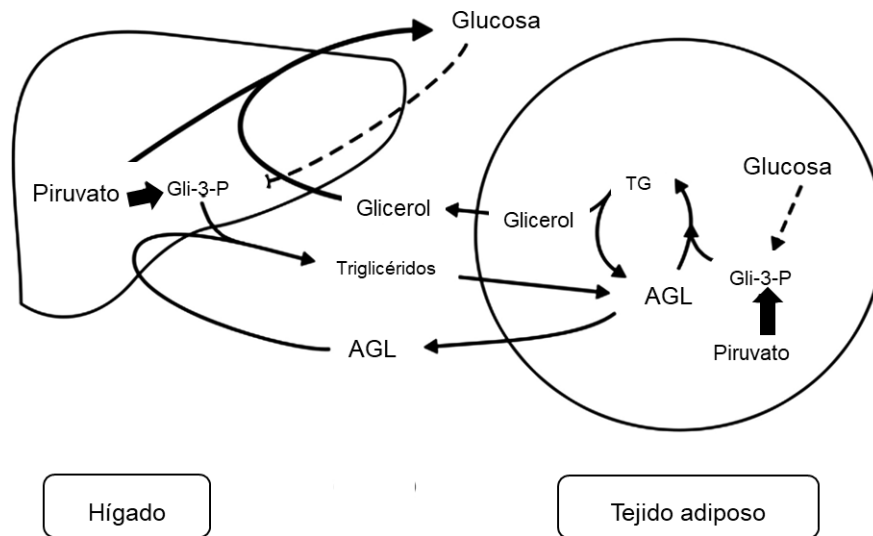


Figura 3. Síntesis e hidrólisis de triglicéridos. Modificado de Reshef *et al.*, (2003).

Cuando la energía es requerida en otros órganos, el almacenamiento de TG en el tejido adiposo es hidrolizado en glicerol y ácidos grasos libres (AGL), mediante la lipasa sensible a hormonas (LSH), la cual responde a: catecolaminas, hormonas tiroideas y los glucocorticoides, ACTH, ADH e Interleucina-6 (Rodríguez *et al.*, 2006; Engelking, 2015). Estos productos se vierten al torrente sanguíneo, el glicerol llega al hígado y funciona como sustrato para la gluconeogénesis, cubriendo así el requerimiento energético, un ejemplo de ello es durante el ayuno o el ejercicio (Frühbeck, 2005), las moléculas transportadoras de AGL son: la traslocasa de ácidos grasos, la proteína transportadora de ácidos grasos y la proteína de membrana unida a ácidos grasos; la molécula responsable de liberar el glicerol a la circulación es la acuaporina o acuagliceroporina 7 (AQP7) (Reshef *et al.*, 2003). Si existiera una reducción de la permeabilidad de la membrana al glicerol da como resultado un aumento en la concentración de este, en estado estacionario, lo que conduce a un aumento del glicerol-3-fosfato y por lo tanto a la biosíntesis de

triglicéridos, además, alrededor del 30-40% de los AGL se reciclan de nuevo a TG en TAB (Rodríguez *et al.*, 2006).

La obesidad es la condición caracterizada por la acumulación excesiva de energía en forma de triglicéridos en los adipocitos blancos (London y Castonguay, 2009).

2.1.2 Tejido adiposo café

En contraste con el TAB, el TAC desempeña un papel activo en el gasto energético y la oxidación de ácidos grasos para la disipación de calor (London y Castonguay, 2009), siendo el principal sitio de termogénesis en el recién nacido y es especialmente mayor en el feto de los mamíferos, también se encuentra en grandes cantidades en los animales que hibernan. Este tejido, a diferencia del TAB contiene varias gotas pequeñas de lípidos (multiloculares) (Townsend y Tseng, 2012; Dattani y Gevers, 2016). El TAC se localiza cubriendo los riñones, las glándulas suprarrenales, el área interescapular y pequeñas cantidades rodean a los vasos sanguíneos del mediastino y el cuello. La cantidad de TAC alcanza su punto máximo en el momento del nacimiento y disminuye paulatinamente durante las semanas posteriores en mamíferos que no hibernan. La extirpación quirúrgica de este tejido provoca hipotermia neonatal.

A través de los receptores α -adrenérgicos se estimula la termogénesis, la hormona tiroidea es la responsable de que esta respuesta sea la óptima (Dattani y Gevers, 2016). El TAC presenta gran cantidad de mitocondrias, las cuales expresan la proteína desacoplante 1 (UCP1), localizada en la membrana mitocondrial interna y actúa para desacoplar la fosforilación oxidativa de la producción de ATP, liberando energía en forma de calor (Townsend y Tseng, 2012; Dattani y Gevers, 2016). Berg, *et al.*, (2006) informaron que la deficiente termorregulación de los cerdos neonatos se debe a la deficiencia de la UCP1. Los ratones que carecen de UCP1 desarrollan obesidad en condiciones termoneutrales (Barclay *et al.*, 2015). El aumento de la captación de ácidos grasos, la lipólisis y la esterificación se producen simultáneamente en el TAC. La síntesis de TG disminuye durante el ayuno y aumenta considerablemente en forma dependiente de la insulina y la norepinefrina al realimentarse. Probablemente el aumento de la síntesis de TG sea requerido por

los adipocitos cafés activos para adaptarse al influjo de combustible, que a su vez es necesario para la termogénesis. La síntesis concomitante de TG y la degradación de los ácidos grasos probablemente constituye un proceso útil que, en sí mismo, es termogénico (Bernlohr y Simpson, 1996).

Recientemente existe la evidencia que TAC es de importancia crítica para el equilibrio energético, por ejemplo, el aumento de TAC en ratones podría promover el gasto de energía, reducir la adiposidad y proteger a los ratones de la obesidad inducida por la dieta, la extirpación de TAC en ratones aumentó la obesidad en respuesta a las dietas ricas en grasas, por lo tanto, TAC representa un objetivo para la regulación energética. Anteriormente se había considerado que TAC era importante sólo en pequeños mamíferos y neonatos, sin embargo, estudios recientes han revelado la presencia de TAC metabólicamente activas en adultos humanos, presentándose en la mayoría de ellos; entonces, TAC puede desempeñar un papel mucho más importante en el metabolismo humano de lo que se apreciaba anteriormente, por ejemplo, se ha observado que la masa magra se ha reducido significativamente después de 2 horas de enfriamiento diario durante 6 semanas, lo que activó al TAC, esta es una evidencia de que tiene función metabólica significativa en los humanos. La función de TAC en humanos ofrecería la posibilidad de aumentar el gasto energético y la protección contra la obesidad (Liu *et al.*, 2013).

2.2 Glucocorticoides

Los glucocorticoides (GCs) son hormonas esteroides producidas principalmente en la corteza adrenal, a partir del colesterol. Desempeñan un papel fundamental en la regulación del equilibrio energético, así como están también involucrados en procesos como el desarrollo, la cognición, tienen efectos antiinflamatorios, y en el metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas (Xu *et al.*, 2009; Ramamoorthy y Cidlowski, 2016; Busada y Cidlowski, 2017). Se sabe que los GCs están involucrados en enfermedades metabólicas como el síndrome metabólico y el síndrome de Cushing, en donde su exceso produce aumento de peso y obesidad, también se ha reportado que las concentraciones de cortisol circulante son mayores en las personas con hipertensión e intolerancia a la glucosa, siendo su mecanismo

aún incierto (Walker, 2006). Los GCs tienen una profunda influencia en la distribución y función del tejido adiposo, esto implicaría que la relación entre la grasa corporal y los GCs es más que permisiva (London y Castonguay, 2009), pues ellos aumentan la grasa corporal por varios mecanismos, como estimular el reclutamiento de pre adipocitos para madurar adipocitos blancos (AB), interactuando con otras hormonas como la insulina para activar un programa de diferenciación en ellos. También actúan a nivel del sistema nervioso central reduciendo la señalización de leptina y así estimular el apetito (Barclay *et al.*, 2015). Diversos autores concluyeron que los GCs ejercen efectos antiproliferativos en los preadipocitos, pero a su vez se requieren para la diferenciación completa de los adipocitos, en contraste estimula la proliferación de preadipocitos cafés. Barclay *et al.*, (2015) observaron que la dexametasona estimula la diferenciación de preadipocitos cafés humanos, ejerciendo un efecto uniforme sobre la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de diversos genes marcadores: UCP1, CIDEA y PPARgC1A con la dosis máxima (10 μ M), así mismo el aumento se presentó en los niveles de proteína de UCP1. Sin embargo, la dexametasona en AB no estimuló a expresión UCP1 o PPARgC1A, pero aumentó ligeramente la expresión de CIDEA. Por lo tanto, los efectos de la dexametasona en estos genes indican un efecto común en la diferenciación de los precursores de adipocitos blancos y cafés.

2.2.1 Síntesis de glucocorticoides

Se sabe que la síntesis sistémica *de novo* de GCs está localmente restringida a la corteza suprarrenal. Se parte del colesterol, el cual se transporta a la membrana mitocondrial interna por la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR) donde la enzima citocromo P450 familia 11, subfamilia A, miembro 1 (CYP11A1) cataliza la conversión de colesterol a pregnenolona, el primer precursor de todos los esteroides. Después de la deshidroxilación por 3 β -dehidrogenasa hidroxisteroidea (3 β -HSD) como producto se obtiene progesterona y pregnenolona, que son catalizados por la 17 α -hidroxilasa (CYP17) para obtener 17 α -OH-Pregnenolona o 17 α -OH-Progesterona, los pasos adicionales implican la hidroxilación por 21-hidroxilasa (CYP21) para la obtención de 11-deoxicortisol y la enzima 11 β -

hidroxilasa (CYP11B1) es la encargada de catalizarlo en la síntesis de cortisol *novo* (figura 4). En contraste, la activación y desactivación de los metabolitos de GCs circulantes se producen a través de las enzimas 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 1 (11 β -HSD1) y 2 (11 β -HSD2), respectivamente (Taves *et al.*, 2011; San Phan *et al.*, 2019).

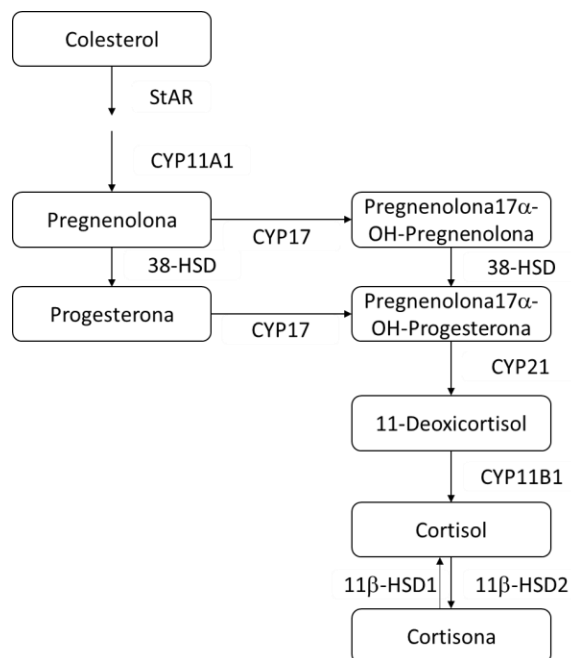


Figura 4. Síntesis de glucocorticoides. Modificado de Taves *et al.*, (2011).

2.2.2 Regulación de glucocorticoides

La regulación de la producción GCs involucra al ciclo circadiano y al sistema neuroendócrino central (figura 5), mediante el eje hipotálamo-pituitaria-suprarrenal (HPA), relacionándose con las reacciones ante el estrés, ya sea inflamatorio, psicológico o físico; comienza con la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) por el núcleo paraventricular a los vasos portales hipofisarios, llegando a la glándula pituitaria anterior, uniéndose a los receptores CRH-R1 acoplado a proteína G, estimulando la producción y liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) a la circulación sanguínea hasta su unión al receptor de melanocortina 2 (MC2R) en la zona fascicular de la corteza suprarrenal, donde promueve la síntesis de GCs, como el cortisol (humanos) y la corticosterona

(roedores), el eje HPA está controlado por un sistema de circuito cerrado de retroalimentación negativa (San Phan *et al.*, 2019; Hewagalamulage *et al.*, 2015).

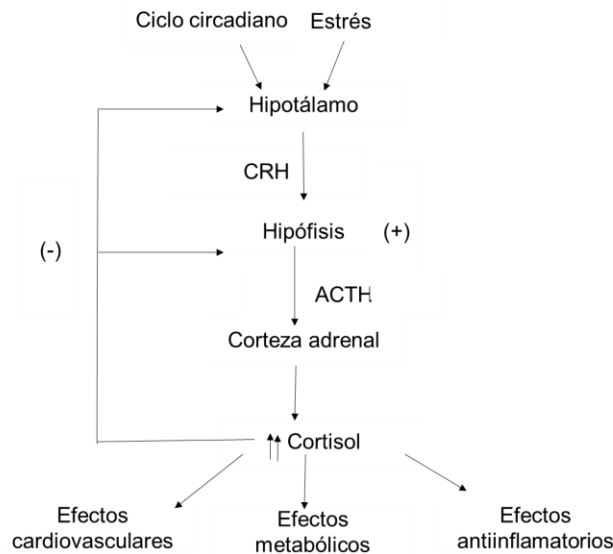


Figura 5. Regulación central de glucocorticoides. Modificado de Pujols (2015).

2.2.3 Receptores de glucocorticoides

Los GCs, por su naturaleza lipídica tienen la capacidad de atravesar la membrana celular y una vez activado por la 11β -HSD1 se unen a los receptores de glucocorticoides (RGC) expresados en el citoplasma (Rodríguez-González y Espinosa, 2016), los cuales son regulados por una proteína de choque térmico, trasladándose al núcleo donde funcionan como regulador transcripcional específico para ADN, también reconoce otros reguladores transcripcionales, esto le permite tener control sobre otros genes. Estos RGC son importantes en la supervivencia del individuo, pues los animales knock out no son viables (Luna-Moreno, 2012).

En el mecanismo genómico, el RGC sufre un cambio conformacional, se activa y traslada al núcleo donde induce o reprime la transcripción de muchos genes directamente sobre sus elementos de respuesta en el ADN. Es importante recalcar que este mecanismo tarda de horas a días en presentarse (Rodríguez-González y Espinosa, 2016). En general, la naturaleza y magnitud de la respuesta de una célula

a los glucocorticoides dependen de los niveles hormonales a los que está expuesta, así como de la concentración del receptor en una célula, además de la eficiencia de la transducción de señales mediada por RGC y la accesibilidad genómica de responder a los GC. Los elementos de respuesta a GCs (ERG) son secuencias específicas que son reconocidos e interactúan con los GCs, esta interacción receptor-ADN se estabiliza aún más mediante el reclutamiento de coactivadores que a su vez inician el ensamblaje de la maquinaria de transcripción general. Alternativamente, el RGC unido a ligando puede situarse en un número de ERG negativos mal definidos (nERG) en la región promotora de los genes diana para suprimir la transcripción (Zhou y Cidlowski, 2005).

Los mecanismos no genómicos son inmediatos (segundos a minutos), resultado de interacciones físico-químicas. Se deben a la activación de cascadas de señalización intracelular mediadas por quinasas con efecto antiinflamatorio (Rodríguez-González y Espinosa, 2016).

2.3 Acuaporinas

El transporte de agua transcelular puede ocurrir por varios mecanismos, pero en la última década se ha prestado especial atención al papel de las acuaporinas (AQPs), pues permiten un movimiento bidireccional rápido y sustancial (Laforenza, *et al.*, 2009). Las AQPs son proteínas ubicadas en la membrana celular que colaboran con el movimiento del agua a través de canales (Rodríguez *et al.*, 2006). Pertenecen a la superfamilia de proteínas mayores intrínsecas de canales transmembranales, que están presentes en todos los niveles de la vida, desde las bacterias hasta los mamíferos. Están descritas 13 diferentes acuaporinas (AQP0-AQP12), distribuidas en diversos tejidos del organismo de los mamíferos. La disfuncionalidad de las AQPs se asocia con muchas enfermedades.

La familia de las AQPs puede dividirse en dos subgrupos según sus características de permeabilidad: acuaporinas (canales solamente de agua) y acuagliceroporinas (canales permeables a agua y glicerol); la acuaporina 7 (AQP7), junto con AQP3,

AQP9 y AQP10 pertenecen a esta subfamilia (Agre y Kozono, 2003; MacDougald y Burant, 2005; Rodríguez *et al.*, 2006).

Estas proteínas son tetrámeros formadas por cuatro monómeros, son seis α -hélices (figura 6) inclinadas que entran en la membrana desde las superficies opuestas formando un canal con un poro central (Agre y Kozono, 2003; Rodríguez *et al.*, 2006). El polipéptido en la estructura está formado por una cadena de aproximadamente 270 aminoácidos, dos motivos de secuencia altamente conservados de asparagina-prolina-alanina (NPA) se encuentra en lados opuestos del monómero, este par de tripletes de aminoácidos se emparejan entre sí y forman el canal de agua. Un residuo de cisteína se puede encontrar en la mayoría de AQPs, ubicándose cerca del canal en orientación extracelular, actúa como un bloqueador de AQPs por su sensibilidad al mercurio. El poro central tiene un diámetro aproximado de 2.8 Å en el punto más estrecho, existen interacciones electrostáticas que median la translocación de agua en un solo lado bloqueando el transporte de protones. Éste proceso depende de los gradientes osmóticos sin gasto de ATP. En el caso de las acuagliceroporinas contienen dos intervalos de péptidos adicionales y modulan el tamaño del poro con un diámetro de 3.4 Å en el punto más estrecho para transportar glicerol. Varios estudios indican que el poro central es permeable a gases como O₂, CO₂ u óxido nítrico (NO) en AQP1, AQP4 y AQP5, sin embargo, el mecanismo molecular del transporte de gas a través del poro central sigue sin estar claro (Wang *et al.*, 2015).

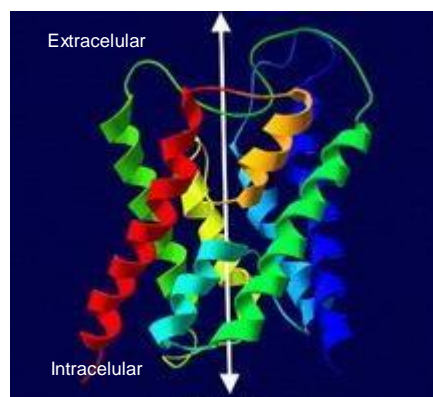


Figura 6. Estructura de Acuaporina. Modificado de Agre y Kozono (2003).

2.3.1 Acuagliceroporina 7

Es una proteína de 269 aminoácidos, se expresa en el corazón, riñón, músculo esquelético, intestino delgado y TA (Laforenza *et al.*, 2012). La AQP7 es uno de los principales canales para la liberación de glicerol de los adipocitos, un proceso que contribuye a la regulación de la acumulación de grasa (Rodríguez *et al.*, 2006). Su expresión en el TA incrementa en hipoglucemia y disminuye en hiperglucemia (Kishida *et al.*, 2001. MacDougald y Burant, 2005). La AQP7 es regulada por diversos compuestos químicos tales como glucocorticoides, factor de necrosis tumoral alfa, agonistas del adrenoreceptor e isoproterenol, conocidos como inductores de resistencia a la insulina. La exposición a la epinefrina estimula a AQP7 para que se traslade del citoplasma a la membrana plasmática en adipocitos 3T3-L1 de acuerdo a los resultados de Shen *et al.*, (2012).

2.4 Glicerol cinasa

La enzima Gk induce cambios conformacionales y actividad del glicerol, siendo una enzima clave para su conversión de glicerol a glicerol 3 fosfato (G3P) (Rodríguez *et al.*, 2006), para ingresar a la síntesis de triglicéridos o fosfolípidos, esta activación de la enzima dependiente de AMPc (Engelking, 2015), produciendo una acumulación progresiva de triglicéridos, resultando en una hipertrofia progresiva de adipocitos (Frühbeck, 2005; Rodríguez *et al.*, 2006). En los mamíferos los niveles normales de glicerol libre en plasma oscilan entre 0.04 y 0.4mM, los niveles son mayores en caso de que exista deficiencia de Gk. Los niveles de glicerol presente en la circulación son un reflejo del estado de movilización de la grasa. Se libera posterior a la degradación de triglicéridos y se fosforila de nuevo a G3P por la Gk, principalmente en el hígado y adipocitos. Su actividad en los mamíferos se puede regular dependiendo del estado fisiológico del animal. Diversos experimentos han demostrado que las dietas altas en grasa aumentan la actividad de Gk en adipocitos de ratas obesas, se cree que se debe al aumento de glicerol en plasma después del tratamiento con esa dieta, entonces esto nos indica que la actividad de Gk se puede regular dependiendo de las necesidades fisiológicas del animal (Ditlecadet *et al.*,

2011). En algunos experimentos los resultados indican que la actividad enzimática de Gk es inducida por el propio glicerol, sin embargo, el papel de Gk en tejido adiposo aún no se ha aclarado, porque el nivel expresado de Gk en TAB es menor que en otros tejidos. Se ha mostrado que las tiazolinedionas aumentan los niveles de ARNm de Gk en adipocitos, resultando en acumulación de triglicéridos. Se ha observado que en adipocitos AQP7-KO la acumulación de glicerol aumenta la actividad enzimática de Gk, dando como resultado aumento de la absorción de ácidos grasos y acumulación de triglicéridos, sin embargo, se necesitan más estudios para investigar el papel de Gk en los adipocitos, también se ha demostrado que la deficiencia de AQP7 aumenta la actividad enzimática de Gk a través del aumento de glicerol intracelular *in vivo* e *in vitro*, provocando obesidad y resistencia a la insulina (Hibuse *et al.*, 2005)

2.5 11 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa

La 11 β -HSD es una enzima intracelular la cual modula la acción glucocorticoide a nivel del pre-receptor controlando las concentraciones de glucocorticoides intracelulares a través de sus actividades de deshidrogenasa y reductasa. Cuando la 11 β -HSD es de tipo 2, 11 β -HSD2 actúa como deshidrogenasa inactivando el cortisol/corticosterona (humano/rata), como resultado el cortisol se convierte en su forma inerte de 11-ceto (cortisona/11 deshidrocorticosterona), cuando 11 β -HSD actúa como reductasa el metabolito inactivo se convierte en glucocorticoide activo (figura 7). La actividad reductora de 11 β -HSD1 es dependiente del cofactor NADPH (London y Castonguay, 2009; Fernández *et al.*, 2011). La 11 β -HSD1 es altamente expresada en el tejido adiposo, hepático, hipofisiario y cerebral. Estudios han demostrado que esta enzima es un regulador en la modulación del metabolismo y función del TAB, su inhibición podría evitar la diferenciación del adipocito blanco, reducir la acumulación adiposa, Los ratones KO tienen niveles elevados de corticosterona y ACTH en plasma en el periodo diurno, así como un pico de corticosterona prolongado, se ha reportado trastornos similares en la ritmicidad de los glucocorticoides en humanos y roedores obesos. Los ratones KO tienen niveles

más bajos de triglicéridos en plasma, aumento en la expresión hepática de las enzimas que catabolizan la grasa, carnitina, acil-CoA oxidasa y proteína de desacoplamiento 2, aumento del colesterol y niveles elevados de ARNm en el hígado y niveles séricos de apolipoproteína A-I. Estos resultados implican que la 11 β -HSD1 es importante en la homeostasis energética (London y Castonguay, 2009). Por otro lado, los ratones que sobre expresan 11 β -HSD1 desarrollan obesidad troncal y muestran tolerancia a la glucosa, hiperfagia, lipidosis y aumento en las concentraciones de leptina sérica, también está asociada con varios tipos de obesidad en humanos y en ratones. En el caso de TAC al inhibir esta enzima se podría atenuar la inflamación en este tejido en ratones obesos inducidos por la dieta. Liu *et al.*, (2013) demostraron que la pérdida de función de 11 β -HSD1 en adipocitos cafés (AC) aumentan la expresión de genes funcionales, mientras que la ganancia de función de 11 β -HSD1 puede ejercer un efecto negativo en la expresión de dichos genes, y por lo tanto ejercer un efecto negativo en la función del TAC. Por lo tanto 11 β -HSD1 puede promover el gasto de energía mediado por adipocitos cafés y reducir potencialmente los riesgos para la salud impuestos por la obesidad.

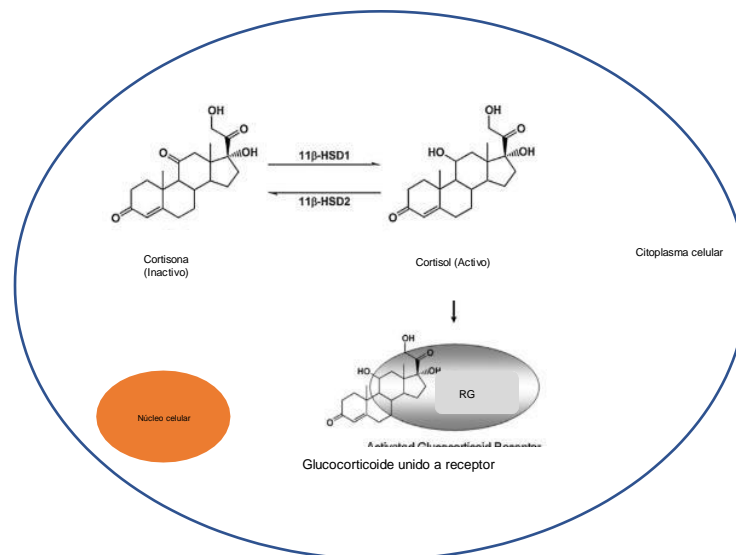


Figura 7. Representación de la activación de 11 β -HSD1 en la célula. Modificado de Staab y Maser (2010).

3. Justificación

Los glucocorticoides son compuestos secretados fisiológicamente en el organismo y en situaciones de estrés, esta secreción estimula la transcripción de genes involucrados en la lipogénesis y la lipólisis, por ello, conocer su efecto al corto y mediano plazo sobre la diferenciación y funcionalidad de los adipocitos, tanto blancos como cafés, ayudará a entender la fisiopatología de las enfermedades metabólicas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Conocer el efecto de la cortisona, a corto y mediano plazo, sobre la expresión del ARNm de *AQP7*, *Gk* y *11 β -HSD1* en el tejido adiposo blanco y café murino.

4.2 Objetivos específicos

1. Medir el efecto de la adición de diferentes concentraciones de cortisona (0, 0.1, 1 y 10 μ M) y en diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 20 minutos y 48 horas) sobre la expresión del ARNm de *AQP7*, *Gk* y *11 β -HSD1* en adipocitos blancos y cafés, provenientes de ratones CD1.

2. Evaluar los cambios en la concentración de glicerol en el medio de cultivo primario de adipocitos blancos y adipocitos cafés al ser expuestos a diferentes concentraciones de cortisona (0, 0.1, 1 y 10 μ M) y en diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 20 minutos y 48 horas).

5. Metodología

5.1 Aislamiento de células de tejido adiposo café y blanco

Se utilizaron 20 ratones CD-1 (*Mus musculus*) de 0 días de edad (RRN) y 20 ratones de 21 días de edad (RVD), los cuales fueron obtenidos del bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

Los RRN fueron sacrificados por el método de decapitación y desangrado, se extrajeron los precursores del tejido adiposo café de la región interescapular. Los RVD se sacrificaron por dislocación de la articulación cervico-occipital, extrayendo los precursores de tejido adiposo blanco de la región glútea.

Se procedió al lavado de TAC y TAB, colocándose en una solución PBS 1x (10 ml) con 2% penicilina-estreptomina, 0.2% anfotericina; posterior a ello el TAB se disgregó mecánicamente.

Para la obtención de los preadipocitos, el tejido se colocó en una solución HBSS (10 ml) con enzima colagenasa tipo II (0.010 g) disuelta y filtrada, se incubó 2 horas a 37° C en agitación lenta (1000 rpm) y se filtró con gasa; posteriormente se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante, a éste se agregaron 10 ml de medio basal (DMEM, 3% penicilina-estreptomina y 0.3% Anfotericina), se sembró la pastilla celular en cajas de cultivo de 10 cm con la técnica en zig zag; se observaron al microscopio para monitorear la presencia de células y se incubaron a 37° C, en una atmósfera de 95% de O₂ y 5% de CO₂.

Para favorecer el crecimiento celular, cada 48 horas se renovaba el medio de cultivo, hasta que la confluencia de las células fue mayor a 75%.

5.2 Tripsinizado de células

Se observaron las células al microscopio para comprobar confluencia, se atemperó a 37° C en baño maría el medio de cultivo, PBS y tripsina.

De la caja de cultivo se retiró el medio con ayuda de una pipeta pasteur y vacío, se adicionó PBS (10 ml) y se retiró transcurridos 2 minutos, repitiendo 3 veces el lavado, se sustituyó el PBS por 1 ml de tripsina colocada por la pared de la caja y ésta se incubó durante 5 minutos, posteriormente se verificó visualmente con microscopio el desprendimiento de las células.

Se colocaron 5 ml de medio en la caja y se tomó el medio haciendo tres lavados, después se transfirió en un tubo de fondo cónico, lentamente por las paredes, del tubo se tomó una muestra y se coloca en la cámara de Neubauer. Se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos. Para conocer la cantidad de células por ml de medio que se obtuvo se realizó un conteo de 10 cuadrantes de la cámara, donde:
(Número de células / cuadrantes contados) (factor de dilución) (Volumen total de medio)= # x 10⁴ células.

Del tubo de fondo cónico se retiró el medio sin desprender el botón que se forma en el fondo, luego se volvieron a suspender en medio y se sembraron cuatro pozos (n=4) de 3 cm de diámetro por cada tratamiento, las cajas de sembrado se identifican con: tipo celular, fecha, número de pasaje, nombre y se sembró lentamente por una pared, al término del sembrado (20,000 células por pozo) se colocaron en la incubadora a 37° C, 95% O₂, 5% CO₂.

5.3 Diferenciación de células

Transcurridos un promedio de 5 días, la confluencia celular fue del 70%, se prosiguió a cambiar el medio basal y se le agregó el medio de diferenciación.

Consistió en:

DMEM, SFB 10%, Insulina 5 microgramos/ml, transferrina 10 µg/ml, T3 2 ng/ml, rosiqlitazona 1 µM/L, penicilina/estreptomina 1% y anfotericina 0.1%. Renovando el medio cada 48 horas durante 5 días (Quesada *et al.*, 2016).

5.4 Tratamientos con cortisona

Una vez diferenciados las células a adipocitos, se procedió a retirar el medio de diferenciación y se agregó el medio de ayuno (DMEM, anfotericina 0.2% y penicilina/estreptomicina 2%) durante 2 horas.

Después de 2 horas se recolectó el medio de cultivo de pozos con medio de ayuno y sin tratamiento 5 minutos antes de iniciar el experimental, luego se retiró el medio de ayuno y se coloca el medio de cultivo con diferentes concentraciones de cortisona. Las concentraciones que se administraron fueron: 0, 0.1, 1 y 10 μM . Los tiempos en los que se expusieron al medio fueron de 0, 5, 10, 15, 20 minutos y 48 horas.

Al final de cada experimento se recolectaron y congelaron muestras de medio de cultivo de cada pozo para la posterior medición de glicerol, también se procedió a la extracción de ARN total, adicionándose 600 μl de TRizol, se raspó el fondo del pozo y se colocó todo el contenido de éste en un tubo eppendorf. Se conservaron a -20°C para su posterior lectura.

5.5 Extracción de ARN total con TRizol

Las muestras obtenidas se descongelaron a 4°C y se añadieron 120 μl de cloroformo, agitándose durante 15 segundos y se incubaron durante 2 minutos a 4°C luego se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, a éste se añadieron 300 μl de alcohol isopropílico y se invirtió el tubo para mezclarlo, se sometieron a incubación de 10 minutos a 4°C y luego se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos, después se realizaron dos lavados de 600 μl de etanol al 75% durante 5 minutos a 7,500 rpm y se secaron hasta que el olor a alcohol hubiese desaparecido, luego se añadió 30 μl agua libre de ARNasa, y se colocó en el Thermomixer compact (eppendorf) 10 minutos a 55°C a 650 rpm. Se dejó enfriar y se leyeron en el Nanodrop 1000 (Thermo scientific) para cuantificar la concentración de ARN presente.

5.5.1 Visualización de ARN

Para conocer la integridad del ARN obtenido de las muestras se corrió un gel de agarosa al 10% desnaturalizante (figura 8): se pesaron 0.3 g de agarosa y se adicionaron 30 ml de buffer TBE 1x, la mezcla se calentó 30 s y se agregó 300 μ l de cloruro guanidina 1M, luego se colocó en los soportes y peines y se dejó enfriar. Se cargó cada pozo con la siguiente mezcla: 7 μ l de agua, 2 μ l de buffer carga 5x y 1 μ l de ARN, se corrió 30 minutos a 90 V, posteriormente se incubó durante 15 minutos en agitación lenta sumergido en bromuro de etidio y luego se observó en la computadora con ayuda del programa VisualizadorGel. La imagen obtenida fue de dos bandas, referentes a las fracciones ribosomales del ARN, las muestras que presentaron las dos bandas, se sometieron a cuantificación de ARN (ng/ μ l) con el equipo Nanodrop, para saber la concentración de ARN presente, siendo estas muestras las que fueron procesadas para la obtención de ADN complementario.

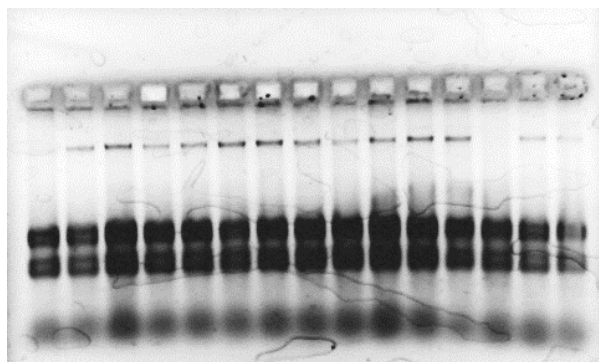


Figura 8. Muestras de ARN corridas en gel de agarosa.

5.6 Síntesis de ADN complementario

Para realizar la qPCR se requiere ARN total, en el que se debe aplicar un procedimiento de transcripción inversa (RT, por sus siglas en inglés) y así sintetizar ADN complementario (ADNc), por ello se descongelaron las muestras antes procesadas y con los datos obtenidos del Nanodrop se calculó la cantidad de agua, de la mezcla 1 y ARN necesario para dicha síntesis, se mezclaron los tres componentes y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y 5 minutos a

70°C; luego se agregó la mezcla 2, incubándose 60 minutos a 42° C y 15 minutos a 72° C, posteriormente se conserva a 4° C.

Componentes de la mezcla 1:

Buffer 5x 6 µl, DNAsa 0,75 µl

Componentes de la mezcla 2:

dNTP's, oligos dT, RNAsin y MMLV: 1 µl de cada una; Buffer 5x 2µl y agua 3µl

5.6.1 Visualización de ADNc

La visualización de ADNc nos ayuda a detectar las muestras aptas para ser sometidas a qPCR, para ello se cargan las muestras, agua y buffer de carga 5x en gel de agarosa al 1% con gel red (figura 9), durante 30 minutos a 90 V, posterior a ello se visualizó con el programa Visualizador Gel, el resultado obtenido fueron bandas continuas de cada muestra asegurando la integridad del ADNc, como se muestra.

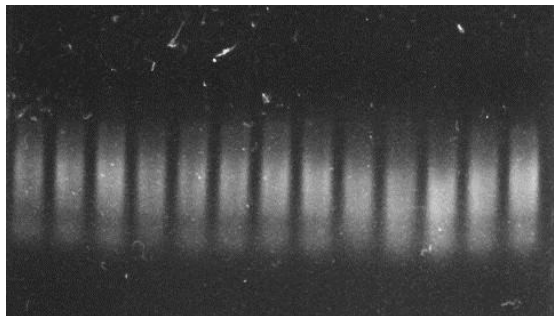


Figura 9. Muestras de ADNc corridas en gel de agarosa al 1%. Fotografía de gel de agarosa, en los carriles 1-13 se observan las bandas del corrimiento de las muestras de ADNc.

5.7 PCR en tiempo real.

La cuantificación de la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) es un método de biología molecular que se utiliza para copiar o amplificar secuencias específicas (oligonucleótidos) de ADN o ADNc por medio de ADN polimerasa estable al calor y ciclos térmicos. El producto de éste proceso se mide en cada ciclo, pudiendo así determinar la cantidad inicial de los genes a partir del ADN final y el número de

ciclos, pues la amplificación es exponencial. La medición se realiza a través de colorantes fluorescentes unidos al ADN que producen una señal creciente en proporción directa al número de moléculas generadas de la PCR.

Cada ciclo está compuesto por tres pasos:

1. Desnaturalización: se utiliza incubación de alta temperatura para obtener dos cadenas simples de ADN, la temperatura que se usa es generalmente 95°C ya que es la más alta que puede soportar a la ADN polimerasa.
2. Alineación: Es la etapa de hibridación entre el ADN muestra y los oligonucleótidos de interés, se utiliza la temperatura de fusión calculada (T_m) específica.
3. Extensión: El momento en que la ADN polimerasa realiza las copias de bases, la temperatura que se utiliza es de 70 a 72°C, siendo óptima para la enzima.

Se realizó con el equipo StepOne (Applied Biosystems), usando los siguientes oligonucleótidos.

Cuadro 1. Primers usados en qPCR

Gen	Secuencia de primer	Clave de acceso	Tamaño de fragmento (bp)
<i>HSD1B11</i>	Forward 5' TCAGACCAGAAATGCTCCAG Reverse 5' CCAGCAATGTAGTGAGCAG	NM_008288. 2	174
<i>AQP7</i>	Forward 5' TATGGTGCGAGAGTTTCTGG Reverse 5' GCCTAGTGCACAATTGGTGA	NM_007473. 4	200
<i>GK</i>	Forward 5' ATCCGCTGGCTAAGAGACAA Reverse 5' AGGCGCATATAACCCTGAAA	NM_008194. 3	126
<i>PPIA</i>	Forward 5' AGCACTGGGGAGAAAGGATT Reverse 5' AGCCACTCAGTCTTGGCAGT	NM_017101. 1	248
<i>TBP</i>	Forward 5' AACAGCCTTCCACCTTATGC Reverse 5' GCTGCTGTCTTTGTTGCTCT	NM_013684. 3	166
<i>MnSOD</i>	Forward 5' GGACCCATTGCAAGGAACAA Reverse 5' TAGTAAGCGTGCTCCCACAC	NM_013671. 3	69
<i>18 S</i>	Forward 5' GGAGCGATTTGTCTGGGTTA Reverse 5' GTAGGGTAGGCACACGCTGA	NR_036642.1	196

Con ayuda del programa computacional Norm Finder se determinó que la mejor combinación de genes para TAB era: PPIA y MnSOD y para TAC fue PPIA y TBP, se realizaron diluciones de los genes endógenos y de los RT de las muestras 1:5 y posteriormente se realizó la mezcla de reactivos para la qPCR.

El protocolo que se utilizó en el equipo fue el siguiente:

40 ciclos de: 10 segundos a 95°C; 10 segundos a 65°C, 10 segundos a 72°C; y 1 ciclo de 1 segundo a 95°C, 1 minuto a 60°C y 15 segundos a 95°C.

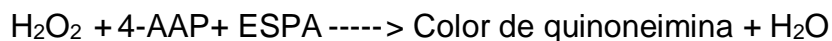
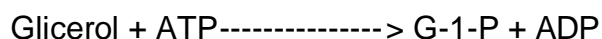
Cuando obtuvimos la cuantificación de los genes endógenos de cada una de las muestras se calculó la expresión relativa de los genes problema, la cual se estima al comparar los valores de Ct. Se utilizó el modelo doble delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), éste nos

indica que la reacción para los genes tiene eficiencia óptima e idéntica, esto nos ayuda a tener una estimación de la producción relativa de la expresión de dichos genes. Estos valores fueron los que usamos para realizar el análisis estadístico.

5.8 Cuantificación de glicerol

El Kit Free Glycerol Determination (Sigma-aldrich) mide la concentración de glicerol endógeno libre en el medio de cultivo mediante reacciones enzimáticas acopladas: El glicerol se fosforila formando glicerol-1-fosfato (G1-P), posteriormente se oxida, formando fosfato de dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno. La peroxidasa (POD) cataliza el acoplamiento de H₂O₂ con 4-aminoantipirina (4-AAP) y N-etil-N(3-sulfopropil)m-anisidina de sodio (ESPA) para producir un color de quinoneimina, leyéndose a un máximo de 540nm de absorbancia. El aumento a la absorbancia de 540nm es directamente proporcional a la concentración de glicerol en el medio.

Reacción enzimática del ensayo de glicerol



Se descongeló el medio de cultivo de cada tratamiento, se realizaron diluciones 1:5, de esa dilución se tomaron 10 µl y se agregaron 800µl del reactivo glicerol libre, 10µl del reactivo de glicerol estándar y para blanquear se utilizó el medio de cultivo sin tratamiento (DMEM), la reacción se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se leyó en el Varioskan Flash (Thermo scientific), a 540nm de longitud de onda. Se leyó la absorbancia y se realizaron los cálculos:

$$\text{Contenido de glicerol} = \frac{X_{\text{muestra}} - X_{\text{blanco}}}{X_{\text{estándar}} - X_{\text{blanco}}} * \text{Concentración del estándar}$$

5.9 Modelo experimental

Se utilizó un diseño experimental al azar con un arreglo de 4 x 6 donde los factores fueron: tratamiento (0, 0.1, 1 y 10 μM) y tiempo (0, 5, 10, 15, 20 minutos y 48 horas):

$$y = \mu + Tx_i + \text{Tiempo}_j + (Tx * \text{Tiempo})_{ij} + E_{ij}$$

Donde:

y= variable de respuesta

μ = es la media poblacional

Tx_i = es el efecto del i-ésimo tratamiento

Tiempo_j = es el efecto del j-ésimo tiempo

$Tx * \text{Tiempo}$ =es la interacción del i-ésimo tratamiento y el j-ésimo tiempo.

E_{ij} = es el error experimental

5.10 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con el programa SAS (2006), mediante el procedimiento de modelos lineales generales, la prueba que se usó fue la de comparación de medias por diferencias mínimo cuadráticas (lsmeans).

6. Resultados

En la figura 10 se observa aumento de la expresión relativa de *AQP7* ($P < 0.05$) desde los 10 minutos con concentración de $10 \mu\text{M}$ de cortisona de 1.5 veces más en comparación con la concentración basal (-5 min), misma expresión se observa a los 15 y 20 minutos en concentraciones de 0.1, 1 y $10 \mu\text{M}$ respectivamente, posteriormente disminuye la expresión de *AQP7* a las 48 horas siendo la concentración de $10 \mu\text{M}$ la que presenta una disminución de 0.7 veces con respecto al control. Las barras de error representan la media \pm el error estándar, $P < 0.05$ ($n = 4$)

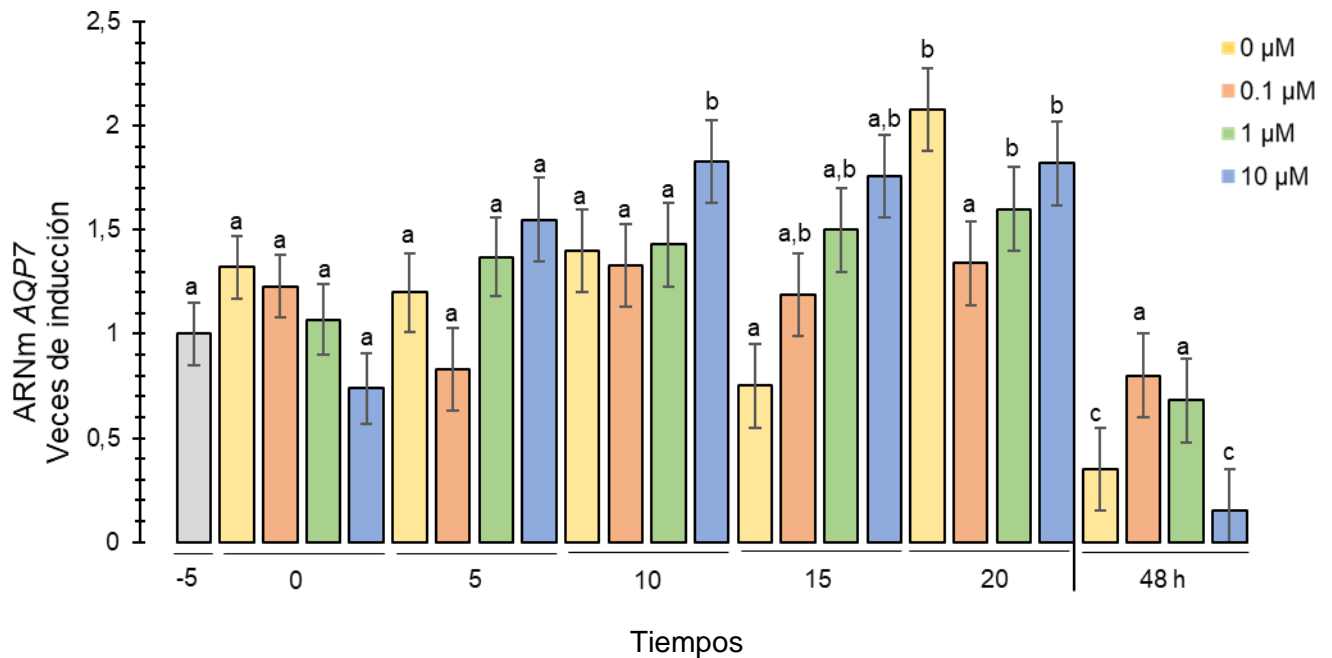


Figura 10. Efecto de la cortisona sobre la expresión de ARNm de *AQP7* en AB de ratón.

En la figura 11 se observa aumento en la expresión relativa de AQP7 desde los 10 minutos con concentraciones de 0.1 y 1 μM de cortisona, siendo este aumento el doble comparado con el control (-5 min), en los tiempos 15 y 20 la tendencia es la misma sólo en la concentración de 10 μM . Al igual que AB, la expresión de AQP7 disminuye a las 48 horas, siendo más evidente con concentraciones de cortisona de 0.1 y 1 μM . Las barras de error representan la media \pm el error estándar, $P < 0.05$ ($n = 4$).

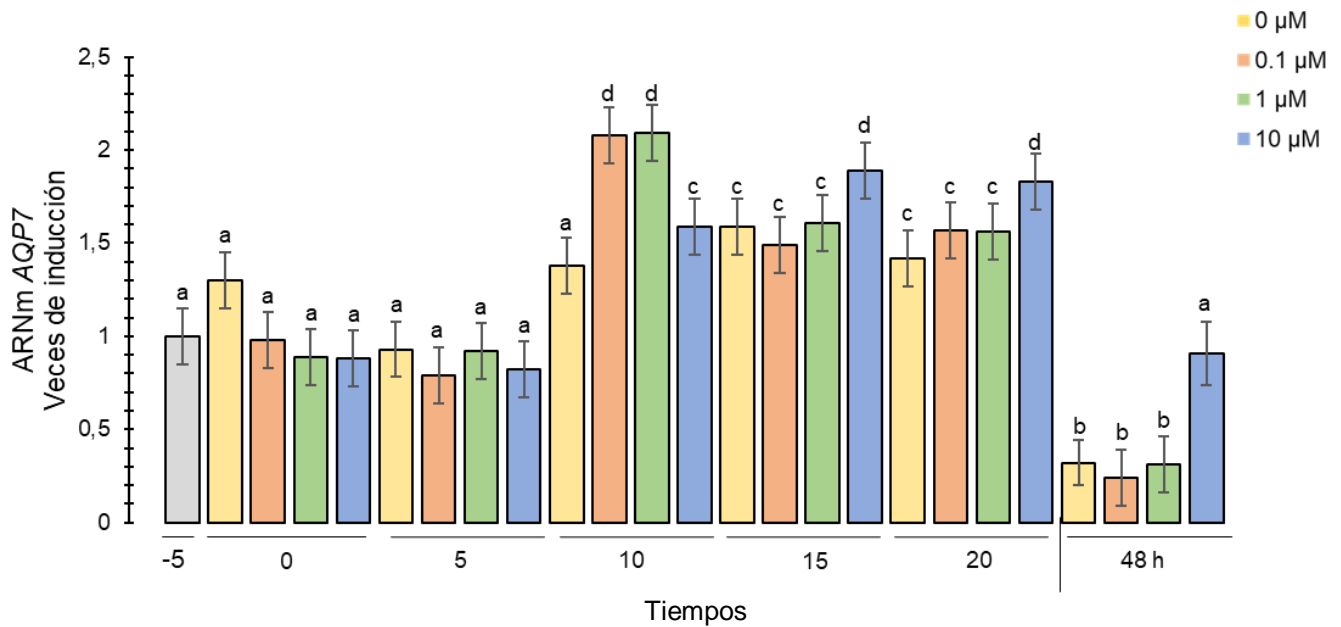


Figura 11. Efecto de la cortisona sobre la expresión de ARNm de AQP7 en AC de ratón.

La figura 12 muestra la concentración de glicerol en el medio de cultivo de AB, en varios tratamientos esta concentración es indetectable, sin embargo, para 0, 5 10 y 15 minutos se ve aumento en la concentración, a las 48 horas se observa aumento en todos los tratamientos, siendo la concentración de 1 μ M la de mayor aumento. Las barras de error representan la media \pm error estándar, $P < 0.05$ (n= 4). Donde * = No detectable

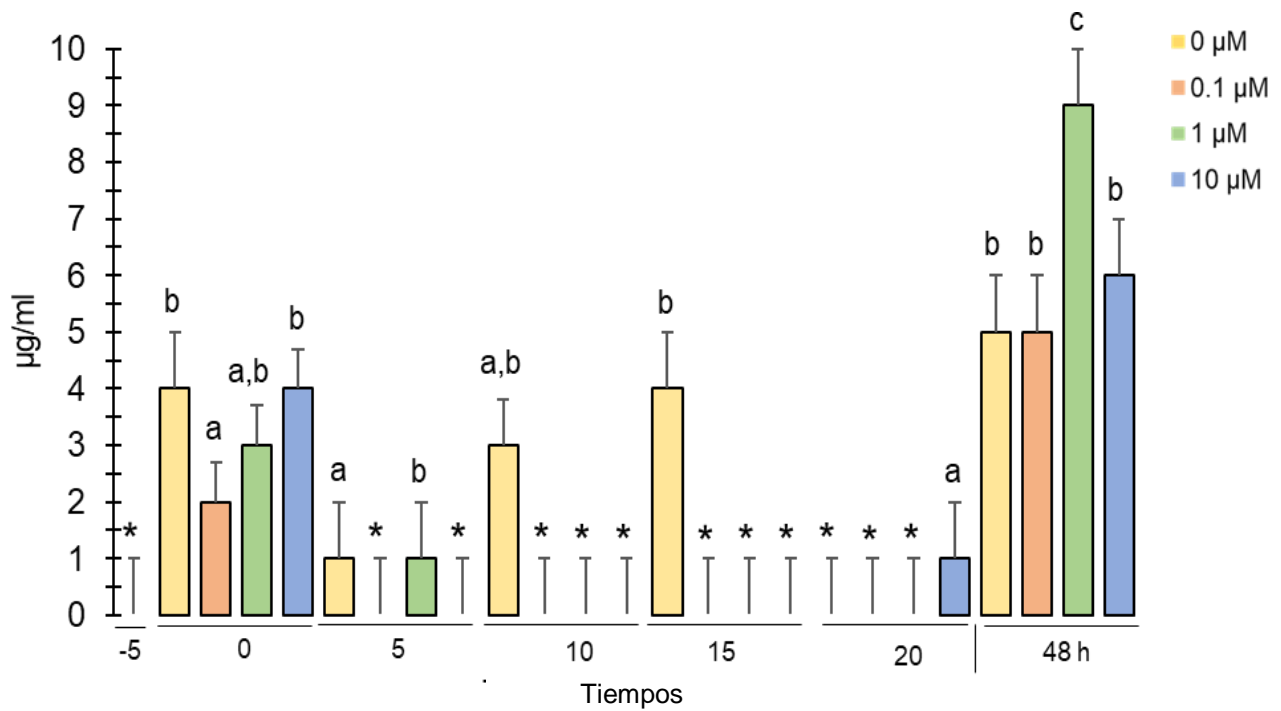


Figura 12. Efecto de la cortisona en la concentración del glicerol en el medio de AB de ratón.

En la figura 13 se observa la concentración de glicerol en el medio de cultivo de adipocitos cafés muestra en algunos tratamientos indetectable (*), sin embargo, se observa un aumento a los 10 minutos con la concentración de 0.1 μM y hasta las 48 horas con concentraciones de 0.1, 1 y 10 μM . Las barras muestran la cuantificación de -5 min a 48 h para tratamientos con 0, 0.1, 1 y 10 μM de cortisona. Las barras de error representan la media \pm el error estándar, $P < 0.05$ ($n = 4$). Donde * = No detectable.

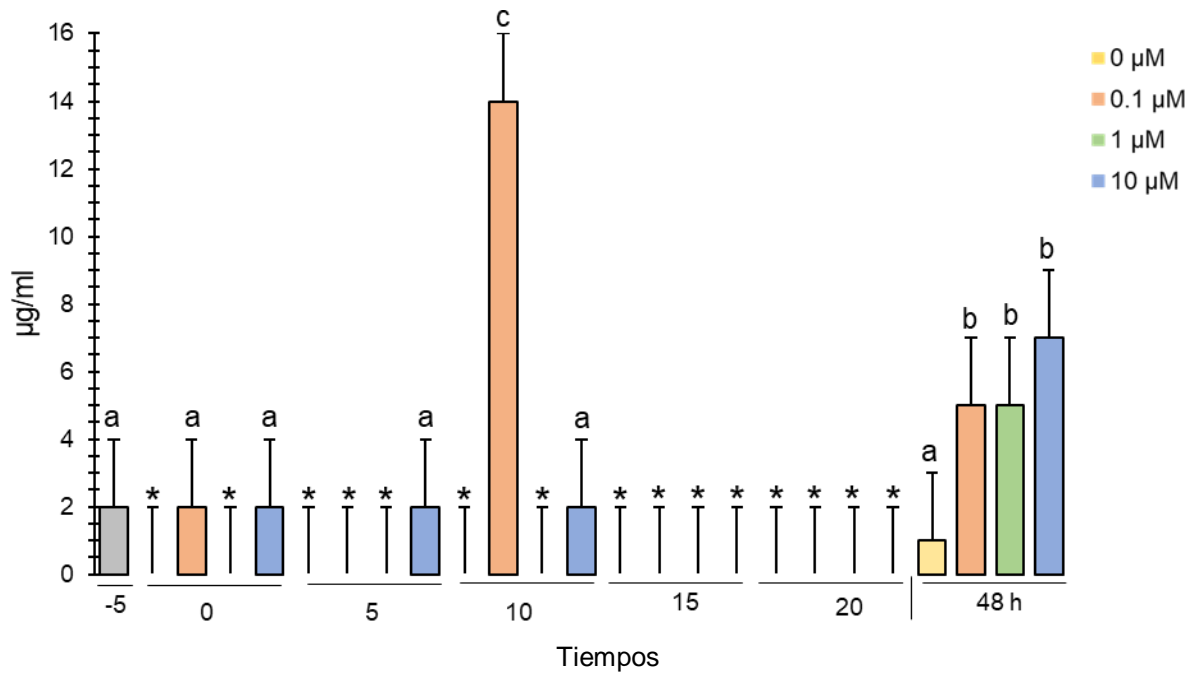


Figura 13. Efecto de la cortisona en la concentración del glicerol en el medio de AC de ratón.

La expresión relativa de *Gk* en AB se observa con un aumento ligero y constante en los tratamientos, siendo más evidente desde los 10 hasta los 20 minutos con concentraciones de 10 μ M (figura 14). A las 48 horas se observa disminución (P=0.05) en la expresión con todos los tratamientos de cortisona. Las barras muestran la expresión relativa de ARNm desde -5 min hasta 48 h, como se indica en la figura, para tratamientos con 0, 0,1, 1 y 10 μ M de cortisona. Todas las barras de error representan la media \pm el error estándar, P <0.05 (n = 4).

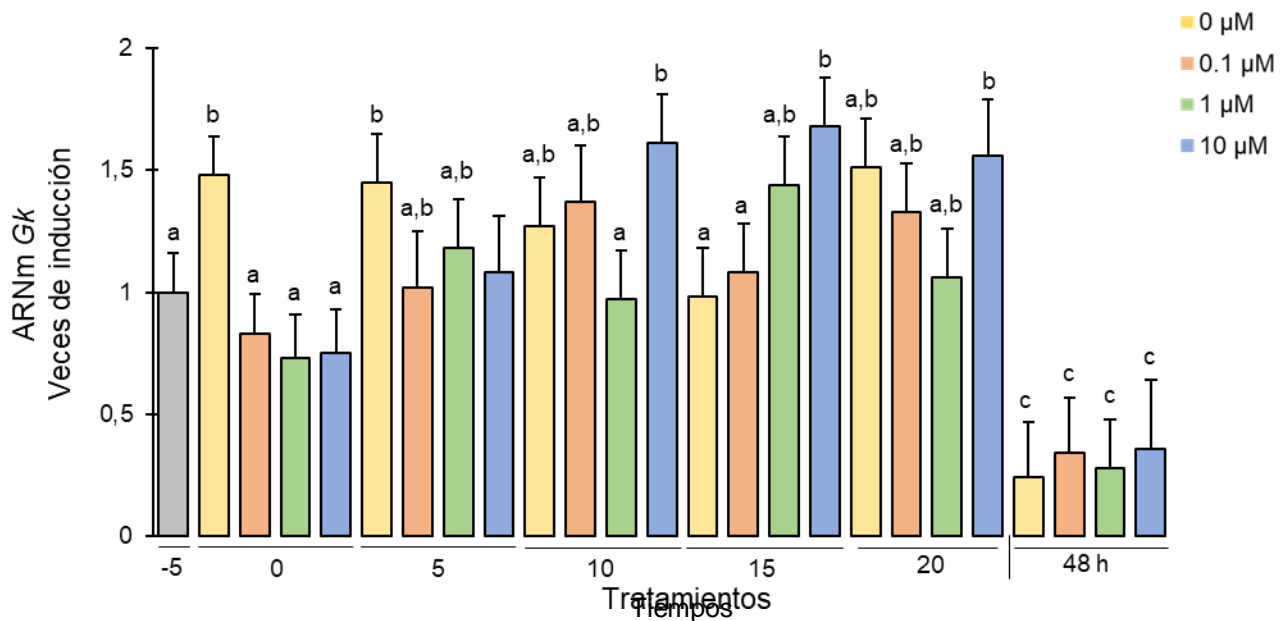


Figura 14. Efecto de la cortisona sobre la expresión de ARNm de *GK* en AB de ratón.

La expresión relativa de Gk en AC (figura 15) muestra un único aumento en el tiempo 0 con la concentración de 0 μ M de cortisona, en los demás tratamientos no se observa aumento, los tratamientos a las 48 horas muestran disminución de más de la mitad que la basal (-5 min), comportándose de la misma manera que AB. Las barras muestran la expresión relativa de ARNm desde -5 min hasta 48 h, como se indica en la figura, para tratamientos con 0, 0,1, 1 y 10 μ M de cortisona. Todas las barras de error representan la media \pm el error estándar, P <0.05 (n = 4).

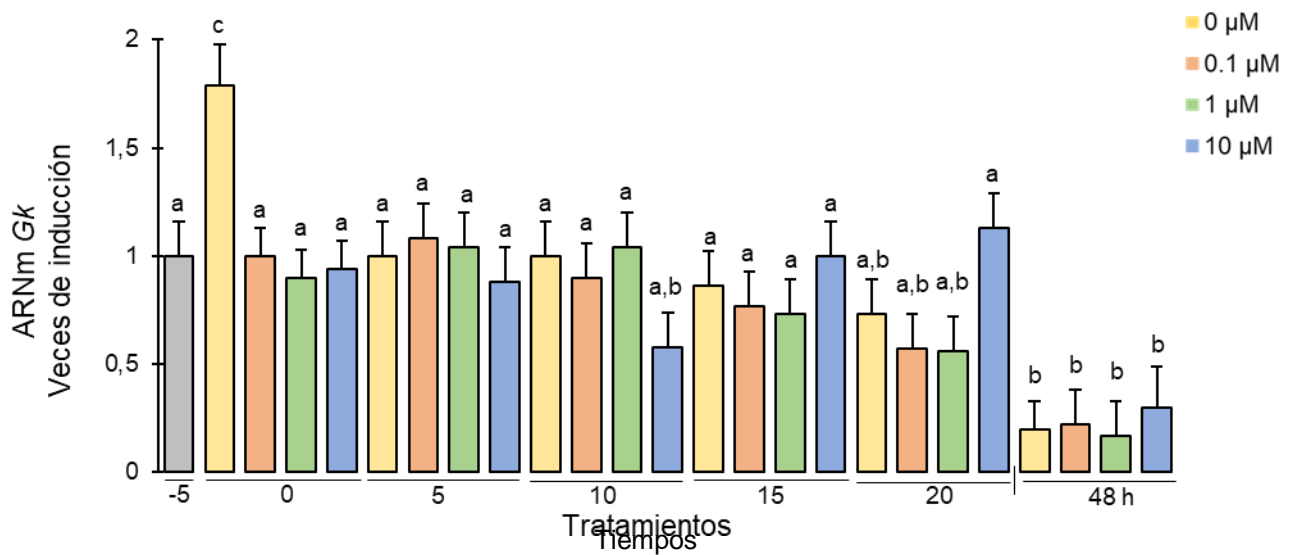


Figura 15. Efecto de la cortisona sobre la expresión de ARNm de GK en AC de ratón.

La figura 16 presenta la concentración basal de AQP7 en AB y AC, se observa que los adipocitos cafés tienen mayor expresión basal de éste gen (más del doble) que los adipocitos blancos. Las barras de error representan la media \pm el error estándar, $P < 0.05$ ($n = 4$).

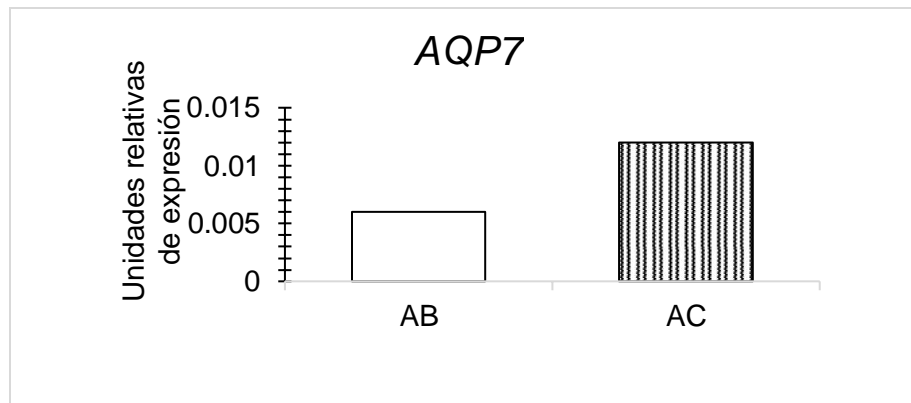


Figura 16. Relación entre la expresión de ARNm de AQP7 en AB y AC, Δ Ct ARNm a -5 min.

La figura 17 nos muestra la expresión relativa de AQP7 de AC comparada con AB en todos los tratamientos con cortisona, podemos observar que tienen la misma tendencia al estímulo de la cortisona en la mayoría de ellos, siendo en algunos casos menor la expresión de AB comparada con AC con el mismo tratamiento como son los casos de 1 y 10 μM a los 5 minutos, 0 μM a los 20 minutos y 0.1 y 1 a las 48 horas. AC presenta un mayor aumento en la expresión de APQ7 en comparación con AB en los tratamientos de 0.1 y 1 μM a los 10 minutos, 0 y 1 μM a los 15 minutos y 10 μM a las 48 horas. Las barras de error representan la media \pm el error estándar, $P < 0.05$ ($n = 4$).

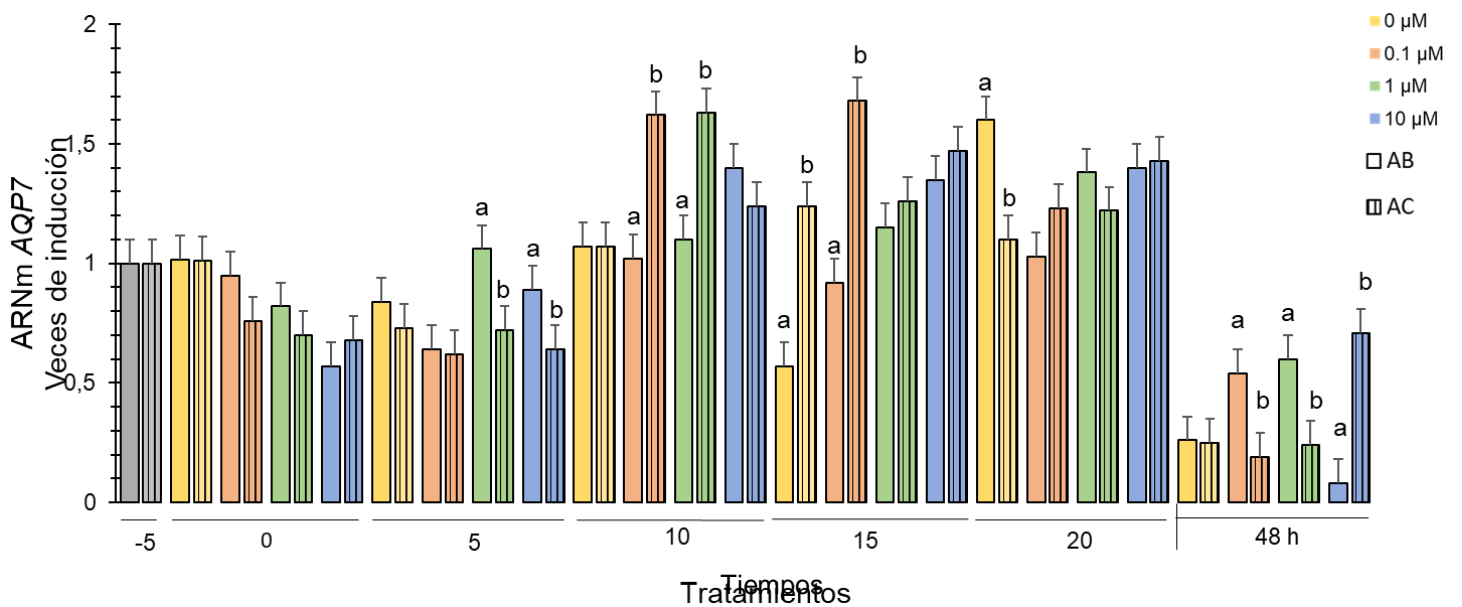


Figura 17. Relación entre la expresión de ARNm de AQP7 en AB y AC.

En la figura 18 observamos un ligero aumento en la expresión en todos los tratamientos desde los 0 hasta los 20 minutos, los tratamientos a las 48 horas muestran un aumento hasta de 4 veces más la expresión de 11β -HSD1 con la concentración de $1\mu\text{M}$, el aumento que se observa con las concentraciones de 0.1 y 1 es de más del doble con respecto al control (-5 minutos). Las barras de error representan la media \pm el error estándar, $P < 0.05$ ($n = 4$).

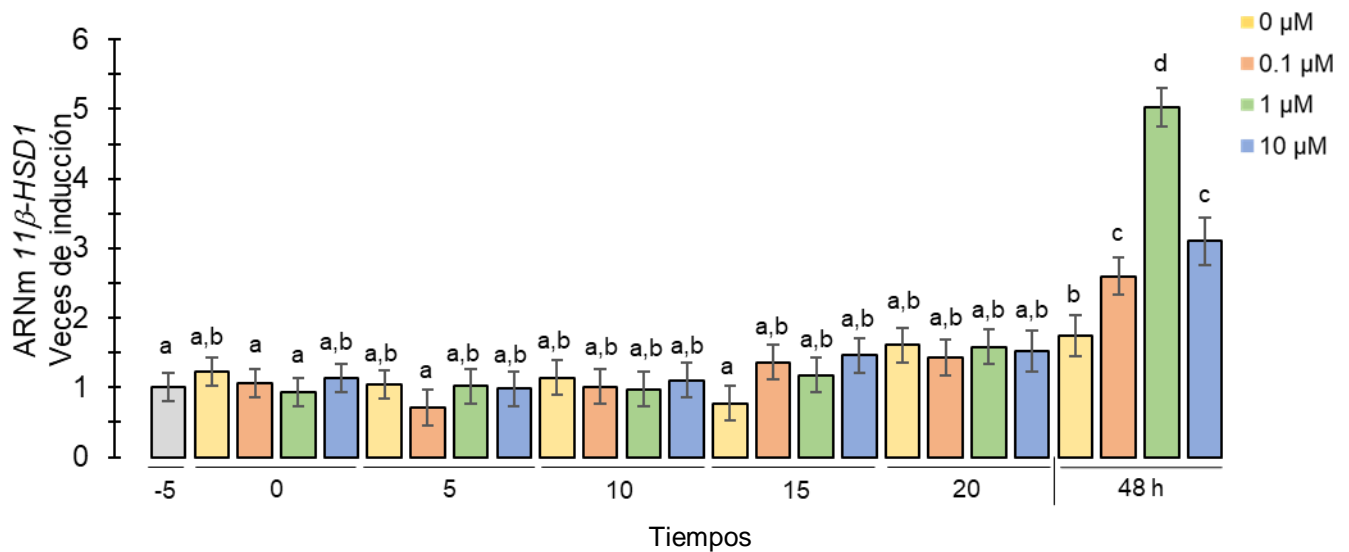


Figura 18. Efecto de la cortisona en la expresión de ARNm de 11β -HSD1 en AB de ratón.

La figura 19 nos muestra la expresión relativa de 11β -HSD1 que se comporta oscilante dentro de los primeros 20 minutos, con aumento y disminución leve, siendo más evidente el aumento de la expresión con $0\mu\text{M}$ a los 0 minutos y $10\mu\text{M}$ a los 20 minutos, con los tratamientos a las 48 horas el aumento es más marcado siendo de más de 0.5 veces mayor que el control con concentraciones de 0 y $1\mu\text{M}$ y el doble en el tratamiento de $10\mu\text{M}$ (-5 minutos). Las barras de error representan la media \pm el error estándar, $P < 0.05$ ($n=4$).

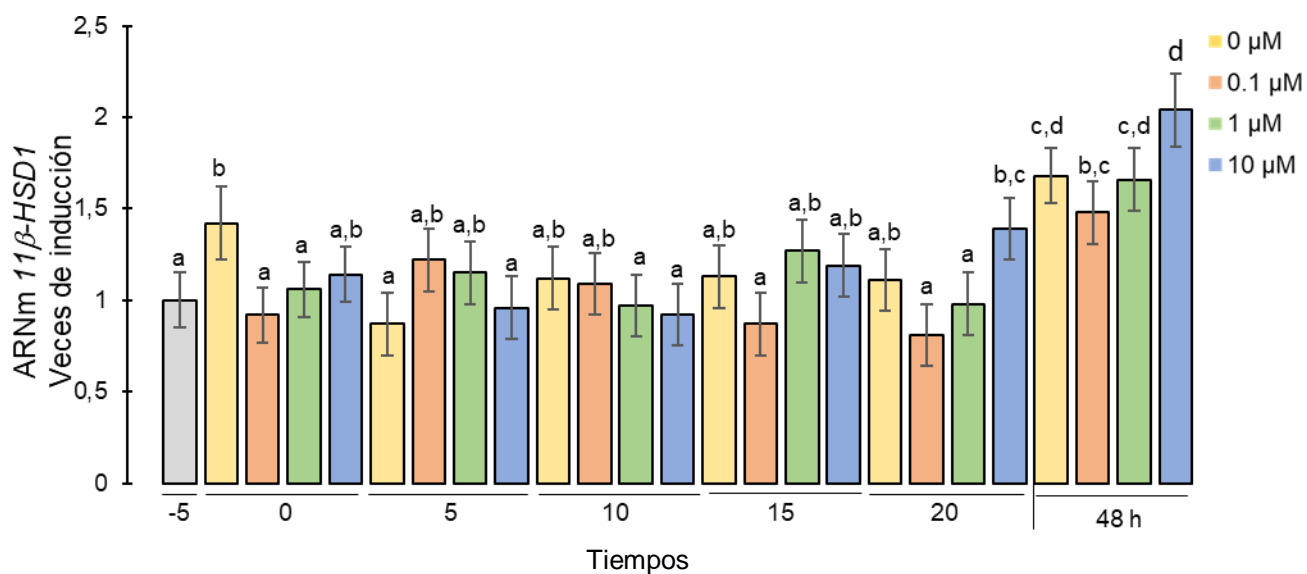


Figura 19. Efecto de la cortisona en el ARNm de 11β -HSD1 en AC de ratón.

7. Discusión

El conocer el efecto de glucocorticoides fisiológicos sobre la expresión de *AQP7* en adipocitos blancos y cafés nos ayuda a entender la fisiología de procesos metabólicos y así poder inferir mejor la fisiopatología de enfermedades relacionadas con el metabolismo energético, tales como resistencia a la insulina y síndrome metabólico, así como las diferencias fisiológicas que existen entre estos dos tipos celulares.

Nuestros resultados mostraron aumento en la expresión de ARNm de *AQP7* en los primeros 10 minutos en AB y AC con concentraciones de 10 μ M y su descenso a las 48 horas en ambos tejidos, Fasshauer, *et al.*, (2003) muestran que adipocitos 3T3-L1, estimulados con glucocorticoides (100nM dexametasona durante 16 horas) disminuye la expresión 39% de *AQP7*; lo que concuerda con nuestro datos pues una exposición de GCs durante horas (16 y 48 respectivamente) disminuye dicha expresión; Quesada *et al.*, (2016) mostraron resultados similares en células 3T3-L1 con el aumento de *AQP7* desde el minuto 5 siendo más aguda la respuesta es esa línea celular y mayor (6 veces más) a comparación con nuestro cultivo celular primario que fue a partir de los 10 minutos con el doble de expresión; el comportamiento en la expresión en ambos protocolos fue similar a las 48 horas con la evidente disminución en la transcripción del gen. Tomando esto en cuenta, tanto los adipocitos blancos como en los cafés, cuando se exponen al estímulo de la cortisona aumenta la expresión de *AQP7* dentro de los primeros minutos y disminuye en el transcurso de horas.

Los resultados obtenidos en los AB muestran que la expresión de Gk aumenta desde los primeros 5 minutos, siendo más evidente a los 10 minutos con la concentración de 10 μ M, posteriormente se presentó inhibición de la expresión a las 48 horas con todos los tratamientos,

Por otra parte, Hibuse *et al.*, (2015) observaron que existía una correlación negativa entre la expresión de *AQP7* y Gk, para el caso de los adipocitos cafés la expresión

de Gk tendió a disminuir conforme la duración de los tratamientos se acercaba a los 20 minutos, mostrando los niveles de expresión más bajos a las 48 horas; siendo, en este caso contrarios a la expresión de AQP7 durante los primeros 20 minutos. La discrepancia se observó entre la expresión de Gk entre los AC y AB, esto puede deberse a que la respuesta ante la cortisona es similar a los efectos ocasionados por los GCs en la proliferación celular, como lo señalan Barclay *et al.*, (2015), donde la respuesta es opuesta en preadipocitos cafés y blancos, lo que es similar a los resultados aquí obtenidos, ellos observaron que se estimula el crecimiento de AC y se inhibe el de los AB, así mientras la cortisona aumenta la expresión de Gk en los adipocitos blancos, la disminuye en los adipocitos cafés.

Los resultados obtenidos respecto a la expresión de AQP7 en ambos tipos celulares (AB y AC) sugieren que las concentraciones de glicerol se encontrarían altas después de la elevada expresión del gen, sin embargo parece comportarse inversamente la concentración de glicerol en el medio y la expresión de AQP7, pero tomando en cuenta que la Gk, encargada de fosforilar al glicerol y evitar su salida en el adipocito, es estimulada por los GCs, podemos deducir que su expresión relativa aumenta en el caso de los AB, aumenta conforme pasa el tiempo en concentraciones de 10 μ M de cortisona, siendo concordante con los resultados obtenidos en glicerol, en los minutos 15 y 20 los niveles son indetectables, los niveles de glicerol aumentan a las 48 horas cuando la expresión de Gk es mínima, pudiendo así salir de adipocito. Si bien ya no existe expresión relativa de ARNm de AQP7 a las 48 horas, pudieran existir ya las cantidades suficientes de la proteína de este gen para así facilitar la expulsión de este compuesto gluconeogénico, en este sentido, pudiera hondarse más en estudios posteriores la presencia y cantidad de la AQP 7 en los adipocitos.

Es evidente que tanto AB como los AC tienen diferencias metabólicas, por lo tanto, se midieron los niveles de expresión de AQP7 en el tiempo -5 comparando el Δ Ct, en ambas células y los resultados que indican que los AC expresan 100% más de AQP7 que los AB ($P < 0.01$), aunado a esto se compararon los tratamientos de

ambos tipos celulares mostrando una expresión disminuida en AQP7 después del tratamiento con cortisona a los 5 minutos (para las dosis 1 y 10 μM). Y a los 10 min una sobreexpresión promovida por el tratamiento con cortisona a 0.1 y 1 μM ; que se detectó a los 15 minutos a dosis de 0.1 μM . Finalmente, a las 48 horas de tratamiento con cortisona (0.1 y 1 μM), los AC expresaron menos del 50% de AQP7 en comparación con AB ($P < 0.05$).

La mayor expresión relativa de ARNm de *11 β -HSD1* se obtuvo a las 48 horas con la concentración de 10 μM en AC, fue 2 veces mayor al control ($P < 0.05$), para el caso de los AB la mayor expresión fue de 2.5 veces más a las 48 horas con la concentración de 0.1 μM , esto es similar a los resultados de Quesada *et al.*, 2016, en donde la mayor expresión se muestra en los tratamientos con cortisona a las 48 horas en adipocitos 3T3-L1 ($P < 0.05$), también concuerdan con lo que Barclay *et al.*, (2015) muestran en su experimento con dexametasona en AB y AC, en donde la mayor respuesta fue también en AC, sugiriendo que la expresión de *11 β -HSD1* es un reflejo de los efectos de los GCs en estos tejidos. Otros trabajos nos indican que existe diferencias entre ambos tejidos en la respuesta a los mismos estímulos (Lee *et al.*, 2008). Sin embargo, aún no está muy claro los efectos que tienen los GCs con la expresión de ARNm de *11 β -HSD1* y el distinto nivel de actividad en los diferentes tejidos.

8. Conclusiones

El efecto fisiológico de los glucocorticoides sobre el tejido adiposo blanco y café es amplio y aún no está bien dilucidado, sin embargo con base en los resultados en éste trabajo se puede concluir que la administración de cortisona a adipocitos murinos blancos y cafés aumentan la expresión relativa del ARNm de *AQP7* en periodos cortos (10 minutos) disminuyendo en periodos largos (48 horas), su efecto también influye la expresión de *Gk* y *11 β -HSD1*, dependientes de dosis y tiempo; tratándose de reacciones fisiológicas complejas.

Las concentraciones de glicerol en el medio de cultivo obtenidas de los tratamientos con cortisona a 48 horas todas presentan aumento, siendo menos evidente y en algunos casos indetectable en los tratamientos de tiempos cortos (0-20 minutos).

La estimulación de los genes involucrados en los procesos metabólicos por GCs aún necesita ser mejor comprendida, para que su entendimiento se refleje en la comprensión y tratamiento de las enfermedades metabólicas, tanto en humanos como en los animales, particularmente en perros y gatos.

9. Artículo: Glucocorticoid Gene Regulation of Aquaporin-7

Laura González-Dávalos^{*}, Mariana Álvarez-Pérez^{*}, Tania Quesada-López[†], Rubén Cereijo[†], Laura Campderrós[†], Enrique Piña[‡], Armando Shimada^{*}, Francesc Villarroya[†], Alfredo Varela-Echavarría[§], Ofelia Mora^{*,1}

^{*} Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Cuautitlán, México

[†] Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Institute of Biomedicine of the University of Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain; CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Barcelona, Catalonia, Spain.

[‡] Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México, México

[§] Laboratorio de Diferenciación Neural y Axogénesis, Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, México

¹ Corresponding author: e-mail address: ofemora66@unam.mx

ABSTRACT

AQP7 is the primary glycerol transporter in white (WAT) and brown (BAT) adipose tissues. There are immediate and quantitatively important actions of cortisone over the expression of *AQP7* in murine and human adipocytes. Short-term response (minutes) of cortisone treatment result in an mRNA overexpression in white and brown differentiated adipocytes (between 1.5 and 6 folds). Conversely, long-term response (hours or days) result in decreased mRNA expression. The effects observed on *AQP7* mRNA expression upon cortisone treatment in brown and white differentiated adipocytes are concordant with those observed for *GK* and *HSD1B11*.
Keywords: *AQP7*, *GK* activity, *HSD1B11*, glycerol, cortisone.

Contents

1. Aquaporin family

1.1 Classification

1.2 Tissue expression and its relationship with glands secretion

2. Aquaporin 7

3. Hormone regulation of AQP-7 and obesity

4. Cortisone short-term regulation of *AQP7* is correlated to *GK* and *HSD1B11* gene expression in white and brown adipocytes

5. Adrenergic stimulation effects over *AQP7*, *GK* and *HSD1B11* mRNA expression

6. Conclusions and Future Directions

Acknowledgments

References

1. AQUAPORINE FAMILY

Aquaporins (AQPs) are a class of membrane water channels whose primary function is to facilitate the passive transport of water across the plasma membrane of the cell in response to osmotic gradients that are created by the active transport of solutes (Verkman, Anderson, & Papadopoulos, 2014). They transport water and small molecules, such as urea and glycerol, for the maintenance of fluid homeostasis in various environments (Ishibashi, Morishita, & Tanaka, 2017). Moreover, some AQPs transport nutrients, metabolic precursors, waste products, toxins and gases. AQPs are ubiquitous in almost all living systems including virus, but excluding some prokaryotes and protozoa (Gazzarrini et al., 2006; Ishibashi et al., 2017).

1.1 Classification

Since the discovery of mammalian AQPs in 1992, much effort has been made to understand their structure and function (Pérez Di Giorgio et al., 2014). The idea of AQPs as a protein family was formally introduced with a phylogenetic analysis of putative proteins that can transport water and solutes in bacteria and eukaryotes, hypothetically evolutionally related to previously characterized AQPs (Zardoya & Villalba, 2001). Bioinformatic tools have allowed to identify putative functional domains which helped to almost automatically identify new potential AQPs. This superfamily of integral membrane channel proteins was called major intrinsic protein (MIP). The AQP family could be constituted by non-homologous proteins with similar structure and motifs due to evolutionary convergence (Pérez Di Giorgio et al., 2014).

However, structural analysis of several AQPs has established that these protein channels share common structural features. The functional aquaporin unit is a homotetramer, which comprises six α -helix transmembrane domains with two conserved asparagine–proline–alanine (NPA) motifs embedding into the plasma membrane, a signature sequence of water channels, five loops (A-E) and intracellular N- and C-termini. Human AQPs have been reported to share approximately 30–50% homology in their amino acid sequences. And interestingly, conformational changes of AQP protein allow the traffic through the plasma membrane of other molecules (i.e. urea, glycerol, H_2O_2 , NH_3 , CO_2 , etc.) (Li & Wang, 2017).

Based on their structure and functional similarities, AQPs are initially subdivided into two subfamilies, classical AQPs (water-selective) and aquaglyceroporins (glycerol channel) aquaporins. However, this viewpoint was challenged by recent evidence revealing that both subfamilies overlap functionally, for example, some classical AQPs transport water and other small solutes e.g. glycerol. In addition, a

new group of AQPs discovered recently showed that their structure is highly deviated from the previous AQPs especially around the AQP NPA box (Ishibashi, Tanaka, & Morishita, 2014; Li & Wang, 2017). This subfamily was later named superaquaporin (also called unorthodox aquaporin) as it has very low homology with the previous two subfamilies, the three families of human aquaporins are shown in Fig. 1 (Li & Wang, 2017).

Aquaglyceroporins, which form a subset of the 13 mammalian AQPs, also facilitate the passive transport of glycerol and possibly other small solutes such as urea and carbon dioxide. While water-selective AQPs are involved in many biological functions, including transepithelial fluid transport, cell migration, brain edema and neuroexcitation, aquaglyceroporins are involved in cell proliferation, adipocyte metabolism and epidermal water retention (Verkman et al., 2014).

There is also evidence (some of which is conflicting) suggesting that, in addition to the transport of water and glycerol, aquaglyceroporins could potentially transport gases such as carbon dioxide, ammonia and nitric oxide; as well as larger polar solutes such as sugars, hydrogen peroxide and even some ions. However, it is not known whether the transport of molecules other than water and glycerol is biologically important (Verkman et al., 2014).

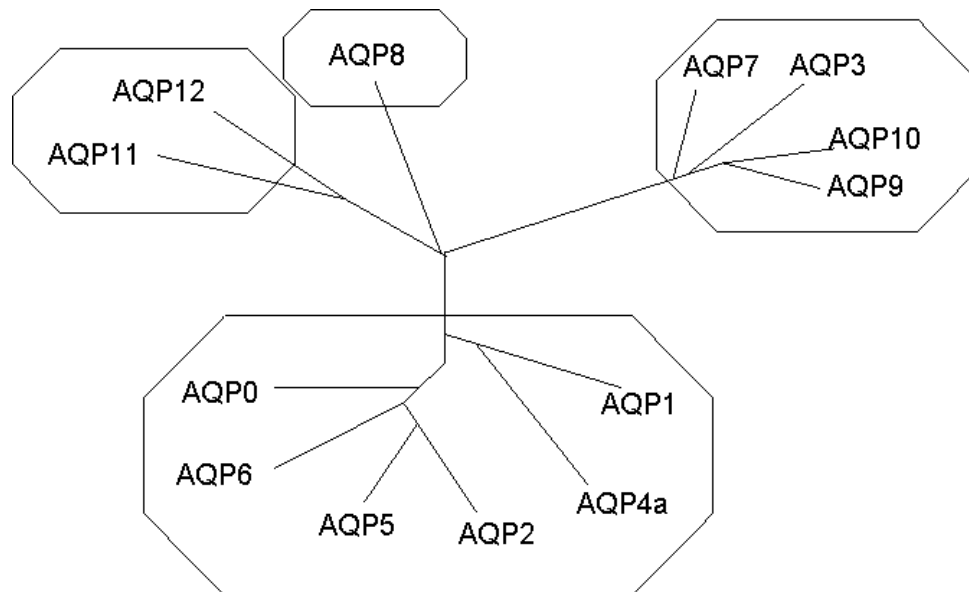


Fig. 1 The phylogenetic tree of human AQPs (Modified by Li & Wang, 2017).

1.2 Tissue expression and its relationship with glands secretion

AQPs are expressed in a wide range of tissues (Day et al., 2014), often spatially located within a certain region of the cell. Their expression is particularly important in cell types that are involved in fluid transport, such as epithelial cells; however in

some other organs that do not have an obvious role in fluid transport, such as adipose tissue, their expression has proved to have a critical role in homeostatic maintenance (Verkman et al., 2014). This enables them to play a central role in the flow of water through those tissues, which typically triggers cell volume regulation mechanisms. Whilst transport through all AQPs utilizes a common passive mechanism; their regulation and cellular distribution varies significantly between systems, specifically in constituent tissues and cells (Day et al., 2014).

Regarding its relationship with glands, AQPs are expressed in most exocrine and endocrine secretory glands. By participating to transcellular water flow, AQPs are involved in the mechanisms leading to exocrine glandular fluid secretion. A first step involves the creation of a transepithelial osmotic gradient, formed by the accumulation of ions, mostly NaCl. A second step involves the movement of water from epithelial cells to the gland lumen through AQPs. Water flows from secretory epithelial cells according to a transepithelial osmotic gradient. In addition, AQPs could somehow participate in endocrine secretion, however more studies will be needed to clarify the role played by them in glandular secretory processes. (Delporte, 2017).

1. AQUAPORIN-7

AQP7 is the primary glycerol transporter in white (WAT) and brown (BAT) adipose tissues. This aquaglyceroporin resides predominantly in the cytoplasm and is abundantly expressed in the plasma membrane of adipocytes. The differentiation of 3T3-L1 rodent cell line to adipocytes, has proven that *AQP7* mRNA expression was increased in parallel with differentiation, and that this induction was correlated with glycerol release from these cells suggesting that plasma membrane glycerol permeability may mediate the accumulation of fat in adipocytes. (Iena & Lebeck, 2018). Also, fasting conditions caused an increase *AQP7* mRNA expression in rodent's adipocytes (Day et al., 2014). *AQP3* and *AQP9* are also expressed in human adipose tissue. *AQP3* is predominantly localized in the cytoplasm and *AQP9* constitutively expressed in the plasma membrane. Interestingly, a positive correlation between adipose transcript levels of AQPs 3, 7 and 9 and body weight (BMI) has been suggested (Day et al., 2014; Rodríguez et al., 2011).

Regarding *AQP7* gene expression and metabolic diseases, it has been shown to be down-regulated in the WAT of obese human subjects compared with normal controls, but unchanged in type 2 diabetes (T2DM) (Day et al., 2014). Rodríguez et al. (2011) showed that obese patients with T2DM showed higher expression of *AQP7* in visceral adipose tissue and lower expression in subcutaneous adipose tissue while hepatic *AQP9* showed a decreased expression. However, the link between human AQPs and obesity is contradictory; further information can be consulted in a review by Maeda (2012). While *AQP10* is predominantly expressed

in the intestine, it has recently been proposed as an alternative pathway for glycerol efflux in human adipocytes (Day et al., 2014).

The aquaglyceroporins *AQP7* (expressed primarily in adipocytes) and *AQP9* (expressed in hepatocytes) are involved in adipose metabolism. *AQP7*-null mice have a progressive age-related increase in adipose mass and adipocyte hypertrophy, with the accumulation of glycerol and triglycerides in adipocytes. *AQP7* deficiency leads to reduced permeability of the plasma membrane to glycerol, which causes cellular accumulation of glycerol and triglyceride as well as upregulation of glycerol kinase expression. In humans, *AQP7* expression in adipocytes is downregulated in obesity (Rodríguez et al., 2011). These results suggest that increasing adipocyte *AQP7* expression and/or function may be a novel approach for treating obesity; however, there is a lack of critical proof-of-concept data, such as the effects of *AQP7* overexpression (induced by gene transfer) on adipocyte hypertrophy in obese mice. There is evidence that *AQP9* is involved in the hepatic uptake of glycerol and perhaps urea, and that *AQP7* and *AQP9* act as metabolic regulators in diabetes and obesity (Verkman et al., 2014).

HORMONE REGULATION OF AQUAPORIN-7 AND OBESITY

Long-term regulation by AQPs is modulated (increased/decreased) by systemic hormones (vasopressin, insulin, ANP, angiotensin II), local molecules (purines, prostaglandins, bradykinin, dopamine), and other common microenvironment signals (pH, divalent cation concentrations and osmolality) (Boone, Kortenoeven, Robben, Tamma, & Deen, 2011; Choi, Jung & Kwon, 2015; Gunnarson et al., 2005; Lanaspá et al., 2010; Li & Wang, 2017; Olesen, Rutzler, Moeller, Praetorius, & Fenton, 2011; Tamma, Carmosino, Svelto, & Valenti, 2005; Zhang et al., 2015). These regulations of AQPs are often associated with certain physiological or pathophysiological conditions.

Adipose tissue AQPs are selectively regulated by hormones implicated in the pathogenesis of insulin resistance and dyslipidemia, as shown in different reports (da Silva & Soveral, 2017; Miranda et al., 2010; Rodríguez et al., 2011). Recent studies evidenced that AQPs are key players in adipose tissue biology and involved in obesity onset. Among the various mammalian aquaglyceroporins, *AQP7* is the most representative glycerol channel and was the first to be detected in human and mice adipose tissue and adipocytes. *AQP7* was localized in the vascular tissue surrounding fat rather than in adipose tissue membranes, a double localization in adipocytes and endothelial cells was also described and *AQP7* expression in both human subcutaneous and visceral adipose tissue was reported (da Silva & Soveral, 2017; Miranda et al., 2010; Rodríguez et al., 2011; Rojek, Praetorius, Frokiaer, Nielsen, & Fenton, 2008).

However, a correlation of adipose *AQP7* expression with glycerol metabolism and related metabolic complications was not so obvious in human studies (Ceperuelo-Mallafre et al., 2007). Albeit a link between adipocyte *AQP7* expression and insulin resistance was found by a genome-wide study, where *AQP7* decreased gene expression was linked to T2DM and metabolic syndrome as well as with obesity but only for the female. Gender differences in the role of *AQP7* in adipose tissue metabolism were supported by higher fasting circulating levels of glycerol in women than in men, probably due to higher percentage of subcutaneous fat in females, higher lipolytic rates and higher *AQP7* expression levels (da Silva & Soveral, 2017; Lindgren et al., 2002; Loos et al., 2003; Prudente et al., 2007; Rodríguez, Marinelli, Tesse, Fruhbeck, & Calamita, 2015).

In humans and mice, *AQP7* gene expression is upregulated by fasting or exercise, leading to glycerol production from endogenous triacylglycerols, whereas during the feeding state it is downregulated. So, *AQP7* abundance showed to be related to plasma insulin levels (Kishida et al., 2000) and *AQP7* gene transcription was inhibited by the increase of insulin levels through a negative insulin response element (IRE) identified in the promoter region of *AQP7* gene in mice and humans and by blockage of the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) pathway (da Silva & Soveral, 2017). On the contrary, an upregulation of *AQP7* by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPAR γ*) was demonstrated in mice and human adipocytes. Thiazolidinediones (synthetic *PPAR γ* ligands) and insulin sensitizers were reported to upregulate *AQP7*, whereas leptin, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), adrenergic agonists and steroids, being insulin resistance inducers, down-regulate *AQP7* expression. Concordant with these findings, it has also been shown that under fasting conditions, concomitant with lipolysis, low plasma insulin levels and catecholamine stimulation, there is an induction of *AQP7* gene transcription and intracellular *AQP7* translocation to the plasma membrane, thus potentiating glycerol release from adipocytes.

Rodríguez et al., (2011) showed that isoproterenol treatment of 3T3-L1 differentiated adipocytes caused intracellular *AQP7* translocation to the plasma membrane. A similar translocation was observed for *AQP3* upon isoproterenol treatment, whereas the *AQP9* immunoreactivity in the plasma membrane was maintained. However, the isoproterenol (10 μ mol/L) stimulation for 4 hours showed no significant differences in AQPs expression in human omental adipocytes.

CORTISONE SHORT-TERM REGULATION OF *AQP7* IS CORRELATED TO *gk* AND *hsd1b11* GENE EXPRESSION IN white and brown adipocytes

We have previously described (Quesada-López, González-Dávalos, Piña, & Mora, 2016b) that there is an immediate and quantitatively important action of cortisone over the expression of *AQP7* and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (*HSD1B11*) in 3T3-L1 adipocytes. The treatment with cortisone (0.1, 1, and 10 μ M) during different times (0, 5, 10, 15, and 20 min, and 48 h) to 3T3-L1 differentiated cells resulted in a time-dependent response of *AQP7*, a dose-dependent response of *HSD1B11*, and an increased expression of both genes during the first minute of treatment (5- and 6-fold, respectively), followed by a decrease during the following 5–10 min ($P < 0.05$).

These studies suggest an important hormone response, which would be worthwhile to explore in greater depth, and the study also questions the physiological significance of real, fast regulation mediated by corticosteroids that favors a dramatic increase in expression during short time periods. We have now identified an important effect on genomic responses mediated by glucocorticoids (GCs), and its impact on metabolic complications. The response during short intervals should be explored in metabolically compromised cells in order to determine the role of cortisone in metabolism and the pathogenesis of obesity in adipose tissue.

With the aim to compare the action of cortisone over the expression of the two genes analyzed previously: *AQP7* and *HSD1B11*, and to test if there were differences between white adipocytes (WA) and brown adipocytes (BA), two different primary cultures from CD-1 mice were performed (following the Mexican government's technical specifications for production, care, and use of laboratory animals, NOM-062-ZOO-1999). Brown adipose tissue from 1-day old mice was dissected and digested for precursors' extraction and 21-day old mice subcutaneous WAT was dissected to obtain white precursors. All cell culture assays were differentiated into white or brown adipocytes (when corresponding, as previously reported by Carrière et al., 2014) and, once differentiated, cortisone response was characterized. In addition, the human SGBS cell line was employed, these precursors were differentiated into white adipocytes (as previously described Moure et al., 2016) in order to characterize potential differences between mice and human cells. Our working hypothesis was that cortisone favored *HSD1B11* expression and reduced *AQP7* expression; effects which, by means of two complementary mechanisms, may impact metabolism of pro-diabetic adipocytes. Our previous results (Quesada-López et al., 2016b) showed, contrary to our hypothesis, the ability of cortisone to induce immediate and nearly parallel messenger RNA (mRNA) expression for both genes under study.

After cell culture treatment, total RNA was isolated employing the TRIzol reagent and processed to obtain the complementary DNA (cDNA) strand in order to performed the quantitative PCR (qPCR) analyses as previously described (Quesada-López et al., 2016b). Quantitative RNA expression for *AQP7* and *HSD1B11* was determined employing a StepOne Real-Time PCR System (Applied

Biosystems, Foster City, CA, USA) and the LightCycler FastStart DNA Master Sybr Green I kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). The program was performed as follows: a denaturation at 96°C for 10 min followed by 40 cycles of 10 sec at 95°C for denaturation; 10 sec at 65°C for primer alignment (for *AQP7*, *HSD1B11*, *TBP*, *MnSOD* and *PPIA*), and 10 sec at 63°C for *GK*, and 10 sec at 72°C for elongation; the melting curve started at 60°C for 1 min and ended with 15 sec at 95°C. Subsequently, the relative abundance of the mRNA was calculated by normalization to *MnSOD* and *PPIA* for BA, and *TBP* and *PPIA* for WA [best housekeeping gene candidates suggested by NormFinder (MDL, Aarhus, Denmark)] according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

In the case of SGBS cells 1 μ L of the previously synthesized cDNA, 1 μ L of the TaqMan probes solution (Table 2, Applied Biosystems) and 10 μ L Master mix reagents (Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG with ROX reagent; Thermo Fisher Scientific) were used. Quantitative RNA expression for the previously mentioned genes was determined using 7500 Fast Real-time PCR systems and 7500 Software (Applied Biosystems). The program was adjusted as follows: a pre-holding stage of 2 minutes at 50°C and a denaturation stage at 96°C for 10 minutes; followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C for denaturation and 1 minute at 60°C for alignment and elongation. Subsequently, the relative abundance of mRNA was calculated by normalization to *RPLP0* using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Table 1 PCR primers used in mice cells.

Gene	Primer sequence	Accession number	Fragment size (bp)
<i>HSD1B11</i>	Forward 5' TCAGACCAGAAATGCTCCAG Reverse 5' GCCAGCAATGTAGTGAGCAG	NM_008288.2	174
<i>AQP7</i>	Forward 5' TATGGTGCGAGAGTTTCTGG Reverse 5' GCCTAGTGCACAATTGGTGA	NM_007473.4	200
<i>GK</i>	Forward 5' ATCCGCTGGCTAAGAGACAA Reverse 5' AGGCGCATATAACCCTGAAA	NM_008194.3	126
<i>PPIA</i>	Forward 5' AGCACTGGGGAGAAAGGATT Reverse 5' AGCCACTCAGTCTTGGCAGT	NM_017101.1	248
<i>TBP</i>	Forward 5' AACAGCCTTCCACCTTATGC Reverse 5' GCTGCTGTCTTTGTTGCTCT	NM_013684.3	166
<i>MnSOD</i>	Forward 5' GGACCCATTGCAAGGAACAA Reverse 5' GTAGTAAGCGTGCTCCCACAC	NM_013671.3	69
<i>18 S</i>	Forward 5' GGAGCGATTTGTCTGGGTTA Reverse 5' GTAGGGTAGGCACACGCTGA	NR_036642.1	196

Table 2 TaqMan qRT-PCR probes used for SGSB cells.

Gene	Reference Number (Applied Biosystems)
<i>SOD2</i>	Hs00167309_m1
<i>HSD11B1</i>	Hs00194153_m1
<i>AQP7</i>	Hs00927261_g1
<i>GK</i>	Hs00609791_m1

Glycerol quantification was performed following the protocol suggested by the free glycerol determination kit (Sigma-Aldrich).

All results were analyzed with the SAS general linear model, and a least square means comparison testing was performed.

4.1 Cortisone effects over adipose *AQP7* and *GK* mRNA expression and metabolites

The acute and long-term effects of GCs on adipose tissue remain unclear (Peckett, Wright, & Riddell, 2011, Quesada et al., 2016b). It is known that *AQP7* facilitates the secretion of glycerol from adipocytes. Glycerol constitutes a key metabolite in the control of fat accumulation (as the carbon backbone of triglycerides, TG) and glucose metabolism (as the major substrate for hepatic gluconeogenesis during fasting), for these reasons it was proposed that the glycerol channel *AQP7* plays a pivotal role in adipose tissue enlargement and function as well as in glucose homeostasis (Hibuse et al., 2005; Rodríguez, Catalán, Gómez-Ambrosi, & Frühbeck, 2006).

In a previous report, using 3T3-L1 adipocytes, we observed that *AQP7* mRNA expression was increased 6-fold after 1 min treatment with 1 μ M cortisone and 3-fold after 5 min with 0.1 μ M cortisone, but similar expressions of mRNA after 5 min until 48 h, were observed with both treatments ($P < 0.05$). Quantification of mRNA relative expression by qPCR was not possible with the 10 μ M cortisone treatment.

Our present results with murine WA showed an increase near to 2-fold induction after 10 min, but only for 10 μ M cortisone, a situation that is maintained up to 20 min for doses of 0.1 to 10 μ M cortisone (Fig. 2). Fasshauer et al. (2003) using 3T3-L1 adipocytes, observed that with 10 μ M isoproterenol, 10 ng/mL TNF- α , and 100 nM dexamethasone for 16 h inhibited *AQP7* gene expression by 62, 60, and 39 %, respectively. The inhibitory effects were dose-dependent with significant suppression detectable at concentrations as low as 1 nM isoproterenol, 1 ng/mL TNF- α , and 10 nM dexamethasone.

In the case of SGBS adipocytes, the induction of *AQP7* mRNA by cortisone was lower but immediate, similar to those reported by Quesada et al. (2016b) and also the effect was observed at 10 minutes ($P=0.09$). This diminished observed response, could be due to fact that they were affected by a previous GCs stimulus, SGBS cells precise the presence of 25 nM dexamethasone and 100 nM cortisol in cell culture medium in order to achieve a proper differentiation. This previous long-term exposure may affect these adipocytes' response to cortisone reflected in a lower *AQP7* mRNA induction compared to murine differentiated white adipocytes. Regardless of this detail, *AQP7* mRNA induction by cortisone in WA (murine, SGBS and 3T3-L1) showed the same tendency, an increase in the short-time (1-20 minutes) with doses among 0.1-1 μ M, over expression was higher in 3T3-L1 (6-fold) and faster (1 min, Quesada et al., 2016b). In the case of BA, the induction observed was greater than that observed for WA, during the first 10 minutes of treatment at doses of 0.1- and 1- μ M cortisone, but not for 15 and 20 minutes where the effect was only observed with the highest dose (10 μ M).

In all three protocols for the distinct adipocytes used there was an important decrease in the expression of *AQP7* after 48 hours of treatment (Fig. 2), 0.5-fold induction compared with basal (-5 min), those results were similar with the ones observed in 3T3-L1 where after 48 h (Quesada et al., 2016b). We could highlight from all these *in vitro* experiments that *AQP7* expression is increased in the short-term (minutes) by exposure to cortisone but decreases when exposure is medium or long-term (hours or days).

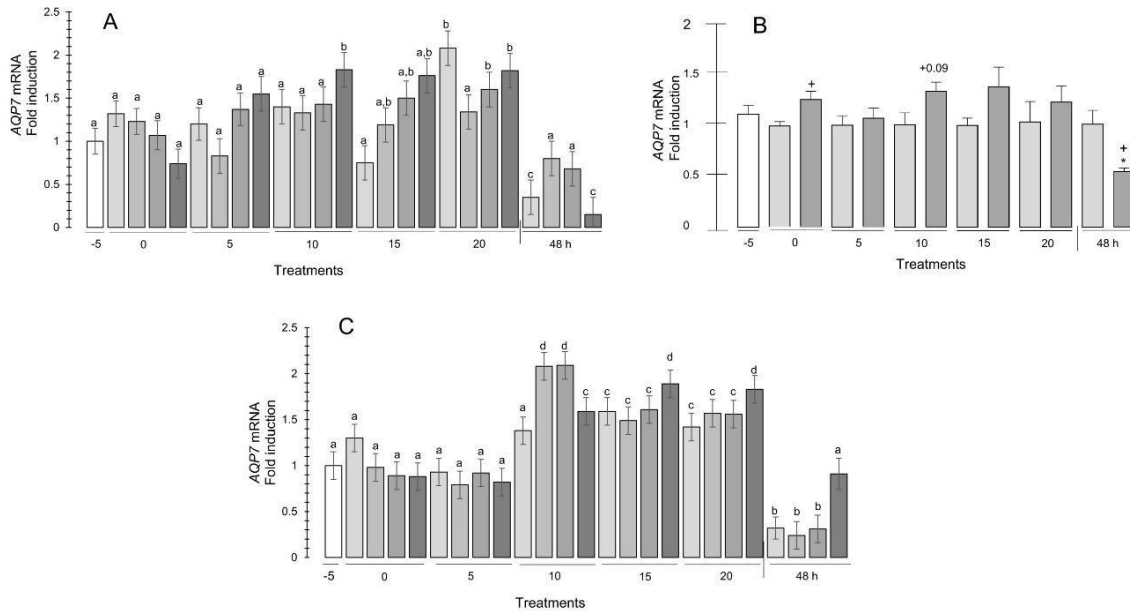


Fig. 2 Effect of cortisone on *AQP7* mRNA in adipocytes of mice and human.

(A) *AQP7* in mice WA. Bars show the relative expression of mRNA from -5 min up to 48 h, as indicated in the figure, for treatments with 0, 0.1, 1 and 10 μ M cortisone. (B) *AQP7* in SGBS adipocytes. Bars show the relative expression of mRNA from -5 min up to 48 h, as indicated in the figure, for treatments with 0 and 1 μ M cortisone. (C) *AQP7* in mice BA. Bars show the relative expression of mRNA from -5 min up to 48 h, as indicated in the figure, for treatments with 0, 0.1, 1 and 10 μ M cortisone.

The intensity of the bars corresponds to the increase in cortisone concentration.

All error bars represent mean \pm SEM, $P < 0.05$ ($n = 4$, SGBS adipocytes $n=3$).

To complete the scheme, we measured the glycerol concentration in the medium of the cells exposed to cortisone and observed (Fig. 3) in WA (A) a slight time-dependent decrease in glycerol concentration at the beginning of the treatment, but an increase at 48 hours with 1 μ M cortisone. In the case of SGBS adipocytes (B), glycerol levels in the media was practically non-detected. On the other side, for BA (C), cortisone treatment caused a 7-fold increase in glycerol concentration in the media with 0.1 μ M concentration of the hormone. Yet, after 48 hours of treatment, glycerol concentration in the culture media increased 2-fold under all cortisone

treatments ($P < 0.05$). Taking into consideration these results, we considered appropriate to monitor glycerol kinase (*GK*) mRNA in our models.

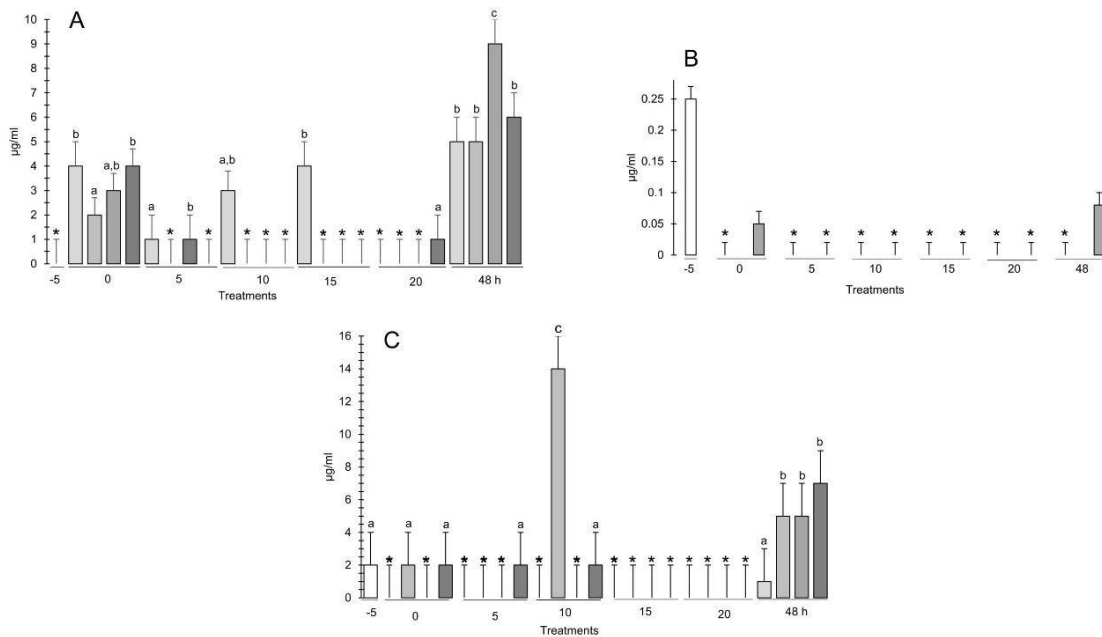


Fig. 3 Effect of cortisone on glycerol quantification in the medium of mice and human adipose cells.

(A) Glycerol concentration in the medium of mice WA. Bars show the quantification from -5 min up to 48 h for treatments with 0, 0.1, 1 and 10 μM cortisone. (B) Glycerol concentration in the medium of SGBS adipocytes. Bars show the quantification from -5 min up to 48 h for treatments with 0 and 1 μM cortisone. (C) Glycerol concentration in the medium of mice BA. Bars show the quantification from -5 min up to 48 h for treatments with 0, 0.1, 1 and 10 μM cortisone. The intensity of the bars corresponds to the increase in cortisone concentration. All error bars represent mean \pm SEM, $P < 0.05$ ($n = 4$, SGBS adipocytes $n=3$).

* = Non-detectable

GK is a key enzyme that catalyzes the phosphorylation of glycerol to glycerol-3-phosphate. Particularly in fasted liver, *GK* enhances the conversion of glycerol to glycerol-3-P for gluconeogenesis in parallel with the up-regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (Hibuse et al., 2005). Yeh et al. (2004) analyzed the crystal structure of *GK* in Gram-positive *Enterococcus casseliflavus* and determined the phosphorylation site which, when phosphorylated, resulted in 10- to 15-fold increase of *GK* enzymatic activity. They also demonstrated the catalytic cleft of *GK*, in which glycerol and ATP bind. Their results indicate that *GK* enzymatic activity is induced by glycerol itself. Hibuse et al. (2005) showed that intracellular accumulation of glycerol in *AQP7-KO* and -knockdown adipocytes

increased GK enzymatic activity, resulting in enhancement of fatty acid uptake and triglyceride accumulation. *AQP7* KO mice exhibited adult-onset and diet induced obesity associated with severe insulin resistance. Disruption of adipose *AQP7* is associated with elevated GK enzymatic activity through increased intracellular glycerol, increased uptake of fatty acid, and acceleration of triglycerides synthesis.

Our results show (Fig. 4) that, upon cortisone treatment, rodent WA (A) show a slight increase of *GK* mRNA (1.5 fold at 10 μ M cortisone) at 10 min and a decrease (0.5-fold) in all doses of cortisone at 48 hours. In the case of SGSB differentiated adipocytes (B), *GK* mRNA expression decrease was observed only at 48 hours. This was similar to what was observed for murine BA (C) which decreased *AQP7* expression after 48 hours of treatment.

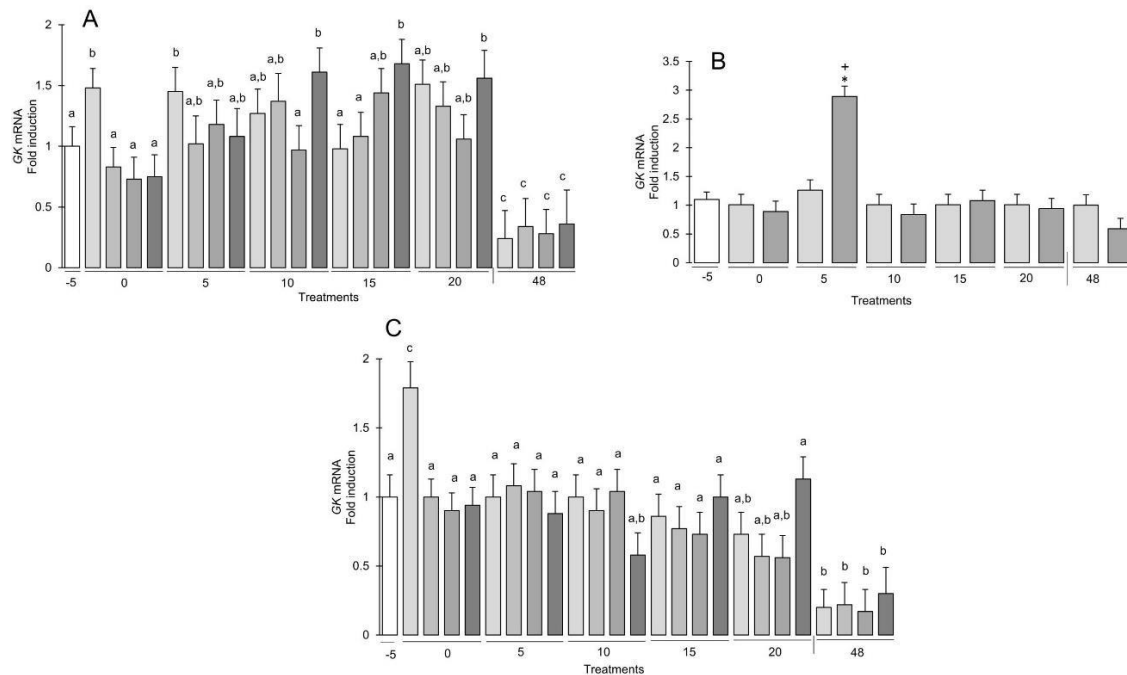


Fig. 4 Effect of cortisone on *GK* mRNA in adipocytes of mice and human.

(A) *GK* in mice WA. Bars show the relative expression of mRNA from -5 min up to 48 h, as indicated in the figure, for treatments with 0, 0.1, 1 and 10 μ M cortisone.

(B) *GK* in SGSB adipocytes. Bars show the relative expression of mRNA from -5 min up to 48 h, as indicated in the figure, for treatments with 0 and 1 μ M cortisone.

(C) *GK* in mice BA. Bars show the relative expression of mRNA from -5 min up to 48 h, as indicated in the figure, for treatments with 0, 0.1, 1 and 10 μ M cortisone.

The intensity of the bars corresponds to the increase in cortisone concentration.

All error bars represent mean \pm SEM, $P < 0.05$ ($n = 4$).

+* = $P < 0.01$ ($n = 3$).

The consistency between *GK* and *AQP7* mRNA expression observed for WA results of special interest, suggesting a correlation in the regulation of both genes in parallel to cortisone response. On the contrary, for BA, the drop in *GK* mRNA

expression at times 0 and 10 minutes could be the trigger for the induction of *AQP7* at 10 minutes. This evidence may suggest that for WA cortisone promotes *AQP7* mRNA induction firstly and as a consequence of this induction *GK* is modified. Conversely, in BA the effect over mRNA expression is observed early for *GK* and followed by *AQP7*. These contrary effects observed for both types of adipocytes is also observed for proliferation. Barclay et al. (2015) demonstrated that GCs appear to exert opposite effects on the proliferation of brown and white preadipocytes, stimulating growth of former and inhibiting that of the latter.

Finally, we wanted to know the differential levels of expression of *AQP7* between murine WA and BA, so we compared the $2^{-\Delta Ct}$ at time -5 min (Fig. 5A). Results suggest that BA express 100% more *AQP7* than WA ($P < 0.01$). Furthermore, a comparison between WA and BA among all treatments (Fig. 5B) was performed showing a decreased expression in *AQP7* upon cortisone treatment at 5 min (for the doses 1 and 10 μM). And at 10 min an overexpression promoted by cortisone treatment at 0.1 and 1 μM ; which was detected at 15 min at dose 0.1 μM . Lastly, at 48 hours of cortisone treatment (0.1 ad 1 μM) BA expressed less than 50% of *AQP7* when compared with WA ($P < 0.05$).

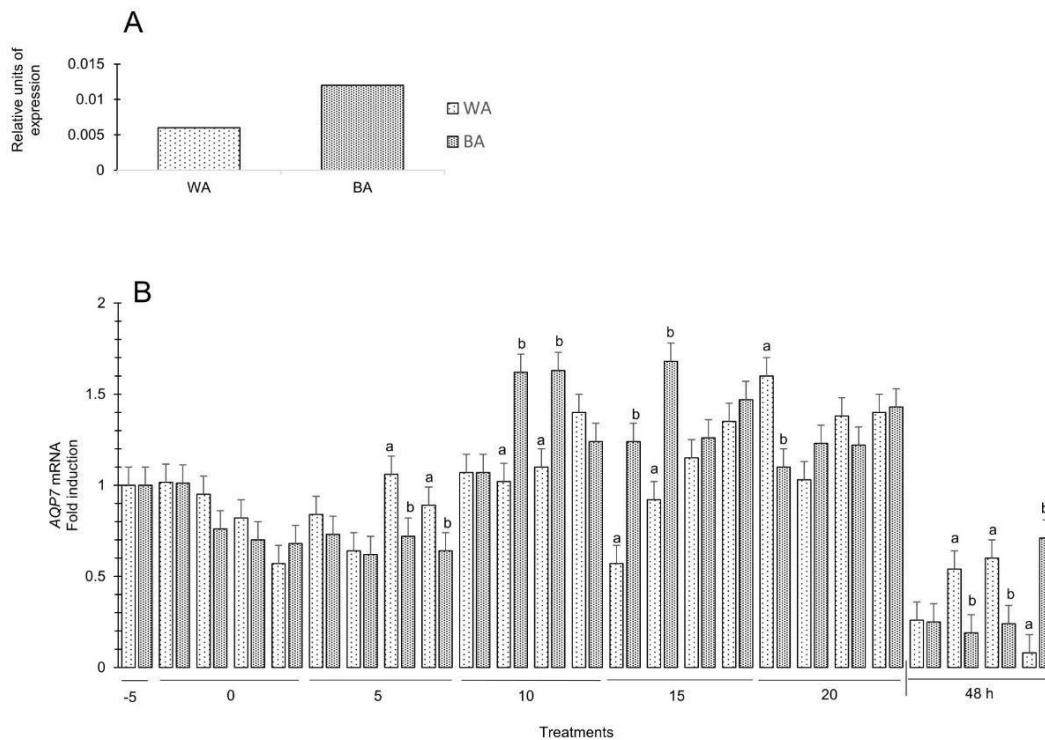


Fig.5 Relation between *AQP7* mRNA expression on WA and BA. (A). ΔCt mRNA at -5 min. (B). Bars represents *AQP7* mRNA fold induction in WA (first column) and BA (second column), compared between treatments. All error bars represent mean \pm SEM, $P < 0.05$ ($n = 4$).

Kroon et al. (2018) observed activity of murine BA was inhibited by corticosterone, that is, decreased NE-induced *UCP-1* expression upon 10 nM and 1 μ M corticosterone exposure. GC receptors inhibitor CORT125281 and RU486 were able to (partially) prevent corticosterone-induced inhibition of BAT activity, as coincubation with the GR antagonists results in enhanced *UCP-1* expression. Although we did not quantify *UCP-1* mRNA expression nor adrenergic stimulation response in BA, GK is an important marker of BA thermogenic activation, thus the result after 48 hours may suggest a decrease thermogenic machinery expression (Festuccia et al., 2003).

Finally, Glucocorticoid Response Elements (GREs) were identified in the lastly updated available gene sequences for *AQP7* in *Mus musculus* and *Homo sapiens*. Using MatInspector computer software, we entered both sequences. This software was able to identify GREs in both genes. In the case of the murine gene for *AQP7*, 2 potential response elements at positions 98 and 359 were identified. On the other hand, in the reported human gene for *AQP7*, 3 potential response elements were found, at 830, 1017, and 1087. The presence of these GREs strongly suggests that cortisone can certainly regulate the transcription of the *AQP7* gene which supports the results obtained in this work.

4.1 Cortisone effect on *HSD1B11* mRNA expression in white and brown adipocytes

Exogenous administration or endogenous overproduction of GCs have shown to have lipogenic effects, this has been linked to increased adiposity. The link between GCs and excess adiposity is well established clinically and is clearly demonstrated in individuals with Cushing Syndrome or those on exogenous corticosteroid treatment. These individuals show increased weight gain, hypertension, and visceral adiposity, and are at an increased risk for developing T2DM (Peckett et al., 2011; Stewart & Petersenn, 2009). Adipose tissue-specific increases in GCs action, via the upregulation of the enzyme HSD1B11 has also shown to promote and increase in visceral fat accumulation, thereby further suggesting that GCs may have a primary role in the development of central obesity (Desbriere et al., 2006). When GCs are released, both active and inactive forms of the hormone are sent into circulation. Inactive GCs, cortisone in humans and rodents, travel freely in plasma in high concentrations. When these hormones reach the target tissues, these tissues possess varying levels of activating enzymes that are able to convert between the active and inactive forms. Two microsomal enzymes, collectively referred to as the 11β -hydroxysteroid dehydrogenase (11β -HSD) system, interconvert receptor-active

cortisol and inert cortisone as shown in Fig. 6 (Peckett et al., 2011). Although it is difficult to adequately measure tissue levels of GCs; Masuzaki et al. (2001) have suggested that adipose tissue may have active GCs levels that are 10 to 15 times higher than the circulating levels due to the actions of HSD1B11. Studies have shown that HSD1B11 was a powerful regulator in modulating WAT metabolism and function (Bujalska, Kumar, Hewison, & Stewart, 1999; Stimson & Walker, 2007). Inhibition of HSD1B11 could prevent the differentiation of white adipocyte, reduce white adipose accumulation, and improve the function of WAT (London & Castonguay, 2009; Staab & Maser, 2010).

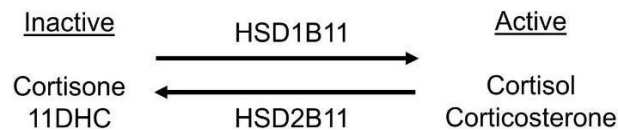


Fig. 6 Sterols inter-conversion by *HSD1B11* and *HSD2B11* in adipose tissue.

Our previous experiments (Quesada et al., 2016b) demonstrate that the expression of the *HSD1B11* mRNA was increased during the first minute of treatment with 0.1, 1, and 10 μ M of cortisone treatment. This response was greater with the 0.1- and 1- μ M treatments, showing 4.5- and 4.8-fold induction, respectively. It is noteworthy that the three concentrations exhibited a similar waved-manner response, and it should be noted that the response with 0.1 and 1 μ M after 20 min returned to control values, while mRNA expression with 10 μ M was decreased ($P < 0.05$). Results found by Kim et al. (2007) characterized a role of HSD1B11 in mediating glucocorticoid-driven adipocyte differentiation. In their studies, they found that 3T3-L1 fibroblasts could be induced to differentiate into adipocytes by five glucocorticoids: dexamethasone, corticosterone, cortisol, dehydrocorticosterone (DHC), and cortisone. Also, these results suggest that HSD1B11 activity is tightly controlled during 3T3-L1 differentiation. Fibroblasts show low mRNA levels of *HSD1B11* but the expression levels are enough to enable the conversion of inactive GCs. This activity will cause the initiation of adipocyte differentiation. Endogenous HSD1B11 levels are increased late during adipogenesis, presumably when the differentiating cells have sufficient capacity to generate NADPH and preserve the oxoreductase activity of HSD1B11 and thus prevent glucocorticoid inactivation and suppression of the adipogenic program (Kim et al., 2007).

Concerning our current experiments, cortisone treatment of murine WA showed no significant modifications in the expression of *HSD1B11* during the first 20 minutes of treatment. However, after 48 hours of treatment, 0.1 and 10 μ M of cortisone caused an induction of 3-folds in *HSD1B11* mRNA expression and 1 μ M showed a

5-fold induction ($P < 0.05$, Fig. 7A). This was different from the results obtained in the cell line 3T3-L1 which showed a repression in *HSD1B11* mRNA expression after 48 h of treatment (0.2- and 0.4-fold induction for 0, 1 and 1 μM , respectively). Our results demonstrate that there are differences between isolated precursors and the cell line 3T3-L1, at least regarding the timing in the induction of *HSD1B11* (Quesada et al., 2016b). Regarding human adipocytes, treatment of SGBS differentiated cells with cortisone showed minor effects in *HSD1B11* mRNA expression. The only significant modification was observed after 5 minutes of treatment with 1 μM of cortisone which caused an increase in 1.5-folds ($P < 0.001$, Fig.7B).

BAT plays an active role in energy expenditure and fatty acid oxidization for heat dissipation (Cannon & Nedergaard, 2004). Evidence has demonstrated that BAT is critically important for energy equilibrium (Liu et al., 2013). Viengchareun, Penforinis, Zennaro, & Lombès, (2001) demonstrate that exposure of human and mouse BAT to chronically elevated GCs levels impairs function by interfering with sympathetic adrenergic signaling and suppression of transcriptional programs that regulate nonshivering thermogenesis. Doig et al. (2017) provide evidence that elevated *HSD1B11* expression within brown adipocytes, as a consequence of GC excess and aging, can impair the BAT thermogenic program, mitochondrial biogenesis, and respiratory capacity. As such, *HSD1B11*-mediated GCs generation can influence the ability of BAT to execute its primary function of thermogenic regulation.

The results obtained from BA treatment with cortisone show a rapid increase (1.5-fold induction) in *HSD1B11* expression which is stabilized after 10 minutes. However, the greater registered induction (2-fold) was observed after 48 hours of cortisone treatment at 10 μM ($P < 0.05$, Fig. 7C). This is similar to what Barclay et al. (2015) showed. In these assays, treatment with dexamethasone induced expression of *HSD1B11* in brown and white preadipocytes. However, this effect was significantly greater in brown preadipocytes. Therefore, these results suggest that the differences in *HSD1B11* expression between brown and white adipocytes may probably reflect contrasted effects of GCs between these tissues rather than their local availability. A report by Lee et al. (2008) revealed that dexamethasone did not enhance the expression of *HSD1B11* in white preadipocytes derived from subcutaneous abdominal fat. In contrast, *HSD1B11* from omental fat was upregulated by dexamethasone, indicating that there are also depot-specific differences in responsiveness of *HSD1B11* to GCs (Lee et al., 2008). Nevertheless, the observation that dexamethasone stimulates the expression of *HSD1B11* could be indicative of a novel stimulatory role for GCs in adipogenesis of BA, potentiated via a feed-forward pathway through the induction of *HSD1B11*.

Further work is needed to address matters in the regulation of adipogenesis and thermogenesis in interplay with glucocorticoid metabolism. Specially regarding *HSD1B11* expression and activity direction; localized glucocorticoid

activation/inactivation, induction of adipogenesis, and development of insulin resistance.

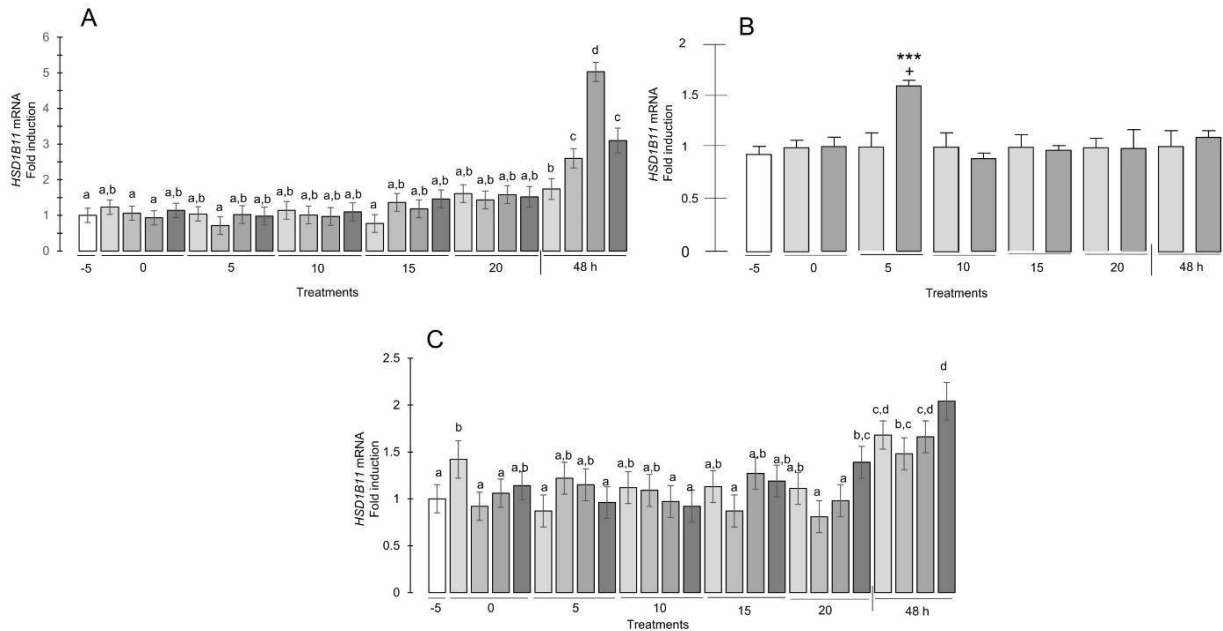


Fig. 7 Effect of cortisone on *HSD1B1* mRNA in adipocytes of mice and human. (A) *HSD1B1* in mice WA. Bars show the relative expression of mRNA from -5 min up to 48 h, as indicated in the figure, for treatments with 0, 0.1, 1 and 10 μ M cortisone. (B) *HSD1B1* in SGBS adipocytes. Bars show the relative expression of mRNA from -5 min up to 48 h, as indicated in the figure, for treatments with 0 and 1 μ M cortisone. (C) *HSD1B1* in mice BA. Bars show the relative expression of mRNA from -5 min up to 48 h, as indicated in the figure, for treatments with 0, 0.1, 1 and 10 μ M cortisone.

The intensity of the bars corresponds to the increase in cortisone concentration. All error bars represent mean \pm SEM, $P < 0.05$ ($n = 4$, SGBS adipocytes $n=3$).

ADRENERGIC STIMULATION EFFECTS OVER *Aqp7*, *GK* and *Hsd1B11* mRNA EXPRESSION

The influence of cortisol on the sensitivity to catecholamines could also be compatible with changes in β -adrenoceptor number or functional coupling to its G_s protein. In 3T3-F442A adipocytes dexamethasone down-regulates β_3 -adrenoceptor protein expression and β_3 -adrenoceptor-mediated adenylate cyclase activity (Fève et al., 1992). Observations made by Ottosson et al. (2000) suggest that cortisol affects the cAMP production rate at the adenylate cyclase level or, alternatively, alters the cAMP elimination rate by stimulating phosphodiesterase activity.

In this sense, AQP7 in 3T3-L1 adipocytes is localized at the periphery of the nucleus in steady state. However, AQP7 translocate to the plasma membrane following adrenaline stimulation, which induces lipolysis (Kishida et al., 2000). Adrenaline does not affect *AQP7* gene expression. However, adrenaline elevates intracellular cAMP levels through adrenergic receptor which then activate protein kinase A (PKA) and will facilitate AQP7 translocation to the membrane. Interestingly, similar results are observed for AQP2, which is a key water channel of the kidney. AQP2 exists in the principal cells of the renal collecting duct (Maeda, Hibuse, & Funahashi, 2009; Nielsen et al., 1995).

In the other hand, it is known that thermogenic activation of BAT is also associated with a strong enhancement of intracellular lipolysis, which produces fatty acids that fuel intracellular thermogenesis. Fatty acids might be released from brown adipocytes to mediate relevant signaling processes either locally or at a distance; noradrenergic- mediated stimulation of lipolysis in cultured brown adipocytes can trigger the release of fatty acids to the medium (Cannon & Nedergaard, 2004; Villarroya et al., 2017). Armengol et al. (2012) showed the action of dexamethasone in BA differentiation and the C/EBP δ -Pref-1 axis, they established that dexamethasone blunted the Pref-1 down-regulation in normal BA differentiation.

We used SGBS differentiated adipocytes treated with cAMP and CL316243 (β 3-agonist) to measure *AQP7*, *GK*, *HSD1B11* and *UCP1* mRNA expression (Fig. 8). The treatment with cAMP was applied by 6 and 24 h and CL316243 only 24 h. While CL316243 results show no β 3-receptor specific effects on the expression of the aforementioned genes, cAMP did show significant modifications in mRNA expression (suggesting a response mediated by other type of β receptors). cAMP treatment of human differentiated SGBS adipocytes show an induction in the expression of the three genes under study, in parallel with *UCP1* (main thermogenic gene marker); which suggests a response to thermogenic activation of adipocytes and also imply an important regulation in glycerol traffic during thermogenic response. To further elucidate in these results, we decided to check for a possible effect on a murine model. We took the data base available for a cold-exposure experiment performed on mice. RNA-seq data were obtained from BAT samples obtained from mice housed under thermoneutral conditions or following a 24h exposure to 4°C. The database analysis software developed by Dr. Cereijo (data set in Quesada-López et al., 2016a) helped us to identify the effects of cold exposure over the expression of *HSD1B11*, *GK* and *AQP7*. In the case of *HSD1B11* and *GK*, the results are concordant with those observed for the RNA-seq. In the case of *AQP7*, although there is a decrease in the induction of *AQP7* upon 24 hours of cAMP treatment, *in vivo* the effects are maintained upon 24 hours of cold exposure. This could mean that the peak in *AQP7* mRNA expression *in vitro* is maintained for short periods of time and what would remain to be elucidated is be the effect over *AQP7* mRNA expression under a chronic cold challenge *in vivo*.

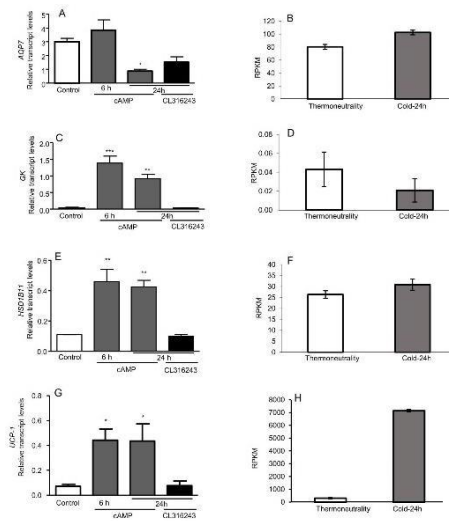


Fig. 8 Effect of cAMP and CL316243 (β 3-agonist) on mRNA (A, B) *AQP7*, (C, D) *GK* and (E, F) *HSD1B11*, and *UCP1* (G, H) expression. All error bars represent mean \pm SEM, $P < 0.01$ ($n = 4$). RPKM = Lectures in millions of kilobases. All error bars represent mean \pm SEM, $P < 0.05$

Conclusions and Future Directions

To date, the mechanisms by which GCs regulate *AQP7* have not been completely elucidated. As for our findings, Fig. 9 summarizes cortisone effects over the mRNA expression of *AQP7*, *GK* and *HSD1B11* in white and brown adipocytes. *AQP7* is an aquaglyceroporin which mRNA expression is induced rapidly upon cortisone treatment in adipocytes. However, after a chronic treatment, *AQP7* mRNA expression in adipose cells is decreased. The regulatory pathways in the distinct adipose depots-derived cells should be better characterized in order to clarify the role of GCs on AQPs and its relevance in the development of metabolic diseases. Also, the mechanisms by which an excessive input of corticosteroids may affect adipose cells' response to metabolic signals (i.e. insulin, catecholamines, etc.) should be clarified not only to better understand the pathophysiology of metabolic diseases but also to identify potential therapeutic targets. In addition, taking into consideration the evidence which suggests that GCs may affect adipocyte thermogenic activation should be an important adverse effect to take into account considering the relevance of this activation as a therapeutic target.

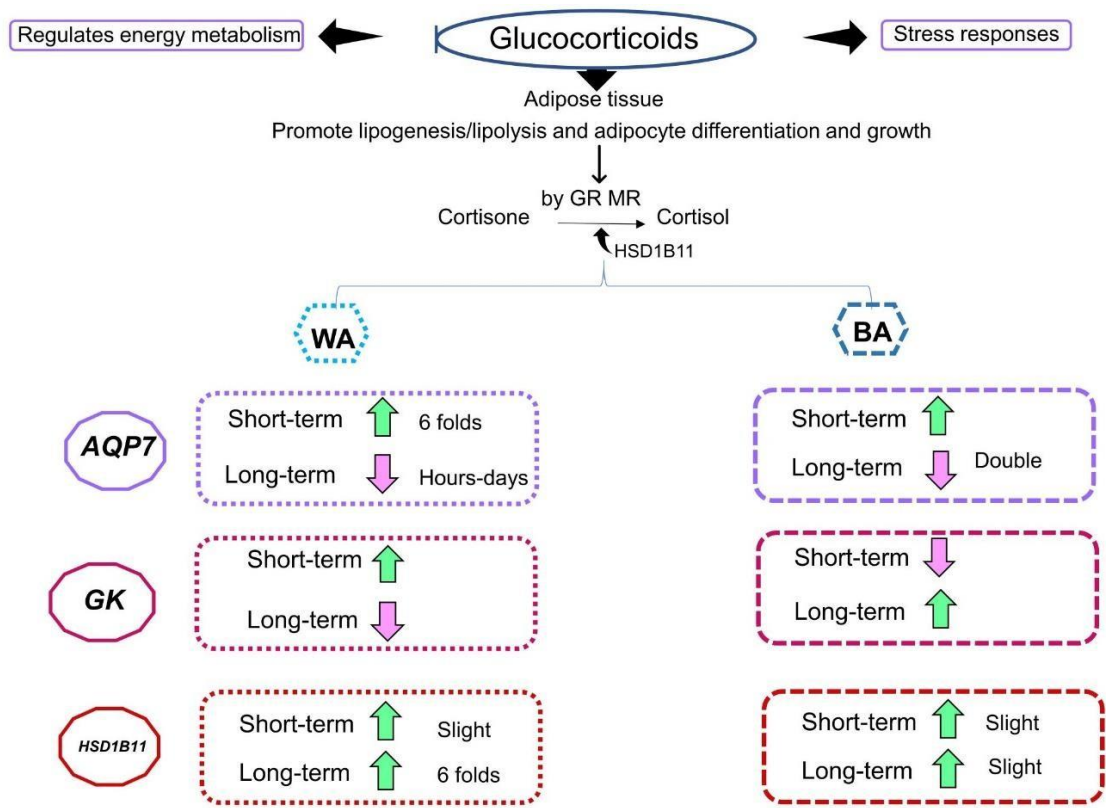


Fig. 9 Summary of the effect of cortisone on the mRNA of *AQP7*, *GK* and *HSD1B11* in white and brown adipocyte cultures.
GR, MR = Glucocorticoids and Mineralocorticoids Receptors.

Acknowledgments

This study was supported by a grant 211559 from CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México City, México) and grant SAF2017-85722R, from MINECO, Spain. LG-D and MA-P contributed in the same way in the development of this study. This work is part of the undergraduate thesis that MA-P submitted to the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). MA-P thanks SNI-CONACYT for a scholarship at Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM. We also thank Martín García-Servín, Alejandra Castilla and Adriana González-Gallardo [INB (Neurobiology Institute)-UNAM, Querétaro, Qro., México] for their technical assistance.

References

- Armengol, J., Villena, J. A., Hondares, E., Carmona, M., Sul, H., Iglesias, R., Giralt, M., Villarroya, F. (2012). Pref-1 in brown adipose tissue: specific involvement in Brown adipocyte differentiation and regulatory role of C/EBP δ . *Biochemistry Journal*, 443(3), 799-810. [https://doi: 10.1042/BJ20111714](https://doi.org/10.1042/BJ20111714).
- Barclay, J. L., Agada, H., Jang, C., Ward, M., Wetzig, N., & Ho, K. K. (2015). Effects of glucocorticoids on human brown adipocytes. *Journal of Endocrinology*, 224(2), 139-147. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0538>.
- Boone, M., Kortenoeven, M. L., Robben, J. H., Tamma, G., & Deen, P. M. (2011). Counteracting vasopressin-mediated water reabsorption by ATP, dopamine, and phorbol esters: mechanisms of action. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 300(3), F761–F771. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00247.2010>.
- Bujalska, I. J., Kumar, S., Hewison, M., & Stewart, P. M. (1999). Differentiation of adipose stromal cells: the roles of glucocorticoids and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology*, 140(7), 3188-3196. <https://doi.org/10.1210/endo.140.7.6868>.
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews*, 84, 277–359. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>.
- Carrière, A., Jeanson, Y., Berger-Müller, S., André, M., Chenouard, V., Arnaud, E., ... Casteilla, L. (2014). Browning of white adipose cells by intermediate metabolites: an adaptive mechanism to alleviate redox pressure. *Diabetes*, 63(10), 3253-3265. <https://doi.org/10.2337/db13-1885>.
- Cereijo, R., & Sánchez-Infante, D. (2017). Brown adipose tissue and browning: More than just a heating device. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*, 64(4), 185-187. <https://doi.org/10.1016/j.endinu.2017.03.001>.
- Ceperuelo-Mallafre, V., Miranda, M., Chacon, M. R., Vilarrasa, N., Megia, A., Gutierrez, C., ... Vendrell, J. (2007). Adipose tissue expression of the glycerol channel aquaporin-7 gene is altered in severe obesity but not in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(9), 3640–3645. <https://doi.org/10.1210/jc.2077-0531>.
- Choi, H. J., Jung, H. J., & Kwon, T. H. (2015). Extracellular pH affects phosphorylation and intracellular trafficking of AQP2 in inner medullary collecting duct cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 308(7), F737–F748. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00376.2014>.
- da Silva, I. V., & Soveral, G. (2017). Aquaporins in Obesity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 969, 227-238. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1057-0_15.

- Day, R. E., Kitchen, P., Owen, D. S., Bland, C., Marshall, L., Conner, A. C., ... Conner, M. T. (2014). Human aquaporins: Regulators of transcellular water flow. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(5), 1492-1506. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.033>.
- Delporte, C. (2017). Aquaporins and Gland Secretion. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 969, 63-79. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1057-0_4.
- Desbriere, R., Vuaroqueaux, V., Achard, V., Boullu-Ciocca, S., Labuhn, M., Dutour, A., & Grino, M. (2006). 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 mRNA is increased in both visceral and subcutaneous adipose tissue of obese patients. *Obesity*, 14(5), 794-798. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.92>.
- Doig, L. C., Fletcher, R. S., Morgan, S. A., McCabe, E. L., Lerner, D. P., Tomlinson, J. W., ... Lavery, G. G. (2017). 11B-HSD1 Modulates the Set Point of Brown Adipose Tissue Response to Glucocorticoids in Male Mice. *Endocrinology*, 158(6), 1964-1976. <https://doi.org/10.1210/en.2016.1722>.
- Fasshauer, M., Klein, J., Lossner, U., Klier, M., Kralisch, S., & Paschke, R. (2003). Suppression of aquaporin adipose gene expression by isoproterenol, TNFalpha, and dexamethasone. *Hormone and Metabolic Reserch*, 35(4), 222-227. <https://doi.org/10.1055/s-2003-39478>.
- Festuccia, W. T., Guerra-Sá, R., Kawashita, N. H., Garófalo, M. A., Evangelista, E. A., Rodrigues, V., ... Migliorini, R.H. (2003). Expression of glycerokinase in brown adipose tissue is stimulated by the sympathetic nervous system. *American Journal of Pphysiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 284(6), R1536-1541. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00764.2002>.
- Fève, B., Baude, B., Krief, S., Strosberg, A. D., Pairault, J., & Emorines, L. J. (1992). Inhibition by dexamethasone of β 3-adrenergic receptor responsiveness in 3T3-F442A adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 267(22), 15909-15915.
- Gazzarrini, S., Kang, M., Epimashko, S., Van Etten, J. L., Dainty, J., Thiel, G., & Moroni, A. (2006). Chlorella virus MT325 encodes water and potassium channels that interact synergistically. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(14), 5355-5360. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600848103>.
- Gunnarson, E., Axehult, G., Baturina, G., Zelenin, S., Zelenina, M., & Aperia, A. (2005). Lead induces increased water permeability in astrocytes expressing aquaporin 4. *Journal Neuroscience*, 136(1), 105-114. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.07.027>.
- Iena, F. M., & Lebeck, J. (2018). Implications of Aquaglyceroporin 7 in Energy Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), E154. <https://doi.org/10.3390/ijms19010154>.

- Ishibashi, K., Morishita, Y., & Tanaka, Y. (2017). The Evolutionary Aspects of Aquaporin Family. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 969, 35-50. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1057-0_2.
- Ishibashi, K., Tanaka, Y., & Morishita, Y. (2014). The role of mammalian supraaquaporins inside the cell. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(5), 1507–1512. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.039>.
- Hibuse, T., Maeda, N., Funahashi, T., Yamamoto, K., Nagasawa, A., Mizunoya, W., ... Shimomura, I. (2005). Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. *Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 10993– 10998. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503291102>.
- Kim, J., Temple, K. A., Jones, S. A., Meredith, K. N., Basko, J. L., & Brady, M. J. (2007). Differential Modulation of 3T3-L1 Adipogenesis Mediated by 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase-1 Levels. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 11038-11046. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606197200>.
- Kishida, K., Kuriyama, H., Funahashi, T., Shimomura, I., Kihara, S., Ouchi, N., Matsuzawa, Y. (2000). Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20896–20902. <https://doi.org/10.1074/jbcM001119200>.
- Kroon, J., Koorneef, L. L., van den Heuvel, J. K., Verzijl, C. R. C., van de Velde, N. M., Mol, I. M. ... Meijer, O. C. (2018). Selective Glucocorticoid Receptor Antagonist CORT125281 Activates Brown Adipose Tissue and Alters Lipid Distribution in Male Mice. *Endocrinology*, 159(1), 535-546. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00512>.
- Lanaspa, M. A., Andres-Hernando, A., Li, N., Rivard, C. J., Cicerchi, C., Roncal-Jimenez, C., ... Beri, T. (2010). The expression of aquaporin-1 in the medulla of the kidney is dependent on the transcription factor associated with hypertonicity, TonEBP. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(41), 31694–31703. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.093690>.
- Lee, M. J., Fried, S. K., Mundt, S. S., Wang, Y., Sullivan, S., Stefanni, A., ... Hermanowski-Vosatka, A. (2008). Depot-specific regulation of the conversion of cortisone to cortisol in human adipose tissue. *Obesity*, 16(6), 1178-1185. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.207>.
- Li, C., & Wang, W. (2017). Molecular Biology of Aquaporins. In: Yang, B. (Eds.), *Aquaporins. Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp.1-34). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1057-0_1.
- Lindgren, C. M., Mahtani, M. M., Widen, E., McCarthy, M. I., Daly, M. J., Kirby, A., ... Lander, E. S. (2002). Genomewide search for type 2 diabetes mellitus susceptibility loci in Finnish families: the Botnia study. *American Journal of Human Genetics*, 70(2), 509–516. <https://doi.org/10.1086/338629>.

- Liu, J., Kong, X., Wang, L., Qi, H., Di, W., Zhang, X., ... Ding, G. (2013). Essential roles of 11 β -HSD1 in regulating brown adipocyte function. *Journal of Molecular Endocrinology*, 50(1), 103-113. <https://doi.org/10.1530/JME-12-0099>.
- London, E., & Castonguay, T. W. (2009). Diet and the role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 on obesity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(7), 485-493. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.02.012>.
- Loos, R. J., Katzmarzyk, P. T., Rao, D. C., Rice, T., Leon, A. S., Skinner, J. S., ... Bouchard, C. (2003). Genome-wide linkage scan for the metabolic syndrome in the HERITAGE Family Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(12), 5935–5943. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030553>.
- Maeda, N. (2012). Implications of aquaglyceroporins 7 and 9 in glycerol metabolism and metabolic syndrome. *Molecular Aspects of Medicine*, 33(5-6), 665-675. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.02.004>.
- Maeda, N., Hibuse, T., & Funahashi, T. (2009). Role of Aquaporin-7 and Aquaporin-9 in Glycerol Metabolism; Involvement in Obesity. In: Beitz, E. (Ed.) *Aquaporins. Handbook of experimental pharmacology*. Springer, https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9_12.
- Masuzaki, H., Paterson, J., Shinyama, H., Morton, N. M., Mullins, J. J., Seckl, J. R., & Flier, J. S. (2001). A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science*, 294(5549), 2166-2170. <https://doi.org/10.1126/science.1066285>.
- Miranda, M., Escote, X., Ceperuelo-Mallafre, V., Alcaide, M. J., Simon, I., Vilarrasa, N., ... Vendrell, J. (2010). Paired subcutaneous and visceral adipose tissue aquaporin-7 expression in human obesity and type 2 diabetes: differences and similarities between depots. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(7), 3470–3479. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-2655>.
- Moure, R., Domingo, P., Gallego-Escuredo, J. M., Villarroya, J., Gutierrez Mdel, M., Mateo, M. G., ... Villarroya, F. (2016). Impact of elvitegravir on human adipocytes: Alterations in differentiation, gene expression and release of adipokines and cytokines. *Antiviral Research*, 132, 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.05.013>.
- National Research Council. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. (8th ed). Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/12910>.
- Nielsen, S., Chou, C. L., Marples, D., Christensen, E. I., Kishore, B. K., & Knepper, M. A. (1995). Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 1013–1017. <https://doi.org/10-1073/pnas.92.4.1013>.

- NOM-062-ZOO-1999. (1999). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales domésticos. *Norma Oficial Mexicana. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA*. Estados Unidos Mexicanos. Diario Oficial de la Federación, 1–19.
- Olesen, E. T., Rutzler, M. R., Moeller, H. B., Praetorius, H. A., & Fenton, R. A. (2011). Vasopressin-independent targeting of aquaporin-2 by selective E-prostanoid receptor agonists alleviates nephrogenic diabetes insipidus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(31), 12949–12954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104691108>.
- Ottosson, M., Lönnroth, P., Björntorp, P., & Edén, S. (2000). Effects of cortisol and growth hormone on lipolysis in human adipose tissue. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *85*(2), 799-803. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.2.6358>.
- Peckett, A. J., Wright, D.C., & Riddell, M. C. (2011). The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism*, *60*(11), 1500-1510. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2011.06.012>.
- Pérez Di Giorgio, J., Soto, G., Alleva, K., Jozefkowicz, C., Amodeo, G., Muschietti, J. P., & Ayub, N. D. (2014). Prediction of aquaporin function by integrating evolutionary and functional analyses. *Journal of Membrane Biology*, *247*(2), 107-125. <https://doi.org/10.1007/s00232-013-9618-8>.
- Prudente, S., Flex, E., Morini, E., Turchi, F., Capponi, D., De Cosmo, S., ... Trischitta, V. (2007). A functional variant of the adipocyte glycerol channel aquaporin 7 gene is associated with obesity and related metabolic abnormalities. *Diabetes*, *56*(5), 1468–1474. <https://doi.org/10.2337/db06-1389>.
- Quesada-López, T., Cereijo, R., Turatsinze, J.V., Planavila, A., Cairó, M., Gavaldà-Navarro, A., ... Villarroya, F. (2016a). The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes. *Nature Communications*, *7*, 13479. <https://doi.org/10.1038/ncomms13479>.
- Quesada-López, T., González-Dávalos, L., Piña, E., & Mora, O. (2016b). HSD1 and AQP7 short-term gene regulation by cortisone in 3T3-L1 adipocytes. *Adipocyte*, *5*(3), 298-305. <https://doi.org/10.1080/21623945.2016.1187341>.
- Rodríguez, A., Marinelli, R. A., Tesse, A., Fruhbeck, G., & Calamita, G. (2015). Sexual dimorphism of adipose and hepatic Aquaglyceroporins in health and metabolic disorders. *Frontiers in Endocrinology*, *5*(6), 171. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00171>.
- Rodríguez, A., Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., García-Navarro, S., Rotellar, F., Valentí, V., ... Frühbeck, G. (2011). Insulin- and leptin-mediated control of aquaglyceroporins in human adipocytes and hepatocytes is mediated via the

- PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(4), E586-597. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1408>.
- Rodríguez, A., Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., & Frühbeck, G. (2006). Role of aquaporin-7 in the pathophysiological control of fat accumulation in mice. *FEBS Letters*, 580(20), 4771-4776. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.080>.
- Rojek, A., Praetorius, J., Frokiaer, J., Nielsen, S., & Fenton, R. A. (2008). A current view of the mammalian aquaglyceroporins. *Annual Review of Physiology*, 70, 301–327. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100452>.
- Staab, C. A., & Maser, E. (2010). 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an important regulator at the interface of obesity and inflammation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 119(1-2), 56-72. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.12.013>.
- Stewart, P. M., & Petersenn, S. (2009). Rationale for treatment and therapeutic options in Cushing's disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 23(Suppl 1), S15-22. [https://doi.org/10.1016/S1521-690X\(90\)70004-1](https://doi.org/10.1016/S1521-690X(90)70004-1).
- Stimson, R. H., & Walker, B. R. (2007). Glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obesity and the metabolic syndrome. *Minerva Endocrinologica*, 32(3), 141-159.
- Tamma, G., Carmosino, M., Svelto, M., & Valenti, G. (2005). Bradykinin signaling counteracts cAMP-elicited aquaporin 2 translocation in renal cells. *Journal of American Society of Nephrology*, 16, 2881–2889. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005020190>.
- Verkman, A. S., Anderson, M. O., & Papadopoulos, M. C. (2014). Aquaporins: important but elusive drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13, 259–277. <https://doi.org/10.1038/nrd4226>
- Viengchareun, S., Penforis, P., Zennaro, M. C., & Lombès, M. (2001). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors inhibit UCP expression and function in brown adipocytes. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 280(4), E640–E649. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.4.E640>.
- Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J., & Giralt, M. (2017). Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(1), 26-35. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.136>.
- Yeh, J. I., Charrier, V., Paulo, J., Hou, L., Darbon, E., Claiborne, A., Deutscher, J. (2004). Structural of enterococcal glycerol kinase in the absence and presence of glycerol: Correlation of conformation to substrate binding and mechanism of activation by phosphorylation. *Biochemistry*, 43, 362–373. <https://doi.org/10.1021/bi034258o>.

- Zardoya, R., & Villalba, S. (2001). A phylogenetic framework for the aquaporin family in eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, *52*, 391–404. <https://doi.org/10.1007/s002390010169>.
- Zhang, Y., Peti-Peterdi, J., Muller, C. E., Carlson, N. G., Baqi, Y., Strasburg, D. L., ... Kishore, B. K. (2015). P2Y₁₂ receptor localizes in the renal collecting duct and its blockade augments arginine vasopressin action and alleviates nephrogenic diabetes insipidus. *Journal of the American Society of Nephrology*, *26*(12), 2978–2987. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014010118>.

10. Referencias citadas

- Agre, P. y Kozono, D. (2003). Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Letters*, Vol. 555, Issue 1, Pages 72-78. doi:10.1016/S0014-5793(03)01083-4
- Barclay, J. L., Agada, H., Jang, C., Ward, M., Wetzig, N., y Ho, K. K. (2015). Effects of glucocorticoids on human brown adipocytes. *Journal of Endocrinology*, 224(2), 139-147. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0538>.
- Berg F, Gustafson U & Andersson L. (2006). The uncoupling protein 1 gene (UCP1) is disrupted in the pig lineage: a genetic explanation for poor thermoregulation in piglets. *PLoS Genet*. Aug 18;2(8):e129.
- Bernlohr, D., y Simpson, M. (1996). Chapter 10 – Adipose tissue and lipid metabolism. *New comprehensive biochemistry*. Vol. 31. Pp. 257-281. [https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(08\)60517-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60517-7)
- Busada, J. y Cidlowski, J. (2017). Mechanisms of glucocorticoid action during development. *Current topics in developmental biology*. Vol. 125. Pp 147-170. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.12.004>
- Dattani, M. y Gevers, E., 2016. Chapter 22 – Endocrinology of fetal development. *Williams textbook of endocrinology (Thirteenth edition)*. Pp. 849-892. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-29738-7.00022-8>
- Engelking, L. (2015) Chapter 70 – Lipolysis. *Textbook of veterinary physiological chemistry (Third edition)*. Pp 445-449 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391909-0.50070-0>
- Fasshauer, M., Klein, J., Lossner, U., Klier, M., Kralisch, S., & Paschke, R. (2003). Suppression of aquaporin adipose gene expression by isoproterenol, TNFalpha, and dexamethasone. *Hormone and Metabolic Research*, 35(4), 222-227. <https://doi.org/10.1055/s-2003-39478>.
- Fernández, V., Torrecilla, G. y Rubio, H. (2011). Endocrinología y Nutrición. *Apr*;58(4):153-6. doi: 10.1016/j.endonu.2010.12.003. Epub 2011 Mar 2
- Frühbeck, G. (2015). Aquaporin enters the picture. *Obesity. Nature* Pp.438, 436-437.
- Hewagalamulage, S.D., Lee, T.K., Clarke, I.J. Henry, B.A. (2015). Stress, cortisol, and obesity: a role for cortisol responsiveness in identifying individuals prone to obesity. *Domestic animal endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.03.004>
- Hibuse, T., Maeda, N., Funahashi, T., Yamamoto, K., Nagasawa, A., Mizunoya, W., Kishida, K., Inoue, K., Kuriyama, H., Nakamura, T., Fushiki,

- T., Kihara, S. y Shimomura, I. (2005) Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. *PNAS*, Vol. 102. No. 31. Pp.10993-10998. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0503291102
- Kishida, K., Shimomura, I., Kondo, H., Kuriyama, H., Makino, Y., Nishizawa, H., Maeda, N., Matsuda, N., Ouchi, N., Kihara, S., Kurachi, Y., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y. (2001). Genomic Structure and Insulin-mediated Repression of the Aquaporin Adipose (AQPap), Adipose-specific Glycerol Channel. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 276. No. 39. Pages 36251-36260. DOI 10.1074/jbc.M106040200
 - Laforenza, U., Gastaldi, G., Grazioli, M., Cova, E., Tritto, S., Faelli, A., Calamita, G. y Ventura, U. (2012). Expression and immunolocalization of aquaporin-7 in rat gastrointestinal tract. *Wiley Online Library*. <https://doi.org/10.1042/BC20040090>
 - Laforenza, U., Bottino, C., Gastaldi, G. (2015). Mammalian aquaglyceroporin function in metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*.
 - Lee, M. J., Fried, S. K., Mundt, S. S., Wang, Y., Sullivan, S., Stefanni, A., ... Hermanowski-Vosatka, A. (2008). Depot-specific regulation of the conversion of cortisone to cortisol in human adipose tissue. *Obesity*, 16(6), 1178-1185. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.207>.
 - London, E y Castonguay T. (2009) Diet and the role on 11b-hydroxysteroid dehydrogenase-1 on obesity. *Journal of Nutritional Biochemistry* 20 485–493. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.02.012
 - Luna-Moreno, (2012). Adaptacones metabólicas a la respuesta a glucocorticoides durante la expresión del oscilador Sincronizado por Alimento. UNAM.
 - MacDougal, O., y Burant, C. (2005). Obesity and metabolic perturbations after loss of aquaporin 7, the adipose glycerol transporter. *PNAS*, Vol. 102, no. 31, Pages 10759-10760. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504965102>
 - Meruane, M. y Rojas, M. Células troncales derivadas del tejido adiposo. *Int. J. Morphol.*, 28(3):879-889, 2010.
 - Pujols, L. (2015) *Medicina respiratoria*, 8 (3):31-42.
 - Quesada-López, T., González-Dávalos., L, Piña, E. y Mora, O. (2016) HSD1 and AQP7 short-term gene regulation by cortisone in 3T3-L1 adipocytes, *Adipocyte*, 5:3, 298-305, DOI: 10.1080/221623945.2016.1187341
 - Qiang L, H Wang, y SR Farmer. (2007). Adiponectin Secretion Is Regulated by SIRT1 and the Endoplasmic Reticulum Oxidoreductase Ero1-L α . *Mol Cell Biol*. 27 (13): 4698–4707.

- Ramamoorthy, S., y Cidlowski, J. A. (2016). Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheumatic diseases clinics of North America*, 42(1), 15-31, vii. doi: 10.1016/j.rdc.2015.08.002
- Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C., Kalhan, S., Tilghman, S. y Hanson, R. 2003. Glyceroneogenesis and the Triglyceride/Fatty Acid Cycle. *The Journal of Biological Chemistry*. DOI 10.1074/jbc.R300017200
- Rodríguez, A., Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., Frùhbeck, G. (2006). Role of aquaporin-7 in the pathophysiological control off at accumulation in mice. *FEBS Letters*, Vol. 580, Issue 20, Pages 4771-4776. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.080>
- Rodríguez-González M, Espinosa-Rosales F. Uso de glucocorticoides sistémicos en pediatría: generalidades. *Acta Pediátrica de México*; 37(6):349-354. <http://www.scielo.org.mx/pdf/apm/v37n6/2395-8235-37-06-00349.pdf>
- San Phan, T., Merk, V., y Brunner, T. (2019). Extra-adrenal glucocorticoid synthesis at epithelial barriers. *Genes and immunity*. <https://www.nature.com/articles/s41435-019-0058-z>
- Shapiro B y E Wertheimer. (1943). Fatty acid dehydrogenase in adipose tissue. *Biochem J*. 37 (1): 102-104.
- Shen, F., Gu, X., Pan, W., Li, W., Li, W., Ye, J., Yang, L., Gu, X., Ni, L. (2012). Over-expression of AQP7 contributes to improve insulin resistance in adipocytes. *Experimental Cell Research*. Vol. 318, Issue 18, Pp. 2377-2384. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.07.016>
- Taves MD, Gomez-Sanchez CE, Soma KK. (2011) Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: E11–E24, doi:10.1152/ajpendo.00100.2011
- Townsend, K. y Tseng, Y. (2012). Brown adipose tissue. *Adipocyte*. Jan 1; 1(1): 13–24. doi: 10.4161/adip.18951
- Verma, S., Nagashima, K., Yaligar, J., Michael, N., Shean, S., Xianfeng, T., Gopalan, V., Sadananthan, S., Anantharaj, R., y Velan, S. (2016). Differentiating brown and white adipose tissues by high-resolution diffusion NMR spectroscopy. *J Lipid Res.*; 58(1): 289–298 doi: 10.1194/jlr.D072298
- Walker, B. (2006) Cortisol-casuse and cure for metabolic syndrome? *Diabetic Medicine*. Vol. 23, Issue 12. Pp. 1281-1288. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2006.01998.x>

- Wang, J., Feng, L., Zhu, Z. et al. (2015) Aquaporins as diagnostic and therapeutic targets in cancer: How far we are? *J Transl Med* 13: 96. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0439-7>
- Xu, C., He, J., Jiang, H., Zu, L., Zhai, W., Pu, S., Xu, G., (2009) Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes. *Mol Endocrinol.* 2009 Aug;23(8):1161-70. doi: 10.1210/me.2008-0464.
- Zhou, J., y Cidlowski J. (2005) The human glucocorticoid receptor: One gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids.* Vol. 70, Issue 5-7, Pp. 407-4017. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2005.02.006>