

# ESTUDI DELS CANVIS PROMOGUTS PER LA CIRURGIA BARIÀTRICA A NIVELL D'EXPRESSIÓ GÈNICA DEL TEIXIT ADIPÓS SUBCUTANI I LA RELACIÓ AMB LA SENSIBILITAT A LA INSULINA

**Gemma Xifra Villarroya**

Per citar o enllaçar aquest document:

Para citar o enlazar este documento:

Use this url to cite or link to this publication:

<http://hdl.handle.net/10803/403497>

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

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

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

Tesi Doctoral

**ESTUDI DELS CANVIS PROMOIGUTS PER LA CIRURGIA  
BARIÀTRICA A NIVELL D'EXPRESSIÓ GÈNICA EN TEIXIT  
ADIPÓS SUBCUTANI I LA RELACIÓ AMB LA SENSIBILITAT A  
LA INSULINA**



**Gemma Xifra Villarroya**

**2016**

  
**Universitat  
de Girona**  














## **TESI DOCTORAL**

---

**Estudi dels canvis promoguts per la cirurgia bariàtrica a nivell d'expressió gènica en el teixit adipós subcutani i la relació amb la sensibilitat a la insulina.**

**Gemma Xifra Villarroya**

**2016**







Tesi Doctoral

**Estudi dels canvis promoguts per la cirurgia bariàtrica  
a nivell d'expressió gènica en teixit adipós subcutani i  
la relació amb la sensibilitat a la insulina.**

Gemma Xifra Villarroya

2016

Programa de doctorat: "Ciències experimentals i sostenibilitat"

Dirigida pel Dr. José Manuel Fernández-Real

Memòria presentada per optar al títol de doctora per la Universitat de Girona.



Als meus pares, avis, germà  
i Joan.



# ÍNDEX GENERAL

---

	PÀG.
<b>I. CERTIFICAT DE DIRECCIÓ DE TESI.....</b>	<b>15</b>
<b>II. ACRÒNIMS, ABREVIACIONS I ANGLICISMES .....</b>	<b>19</b>
<b>III. INDEX DE TAULES.....</b>	<b>23</b>
<b>IV. INDEX DE FIGURES .....</b>	<b>27</b>
<b>V. RESUM/RESUMEN/ABSTRACT .....</b>	<b>33</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>41</b>
1.1. OBESITAT.....	43
1.1.1. <i>Definició.....</i>	43
1.1.2. <i>Etiopatogènia de la obesitat .....</i>	46
1.1.3. <i>Comorbiditats associades a obesitat. ....</i>	47
1.1.4. <i>Obesitat, resistència a la insulina i diabetes Mellitustipus 2. ....</i>	48
1.1.5. <i>Tractament de la obesitat.....</i>	50
1.2. TEIXIT ADIPÓS .....	55
1.2.1. <i>Fisiologia del teixit adipós. ....</i>	56
1.2.2. <i>Expressió gènica teixit adipós i estat pro-inflamatori crònic .....</i>	60
<b>2. HIPÒTESI.....</b>	<b>63</b>
<b>3. OBJECTIUS .....</b>	<b>67</b>
<b>4. SUBJECTES I METODOLOGIA.....</b>	<b>71</b>
4.1. DISSENY EXPERIMENTAL .....	73
4.2. SUBJECTES D'ESTUDI.....	73
4.3. DETERMINACIONS CLÍNiques.....	74
4.3.1. <i>Caracterització antropomètrica. ....</i>	74
4.3.2. <i>Caracterització bioquímica.....</i>	75
4.3.3. <i>Test de tolerància oral a la glucosa .....</i>	76
4.3.4. <i>Sensibilitat a la insulina.....</i>	76
4.4. DETERMINACIONS DE LABORATORI.....	78
4.4.1. <i>Protocol obtenció de les mostres de teixit adipós .....</i>	78
4.4.2. <i>Protocol per a l'anàlisi d'expressió gènica. ....</i>	79
4.5. ANÀLISI ESTADÍSTIC .....	85
<b>5. RESULTATS.....</b>	<b>87</b>
5.1. CARACTERITZACIÓ DE LES COHORTS.....	89
5.2. RESULTATS DEL PRIMER OBJECTIU: ESTUDI DELS CANVIS EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE SAT DESPRÉS DE LA PÈRDUA DE PES PROMOGUDA PER LA CB. ....	93

5.3.	RESULTATS DEL SEGON OBJECTIU. APROFUNDIR EN L'ESTUDI DE 5 DELS GENS QUE MÉS VEUEN MODIFICADA LA SEVA EXPRESSIÓ DESPRÉS DE LA PÈRDUA DE PES PROMOGUDA PER LA CB. ....	96
5.3.1.	<i>Proteïna-G reguladora de senyal tipus-1 (RGS-1)</i> .....	99
5.3.2.	<i>Lysozyme (LYZ)</i> .....	104
5.3.3.	<i>Transportador d'àcids grassos de la família 27 (SLC27A2)</i> .....	108
5.3.4.	<i>Olfactomedina-2 (OLFM2)</i> .....	113
5.3.5.	<i>Plakophilin-2 (PKP2)</i> .....	117
5.3.6.	<i>Estudi del canvi en l'expressió de SAT de RGS-1, OLFM2, PKP2, LYZ i SLC27a2 promogut per l'acte quirúrgic:</i> .....	121
5.4.	RESULTATS DEL TERCER OBJECTIU: ESTUDIAR ELS CANVIS EN LA SENSIBILITAT A LA INSULINA DESPRÉS DE LA PÈRDUA DE PES PROMOGUDA PER LA CB I LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB ELS CANVIS EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA DEL TEIXIT SUBCUTANI.....	122
<b>6.</b>	<b>DISCUSSIÓ</b> .....	<b>125</b>
6.1.	OBJECTIU 1: CANVIS EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA DEL TEIXIT ADIPÓS DESPRÉS DE LA CIRURGIA BARIÀTRICA.....	128
6.2.	OBJECTIU 2: APROFUNDIR EN L'ESTUDI D'UNA SELECCIÓ DE 5 GENS DELS QUE MÉS VEUEN MODIFICADA LA SEVA EXPRESSIÓ DESPRÉS DE LA CIRURGIA BARIÀTRICA I LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB PARÀMETRES CLÍNICS I AMB L'EXPRESSIÓ D'ALTRES FACTORS. ....	134
6.2.1.	<i>Proteïna reguladora de senyal tipus 1 (RGS-1)</i> .....	134
6.2.2.	<i>Lysozyme (LYZ)</i> .....	140
6.2.3.	<i>Solute carrier family 27 A2 (SCL27A2)</i> .....	144
6.2.4.	<i>Olfactomedina-2 (OLFM2)</i> .....	147
6.2.5.	<i>Plakophilina-2 (PKP2)</i> .....	150
6.3.	ESTUDI DEL CANVI EN L'EXPRESSIÓ DE SAT DE RGS-1, OLFM2, PKP2, LYZ I SLC27A2, PROMOGUT PER L'ACTE QUIRÚRGIC: .....	153
6.4.	OBJECTIU 3: ESTUDIAR ELS CANVIS EN LA SENSIBILITAT A LA INSULINA DESPRÉS DE LA PÈRDUA DE PES PROMOGUDA PER LA CB I LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB ELS CANVIS EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA DEL TEIXIT SUBCUTANI.....	154
6.5.	LIMITACIONS DE L'ESTUDI .....	161
6.6.	FORTALESES DE L'ESTUDI .....	161
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>163</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÈNCIES</b> .....	<b>167</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXES</b> .....	<b>185</b>
9.1.	DOCUMENT D'APROVACIÓ COMITÈ ÈTIC D'INVESTIGACIÓ CLÍNICA .....	187
9.2.	ACTIVITAT DEL DOCTORANT EN LA INVESTIGACIÓ DEL TEIXIT ADIPÓS. ....	189
9.2.1.	<i>Articles indexats a pubmed.</i> .....	189

# I. CERTIFICAT DE DIRECCIÓ DE TESI

---





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

Certifico:

Que el present treball, titulat “**Estudi dels canvis promoguts per la cirurgia bariàtrica a nivell d’expressió gènica en teixit adipós i la relació amb la sensibilitat a l’insulina**”, que presenta **Gemma Xifra Villarroya** per a la obtenció del títol de doctora, ha estat realitzat sota la meua direcció i que compleix els requeriments per poder optar a aquest títol.

Firma:

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping, stylized strokes that form a complex, abstract shape.

Girona, 23 de novembre de 2015



## **II. ACRÒNIMS, ABREVIACIONS I ANGLICISMES**

---



AT	<i>Teixit adipós "Adipose Tissue"</i>
BAT	<i>Teixit adipós marró "Brown adipose tissue"</i>
BPG	<i>By-pass gàstric</i>
CB	<i>Cirurgia Bariàtrica</i>
DEXA	<i>Absorciometria de raig X d'energia dual</i>
DM2	<i>Diabetes mellitus de tipus 2</i>
DNA	<i>Àcid desoxiribonucleic "Deoxyribonucleic acid"</i>
HbA1c	<i>Hemoglobina glicada o glicosilada</i>
HDL	<i>Lípids d'alta densitat "High-density lipoprotein"</i>
HOMA	<i>Modelo homeostàtic de resistència a la insulina "Homeostasis Model Assessment"</i>
ICC	<i>Índex Cintura-Cadera</i>
IMC	<i>Índex de Masa Corporal</i>
LDL	<i>Lípids de baixa densitat "low-density lipoprotein"</i>
OMS	<i>Organització Mundial de la Salut</i>
RNA	<i>Àcid ribonucleic "ribonucleic acid"</i>
RT-PCR	<i>Reacció en cadena de la polimerasa en temps real.</i>
SAT	<i>Teixit adipós subcutàni "subcutaneous adipose tissue"</i>
SU	<i>Sulfonilurees</i>
TG	<i>Triglicèrids</i>
TSH	<i>Tirotropina "thyroid-stimulating hormone"</i>
TTOG	<i>Test de tolerància oral a la glucosa</i>
VAT	<i>Teixit adipós visceral "visceral adipose tissue"</i>
WAT	<i>Teixit adipós blanc "white adipose tissue"</i>



### **III. INDEX DE TAULES**

---





<b>Taula 1:</b> Criteris resolució DM2 American Diabetes Association 2009. ....	49
<b>Taula 2:</b> Fenotipació clínica i analítica bàsica de les cohorts 1 i 2. ....	90
<b>Taula 3:</b> Fenotipació clínica i analítica bàsica de la cohort 3.....	91
<b>Taula 4:</b> Fenotipació clínica i analítica bàsica de la cohort 4.....	92
<b>Taula 5:</b> Recull dels gens que més veuen modificada la seva expressió ( <i>Log2 fold change</i> ) a l'estudi d'expressió gènica en SAT mitjançant tècniques de <i>microarray</i> . Cohort 1. ....	93
<b>Taula 6:</b> Estudi expressió gènica en SAT mitjançant <i>RT-PCR</i> . Cohort 1 i 2. Estudiats els gens que més canvien al <i>microarray</i> i una selecció d'altres gens d'interès. Cohort 1 i 2. ....	95
<b>Taula 7:</b> Associació entre expressió gènica en SAT dels 5 gens a estudi i l'expressió gènica d'altres factors. Expressió determinada mitjançant <i>RT-PCR</i> . Cohort 2. ....	97
<b>Taula 8:</b> Estudi expressió gènica en SAT mitjançant <i>RT-PCR</i> inici-final de la CB. cohort 4. ....	121
<b>Taula 9:</b> Associacions entre percentatge de canvi M-CLAMP i percentatge de canvi d'expressió gènica en SAT (determinada a través de <i>RT-PCR</i> ) després de la CB. ....	123
<b>Taula 10:</b> Associació entre percentatge de canvi de M-CLAMP i percentatge de canvi d'expressió relativa ( <i>RT-PCR</i> ). ....	124
<b>Taula 11:</b> Resum literatura existent on s'avalua a través de tècniques de <i>microarray</i> els canvis en l'expressió gènica en teixit adipós després de pèrdua de pes. ....	129
<b>Taula 12:</b> Resum literatura existent on es valora la sensibilitat a la insulina a través de CLAMP abans i després de cirurgia bariàtrica. ....	156



## **IV. INDEX DE FIGURES**

---



<b>Figura 1:</b> procediments quirúrgics mes emprats per portar a terme la CB.....	53
<b>Figura 2:</b> Tècniques quirúrgiques emergents per al tractament de la obesitat i la diabetis associada a obesitat.. ..	54
<b>Figura 3:</b> Esquema procés de lipogènesi (A) i de lipolisi (B) .....	59
<b>Figura 4:</b> Esquema procediments d'un CLAMP Euglucèmic Hiperinsulinèmic. ....	77
<b>Figura 5:</b> Esquema procediment de retrotranscripció. ....	80
<b>Figura 6:</b> Esquema de procediments <i>PCR</i> en temps real. ....	82
<b>Figura 7:</b> Esquema procediment <i>Microarray Affymetrix GeneChip® Human Gene 2.0 ST</i> . ....	84
<b>Figura 8:</b> 95% de l'interval de confiança de l'expressió relativa d'RGS-1 en SAT determinada per <i>RT-PCR</i> abans i després de la CB i en el grup control.....	99
<b>Figura 9:</b> Correlació entre l'expressió de RGS-1 calculada a través de <i>RT-PCR</i> i l'expressió gènica d'altres factors pro-inflamatoris com són IL-6 (interleucina-6), IL-8 (Interleucina-8) i TNF- $\alpha$ (factor de necrosi tumoral- $\alpha$ ). ....	100
<b>Figura 10:</b> Correlació entre l'expressió de RGS-1 calculada a través de <i>RT-PCR</i> i l'expressió gènica del marcador de macròfags ITGAX separat per sexes .....	101
<b>Figura 11:</b> Correlació entre l'expressió de RGS-1 calculada a través de <i>RT-PCR</i> i l'expressió d'interleuquina 10. ....	101
<b>Figura 12:</b> Correlació entre l'expressió de RGS-1 calculada a través de <i>RT-PCR</i> i GLUT-4 i amb l'expressió dels gens lipogènics tip47 i ADRP.....	102
<b>Figura 13:</b> Correlació entre l'expressió de RGS-1 calculada a través de <i>RT-PCR</i> i l'expressió de CO3 i TMEM26. ....	103
<b>Figura 14:</b> Correlació entre l'expressió de RGS-1 calculada a través de <i>RT-PCR</i> i l'expressió de DIO-1. ....	103

<b>Figura 15:</b> 95% de d'interval de confiança de l'expressió relativa LYS en SAT determinada per <i>RT-PCR</i> abans i després de la CB i en el grup control. ....	104
<b>Figura 16:</b> Correlació entre l'expressió de LYZ calculada a través de <i>RT-PCR</i> amb l'IMC i la concentració de triglicèrids en plasma.....	105
<b>Figura 17:</b> Correlació entre l'expressió de LYZ calculada a través de <i>RT-PCR</i> i l'expressió de ITGAX i TNF- $\alpha$ . ....	105
<b>Figura 18:</b> Correlació entre l'expressió de LYZ calculada a través de <i>RT-PCR</i> i l'expressió d' IL-10.....	106
<b>Figura 19:</b> Correlació entre l'expressió de LYZ calculada a través de <i>RT-PCR</i> i l'expressió dels gens FLVCR2, GLUT-4 i IRS-1. ....	106
<b>Figura 20:</b> Correlació entre l'expressió de LYZ calculada a través de <i>RT-PCR</i> i el log10 de l'expressió de CO3.....	107
<b>Figura 21:</b> 95% de d'interval de confiança de l'expressió relativa de SLC27A2 en SAT determinada per <i>RT-PCR</i> abans i després de la CB i en el grup control. ....	108
<b>Figura 22:</b> Associació entre l'expressió relativa de SLC27A2 en SAT determinada mitjançant <i>RT-PCR</i> i l'IMC.....	109
<b>Figura 23:</b> Associació entre l'expressió relativa de SLC27A2 en SAT determinada mitjançant <i>RT-PCR</i> i l'expressió de BCRA1. ....	109
<b>Figura 24:</b> Associació entre l'expressió relativa de SLC27A en SAT determinada mitjançant <i>RT-PCR</i> i l'expressió de RBL1 i ATF6.....	110
<b>Figura 25:</b> Associació entre l'expressió relativa de SLC27A en SAT determinada mitjançant <i>RT-PCR</i> i l'expressió de CD14 i SPP1.....	110
<b>Figura 26:</b> Associació entre l'expressió relativa de SLC27A en SAT determinada mitjançant <i>RT-PCR</i> i l'expressió de IREB2 i IRS1.....	111

<b>Figura 27:</b> Associació entre l'expressió relativa de SLC27A en SAT determinada mitjançant <i>RT-PCR</i> i l'expressió de DIO1 i TRB2. ....	111
<b>Figura 28:</b> Associació entre l'expressió relativa de SLC27A2 en SAT determinada mitjançant <i>RT-PCR</i> i l'expressió de CBS i ALMS1.....	112
<b>Figura 29:</b> 95% de d'interval de confiança de l'expressió relativad'OLFM2 en SAT determinada per <i>RT-PCR</i> abans i després de la CB i en el grup control. ....	113
<b>Figura 30:</b> Associació entre l'expressió relativa d'OLFM2 en SAT determinada mitjançant <i>RT-PCR</i> i edat, separat per sexe i separat per obesitat.....	114
<b>Figura 31:</b> Associació entre l'expressió relativa d'OLFM2 en SAT determinada mitjançant <i>RT-PCR</i> i el valor de HOMA-IR, i associació entre OLFM2 i concentració d'insulina plasmàtica basal. ....	114
<b>Figura 32:</b> Associació entre l'expressió relativa d'OLFM2 en SAT determinada mitjançant <i>RT-PCR</i> i l'expressió del gen FSP27.....	115
<b>Figura 33:</b> Associació positiva entre l'expressió relativa d'OLFM2 en SAT determinada mitjançant <i>RT-PCR</i> i l'expressió del gen GLUT-4. Associació negativa entre l'expressió relativa d'OLFM2 en SAT determinada mitjançant <i>RT-PCR</i> i l'expressió dels gens CD14, TLR2, Ferroprotina-1. ....	115
<b>Figura 34:</b> Associació positiva entre l'expressió relativa d'OLFM2 en SAT determinada mitjançant <i>RT-PCR</i> i l'expressió de ALAD, PEDF i IRF3.....	116
<b>Figura 35:</b> Associació entre l'expressió relativa d'OLFM2 en SAT determinada mitjançant <i>RT-PCR</i> i l'expressió d'ACY1.....	116
<b>Figura 36:</b> 95% de d'interval de confiança de l'expressió relativa de PKP2 en SAT determinada per <i>RT-PCR</i> abans i després de la CB i en el grup control. ....	117
<b>Figura 37:</b> Associació entre l'expressió relativa de PKP2 en SAT determinada per <i>RT-PCR</i> i l'IMC .....	118



<b>Figura 38:</b> Associació entre l'expressió relativa de PKP2 en SAT determinada per <i>RT-PCR</i> i l'expressió gènica de CD14 i del receptor d'eritropoietina.....	118
<b>Figura 39:</b> Associació entre l'expressió relativa de PKP2 en SAT determinada per <i>RT-PCR</i> i l'expressió gènica de TIMP3 i d'INSIG1.....	119
<b>Figura 40:</b> Associació entre l'expressió relativa de PKP2 en SAT determinada per <i>RT-PCR</i> i l'expressió gènica de deiodinasa-1 i de TRB2.....	119
<b>Figura 41:</b> Associació entre l'expressió relativa de PKP2 en SAT determinada per <i>RT-PCR</i> i l'expressió gènica d'ATF6 i BAX.....	120
<b>Figura 42:</b> Comparació de mitjanes de M-CLAMP abans i després de la CB. ....	122
<b>Figura 43:</b> Associació entre percentatge de canvi de M-CLAMP ( $\log(10)$ del percentatge de canvi) i el percentatge de canvi en l'expressió relativa de IL-6, TNF- $\alpha$ , Receptor de IL1 i MCR1, determinada per <i>RT-PCR</i> .....	123
<b>Figura 44:</b> Esquema de l'actuació dels reguladors de proteïna G .....	135

## V. RESUM/RESUMEN/ABSTRACT

---



## **Estudi dels canvis promoguts per la cirurgia bariàtrica a nivell d'expressió gènica en teixit adipós subcutani i la relació amb la sensibilitat a la insulina.**

**INTRODUCCIÓ:** L'obesitat és actualment un dels problemes de salut pública més important en la majoria de països industrialitzats, amb una incidència creixent i un fort impacte socioeconòmic. La relació entre obesitat i diabetis tipus 2 (DM2) és tal, que ha motivat la consolidació de la cirurgia bariàtrica (CB) com una opció de tractament, no només de la obesitat, sinó també de les comorbiditats associades a obesitat, especialment la DM2. La CB és la única opció de tractament que ha demostrat ser capaç de resoldre la DM2 associada a obesitat en un elevat percentatge de casos. A més de l'impacte en la obesitat i les comorbiditats associades, la CB ha demostrat tenir un gran impacte en la fisiologia del teixit adipós, modificant la seva expressió gènica i esdevenint un valuós model per comprendre millor els mecanismes fisiopatològics pels quals té lloc aquesta milloria del perfil metabòlic.

**HIPÒTESI:** La CB modifica l'expressió gènica del teixit adipós subcutani (SAT) i contribueix a explicar els canvis en la sensibilitat a la insulina.

**OBJECTIUS:** Avaluar els canvis en l'expressió gènica de SAT després de la pèrdua de pes promoguda per la CB. Investigar quins són els gens que més modifiquen la seva expressió i quines associacions presenten aquests canvis amb l'expressió d'altres factors i amb les variables clíniques que més modifiquen després de la CB com és la sensibilitat a la insulina.

**SUBJECTES I METODOLOGIA:** Per valorar els canvis en l'expressió gènica de SAT promoguts per la CB, s'estudia una cohort conformada per 25 dones obesas mòrbides, operades de cirurgia bariàtrica mitjançant bypass gàstric (BPG) (*Cohort 1*). Els canvis en l'expressió gènica de SAT són estudiats a través de l'anàlisi de *microarray* i validats mitjançant *RT-PCR* per aquells gens que més veuen modificada la seva expressió. La sensibilitat a la insulina s'estudia mitjançant CLAMP euglucèmic hiperinsulinèmic en un subgrup de 10 pacients de la *Cohort 1* abans i després de la màxima pèrdua de pes. Les associacions trobades a la *cohort 1* són explorades en una segona cohort conformada per 25 dones primes aparellades per edat, operades de manera electiva de paret abdominal, procés en el qual s'obté la mostra de SAT (*Cohort 2*).

Les associacions trobades, són explorades en una cohort independent de pacients (n=132) homes i dones, amb un ampli rang d'índex de massa corporal (*Cohort 3*).

Finalment, a fi de discriminar l'efecte de l'acte quirúrgic *per se* com a possible factor de confusió, aquells gens que més modificaven la seva expressió després de la CB són estudiats en una quarta cohort de pacients, estudiats a l'inici de la intervenció de CB i al final d'aquesta (*Cohort 4*).

Aquesta cohort inclou 16 pacients obesos mòrbids, intervinguts tots ells al mateix hospital, per la mateixa tècnica i pel mateix cirurgià.

**RESULTATS:** A l'anàlisi de *microarray* de la *Cohort 1* s'observa canvis estadísticament significatius en l'expressió de 5.018 dels 49.852 transcrits explorats a nivell de SAT. D'aquests, 2.432 (48.5%) incrementen la seva expressió després de la cirurgia i 2.586 (51.5%) la disminueixen. S'observa una disminució de l'expressió de gens pro-inflamatoris i relacionats amb el metabolisme del ferro i un increment en l'expressió de gens lipogènics i implicats en la sensibilitat a la insulina.

La mitjana del valor de M-CLAMP passa de 4.87 a 6,50 mg/(kg·min) ( $p = 0.0032$ ) mostrant una notable milloria de la sensibilitat a la insulina. Aquest canvi es correlaciona amb la caiguda de l'expressió de gens pro-inflamatoris a nivell de SAT.

Cinc dels gens que més veuen modificada la seva expressió a l'anàlisi de *microarray* i que es validen per *RT-PCR* són RGS-1 i LYZ -gens que veuen disminuïda la seva expressió- ( $p = 0,014$  i  $p < 0.0001$ , respectivament) i SLC27A2, OLFM2 i PKP -gens que més veuen incrementada la seva expressió- ( $p = 0.011$ ,  $p < 0.0001$  i  $p < 0.0001$ , respectivament). L'expressió d'aquests gens a la cohort ampliada de pacients (*Cohort 3*) s'associa a l'expressió d'altres factors implicats en el metabolisme lipídic, inflamació i sensibilitat a la insulina i s'observa una sòlida associació entre l'expressió d'aquests 5 gens i alguns dels paràmetres clínics que més es modifiquen després de la CB. L'estudi de la *Cohort 4* permet excloure l'efecte de la CB *per sé* com a potencial factor de confusió. L'expressió d'aquests 5 gens no es veu modificada per l'acte quirúrgic.

**CONCLUSIONS:** La pèrdua de pes promoguda per la CB modifica dràsticament l'expressió gènica en SAT. La CB implica una disminució de l'expressió de gens pro inflamatoris i relacionats amb el metabolisme del ferro i un increment en l'expressió del gens lipogènics i implicats en la sensibilitat a la insulina. Els gens OLFM2, SLC27A2, PKP2, LYZ i RGS-1 es troben entre els 10 gens que més veuen modificada la seva expressió a nivell de SAT després de la CB. La seva expressió s'associa amb algunes de les variables clíniques que més modifiquen després de la CB i amb l'expressió de múltiples gens implicats en el metabolisme lipídic, la sensibilitat a la insulina, la inflamació i el metabolisme del ferro.

La pèrdua de pes promoguda per la CB indueix el pas a un teixit adipós menys disfuncional i metabòlicament més favorable.

## **Estudio de los cambios promovidos por la cirugía bariátrica a nivel de la expresión génica del tejido adiposo subcutáneo y la relación con la sensibilidad a la insulina.**

**INTRODUCCIÓN:** La obesidad es actualmente uno de los problemas de salud pública más importantes en la mayoría de países industrializados, con una incidencia creciente y un fuerte impacto socioeconómico. La relación entre obesidad y diabetes tipo 2 (DM2) es tal, que ha motivado la consolidación de la cirugía bariátrica (CB) como una opción de tratamiento, no sólo de la obesidad, sino también de las comorbilidades asociadas a la obesidad, especialmente la DM2. La CB es la única opción de tratamiento que ha demostrado ser capaz de resolver la DM2 asociada a obesidad en un elevado porcentaje de casos. Además del impacto en el peso y las comorbilidades, la CB ha demostrado tener un gran impacto en el tejido adiposo, suponiendo también un cambio en su expresión génica y convirtiéndose en un valioso modelo para comprender mejor los mecanismos fisiopatológicos a través de los cuales tiene lugar esta mejoría del perfil metabólico.

**HIPÓTESIS:** La CB modifica la expresión génica del tejido adiposo subcutáneo (SAT) y contribuye a explicar los cambios en la sensibilidad a la insulina.

**OBJETIVOS:** Evaluar los cambios en la expresión génica de SAT después de la pérdida de peso promovida por la CB. Investigar cuáles son los genes que más modifican su expresión y qué asociaciones presentan estos cambios con la expresión de otros factores y con las variables clínicas que más modifican tras la CB como es la sensibilidad a la insulina.

**SUJETOS Y METODOLOGÍA:** Para valorar los cambios en la expresión génica de SAT promovidos por la CB, se estudia una cohorte conformada por 25 mujeres obesas mórbidas, operadas de cirugía bariátrica mediante bypass gástrico (BPG) (*Cohorte 1*). El estudio del cambio de expresión en SAT se analiza a través del análisis de *microarray* y se valida mediante *RT-PCR* para aquellos genes que más ven modificada su expresión. La sensibilidad a la insulina se estudia mediante CLAMP euglucémico hiperinsulinémico en un subgrupo de 10 pacientes de la *Cohorte 1* antes y después de la máxima pérdida de peso. Las asociaciones encontradas en la *cohorte 1* son exploradas en una segunda cohorte constituida por 25 mujeres delgadas emparejadas por edad, operadas de forma electiva de pared abdominal, proceso en el que se obtiene la muestra de SAT (*Cohorte 2*).

Las asociaciones encontradas, son explotadas en una cohorte ampliada de pacientes ( $n = 132$ ), hombres y mujeres, con un amplio rango de índices de masa corporal (*Cohorte 3*).

Finalmente, con el fin de discriminar los efectos del acto quirúrgico *per se* como posible factor de confusión, aquellos genes que más ven modificada su expresión tras la CB son estudiados en

una cuarta cohorte de pacientes estudiados al inicio de la intervención de CB y al final de ésta (*Cohorte 4*). Esta cohorte incluye 16 pacientes obesos mórbidos, operados todos ellos en el mismo hospital, con la misma técnica y por el mismo cirujano.

**RESULTADOS:** En análisis de *microarray* de la Cohorte 1 se observa cambios estadísticamente significativos en la expresión de 5.018 de los 49.852 transcritos explorados a nivel de SAT. De ellos, 2.432 (48.5%) incrementan su expresión después de la cirugía y 2.586 (51.5%) la disminuyen. Se observa una disminución de la expresión de genes pro-inflamatorios y relacionados con el metabolismo del hierro y un incremento en la expresión de genes lipogénicos e implicados en la sensibilidad a la insulina.

La media del valor de M-CLAMP pasa de 4.87 a 6.50 mg/ (kg·min) ( $p = 0.0032$ ) mostrando una notable mejoría de la sensibilidad a la insulina. Este cambio se correlaciona con la disminución de la expresión de genes pro-inflamatorios a nivel de SAT.

Cinco de los genes que más ven modificada su expresión en el análisis de *microarray* y que se validan por *RT-PCR* son RGS-1 y LYZ -genes que ven disminuida su expresión- ( $p = 0,014$  y  $p < 0.0001$ , respectivamente) y SLC27A2, OLFM2 y PKP -genes que ven incrementada su expresión- ( $p = 0,011$ ,  $p < 0.0001$  y  $p < 0.0001$ , respectivamente). La expresión de estos genes en la cohorte ampliada de pacientes (*Cohorte 3*) se asocia a la expresión de otros factores implicados en el metabolismo lipídico, inflamación y sensibilidad a la insulina y se observa una sólida asociación entre la expresión de estos 5 genes y algunos de los parámetros clínicos que más modifican después de la CB. El estudio de la *Cohorte 4* permite excluir el efecto de la CB *per sé* como potencial factor de confusión. La expresión de estos 5 genes no se ve modificada por el acto quirúrgico.

**CONCLUSIONES:** La pérdida de peso promovida por la CB modifica drásticamente la expresión génica en SAT. La CB implica una disminución de la expresión de genes proinflamatorios y relacionados con el metabolismo del hierro y un incremento en la expresión de genes lipogénicos e implicados en la sensibilidad a la insulina. Los genes OLFM2, SLC27A2, PKP2, LYZ y RGS-1 se encuentran entre los 10 genes que más ven modificada su expresión a nivel de SAT tras la CB. Su expresión se asocia con algunas de las variables clínicas que más modifican tras la CB y con la expresión de múltiples genes implicados en el metabolismo lipídico, sensibilidad a la insulina, inflamación y metabolismo del hierro.

La pérdida de peso derivada de la CB promueve el paso a un tejido adiposo menos disfuncional y metabólicamente más favorable.

**Study of the subcutaneous adipose tissue gene expression changes promoted by bariatric surgery and their impact to the insulin sensitivity.**

**INTRODUCTION:** Obesity is currently one of the most important public health problems in industrialized countries, with increasing incidence and important socioeconomic impact. The strong relationship between obesity and type 2 diabetes (DM2) has motivated the consolidation of bariatric surgery (BS) as a treatment option not only for the obesity, but also for the associated comorbidities, especially DM2. BS is the only treatment option that has proven to be able to solve obesity-associated DM2 in an important proportion of cases. In addition to the impact on weight and related comorbidities, BS has a deep impact on adipose tissue physiology, modifying gene expression and becoming a valuable model for better understanding the pathophysiological mechanisms through which the metabolic profile improves.

**HYPOTHESIS:** BS modifies subcutaneous adipose tissue (SAT) gene expression and contributes to explain changes in insulin sensitivity.

**OBJECTIVES:** To evaluate changes in gene expression of SAT promoted by BS-induced weight loss. To investigate those genes that change their expression more importantly and their possible associations with other transcripts, with clinical variables and with insulin sensitivity.

**SUBJECTS AND METHODS:** Changes in SAT gene expression, after BS (gastric by-pass) induced weight loss, were studied in 25 morbidly obese women (*Cohort 1*). Gene expression changes in SAT were assessed by *microarray* analysis and validated by *RT-PCR* of those genes which changed their expression more significantly. Insulin sensitivity was assessed using euglycemic hyperinsulinemic CLAMP in a subgroup of 10 patients of the Cohort 1 before and after the maximum weight loss. The findings in cohort 1 were explored in a second cohort of 25 age-matched lean women, in whom adipose tissue was obtained during elective surgery (*Cohort 2*).

The associations were also studied in an independent cohort of men and women ( $n = 132$ ) (*Cohort 3*) with a wide range of adiposity.

Finally, in order to discriminate the effects of surgery *per se* as a possible confounding factor, those genes that experienced the most dramatical change were further explored a fourth cohort of patients (at the beginning of surgery and 2 hours thereafter, *Cohort 4*). This cohort included 16 morbidly obese patients, all operated in the same hospital, with the same technique and by the same surgeon.



**RESULTS:** Microarray analysis in cohort 1 showed statistically significant changes in gene expression of 5.018 out of 49.852 transcripts in SAT. Of these, 2.432 (48.5%) increased their expression after weight loss and 2.586 (51.5%) decreased. A decrease in the expression of pro-inflammatory and iron-related metabolism genes were observed whereas the expression of lipogenic genes and those involved in insulin sensitivity increased significantly.

The mean value of M-CLAMP change from 4.87 to 6.50 mg/(kg·min) ( $p = 0.0032$ ), showing remarkable improvement of insulin sensitivity. This change correlated with the decreased expression of proinflammatory genes in SAT.

Five of the genes which most modified their expression in the *microarray* analyses and validated by RT-PCR were LYZ & RGS-1 -genes which reduced their expression- ( $p = 0.014$  and  $p < 0.0001$ , respectively) and SLC27A2, OLFM2 & PKP -genes which were increased- ( $p = 0.011$ ,  $p < 0.0001$  and  $p < 0.0001$ , respectively). In Cohort 3, the expression of those genes was associated with transcripts involved in lipid metabolism, inflammation and insulin sensitivity. A relatively strong link was observed between the expression of these five genes and some of the clinical parameters that were modified after BS. Study of the Cohort 4 allowed the exclusion of BS-induced effects *per se* as a potential confounding factor. These genes did not significantly change acutely in *Cohort 4*.

**CONCLUSIONS:** BS promoted weight loss induced drastical changes in SAT gene expression. BS led to decreased expression of proinflammatory and iron-related metabolism genes and increased expression of lipogenic genes and transcripts involved in insulin sensitivity. OLFM2, SLC27A2, PKP2, LYZ and RGS-1 genes were among the top 10 of the most modified genes after BS. Their expression was also associated with some of clinical parameters that changed most after BS and with the expression of multiple genes involved in lipid metabolism, insulin sensitivity, inflammation and iron-related metabolism.

BS-induced weight loss promotes the transition to a less dysfunctional and metabolically more favourable adipose tissue.

# 1. INTRODUCCIÓ

---



## 1.1. Obesitat

L'obesitat és actualment un dels problemes de salut pública més important en la majoria de països industrialitzats, amb una incidència creixent i un fort impacte socioeconòmic. En els països industrialitzats s'estima que un de cada quatre adults presenta obesitat (*Dee A et al 2014*). A nivell d'estudis poblacionals, la taxa més elevada d'obesitat es troba als Estats Units, on arriba a afectar al 60% de la població adulta (*Dee A et al 2014*) i arriba a afectar al 50% de la població adulta activa espanyola segons la societat espanyola per l'estudi de la obesitat (*SEEDO, 2012*). S'estima un impacte de la obesitat a l'economia mundial global entorn al 2.8% del producte interior brut (PIB) global (*McKinsey Global Institute, 2014*), igualant-se al cost que suposa per l'economia mundial el tabaquisme o la violència armada (*McKinsey Global Institute, 2014*).

### 1.1.1. Definició

L'obesitat es defineix per l'Organització Mundial de la Salut (OMS) com una malaltia caracteritzada per una acumulació anormal o excessiva de teixit adipós perjudicial per a la salut i que inclou tant un excés de greix corporal total ( que pot estimar en adults mitjançant l'Índex de Massa Corporal ( IMC ) ), com una distribució anormal i localitzada al voltant de la regió abdominal (que pot ser identificada mitjançant l'Índex Cintura - Maluc ( ICM ) ) del greix . El primer organisme mundial a considerar la obesitat una malaltia va ser la *American Medical Association* l'any 2013.

L'IMC , també conegut com a *Índex de Quetelet* ( *Lambert AJ Quetelet , 1796-1874* ) , és el paràmetre antropomètric més àmpliament utilitzat per determinar el sobrepès i l'obesitat en població adulta (*Eknayan, 2008*). Estretament relacionat amb el percentatge de greix corporal, es determina mitjançant la fórmula  $IMC = pes / ( alçada )^2$ , on el pes en quilograms es divideix pel quadrat de l'altura en metres. La utilització del BMI per classificar l'estat d'obesitat es basa en associacions epidemiològiques entre aquest índex i la morbiditat i mortalitat que porta associades (*Billington CJ et al, 2002*). El BMI, però, no és el millor sistema per mesurar el grau d'obesitat ja que no pot diferenciar entre l'excés de pes provocat per l'excés de greix o el provocat per una hipertrofia muscular o per un edema. S'accepta com a classificació per al grau d'obesitat, ja que la forma d'obtenir-lo és ràpida, senzilla, no invasiva i econòmica, es relaciona amb el percentatge de greix corporal, i s'ha demostrat una estreta relació amb els problemes de salut associats a l'obesitat. Segons *Picot J* i col·laboradors, el risc de mortalitat global augmenta en un 50% per a un BMI de 30 en comparació a un individu normopes i es duplica a partir d'un BMI de 35, seguint a partir d'aquí una relació lineal (*Picot J et al, 2002*). Més recentment, però, s'han publicat estudis que demostren com persones amb obesitat grau I (IMC 30-35) no presenten una major taxa de

mortalitat global respecte a la situació de normopes, i com una situació de sobrepès (IMC 25-30), no només no incrementa el risc de mortalitat, sinó que disminueix la mortalitat global en algunes poblacions (**Flegal KM et al, 2013**). Serien exemples d'aquesta situació que s'ha anomenat *la paradoxa de la obesitat*, malalties cròniques com la insuficiència cardíaca, malaltia renal crònica, malaltia pulmonar obstructiva crònica, però també situacions agudes com el síndrome coronari agut (**Niedziela J et al, 2014**). Així doncs, l'increment del risc de mortalitat global, seria indiscutible en pacients amb IMC superiors a 35, o superiors a 30 si s'associa a altre patologia (**Berrington de Gonzalez A et al, 2010**).

L'OMS defineix el sobrepès en adults amb un IMC igual o superior a 25 kg/m<sup>2</sup>, i l'obesitat amb un IMC igual o superior a 30 kg/m<sup>2</sup>(**OMS, 2008**). L'obesitat mòrbida és el diagnòstic clínic que s'aplica a aquells pacients que presenten un pes corporal de més de 45 kg per sobre del seu pes ideal en funció de l'edat, alçada, constitució i sexe, o un valor de IMC igual o major a 40 kg/m<sup>2</sup>. Dins d'aquesta mateixa classificació trobaríem el criteri de baix pes o malnutrició, definit per un IMC inferior a 18,5 kg/m<sup>2</sup> (**OMS, 2008**).

El percentatge de greix corporal es pot determinar a partir de l'IMC, considerant l'edat i el sexe, mitjançant l'equació de **Deurenberg (Deurenberg, van der Kooy et al, 1991)** segons la qual [ % de greix corporal = 1,2 \* ( IMC ) + 0,23 \* ( edat ) - 10,8 \* ( sexe ) - 5,4 ], on el sexe equival a 1 per als homes i 0 per a les dones. Amb un error estàndard del 4% i malgrat les limitacions descrites (**Deurenberg, Andreoli et al 2001**), aquesta equació és capaç de detectar fins al 80% de variació en el percentatge de greix corporal d'un mateix subjecte.

Actualment, un dels mètodes més emprats per a l'estimació de la composició corporal és la bioimpedància, definida com l'oposició d'un conductor biològic al pas d'un corrent altern. Es tracta d'una tècnica relativament econòmica, no invasiva i que es basa en les propietats corporals d'impedància. Mesura l'aigua corporal aplicant unes equacions predictives obtingudes mitjançant altres tècniques de referència (**Kyle UG et al, 2004**) i obté la massa grassa de restar la massa total de l'organisme menys la massa lliure de greix mesurada. Aquesta tècnica però, no està recomanada per individus amb un BMI > 35 kg/m<sup>2</sup> (**Kyle UG et al, 2004**), ja que per una banda encara no es disposa d'equacions predictives validades per a aquesta població i per d'altra banda, la tècnica assumeix una hidratació constant de la massa lliure de greix, cosa que s'ha vist que està alterada en el pacient obès (**Ryo M et al, 2005**). Aquest darrer inconvenient podria quedar resolt amb la bioimpedància multifreqüència, ja que treballa amb diverses freqüències que van dels 5 als 1000 kHz i d'aquesta manera té en compte les diferents freqüències que es poden donar al teixit muscular (**Kyle UG et al, 2004**).

Més recentment, noves tècniques d'imatge com la tomografia computeritzada, la ressonància magnètica nuclear o l'absorciometria de raig X d'energia dual (DEXA), basada en la diferent atenuació dels diferents teixits – os, massa grassa i massa magra – enfront al pas dels fotons emesos per un aparell de raig X, han permès no només quantificar de manera molt més fina la composició corporal total, sinó la composició corporal per segments.

Percentatges de greix corporal superiors al 25% en homes i al 35 % en dones s'interpreten també com a indicadors d'obesitat, i valors entre el 21 i el 25% en homes i entre el 31 i el 35 % en dones limiten els rangs que defineixen el sobrepès . Aquests criteris de classificació, així com la relació existent entre l'IMC i els percentatges de greix corporal, poden diferir notablement entre les poblacions d'individus ( *Fernández-Real JM et al 2001* ) .

Els perímetres de cintura i cadera representen també determinacions antropomètriques molt útils en el diagnòstic i l'estudi de la obesitat. El punt de tall per establir quan hi ha obesitat abdominal varia en funció del criteri que se segueixi; la primera definició d'obesitat central la va proposar l'OMS basant-se en l'*índex cintura/maluc(ICC)*. Així, es parlava d'obesitat central quan el quocient era igual o superior a 1 en homes i a 0.9 en dones (*WHO, 1998*). La segona definició, probablement la més popular, la va proposar el *grup d'experts per a la detecció, avaluació i tractament de la hipercolesterolèmia en adults(NCEP-ATPIII)* la qual es basa només en el perímetre de la cintura. Segons aquesta definició, existeix obesitat central quan el perímetre de cintura està per sobre de 102 cm en l'home i de 88 cm en la dona (*Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults , 2011*). Finalment, l'any 2005 la Federació Internacional de Diabetes (IDF) va introduir dos canvis: per una banda va disminuir els punts de tall per a la definició d'obesitat central i per altra banda va proposar diferents punts de tall en funció de l'ètnia dels individus. Segons aquest criteri, en el cas dels europeus es parla d'obesitat central quan el perímetre de cintura és superior a 94 cm en el cas del homes i a 80 cm en el cas de les dones (*Alberti KG, 2005*).

Actualment, sabem que l'excés de teixit adipós és perjudicial per la salut, no tant per l'excés en sí sinó per la distribució i les característiques d'aquest (*Smith U, 2015; Mathieu P, 2014*).

Es plenament acceptat com la distribució dels greix corporal és un factor predictor més potent que l'IMC tan pel que respecta al risc cardiovascular com de la mortalitat global (*Kranendonk ME, 2015*). En particular, l'augment del teixit adipós visceral (VAT) és el que presenta una major associació amb risc metabòlic, cardiovascular i amb el desenvolupament de determinades malalties cròniques (*Kranendonk ME, 2015*)

La societat espanyola per l'estudi de la obesitat (SEEDO), considera la obesitat com una malaltia crònica multifactorial fruit de la integració entre genotip i factors ambientals i aconsella l'ús de l'antropometria considerant valors subsidiaris com el pes, la talla, els perímetres de cintura i cadera i els plecs cutanis pel diagnòstic i valoració dels casos d'obesitat.

### 1.1.2. Etiopatogènia de la obesitat

L'obesitat és una malaltia multifactorial i multisistèmica caracteritzada pel creixement anormal i desproporcionat dels dipòsits de greix corporal. En la seva etiologia es barregen factors, tant genètics com ambientals, que condicionen un desequilibri entre emmagatzematge i consum calòric, favorable al primer. L'excedent de calories ingerides, en relació a les necessitats, són transformades i emmagatzemades en forma de teixit adipós donant lloc a obesitat quan aquesta acumulació esdevé excessiva i suposa un risc per la salut. Els aspectes nocius de l'acumulació excessiva de teixit adipós es poden veure acusats per factors intrínsecs i extrínsecs a cada persona, entenent per factors intrínsecs els genètics, fisiològics i metabòlics, i per factors extrínsecs els patrons culturals i socials afins a cada individu. Malgrat la base sigui aquest disbalanç energètic, l'etiopatogènia de la obesitat és molt més complexa. Existeix un gran nombre d'estudis que suggereixen que la patogènia de la obesitat va més enllà del disbalanç energètic.

Els nadius americans indis Pima, per exemple, presenten cèl·lules adiposes hipertròfiques i una major predisposició a l'obesitat i la diabetis mellitus tipus 2 (DM2) que els subjectes caucàsics (*Abbott and Foley 1987*). Certes poblacions asiàtiques tenen alts percentatges d'obesitat central com a conseqüència d'una incapacitat innata per desenvolupar un teixit adipós equilibrat des d'un punt de vista fisiològic, histològic i molecular. En conseqüència, la incidència de malalties comunament associades a l'obesitat com la resistència a la insulina, la DM2 o la malaltia coronària i vascular és, en aquestes poblacions, molt superior a l'esperada. A la vegada, les comparacions antropomètriques i metabòliques entre bessons representen excel·lents models per estimar *in vivo* la base genètica dels caràcters humans. Aquest tipus d'estudis han permès establir una heretabilitat d'entre el 64 i el 84% de l'IMC (*O'Rahilly and F 2006*). Els estudis realitzats per *Bouchard et al.* a principis dels 90 (*Bouchard 1988; Bouchard 1993*) sobre les variacions de l'IMC en 12 parelles de bessons univitel·lins sota condicions ambientals controlades suggerien que els factors genètics inherents al subjecte determinen amb força les oscil·lacions de l'IMC. D'aquesta manera, la variabilitat entre individus no emparentats triplicava la variabilitat detectada entre subjectes genèticament idèntics (*O'Rahilly F 2006*).

Exceptuant un 1% dels casos en els que la obesitat pot ser explicada per una patologia de base (malalties endocrinològiques com el síndrome de Cushing, malalties neurològiques o alteracions genètiques com la sd. De Prader-Willi, o secundària a fàrmacs, entre altres), en el 99% dels casos, la obesitat presenta un origen multifactorial entre factors intrínsecs: genètics, fisiològics i metabòlics, i factors extrínsecs: patrons culturals i socials afins a cada individu.

### **1.1.3. Comorbilitats associades a obesitat.**

L'obesitat està fortament vinculada a la incidència de la síndrome metabòlica, malaltia cardiovascular, esteatosi hepàtica no alcohòlica, resistència a la insulina i diabetis mellitus tipus 2, a l'estat proinflamatori crònic i al desenvolupament d'alguns tipus de càncer com el de colon, mama, pàncrees, vesícula biliar o endometri.

Un augment en la producció de mediadors proinflamatoris i molècules del sistema immune per part del teixit adipós hipertròfic i disfuncional del subjecte obès sembla ser la clau per explicar aquestes associacions (*Shoelson SE, 2006*).

La denominada síndrome metabòlica es caracteritza per un conjunt de factors de risc per a la salut que inclouen una excessiva acumulació de greix visceral (o obesitat central), desordres en les concentracions de lípids circulants, dislipidèmia i hipertrigliceridemia, hipertensió arterial, resistència a la insulina, un estat protrombòtic crònic (caracteritzat per una elevada concentració de fibrinogen i altres factors plasmàtics de coagulació) i un estat inflamatori sostingut (definit per les altes concentracions de proteïna C-reactiva, IL-6 i TNF- $\alpha$ , entre d'altres citocines, no vinculades a cap causa local o inflamació aguda), entre d'altres (*Bjorntorp 1997; Cuspidi, Sala et al. 2008; Olufadi and Byrne 2008*). La síndrome metabòlica porta el problema de l'obesitat al seu màxim exponent i la conseqüència previsible és, entre altres, la DM2, greus problemes cardiovasculars i la mort prematura (*Cuspidi, Valerio et al. 2008; Cuspidi, Valerio et al. 2009*).



#### 1.1.4. Obesitat, resistència a la insulina i diabetes Mellitus tipus 2.


Obesitat i resistència a la insulina suposen els dos principals factors de risc per al desenvolupament de DM2 i malaltia cardiovascular (*Scheuer SH, 2015*). L'epidèmia de la DM2 creix en incidència a nivell mundial de forma directament proporcional a la de l'obesitat (*Gomez-Ambrosi, 2008*). Prop del 80% dels subjectes amb DM2 presenten sobrepès o obesitat. La prevalença de DM2 en persones obeses és, en homes, fins a 5 vegades superior, i prop de 8 vegades més alta en dones obeses. De fet, estudis epidemiològics han demostrat que la prevalença de la DM2 augmenta a mesura que augmenta l'IMC, fins hi tot quan només hi ha un lleuger sobrepès (*Wilding JP et al, 2007*).

L'ICC (un dels marcadors antropomètrics més recurrents per diagnosticar problemes d'obesitat central) i el perímetre de la cintura són excel·lents indicadors per a la resistència a la insulina i el risc de desenvolupar DM2 (*Gomez-Ambrosi, Pastor et al. 2007*). Es considera que l'acumulació de teixit adipós abdominal és el principal responsable de resistència a la insulina en òrgans sensibles a la insulina com és el fetge, el múscul o el teixit adipós. De fet, la relació entre els percentatges de greix corporal i els trastorns del metabolisme de la glucosa és tan estreta que una pèrdua d'entre el 5 i el 10% del pes d'un pacient amb DM2 és capaç de reduir significativament les concentracions plasmàtiques de glucosa i el valor d'hemoglobina glicosilada circulants, a més de millorar les xifres de tensió arterial i el perfil lipídic circulant (*Lago F, Gomez R et al.*).

La relació entre obesitat i diabetes tipus 2 és tal, que ha motivat la consolidació de la cirurgia bariàtrica com una opció de tractament, no només de la obesitat, sinó també de les comorbilitats associades a obesitat, especialment la DM2.

Resultats recollits en un metanàlisi publicat al 2014 descriuen una taxa de resolució completa de la DM2 del 65% en els pacients intervinguts de cirurgia bariàtrica mitjançant by-pass gàstric (*Ribaric G, 2014*) d'acord amb els criteris de l'associació Americana de diabetes publicats l'any 2009 (*Taula 1*). Importants sèries de pacients, descriuen una resolució de la DM2 en el 75% dels pacients intervinguts mitjançant by-pass gàstric i que s'eleva fins al 95% en el cas de pacients intervinguts mitjançant encreuament duodenal (*Mingrone et al, 2012*). Altres autors demostren una notable millora en la sensibilitat a la insulina en resposta a la cirurgia bariàtrica, també en pacients no afectes de DM2 (*Promintzer-Schifferl M, 2011; Jørgensen NB, 2012; Salinari S, 2013*).

Taula 1: Crítèris resolució DM2 American Diabetes Association 2009.

<p><b>CRITERIS RESOLUCIÓ DM2</b></p> 
<ul style="list-style-type: none"><li>■ Remissió parcial:<ul style="list-style-type: none"><li>– Hiperglicèmia per sota dels valors diagnòstics de DM2 (basal 100-126 mg/dL)</li><li>– Durant almenys 1 any</li><li>– Sense tractament actiu</li></ul></li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>■ Remissió completa:<ul style="list-style-type: none"><li>– Glicèmies dins el rang de normalitat (basal &lt; 100 mg/dL)</li><li>– Durant almenys un any de durada</li><li>– Sense tractament actiu</li></ul></li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>■ Remissió perllongada.<ul style="list-style-type: none"><li>– Remissió completa més enllà dels 5 anys.</li></ul></li></ul>

### 1.1.5. Tractament de la obesitat

L'obesitat requereix una intervenció multidisciplinària amb l'objectiu d'aconseguir una pèrdua ponderal capaç de suposar un impacte en les comorbiditats associades i en els factors de risc cardiovasculars.

La necessitat de tractar l'obesitat ve marcada per l'evidència creixent que demostra com la pèrdua de pes s'associa a una milloria de les comorbiditats presents associades a obesitat i a una disminució de les comorbiditats futures, entre les quals es troben els coneguts factors de risc cardiovascular: diabetis, dislipèmia i hipertensió, perímetre de cintura (*Schwingshackl L et al, 2014*), i de la resta de comorbiditats psicològiques, mecàniques i metabòliques, algunes d'elles també recentment associades a un major risc cardiovascular com és el cas de l'esteatosi hepàtica no alcohòlica (*Athyros VG et al, 2015*) i la síndrome de l'apnea del son (*Kasai T et al, 2012*).

És plenament acceptada l'intervenció en l'estil de vida, la dieta i l'activitat física com a base del tractament, deixant en un segon graó les mesures farmacològiques i la cirurgia bariàtrica, sempre que vagin acompanyades de les mesures higiènico-dietètiques i d'estil de vida, i després de que aquestes hagin demostrat ser insuficients (*Apovian CM et al, 2015; Stegenga H et al, 2014*).

El tractament de la obesitat ha de ser proporcional a les mesures antropomètriques i a la presència de comorbiditats. Així, s'aconsella incidir en les mesures higiènico-dietètiques i en l'estil de vida a partir d'un IMC  $\geq 25$ , valorant la possibilitat d'associar tractament farmacològic passats 6 mesos d'intervenció higiènico-dietètica si IMC  $\geq 30$  (o  $\geq 27$  si s'associa a la presència de comorbiditats) i valorar tractament quirúrgic si IMC  $\geq 40$  (o  $\geq 35$  amb comorbiditats associades) (*Apovian CM et al, 2015*).

#### Mesures higiènico-dietètiques:

El tractament de la obesitat ha de basar-se en una sèrie de canvis en l'estil de vida del pacient encaminats a disminuir l'aport calòric, incrementar el consum energètic i fomentar hàbits de vida saludables.

Els canvis en els hàbits dietètics del pacient obès, han d'anar encaminats a disminuir l'aport calòric garantint l'aport de nutrients necessaris per a la salut. El terme dieta prové de la paraula Grega *'dayta'* que significa 'règim de vida'. Així, cal assegurar una dieta variada, equilibrada i correctament fraccionada, capaç de poder ser incorporada com un estil de vida, i per

tant, mantinguda durant el llarg d'aquesta. Cada dieta ha de ser individualitzada en funció dels paràmetres antropomètrics del pacient, els requeriments calòrics, les patologies de base, l'edat i també de la situació econòmica, social i cultural de cada persona.

Cal fomentar un increment en l'activitat física del pacient d'acord a la capacitat d'aquest per portar-la a terme. Marcant sempre objectius assolibles i que es puguin mantenir al llarg del temps, incorporant-los a la rutina diària. Tanmateix, cal promoure canvis en l'estil de vida saludables com pugui ser l'abandó del tabac o assegurar un descans nocturn suficient. I contemplar la necessitat d'un suport psicològic en alguns casos.

### **Fàrmacs:**

A dia d'avui es disposa d'un únic fàrmac aprovat per l'agència espanyola de medicament i productes sanitaris (AEMPS) per al tractament de la obesitat:

L'orlistat, Inhibidor de la lipasa intestinal, capaç de disminuir l'absorció del greix de la dieta en un 20-30% i de suposar una pèrdua d'un 3% més de pes en comparació amb placebo (*Yanovski SZ et al, 2014*).

Es disposa de 3 fàrmacs més comercialitzats per altres indicacions i amb un efecte provat en el pes:

El Topiramate, agonista dels receptors de glutamat emprat com antiepilèptic i amb un demostrat efecte anorexigen i modulador negatiu de les ingestes compulsives en pacients amb trastorn de la conducta alimentària. Aprovat el seu ús en epilèpsia i en la bulímia. Demostrada una pèrdua de pes mitjana de 3-4kg segons els darrers metanàlisi (*Domenecq et al, 2015*).

La Fluoxetina, inhibidor selectiu de la recaptació de serotonina, emprat com antidepressiu i amb un efecte estadísticament significatiu sobre el pes, si bé clínicament discutit. Aprovat el seu ús en depressió i síndrome ansios-depressiu. Atribuïble al fàrmac una pèrdua de pes no superior a 1.5Kg de mitjana segons els darrers metanàlisi (*Domenecq et al, 2015*).

Els agonistes del receptor de GLP-1, -Exenatide, lixisenatide i Liraglutide-, fàrmacs hipoglucèmics amb ús acceptat segons l'AEMPS per al tractament de la DM2 en el pacient obès. Atribuïble al fàrmac una pèrdua de pes de 2,7Kg de mitjana en el darrer metanàlisi (*Domenecq et al, 2015*).

## **Cirurgia bariàtrica:**

El primer cas documentat de cirurgia bariàtrica data de 1954. Aquesta intervenció va ser portada a terme pels cirurgians Kremen, Linner i Nelson, de la universitat de Minesota, els quals van efectuar un bypass jejuno-ileal en una cohort de gossos amb l'objectiu de valorar l'impacte de la resecció de fragments intestinals de diferent longitud (*Kremen AJ et al, 1954*), entitat coneguda actualment com a 'síndrome de l'intestí curt'. En el seu treball van concloure que la resecció del 50% distal de l'intestí prim conduïa a una disminució del pes deguda a una malabsorció de nutrients, procés que no era incompatible amb la vida si es portava a terme preservant la vàlvula ileo-cecal.

Durant els anys 50 i 60, es van anar publicant diferents casos i algunes sèries d'aquests, si bé no s'arribava a publicar una dotzena de casos anuals, i es recollia una elevada taxa mortalitat i de complicacions. A partir dels anys 70, la tècnica del bypass jejuno-ileal es va anar abandonant, optant per noves tècniques com la derivació bilio-pancreàtica amb gastrectomia o tècnica d'Scopinaro. Amb aquesta tècnica s'optava per deixar un tram major d'intestí prim, preservant el fluxe biliar i pancreàtic i incorporant un component restrictiu a través de la gastroplàstia. Malgrat persistir una elevada taxa d'efectes secundaris i complicacions, aquests eren menors que amb els primers bypass jeju-ileal.

Durant les darreres dècades, s'ha anat modificant les tècniques de CB, arribant a aconseguir resultats molt bons en les diferents sèries publicades (*Ribaric G et al, 2014*), utilitzant l'abordatge laparoscòpic en detriment de les laparotomies mitges, i optant per cirurgies mixtes enlloc de les únicament restrictives o mal absorbives.

A una tècnica de cirurgia bariàtrica se li demana per poder ser acceptada com a model que compleixi els següents principis de seguretat, eficàcia, reproductibilitat i de bona qualitat de vida:

- *Seguretat*: mínim risc de mortalitat ( $\leq 1\%$ ) i morbiditat ( $\leq 10\%$ ), reconeguda i solvantable.
- *Efectivitat*: Ha de comportar una pèrdua superior al 50% de l'excés de pes demostrable com a mínim en el 75% dels pacients als 5 anys de seguiment.
- *Reproductibilitat*: Ha de ser reproduïble per diferents grups de treball amb resultats similars.
- Ha d'oferir una *bona qualitat de vida* al pacient amb uns *efectes secundaris mínims*.

A dia d'avui, s'accepta com a *gold standar* de la CB el *bypass gàstric en Y de Roux*. Portada a terme per primera vegada l'any 1967 (**Mason EE& Ito C, 1967**). Aquesta tècnica consisteix en una doble impacte a l'anatomia digestiva. D'una banda es duu a terme una reducció de la càmera gàstrica (cirurgia restrictiva), i per altra banda, la nova càmera gàstrica s'anastomosa a la nansa d'intestí prim, deixant exclòs el duodè del trajecte absoritiu (cirurgia mal absorptiva). Aquesta tècnica ha demostrat millors resultats que cirurgies únicament restrictives (gastroplàstia tubular o anillada, banda gàstrica ajustable o baló intragàstric) o únicament mal absorptiva (bypass yeyunoileal, tècnica obsoleta), i una menor taxa de complicacions que altres procediments mixtes utilitzats fins no fa massa anys com la derivació biliopancreàtica (tècnica d'Scopinaro).

Es resumeix a continuació les principals opcions de CB, vigents avui (**Figura 1**).

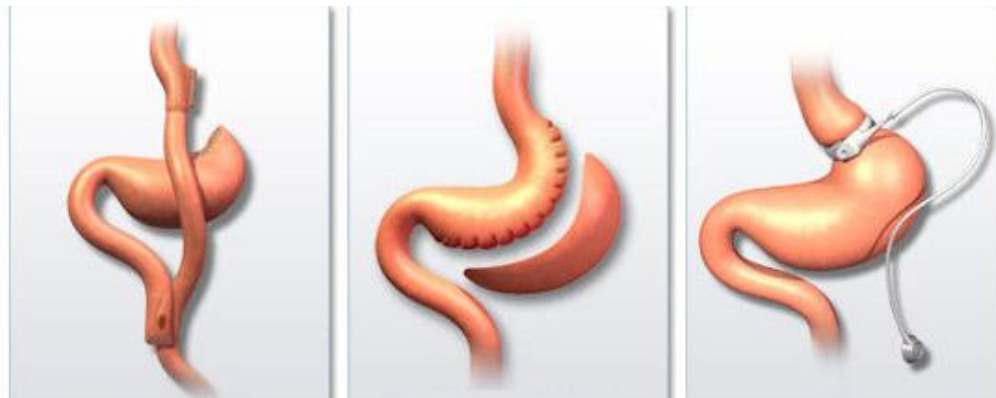


Figura 1: procediments quirúrgics mes emprats per portar a terme la CB. D'esquerra a dreta, by-pass gàstric en Y de Roux, Gastroplàstia vertical i banda gàstrica ajustable.

Font: Imatge obtinguda de la plataforma online look for diagnosis <https://lookfordiagnosis.com>

### **Tècniques quirúrgiques emergents:**

En els darrers anys, s'han popularitzat noves tècniques, menys agressives pel pacient però amb uns resultats no tan espectaculars com es preveia, és el cas de *l'endobarrier*, tècnica laparoscòpia mínimament invasiva que busca mimetitzar l'impacte mal absorptiu d'un bypass. Aquesta tècnica, utilitzada des de l'any 2010, consisteix en la inserció d'un revestiment gastrointestinal ajustable, que impermeabilitza el duodè i la primera nansa jejunal, en un trajecte de 60cm. Aquesta banda intestinal es fixa mitjançant uns petits anclatges a nivell del bulb duodenal per evitar la migració (**Figura 3**). Aquesta tècnica prometia importants avantatges ja que requereix únicament de sedació superficial i d'una hospitalització no superior a les 24h. No obstant, a dia d'avui es disposa d'escasses publicacions abordant sèries de pacients tractats amb aquesta tècnica i s'ha comparat el seu efecte únicament amb la dieta (**Koehestaine P et al, 2014**) i no amb els altres procediments quirúrgics. Malgrat les bones expectatives inicials, no es recomana la seva

utilització rutinària per al tractament de la obesitat ni de la diabetis associada a obesitat (*Zechmeister-Koss I,2014*).

Una altre procediment de recent aparició és l'anomenada *gastroplàstia transoral o laparoscòpica (Figura 2)*. Tècnica restrictiva que requereix de la realització d'una gastroscòpia sota sedació per la seva realització. Igual que passava amb l'endobarrier, s'esperava resultats prometedors d'aquesta tècnica, amb uns avantatges similars als de l'endobarrier en el que respecta a temps d'hospitalització, temps de realització de la tècnica i mitjançant un accés anatòmic que salva la realització d'una cirurgia oberta o laparoscòpia. A dia d'avui, l'escaç volum de literatura existent fa que disti encara de desplaçar els procediments quirúrgics mes àmpliament utilitzats (bypass gàstric en Y de Rous i gastroplàstia tubular). No es disposa a dia d'avui de cap estudi comparatiu amb altres tècniques de CB i de cap metanàlisi.

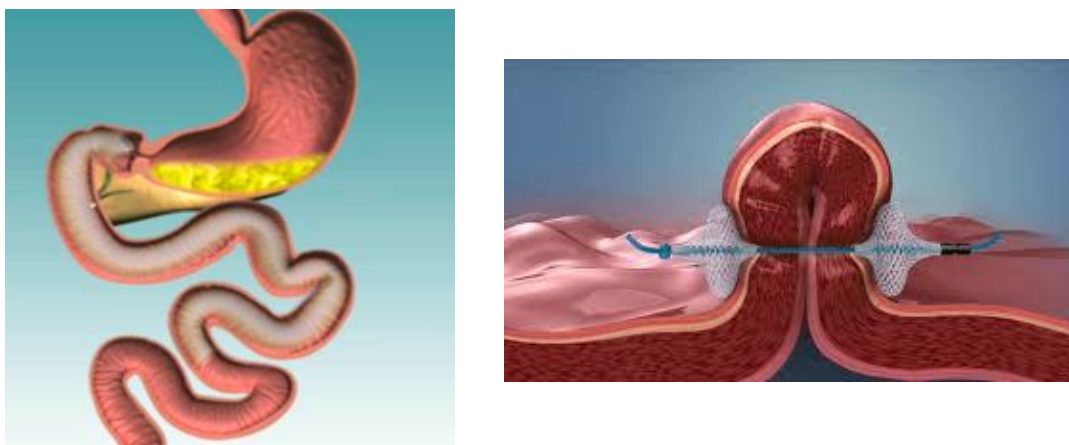


Figura 2: Tècniques quirúrgiques emergents per al tractament de la obesitat i la diabetis associada a obesitat. Esquema de col·locació d'endoBarrier (esquerre), i imatge d'un dels plegaments durant la realització de gastroplàstia transoral (dreta).

Font: Rohde U, Hedbäck N, Gluud LL, Vilsbøll T, Knop FK. Effect of the EndoBarrier Gastrointestinal Liner on obesity and type 2 diabetes: protocol for systematic review and meta-analysis of clinical studies. 2013. *BMJ Open*. 3:e003417 (imatge endobarrier). POSE Procedure (Endoscopy technique of Weight loss) <http://www.drtaipan.com/pose-procedure-endoscopy-technique-of-weight-loss> (imatge POSE).

## 1.2. Teixit adipós

En termes generals, existeixen dos tipus ben diferenciats de teixit adipós: el teixitadipós blanc (WAT), amb funció estructural, metabòlica i energètica, i el teixit adipós marró (BAT), comú entre els mamífers hivernants o semi-hivernants, però reduït en l'ésser humà adult a petits dipòsits testimonials de la zona suprarenal, hipoclavicular, interescapular i mesentèrica.

Durant molt de temps s'havia considerat al teixit adipós blanc (WAT) com un teixit més aviat passiu, al que bàsicament se li atribuïa la funció d'emmagatzemar energia en forma de triacilglicèrids (TG) per proporcionar-la a la resta de l'organisme en situacions de dèficit energètic. En els darrers anys s'ha avançat de forma notòria en la comprensió de la fisiopatologia d'aquest teixit. S'ha pogut comprovar que aquest no és simplement un reservori de greix, sinó que és un important òrgan que participa activament no només en el manteniment de l'homeostasi energètica, sinó que també regula diversos processos fisiològics implicats en el sistema de control de la glucèmia, el sistema immunitari i la reproducció entre d'altres.

Més important que la quantitat de greix, és la distribució d'aquest. L'any 1947, va ser descrit l'existència de dos patrons de distribució del greix corporal: *el ginoide*, observat normalment en dones i *l'androide*, més freqüent en els homes (*Vague J, 1947*). En l'obesitat ginoide els dipòsits grassos s'acumulen a la zona femoral i dels glutis (distribució perifèrica dels greixos) i generalment no va associada a un augment del risc per a la salut. En canvi, en l'obesitat de tipus androide els dipòsits de greix s'acumulen a la zona abdominal (distribució central dels greixos) i sí que està associada a un augment de la morbiditat (*Foz M et al, 1998; Kaplan NM et al 1989; Kissebah AH, 1994*). Així doncs, dues persones amb el mateix grau de sobrepès poden tenir una distribució del greix corporal diferent i per tant un risc de patir malalties associades també diferent. Cal tenir present que tant el sexe (*Montague CT, 1998*) com l'ètnia (*Conway JM, 1995*) són factors que afecten a la distribució i també al metabolisme de l'AT.

L'AT abdominal inclou el greix subcutani (SAT) situat a la regió abdominal i el greix visceral (VAT), situat a la cavitat abdominal al voltant dels principals òrgans. Aquest darrer es subdivideix en *omental* (al voltant de les vísceres), *mesentèric* (al voltant de l'intestí) i el *retroperitoneal* (al voltant dels ronyons).



### 1.2.1. Fisiologia del teixit adipós.

En condicions normals el teixit adipós representa un 15-20% del pes corporal de l'home, i entre el 20-25% del pes de la dona. Es tracta d'un teixit conjuntiu altament especialitzat en l'emmagatzematge energètic on predomina un tipus cel·lular d'origen epitelial denominat adipòcit. Els adipòcits deriven dels seus precursors els fibroblasts, cèl·lules riques en col·lagen de tipus I i II amb una elevada plasticitat i capacitat mitòtica. Els adipòcits madurs perden un cop diferenciats la capacitat de desplaçar-se o duplicar (mitosi) i representen aproximadament un 50% de les cèl·lules del teixit adipós. El 50% restant està constituït per cèl·lules de naturalesa intersticial o d'estroma vascular, inclosos fibroblasts, cèl·lules endotelials i nervioses, macròfags i pre-adipòcits (estadi intermedi de la diferenciació adipocitària o adipogènesi), aquest 50 % que no són adipòcits, s'anomena fracció estroma vascular (SVC).

Constitueixen el WAT adipòcits polièdrics que contenen una única vacuola lipídica que ocupa la major part del citoplasma i desplaça la resta d'òrgànuls (inclòs el nucli, excèntric i aplanat) a la perifèria cel·lular. A diferència dels adipòcits del WAT, els adipòcits del BAT presenten nombroses mitocondries i vacuoles lipídiques repartides per tot el citoplasma i un nucli central molt actiu. Els mitocondris contribueixen positivament al consum energètic i el consegüent desgast del contingut de les vacuoles lipídiques. De fet, una de les seves principals característiques és l'elevada expressió de la proteïna de desacoblament mitocondrial-1 (UCP-1), que indueix el consum energètic mitjançant la producció de calor (*Cannon and Nedergaard 2004*).

Els estudis de transcripció gènica, han descrit un origen i naturalesa diferent dels 2 teixits, ambdues línees cel·lulars diferirien des dels primers estadis de diferenciació (*Timmons and Sundberg, 2006*).

Les diferències existents entre els dos dipòsits -subcutàni i viceral- són evidents tant a nivell fisiològic com molecular (*Vöhl, Sladek et al. 2004; Peral and Camafeita et al, 2009 ; Perez-Perez and Ortega-Delgado et al, 2009; Tchernof A et al, 2013; Lee MJ et al, 2013*). Cal destacar diferències importants en l'expressió de molècules transportadores de glucosa de tipus 4 (GLUT4) i proteïnes 4 d'unió a retinol (RBP4), els PPAR $\gamma$ , la Leptina i els substrats receptors per a la insulina (IRS1) (*Lefebvre, Laville et al. 1998; Vöhl, Sladek et al. 2004*). L'activitat de la lipoproteïna lipasa (LPL), la taxa lipolítica basal i la capacitat de resposta a l'estímul adrenèrgic, així com la mida mitjana dels adipòcits, també difereixen entre els dos teixits (*Tchernof, Belanger et al. 2006; Boivin, Brochu et al. 2007*). Destaca en el teixit adipós OM la major expressió de proteïnes implicades en el transport i el metabolisme de la glucosa i els lípids, la síntesi de proteïnes, la resposta a estrès, i altres involucrades en processos inflamatoris (*Perez-Perez, Ortega-Delgado et al. 2009; Tchernof A et al, 2013; Lee MJ et al, 2013*).

El teixit adipós és el principal punt d'emmagatzematge d'energia en forma de triglicèrids. Els adipòcits contenen la maquinària necessària per al metabolisme dels lípids, incloent els 2 processos essencials: *la lipogènesi i la lipòlisi (Figura 3)*. La lipogènesi, correspon a la síntesi de triglicèrids, els quals un cop sintetitzats són emmagatzemats a la gota lipídica; La lipòlisi, fa referència al procés mitjançant el qual els triglicèrids són convertits en glicerol i en àcids grassos que passen al torrent sanguini on són dirigits cap als teixits que requereixen d'un aport d'energia.

### **Lipogènesi.**

La lipogènesi és el procés pel qual té lloc la síntesi d'àcids grassos, principalment en forma de triglicèrids. Aquest procés té lloc principalment en els adipòcits i també al fetge. Aquesta síntesi està sotmesa a un estricte control nutricional i hormonal. A nivell dels adipòcits aquest procés comença amb la captació de glucosa a través del transportador de glucosa de tipus 4 (GLUT4), proteïna que és translocada a nivell de la membrana plasmàtica gràcies a l'acció de la insulina. En condicions d'alta aportació energètica, quan l'activitat del cicle de *Krebs* és màxima, es generen altes concentracions d'àcid cítric que afavoreixen l'acció d'importants enzims com són: l'enzim sintetitzadora d'àcids grassos (FASN), l'enzim carboxilasa per l'acetil-CoA (ACC), l'enzim desaturasa per al Estearoil-CoA (SCD), la ligasa per citrat i ATP (ACL) i els enzims dedicats a la producció de NADPHs (és el cas de l'enzim màlic) i aquells involucrats en la ruta de les hexoses monofosfat, com la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa, i implicades en l'esterificació dels triglicèrids (TAGs) i del diacilglicerol (DGAT), com la aciltransferasa mitocondrial de glicerol-3-fosfat (mGPAT).

Així, durant aquest procés es produeix la inhibició de la fosfofructosa quinasa, de manera que la glucosa es dirigeix cap a la ruta de les pentoses fosfat en detriment de la ruta glicolítica per permetre la síntesi de alts nivells de NADPH que són requerits durant la lipogènesi; a més a més, el gliceraldehid-3-fosfat generat en la ruta de les pentoses fosfat entra també a la ruta glicolítica per generar acetil-CoA, que s'emprarà també en la síntesi d'àcids grassos. L'enzim acetil-CoA carboxilasa juntament amb la sintasa d'àcids grassos porten a terme la síntesi d'àcids grassos. A continuació l'enzim acyl-transferasa transfereix de manera successiva 3 àcids grassos al glicerol per generar triacilglicerol, que s'emmagatzema a la gota lipídica de l'adipòcit.

D'altra banda, els triglicèrids que genera el fetge són dirigits també cap al teixit adipós en forma d'apolipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL). Quan arriben al teixit adipós, la lipoproteïna lipasa permet la captació dels àcids grassos que porten aquestes partícules. D'aquesta manera els àcids grassos que procedeixen del fetge es converteixen en triglicèrids en el teixit adipós per al seu emmagatzematge.

Els enzims involucrats en la producció d'àcids grassos estan estretament regulats durant els períodes de dejuni i ingesta; així, les activitats específiques d'aquests enzims són molt baixes en situació prepancreàtica, per regla general. Amb la ingesta d'aliments (especialment durant el consum de dietes riques en carbohidrats) les seves activitats específiques augmenten de forma concomitant a la concentració plasmàtica de glucosa i insulina. El primer sistema de control de la lipogènesi el trobem a nivell transcripcional.

## **Lipòlisi**

La lipòlisi és el procés mitjançant el qual els triglicèrids emmagatzemats a nivell de la gota lipídica dels adipòcits es transformen en 3 molècules d'àcid gras i una molècula de glicerol que passen al torrent sanguini.

La lipòlisi està sotmesa a un estricte control tan nutricional com hormonal. Malgrat aquest control, existeix una taxa de lipòlisi basal per la qual els triglicèrids són metabolitzats contínuament a nivell de l'adipòcit.

Són potents inductors de la lipòlisi la insulina, l'adrenalina i la noradrenalina. Les catecolamines s'uneixen a la membrana plasmàtica dels adipòcits, als receptors  $\beta$ -adrenèrgics i als  $\alpha$ 2-adrenèrgics; mentre que els primers potencien la lipòlisi, els segons la inhibeixen. Els receptors adrenèrgics estan acoblats a proteïnes G que modulen l'acció de la adenilat ciclase, la qual sintetitza AMP cíclic (cAMP) a partir d'ATP. El cAMP intervé en l'activació de la proteïna quinasa A (PKA) que fosforila a la lipasa sensible a hormones (HSL) que és l'enzim limitant en la lipòlisi. La HSL genera diacilglicerol i monoacilglicerol a partir dels triglicèrids. L'últim pas de la lipòlisi es porta a terme per una monoglicèrid lipasa (MGL) que trenca el monoacilglicerol en un àcid gras i en glicerol. Aquest últim és alliberat al torrent sanguini a través d'una proteïna de membrana anomenada aquaporina. El transport d'àcids grassos no està completament descrit encara que es coneixen algunes proteïnes que intervenen en ell com ara la caveolina-1 o el CD36 / FAT (*Abumrad et al., 1993*). Un cop al torrent sanguini, els àcids grassos són captats per altres teixits per obtenir energia. La inhibició de la lipòlisi és portada a terme pel receptor  $\alpha$ 2-adrenèrgic acoblat proteïna G i pel receptor de la insulina. L'activació del receptor de la insulina de l'adipòcit porta a l'activació de l'enzim fosfodiesterasa-3B que trenca el cAMP la qual cosa condueix a la inactivació de la PKA.

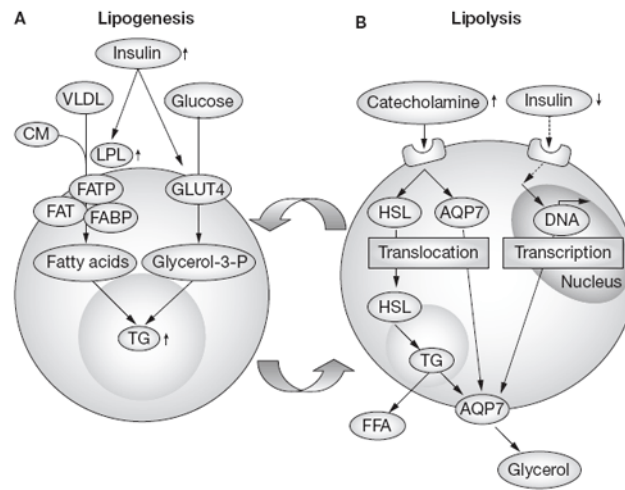


Figura 3: Esquema procés de lipogenesi (A) i de lipolisi (B)

Font: Maeda N, Funahashi T, Shimomura I. Metabolic impact of adipose and hepatic glycerol channels aquaporin 7 and aquaporin 9. 2008; 4:627-34.

### 1.2.2. Expressió gènica teixit adipós i estat pro-inflamatori crònic

L'obesitat pot ser considerada com una situació/estat d'inflamació crònica de baix grau. El teixit adipós del pacient obès es caracteritza per presentar una producció i secreció d'una ampla varietat de molècules pro-inflamatòries entre les quals es trobarien: Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleuquina-6 (IL-6), factor inhibidor de l'activador del plasminogen tipus 1 (PAI-1), proteïna quimiotàctica dels monòcits tipus 1 (MCP-1), entre altres. Aquestes molècules tenen un efecte a nivell local en la fisiologia del teixit adipós, a més del potencial efecte sobre altres òrgans diana que suposa la secreció d'aquests factors. Alguns estudis han reportat importants diferències en l'expressió gènica del teixit adipós del pacient obès respecte al pacient prim (*Lee YH et al, 2005*) i s'ha demostrat com la pèrdua ponderal es tradueix en una milloria de la situació pro-inflamatòria crònica associada a obesitat a través de la disminució en la producció de molècules pro inflamatòries (*Exposito K et al, 2003*).

*Exposito K et al, 2003* descriuen una cohort de 120 dones pre-menopàusiques (25- 49 anys), amb IMC superior a 30 i no afectes de diabetis, hipertensió o dislipèmia. Aquestes pacients van ser randomitzades a un grup d'actuació (N=60) on l'objectiu era assolir una reducció de pes del 10 % a través d'un programa d'activitat física + dieta mediterrània lleument hipocalòrica, i a un grup control (N=60). Transcorreguts 2 anys des de la randomització, es va observar com aquelles pacients que havien reduït un 10% del seu pes presentaven una disminució de factors inflamatoris circulants (IL-6, IL-18, proteïna C Reactiva) a més de presentar un perfil lipídic més favorable i una milloria en la sensibilitat a la insulina determinada a través de HOMA-IR.

Altres estudis, han demostrat com l'obesitat s'associa a una situació pro-inflamatòria crònica a través d'una expressió incrementada de gens pro-inflamatoris a nivell del teixit adipós. *Lee YH et al, 2005*, recullen en el seu treball una cohort de 39 indis Pima, 20 d'ells afectes d'obesitat mòrbida (amb mitjana de BMI de 55) i 19 amb BMI < 30 (mitjana de BMI de 27), tots ells no diabètics. A aquests pacients es va estudiar el perfil d'expressió gènica a nivell de teixit adipós subcutani a través de microarray, observant-se un total de 244 gens infra-expressats (*downregulated*) i 433 gens sobre-expressats (*upregulated*) en obesitat. *Lee et al* van observar com un gran nombre de gens pro-inflamatoris i relacionats amb la resposta immune estaven àmpliament sobre-expressats en el teixit adipós subcutani del pacient obès. Alguns d'aquests gens van ser: proteïna quimioattractant dels monòcits tipus 1 (MCP-1 o CCL2), proteïna inflamatori dels macròfags 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$  o CCL3), (MIP-1 $\beta$  o CCL4), (MIP-2 $\alpha$  o CXCL2), (MIP-2 $\beta$  o CXCL3), factor 1 derivat de l'estroma cel·lular (SDF-1 o CXCL12), interleuquina-8 (IL-8 o CXCL8) i factor inhibidor de la migració dels macròfags, limfocina capaç de regular la funció dels macròfags i la inflamació (MIF); tots ells, gens implicats en atraure i afavorir la infiltració al

teixit adipós per part de macròfags i monòcits. Altres gens sobreexpressats en el teixit adipós del pacient obès van ser gens codificants per molècules de senyalització cel·lular i reguladors de la transcripció, sense arribar a ser estadísticament significatiu. A la categoria de gens infraexpressats, es va observar una expressió significativament disminuïda a nivell de gens implicats en algunes vies metabòliques i en el transport d'electrons, sense especificar-se quins gens.

En aquest treball, es va detectar també diferències estadísticament significatives en l'expressió de 12 gens localitzats al braç curt del cromosoma 11, entre les regions 22q i 24q, regió fortament vinculada amb el BMI en la població d'indis Pima. 6 d'aquests gens candidats per la seva posició, van resultar sobre-expressats en els adipòcits dels subjectes obesos, entre els quals: C1q i factor de necrosis tumoral relacionat amb la proteïna-5 (C1QTNF5), antigen de superfície cel·lular Thy-1 (THY1), proteïna de fasciculació i elongació (FEZ1), N-metiltransferasa nicotinamide (NNMT), factor induïble per hipòxia tipus 1 (HYOU1) i transgrelina. Els altres 6 gens, van resultar estar infra-expressats: membre 4 de la superfamília de gammaglobulines (IGSF4), proteïna vacuolar 11 (VPS11), Acetilcoenzim-A-acetiltransferasa-1 (ACAT-1), SNF-1-like quinasa 2 (SNF1LK2), proteïna sterol-C5-desaturasa (SC5DL) i el receptor implicat en el creixement axonal tipus 3 (ROBO3). 2 d'aquests gens presents en aquesta localització fortament relacionada al BMI i que es sobre-expressaven en obesitat -1QTNF5 i THY1- corresponen a 2 gens directament associats a inflamació i resposta immunitària.



## 2. HIPÒTESI

---





**La pèrdua de pes promoguda per la cirurgia bariàtrica és capaç de modificar l'expressió gènica del teixit adipós subcutani, contribuint a explicar els canvis que tenen lloc a nivell dels diferents paràmetres clínics i de la sensibilitat a la insulina.**



## **3. OBJECTIUS**

---



**3.1. Estudiar els canvis en l'expressió gènica del teixit adipós subcutàni que tenen lloc després de la màxima pèrdua de pes promoguda per la cirurgia bariàtrica i comparar aquests canvis amb l'expressió gènica d'un grup control de subjectes apareaparellats per edat i sexe.**

**3.2. Aprofundir en l'estudi d'una selecció de 5 gens dels gens que més veuen modificada la seva expressió després de la cirurgia bariàtrica i la seva associació amb paràmetres clínics i amb l'expressió gènica d'altres factors.**

**3.3. Estudiar els canvis en la sensibilitat a la insulina després de la pèrdua de pes promoguda per la CB i la seva associació amb els canvis en l'expressió gènica del teixit subcutani.**



## **4. SUBJECTES I METODOLOGIA**

---





#### 4.1. Disseny experimental

Es tracta d'un estudi pilot, longitudinal i transversal, constituït per quatre cohorts de pacients:

**Cohort 1:** 25 pacients obesos mòrbides intervingudes de cirurgia bariàtrica mitjançant bypassgàstric, estudiades abans i després d'haver tingut lloc la màxima pèrdua de pes promoguda per la CB (18 mesos) i obtinguda biòpsia de SAT durant la CB i transcorreguts els 18 mesos. Estudi *longitudinal*.

**Cohort 2:** 25 dones primes aparellades per edat amb els subjectes de la Cohort 1. ). Intervingudes de manera electiva de paret abdominal. Estudiades abans de la intervenció i obtinguda biòpsia de SAT durant aquesta. Estudi *transversal*.

**Cohort 3:** 132 pacients (obesos i no obesos), intervinguts de manera electiva de paret abdominal. Estudiats abans de la intervenció i obtinguda biòpsia de SAT durant aquesta. Estudi *transversal*.

**Cohort 4:** 16 pacients operats de CB, operats pel mateix cirurgià i per la mateixa tècnica (BPG laparoscòpic), estudiats abans de la intervenció i obtinguda biòpsia de SAT a l'inici i al final d'aquesta. Estudi *longitudinal* per excloure l'efecte de l'acte quirúrgic.

#### 4.2. Subjectes d'estudi

Les persones participants al present estudi van ser reclutades de manera activa per la Unitat d'Endocrinologia, Diabetis i Nutrició i la Unitat de Cirurgia General i Digestiva de l'Hospital Josep Trueta de Girona (Cohorts 1, 2 i 3). Els pacients que conformen la cohort 4 van ser reclutats de manera activa pel servei de cirurgia general de l'hospital de la Vall d'Hebró. Es va convidar a participar a tots els pacients afectes d'obesitat mòrbida candidats a cirurgia bariàtrica, i pacients sotmesos a procediments quirúrgics electius de paret abdominal. Els pacients inclosos complien tots els criteris d'inclusió i cap els criteris d'exclusió.

Criteris d' inclusió:

- i) Pacients d'ètnia caucàsica amb edats compreses entre els 18 i 65 anys.
- ii) Habilitat per entendre els procediments de l'estudi.
- iii) Haver firmat el consentiment informat per a la participació a l'estudi.

Criteris de exclusió:

- i) Malaltia sistèmica greu (actual o passada) no relacionada amb la obesitat, on s'inclouria qualsevol tipus de càncer.
- ii) Malaltia sistèmica amb activitat inflamatòria inherent com seria l'artritis reumatoide, Lupus sistèmic, malaltia de Crohn, colitis ulcerosa, etc.
- iii) Malaltia viral crònica tal com virus de la immunodeficiència adquirida, hepatitis B Hepatitis C, etc.
- iv) Síntomes i/o signes clínics de procés infecció actiu en el moment d'estudi o en el més anterior al reclutament.
- v) Tractament actiu amb fàrmacs antiinflamatoris (esteroidals o no), antibiòtics, antifúngics o tractament biològic tals com, antiTNF- $\alpha$  (Ex: etanercept), inhibidors de l'activació dels limfòcits T (Ex: efalizumab), etc.

Previ al reclutament i obtenció de les mostres, tots els pacients van ser degudament informats verbalment i per escrit dels objectius d'estudi i dels procediments. Cada pacient va rebre un informe escrit amb l'objectiu de l'estudi, els procediments i riscos d'aquests i va donar el seu consentiment informat per escrit.

La privacitat i anonimat de totes les mostres queda protegida per les lleis nacionals (LO15/1999, LGC5/2002 i per la llei 14/2007 de recerca biomèdica) i europea (95/46/CE).

El protocol, confeccionat seguint les directrius que figuren al Reial decret 223/2004 que defensen els principis de benevolència i no maleficiència, va ser aprovat pel propi comitè d'ètica de l'Hospital Josep Trueta i per un comitè ètic independent, qui després de revisar els objectius i les propostes de realització de l'estudi, va donar el seu dictamen favorable a la realització d'aquest. L'estudi es va iniciar després de rebre l'aprovació dels comitès d'ètica.

### **4.3. Determinacions clíniques**

#### **4.3.1. Caracterització antropomètrica.**

Totes les exploracions van ser realitzades entre les 8 i les 9 hores del matí, després d'un dejuni mínim de 8 hores.

L'índex de massa corporal (IMC) es calcula mitjançant la divisió del pes (en quilograms) per l'altura (en metres) al quadrat. El perímetre de la cintura s'estableix a l'altura de l'última costella flotant i la cresta ilíaca. El perímetre del maluc es mesura en la regió glútia. La fórmula

de Deurenberg (*Deurenberg, van der Kooy et al . 1991*) i la bioimpedància elèctrica (*TANITA® MC - 190 Body Composition Analyzer, Tanita Corporation, Tòquio, Japan*) s'utilitzen per estimar el percentatge de greix corporal. Els participants es classifiquen en funció de l'IMC com a subjectes primers ( $IMC \leq 25 \text{ kg / m}^2$ ), amb sobrepès ( $25 < IMC \leq 30 \text{ kg / m}^2$ ), obesitat ( $30 < IMC \leq 40 \text{ kg / m}^2$ ), o obesitat mòrbida ( $40 \text{ kg/m}^2 < IMC$ ), segons les directrius de l'OMS (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>). S'estableix com a punt de tall un IMC de  $30 \text{ kg / m}^2$  per identificar els casos d'obesitat com estableix la OMS. Els percentatges de greix obtinguts mitjançant bioimpedància també són útils per distingir els subjectes obesos dels individus control ( $\geq 25 \%$  en homes i  $\geq 35 \%$  en dones) tal com estableix la OMS.

#### 4.3.2. Caracterització bioquímica.

Les nivells plasmàtics de glucosa circulant van ser determinats (en dejú i per duplicat) mitjançant una reacció d'oxidació i la conseqüent variació colorimètrica, monitoritzada amb un espectrofotòmetre *Beckman Glucose Analyzer II* (*Beckman Instruments, Brea, Calif*). Les concentracions de colesterol total en sèrum van ser mesurades emprant un mètode enzimàtic-colorimètric basat en la reacció d'esterificació/oxidació catalitzada per peroxidases (*Cobas CHOL2, Roche*). Les concentracions sèriques del colesterol HDL (*HDL-c*) van ser quantificades utilitzant un mètode enzimàtic-colorimètric homogeni basat en la reacció d'esterificació/oxidació catalitzada per peroxidases (*Cobas HDLC3, Roche*). Les concentracions dels triglicèrids en sèrum van ser determinades mitjançant un mètode enzimàtic-colorimètric basat en la reacció del glicerol fosfat oxidasa / peroxidasa (*Cobas TRIGL, Roche*). Les determinacions de les concentracions d'aquests tres paràmetres: colesterol total, HDL-c i triglicèrids, es van realitzar de forma automatitzada a l'autoanalitzador de bioquímica *Cobas c-711 de Roche*. Finalment, la concentració sèrica de lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) es va estimar utilitzant la fórmula de càlcul de *Friedewald*, segons la qual:  $LDLc = CT - [HDLc + TG/5]$ . Les concentracions sèriques de T3, T4 i TSH, totals i lliures, van ser estudiades per electroquimioluminescència (*Roche Diagnostics, Basel, Switzerland*). L'hemoglobina total (*Hb*) i la proteïna C reactiva (*PCR*) van ser mesurades per espectrofotometria, en mostres de plasma amb un anticoagulant comú, l'àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA) (*Coulter Electronics, Hialeah, FL*).

Les proteïnes suspeses en fluids amb una elevada concentració de glucosa es glicosilen mitjançant la unió covalent de molècules de glucosa i generen proteïnes glicosilades o glucosilades. La Hb té una forta tendència a unir molècules de glucosa lliures en el plasma. El percentatge d'aquestes proteïnes amb molècules de glucosa adherides és el que s'anomena hemoglobina glicada o glicosilada (*HbA1c*), un indicador de les concentracions de glucosa en

el torrent sanguini durant el temps de vida mitjana de la Hb ( de 90 a 120 dies ) i un marcador indirecte de resistència a la insulina . La HbA1c d'un subjecte adult sà oscil·la entre el 4 i el 6%. Un valor de HbA1c superior o igual a 6,5% pot utilitzar-se com a criteri diagnòstic de DM2 si es confirma en una segona determinació, s'acompanya d'uns nivells de glucosa plasmàtica superiors a 126mg/dl o es confirma mitjançant un test de tolerància oral a la glucosa. El percentatge d'HbA1c es va analitzar mitjançant mètodes cromatogràfics , immunològics i electroforètics en un lisat d'eritròcits.

#### **4.3.3. Test de tolerància oral a la glucosa**

Mitjançant el *test de sobrecàrrega oral de glucosa ( OGTT )* es pot establir el grau d'intolerància a la glucosa d'un subjecte, un paràmetre inversament proporcional a la sensibilitat a la insulina . El OGTT té en compte els valors de glucosa circulant en dejú , i 30 , 60 , 90 i 120 min després d'ingerir 75 g de glucosa .

Els valors establerts per al criteri de normotolerància són de 60 a 100 mg de glucosa per decilitre ( dl ) de sang en dejú , de menys de 200 mg / dl 1 hora després , i de menys de 140 mg / dl en finalitzar el OGTT . Valors entre 140 i 200 mg / dL en el minut 120 indiquen un cert deteriorament en la tolerància a la glucosa i un major risc de desenvolupar diabetis . Concentracions de glucosa circulant per sobre de 200 mg / dl al minut 120 del OGTT són diagnòstiques de diabetis sempre que s'acompanyin d'un dels altres 3 criteris diagnòstics (glucosa plasmàtica en dejú superior a 126mg/dL, HbA1c superior a 6,5% o clínica insulino-pènica). Concentracions de glucosa plasmàtica basal compreses entre 100 i 126 són definides com glucèmia plasmàtica basal alterada, i impliquen un major risc de desenvolupar diabetes.

#### **4.3.4. Sensibilitat a la insulina**

El *CLAMP euglucèmic hiperinsulinèmic (Kim JK et al, 2004)* representa la tècnica de referència pel càlcul de la sensibilitat perifèrica a la insulina. Aquesta prova, molt més llarga (120 minuts) i laboriosa, ha esdevingut el mètode de referència per valorar l'acció de la insulina (*De Fronzo RA et al, 1979*). Després d'una nit de dejú, s'insereix un catèter antero-cubital en ambdós braços a través dels quals s'administra insulina (insulina regular, Actràpid, Novo Nordisk) a raó de 80mU/m<sup>2</sup>/min durant 5 min, 60mU/m<sup>2</sup>/min durant 5 min més, seguit immediatament després per una infusió constant d'insulina a raó de 40mU/m<sup>2</sup>/min. Pel mateix braç, s'infon una solució de sèrum glucosat al 20%, que s'inicia al minut 4 de la prova a velocitat de 2mg/kg/min, essent

ajustada posteriorment en funció dels controls de glucèmia plasmàtica, amb l'objectiu de mantenir una concentració plasmàtica de glucosa el més propera possible a 100 mg/dL. A través del segon catèter antero-cubital té lloc un seguiment dels nivells de glucèmia plasmàtica, mitjançant extraccions de plasma separades per intervals de 5 minuts, i que permet regular la velocitat de perfusió de sèrum glucosat per mantenir la glucèmia a 100mg/dL. La situació d'hiperinsulinisme que té lloc durant la prova inhibeix la secreció pancreàtica d'insulina a la vegada que una glicèmia de 100mg/dL inhibeix també la neogluco gensi hepàtica. La sensibilitat a la insulina s'avalua com la taxa d'infusió de glucosa durant els darrers 40' de la prova *'fase estacionaria'*, essent proporcional aquesta velocitat d'infusió a la velocitat de captació de glucosa per part dels teixits perifèrics, majoritàriament, compartiment muscular. (*Figura 4*).

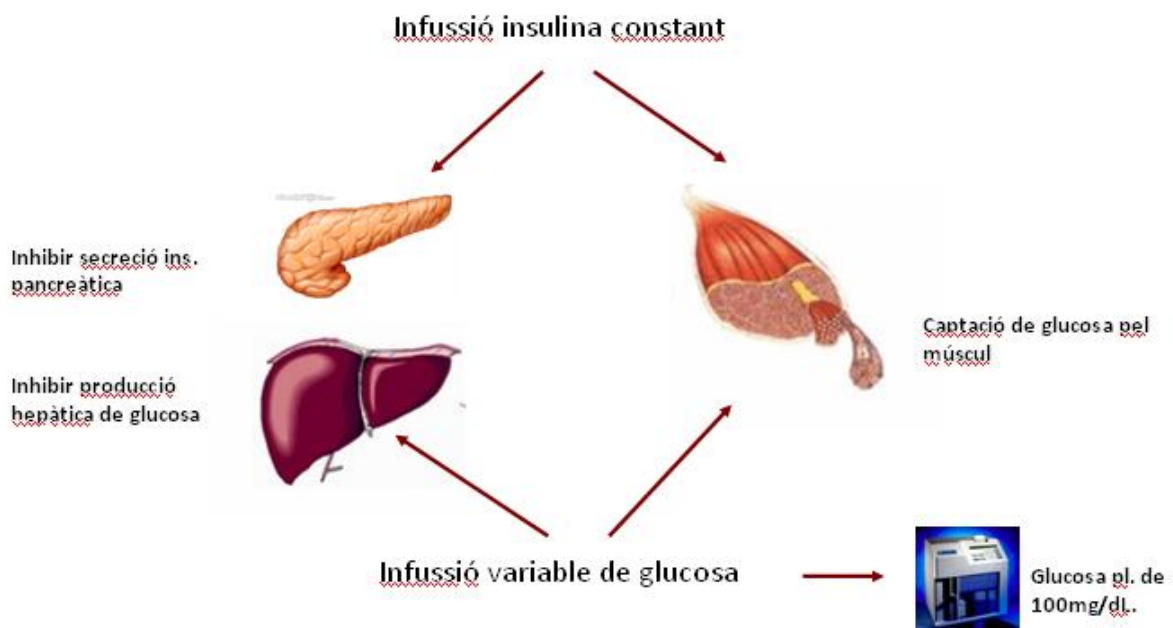


Figura 4.: Esquema procediments CLAMP Euglucèmic Hiperinsulinèmic.

Mitjançant una infusió constant d'insulina, calculada en funció del pes del pacient, té lloc una inhibició de la secreció endògena d'insulina. La hiperinsulinèmia que té lloc durant la prova facilita la captació de glucosa per part dels diferents teixits, principalment el múscul. La infusió de glucosa s'ajusta cada 5' amb l'objectiu de mantenir una situació d'euglucèmia de 100mg/dl, capaç d'inhibir la neogluco gensi hepàtica i de garantir aport suficient per a la captació de glucosa per part del múscul. En la fase estacionaria, infusió de glucosa és igual a captació de glucosa per part del compartiment muscular.

La resistència a la insulina pot ser calculada segons el *model homeostàtic de resistència a la insulina (HOMA)* (*Bonora E et al. 2000*) que utilitza els valors de glucosa i insulina en dejú segons la fórmula  $HOMA-IR = (insulina \times glucosa) / 22.5$ , on la insulina es presenta en  $\mu U / ml$  i la glucosa en  $mmol / l$ . Aquesta, es una fórmula simplificada de l'equació inicial formulada per un equip d'investigació de la universitat d'Oxford (*Turner RC et al, 1979*). Aquesta fórmula, simplifica el procediment matemàtic inicial, assumint una relació simple en el *feedback* glucosa-insulina i, després de ser validada amb altres proves més laborioses com el CLAMP, ha estat utilitzada ampliament per la seva major senzillesa. Es considera que es pot parlar de resistència insulínica amb valors de  $HOMA-IR \geq 2.7$  (*Lebovitz HE et al, 2002*). També a partir de les concentracions plasmàtiques basals de glucosa i insulina, es pot estimar la secreció d'insulina (HOMA-IS), a través de la fórmula:  $20 \times insulina \text{ en dejú} / glucèmia \text{ en dejú} - 3,5$ .

#### **4.4. Determinacions de laboratori.**

##### **4.4.1. Protocol obtenció de les mostres de teixit adipós**

Les mostres de teixit adipós subcutani i visceral van ser obtingudes durant el procediment quirúrgic corresponent al by-pass gàstric. Per a la **cohort 1** (estudi longitudinal), les mostres van ser extretes per part del servei de cirurgia de l'Hospital Josep Trueta de Girona. Les mostres corresponents a la **cohort 2** (estudi transversal), van ser extretes durant la realització de cirurgies electives - mitjançant procés de cirurgia oberta o procés laparoscòpic- als serveis de cirurgia dels centres col·laboradors (Hospital Dr. Josep Trueta de Girona, Hospital Virgen del Rocío de Màlaga i la Clínica Universitària de Navarra). Les cirurgies electives realitzades van ser bàsicament herniorràfies inguinals i umbilicals, i colecistectomies fredes. Per la **cohort 3** (estudi inici-final de l'acte quirúrgic), les mostres van ser obtingudes a l'inici i al final (2h) del by-pass gàstric per part del servei de cirurgia de l'hospital de la Vall d'Hebró. El teixit, immediatament rentat amb una solució salina estèril i trossejat en fragments de ~100mg sobre una base de neucarbònica, va ser immediatament ultracongelat amb nitrogen líquid abans de ser emmagatzemat a una temperatura de  $-80^{\circ}C$  capaç de garantir l'estabilitat del teixit. Les mostres de teixit, igual que les mostres de plasma i sèrum, van ser dipositades al Biobank de l'Hospital Josep Trueta.

#### 4.4.2. Protocol per a l'anàlisi d'expressió gènica.

##### I. Extracció RNA

És possible extreure i purificar el RNA total d'un fragment de teixit adipós ( o de qualsevol altre tipus de mostra biològica ) mitjançant mètodes cromatogràfics.

La mostra de teixit adipós congelada s'introdueix en un *Eppendorf*® estèril de base rodona amb 1 mL de *QIAzol*® *Lysis Reagent* (*QIAGEN; EUA*) fred. El *QIAzol*® ( o *Trizol*® ), una barreja comercial de guanidina , tiocianats , fenols i alcohols que condiciona la degradació de les cèl·lules i el manteniment del material genètic. El *QIAzol*® estabilitza el DNA i l'RNA, i inactiva les RNAses i DNAsas que podrien degradar-los. Dins d'aquest solvent , i mitjançant l'ús d'un homogeneïtzador *Tissuelyser*® (*QIAGEN; EUA*) , es tritura la mostra durant 10 minuts a nivell subcel·lular.

Després d'un període de repòs de 5 minuts, es passa la mostra a un altre *Eppendorf*® estèril i s'afegeixen a la solució 300µL de cloroform. Es barreja enèrgicament durant 15 segons i es deixa reposar durant 3 minuts. A continuació, la solució es centrifuga durant 15 min a 4°C i 1,200 *xg* . La barreja perd llavors la seva homogeneïtat per mostrar tres fases clarament diferenciades de les quals , la fase superior , completament incolora , és la que conté el RNA dissolt i ja separat de la resta de components. Aquesta fase , d'uns ~ 600 µl, es transferida a un nou *Eppendorf*® estèril on es barreja amb un volum equivalent d'etanol absolut fred i estèril. En aquestes condicions és possible que el material genòmic contingut en la solució comenci a ser visible a causa de la desnaturalització de les fibres de RNA. La solució es transfereix llavors a una columna cromatogràfica *RNeasy*® *Mini Spin column del RNeasy*® *Lipid Tissue Kit* ( *QIAGEN , EUA* ), un kit comercial que permet aïllar i purificar l'RNA total de forma ràpida i senzilla. El mecanisme de purificació es basa en les concentracions alcohòliques decreixents amb què es renta la columna cromatogràfica amb el material genòmic adherit abans de la seva elució final en un volum d'aigua destil·lada lliure en RNases . D'aquesta forma és possible obtenir entre 4 i 10 mg de RNA pur a partir de 100 mg de teixit adipós .

La puresa i la concentració de l'ARN obtingut s'estimen mitjançant mètodes espectrofotomètrics. El *NanoDrop*™ (*Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA*) permet valorar de manera precisa la concentració d'RNA de la solució final i la seva puresa al analitzar també altres aspectres d'absorció per a longituds d'ona diferents de les dels oligonucleòtids (260 nm). Un Bioanalitzador (*Bioanalyzer*™, *AgilentTechnologies, Santa Clara, EUA*) és una plataforma microfluídica útil per a quantificar el grau de degradació del material genòmic obtingut



(*RIN number*). Es basa en la presència relativa de les principals subunitats ribosomals Principals, la 18S i la 28S, ambdues molt abundants, a fi de valorar la integritat de la mostra.

## II. Retrotranscripció

La retrotranscripció consisteix en generar una cadena de DNA complementària a la cadena motlle d'RNA (*Figura 5*).

L'RNA en solució aquosa encara lliure d'RNAses és extremadament làbil. Els cicles de congelació i descongelació comporten la formació de cristalls que poden fragmentar els oligonucleòtids i inutilitzar la informació que es pugui derivar del seu estudi. Per aquesta raó és preferible descartar qualsevol mostra de RNA en solució aquosa a partir del tercer cicle de congelació / descongelació, o aquelles mostres amb *RIN numbers* al bioanàlitzador inferiors a 7.

L'alternativa més recurrent per allargar el temps de vida útil d'aquest tipus de mostres és la *retrotranscripció* de l'RNA missatger (mRNA) a cDNA, un DNA monocatenari sintetitzat a partir dels mRNAs en suspensió però molt més estable. Amb aquest propòsit, kits comercials com el *High Capacity® cDNA Archive Kit (Applied Biosystems; Dinamarca)* permeten, mitjançant l'ús d'encebadors aleatoris, nucleòtids lliures i una retrotranscriptasa termosensible, la total conversió mRNA a cDNA.

La reacció de retrotranscripció consta de 2 etapes, una de *melting* o associació de seqüències complementàries (encebadors amb molècules de mRNAs), de 10min a25°C, i una altra d'elongació de seqüències i degradació de molècules de mRNA, dirigida per l'acció de les retrotranscriptases a 37°C durant 120 min.

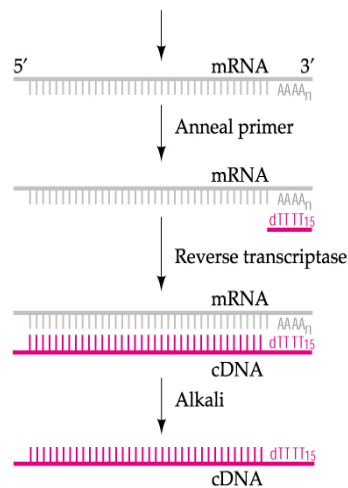


Figura 5: Esquema procediment de retrotranscripció. Font: Imatge extreta del manual del servei de genòmica del IIBm (SQP) 2014.

### III. PCR en temps real

Mitjançant l'ús de parelles d'encebadors, sondes, fluorocroms, tampons, nucleòtids lliures i polimerases termòfiles, les tècniques de *Realtime (RT)-PCR* permeten deduir de l'emissió fluorescent, relativa i específica per a cada cicle d'amplificació, els valors d'expressió dels gens estudiats. Cada assaig *TaqMan®* (*Applied Biosystems; Dinamarca*) inclou un encebador (partidor, iniciador o *primer*) directe (*forward primer*) que permetrà duplicar la cadena de cDNA de 3' a 5', i un altre invers (*reverse primer*) per la seqüència complementària. Els assajos *TaqMan®* contenen també una sonda d'aproximadament 50nts amb un fluorocrom adherit a un extrem i el seu inhibidor específic (*quencher*) fixat a l'altre. La sonda (*probe*) és també complementària a la seqüència genòmica sotmesa a estudi.

La tecnologia *TaqMan®* aprofita la capacitat exonucleasa 5'→ 3' de la DNA polimerasa per degradar les sondes a mesura que s'estenen els *primers* i es dupliquen les seqüències de cDNA. Cada sonda degradada equival a un fluorocrom lliure al mig de l'efecte inhibitori del *quencher* que abans l'acompanyava. D'aquesta manera, a mesura que es succeeixen els cicles tèrmics (Cts) per a la replicació exponencial de seqüències (40 cicles de 15 segons a 92°C i 60segons a 60°C, per separar oligonucleòtids i amplificar seqüències, respectivament) augmenta el senyal fluorescent de la solució.

La tecnologia *Sybr®Green* (*Applied Biosystems; Darmstadt, Anglaterra*) utilitza aquest agent intercalant que emet fluorescència quan s'acobla a les molècules de DNA per a l'estudi de l'expressió gènica mitjançant RT-PCR. El sistema aprofita el fenomen de la *transferència d'energia mitjançant ressonància de fluorescència (FRET)*, per les seves inicials en anglès) per deduir l'expressió d'un gen a partir de l'emissió fluorescent resultant en cada Ct.

Es parla d'expressió *relativa* quan els valors d'expressió per gen i mostra es donen com el nombre de vegades en què el gen diana s'expressa respecte a un control endogen (gen l'expressió del qual no es veu alterada pels paràmetres sotmesos a estudi). En el cas particular del teixit adipós i els adipòcits humans, s'ha testat i seleccionat com a control endogen la *ciclofilina A (PPIA; RefSeq. NM\_002046.3)*. Les *ciclofilines* (Cyp40) són proteïnes d'expressió constitutiva que s'uneixen a les *ciclosporines* i actuen com immunosupressors. Es caracteritzen, entre altres coses, per la seva activitat *isomerasa peptidil-prolil* i catalitzen la isomerització de l'enllaç peptídic o per formar enllaços *cis* a partir d'enllaços *trans* de residus de prolina, facilitant el replegament de les proteïnes i les seves estructures secundàries i terciàries. En essència, les *ciclofilines* actuen com a *xaperones* per altres proteïnes. La *isomerasa peptidil-prolil A* (CypA o PPIA) és una proteïna del

citoplasma que combina un full  $\beta$  amb 2 hèlixs  $\alpha$ , interacciona amb la *ciclosporina A* i inhibeix les fosfatases dependents de complexos  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina.

Durant la RT-PCR cada mostra origina una corba sigmoïdal per a cada un dels gens estudiats, i un nivell de fluorescència determinat per a cada Ct al llarg dels 40 cicles d'amplificació. A partir d'aquestes corbes es determina el nombre de cicles necessaris per arribar a un valor de fluorescència arbitrari (*threshold*). El *valor Ct* es defineix llavors com el nombre de cicles necessaris en la RT-PCR per assolir un nivell de fluorescència determinat i és inversament proporcional al nombre de còpies del transcrit original de manera que, quantes més còpies hi ha a la mostra estudiada, menys Cts seran necessaris per aconseguir aquest *threshold* arbitrari.

La  $\Delta\text{Ct}$  es calcula com la diferència entre les Cts del gen diana i les Cts del control endogen per a la mateixa mostra de cDNA. Les variacions en l'expressió dels diferents gens per a cada mostra respecte al control endogen es quantifiquen mitjançant el valor  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ , que normalitza l'expressió de cada diana amb la del control endogen (*Livak and Schmittgen 2001*).

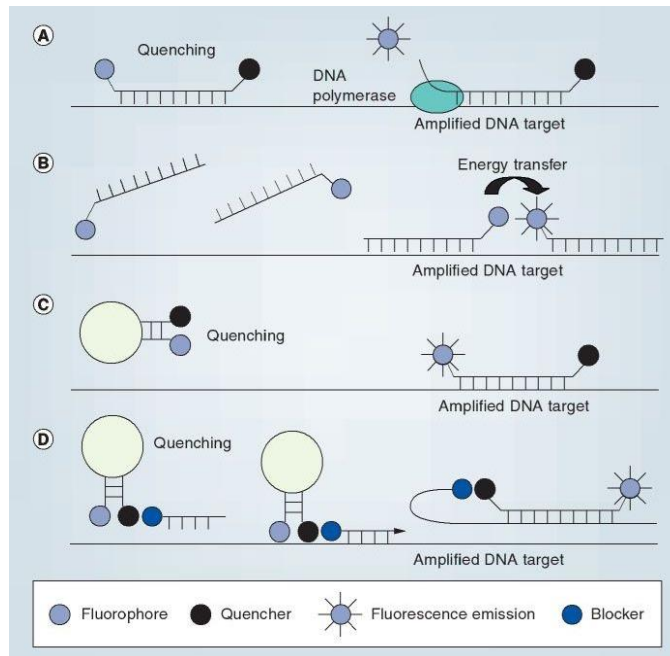


Figura 6: Esquema de procediments PCR en temps real.

Font: Maurin M. Real-time PCR as a diagnostic tool for bacterial diseases. *Expert Rev Mol Diagn.* 2012; 12:731-54.

#### IV. Microarray

La tecnologia utilitzada en el disseny dels *microarrays* es recolza en la propietat biomolecular fonamental del DNA que és la de *complementarietat* de les bases nitrogenades, doncs adenosina (A) i timina (T), i citosina (C) i guanina (G), s'uneixen específicament per ponts d'hidrogen.

Els *microarrays* de DNA, encara que amb gran varietat de formes, tenen el mateix disseny base. Un *microarray* és un *xip* de la mida aproximada d'un segell on, sobre una matriu inerta, es disposen milers de cadenes simples de DNA de seqüències gèniques, oligonucleòtids, de manera que sobre ells poden unir-se (*hibridar*) les seqüències complementàries corresponents que són les que s'obtenen del mRNA de les mostres biològiques que volem analitzar. Encara que hi ha diferents tècniques per a la construcció de *microarrays* de DNA (*Schena M et al. 1995; Tan CS et al. 2014*), el procediment bàsic per a treballar amb elles és el següent:

- 1) Marcar la mostra a estudiar amb un tint fluorescent.
- 2) Aïllar l' mRNA de les cèl·lules de interès i procedir a la seva còpia mitjançant síntesi *in vitro* per passar-lo a cDNA.
- 3) Desnaturalitzar aquest cDNA per obtenir cadenes simples.
- 4) Posar el cDNA fragmentat sobre el microarray on les cadenes simples de cDNA són atretes per les cadenes simples d'oligonucleòtids del microarray unint-se a elles per tornar a conformar l'estructura de doble-hèlix similar a la del DNA (*hibridació*).
- 5) Rentar el microarray per treure les cadenes simples de la mostra que no han *hibridat*.
- 6) Escanejar el microarray amb un làser per quantificar la fluorescència de cada gen.

Engeneral, l'activitat d'un gen està representada pel nombre de còpies d'mRNA d'aquest gen en una mostra de cèl·lules. Un alt (*baix*) nivell de fluorescència indica que moltes (*poques*) còpies del mRNA d'aquest gen han hibridat en el *xip* i que, per tant, el gen té molta(*poca*) activitat a la cèl·lula.

Per al present treball, es va utilitzar el *microarray* Human Gene 2.0 *ST array* (Affymetrix GeneChip® Santa Clara, CA). Es va amplificar 200ng de RNA total utilitzant el kit comercial Ambion® WT Expression Kit (Ambion/Applied Biosystems, Foster City, CA). Per a la hibridació i anàlisi de mRNAs de les mostres de teixit adipós. El *microarray* es va hibridar durant 16 hores a 45°C utilitzant el forn d'hibridació de GeneChip® (Hybridization Oven 645). Finalitzat el procés d'hibridació, es va rentar i tenyir la matriu utilitzant el kit comercial de fluids d'Affymetrix GeneChip®. Els resultats de cada *microarray* es van analitzar amb un scàner per a *microarrays* (Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G) seguint les instruccions del fabricant. Després del control de qualitat, els resultats es van normalitzar utilitzant l'Anàlisi Robust de Multichip (RMA). Les dades van ser obtingudes i procesades mitjançant el Software Ingenuity Pathways Analysis (IPA) 8.7 (Ingenuity System Inc, <http://www.ingenuity.com>). L'expressió diferencial en cada grup es va analitzar mitjançant l'Anàlisi de Significança per Microarrays (SAM) aplicat a la resposta a la radiació ionitzant en les mostres de teixit. Es va utilitzar el mètode del False Discovery Rate (FDR) per corregir la significació obtinguda en múltiples proves. Tots els anàlisi estadístics del *microarray* van ser realitzats amb el Bioconductor® (Aroma.affymetrix) i en l'entorn estadístic R (v2.15.0). Els resultats del *microarray* van ser introduïts a la base de dades pública d'Expressió Gènica Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, amb el codi GSE53378).

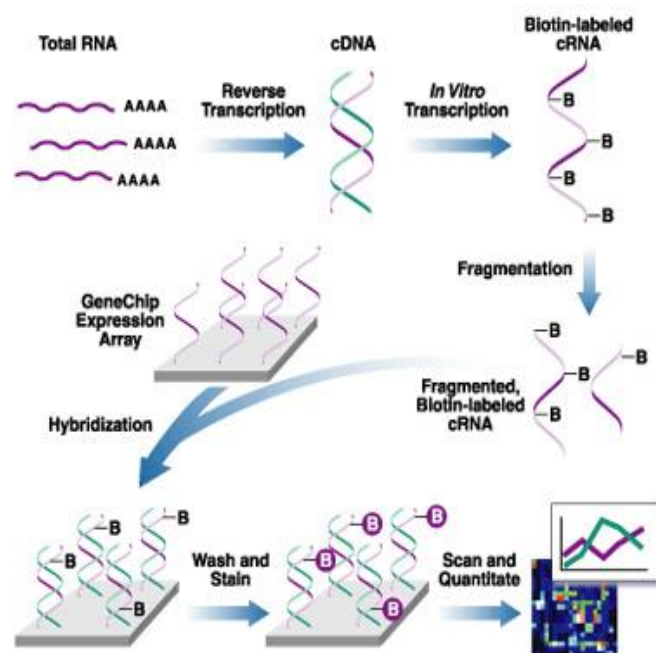


Figura 7: Esquema procediment Microarray Affymetrix GeneChip® Human Gene 2.0 ST.  
 Font: imatge extreta de la fitxa tècnica del *microarray* utilitzat. Human Gene 2.0 *ST array* (Affymetrix GeneChip® Santa Clara, CA).

#### **4.5. Anàlisi estadístic**

Els resultats obtinguts per les variables amb una distribució gaussiana s'expressen com a mitjana  $\pm$  la desviació estàndard (SD) o  $\pm$  l'error estàndard (SE). Abans de procedir amb les comparacions entre grups, s'avalua mitjançant el test de Levene la distribució normal i la homogeneïtat de variàncies. Per comparar paràmetres continus entre grups de subjectes s'empra el test d'ANOVA per a comparacions múltiples quan la equiparabilitat de les variàncies pot ser assumida (inclòs l'anàlisi estadística per a comparacions entre parelles de grups mitjançant Bonferroni), o el test t de Student per a comparacions entre parelles. La relació lineal simple entre variables quantitatives s'analitza amb models bivariables mitjançant el test d'Sperman. El tractament estadístic de models que inclouen més d'una variable independent és una extensió de l'anàlisi amb models bivariables. L'anàlisi estadística i els gràfics són realitzats amb el programa SPSS (versió 13.0; SPSS, Chicago, IL).



## 5. RESULTATS

---





## 5.1. Caracterització de les cohorts

**Cohort 1.** Inclou 25 pacients dones obesas mòrbides intervingudes de cirurgia bariàtrica mitjançant bypass gàstric laparoscòpic durant els anys 2005 i 2011 a l'hospital Josep Trueta de Girona. Aquestes pacients van ser estudiades una setmana abans de la cirurgia i passat un període mínim de 18 mesos ( $3,8 \pm 2,2$  anys) després de la cirurgia bariàtrica, període en el que s'assumeix que ha tingut lloc la màxima pèrdua de pes promoguda per la cirurgia.

Nou de les vint-i-cinc pacients intervingudes de CB presentaven DM2; 7 d'elles coneixien el diagnòstic de DM2 abans de la inclusió a l'estudi i seguien tractament amb fàrmacs hipoglucemians orals (N= 5) i fàrmacs i insulina (N= 2), amb un temps d'evolució promig de 4 [1-6] anys des del diagnòstic i amb una HbA1c de  $6.4 \pm 1,3\%$ . Dues pacients més, van ser diagnosticades de DM2 durant l'estudi, i per tant, no seguien cap tractament hipoglucemiant.

Totes 9 pacients van experimentar una remissió completa de la seva DM2 després de la CB, d'acord amb els criteris de la ADA 2009 (*Buse JB et al, 2009*). Mostrant glicèmies basals inferiors a 100mg/dL durant els 18 mesos de seguiment post cirurgia, sense cap tractament hipoglucemiant.

En les 9 pacients afectes de DM2, es va passar d'una HbA1c de 6.4% (7 d'elles sota tractament amb fàrmacs hipoglucemians) a una de 5,5% als 18 mesos (NS,  $p=0.198$ ).

**Cohort 2.** La cohort 1 s'acompanya d'un grup control que inclou 25 dones primes, aparellades per edat, intervingudes de manera electiva de cirurgia de paret abdominal. Les característiques antropomètriques i bioquímiques d'aquests pacients es troben resumides a la *taula 2*.

El grup de pacients operades de CB i el grup de pacients control eren comparables en edat, sexe, glucosa plasmàtica basal, HbA1c i perfil lipídic (*Taula 2*).

**Taula 2: Fenotipació clínica i analítica bàsica de les cohorts 1 i 2.**

Paràmetres	Estudi longitudinal (N=25)			Grup control (N=25)	
	Pre-IQ	Post-pèrdua de pes	p	Controls	P
Edat (anys)	48 ± 10	51 ± 9	0.199	45 ± 5	0.294
Tabaquisme (si/no) (%)	5/20 (20%)	5/20 (20%)	0.999	6/19 (24%)	0.689
Diabetes (si/no) (%)	9/17 (36%)	0/25 (0%)	<b>&lt;0.0001</b>	0/25 (0%)	<b>&lt;0.0001</b>
IMC (kg / m <sup>2</sup> )	43.1 ± 4.9	29.2 ± 5.5	<b>&lt;0.0001</b>	24.15 ± 2.3	<b>&lt;0.0001</b>
Masa grasa (%)	56 ± 7.3	40.1 ± 7.4	<b>&lt;0.0001</b>	38.15 ± 4.35	<b>&lt;0.0001</b>
TAS (mmHg)	128.4 ± 13.6	130.7 ± 16.7	0.595	116.1 ± 13	<b>0.002</b>
DBP (mmHg)	79.6 ± 9.8	74.2 ± 12.6	0.099	70.85 ± 10.85	<b>0.005</b>
Glucosa (mg / dL)	101 ± 35.3	87.4 ± 13.5	0.077	89.9 ± 8.65	0.131
HOMA-IR*	4.10 ± 3.46	0.68 ± 0.77	<b>0.039</b>	----	---
M-CLAMP**	4.55 ± 2.53	6.36 ± 2.07	<b>0.003</b>	----	---
HbA1c (%)	5.8 ± 1.4	5.3 ± 0.3	0.143	5.4 ± 0.3	0.154
Colesterol (mg / dL)	182.4 ± 33.1	184.7 ± 51.8	0.851	187.6 ± 35	0.562
LDL (mg / dL)	104.6 ± 28.3	100.4 ± 29.7	0.611	110.9 ± 30.7	0.440
HDL (mg / dL)	56 ± 13.1	73.8 ± 22.1	<b>0.001</b>	59.5 ± 13.15	0.360
Triglicèrids (mg / dL)	109 ± 42.5	81.4 ± 28.7	<b>0.010</b>	90.8 ± 42.8	0.171
PCR	0.87 ± 0.34	0.10 ± 0.10	<b>&lt;0.0001</b>	0.33 ± 0.23	<b>0.01</b>

\* HOMA-IR disponible en 7 de les 25 pacients operades de CB. No disponible en els controls.

\*\* CLAMP disponible en 11 de les 25 pacients operades de CB. No disponible en els controls.

Les dades referents a variables quantitatives s'expressen com a valor mig i desviació estàndard (± SD), les variables qualitatives s'expressen a través de percentatges (%). **IMC**: Índex de massa corporal; **TAS**: Tensió arterial sistòlica; **TAD**: tensió arterial diastòlica; **HbA1c**: Hemoglobina glicosilada; **HDL**: Lipoproteïnes d'alta densitat; **LDL**: Lipoproteïnes de baixa densitat; **TG**: Triglicèrids; **PCR**: Proteïna-C reactiva. Els resultats de la comparació pre-post estan realitzats mitjançant *T-Student per mostres aparellades*. La comparació entre els pacients obesos (abans de la cirurgia) i el grup control està realitzat mitjançant *T-Student*. En negreta es marquen els resultats estadísticament significatius.

**Cohort 3.** Aquesta cohort inclou 132 subjectes sans, amb edats compreses entre els 23 i els 65 anys, dels quals es va obtenir mostra de SAT durant una cirurgia electiva (majoritàriament herniorràfies abdominals i colecistectomies laparoscòpiques no complicades). La fenotipació clínica i analítica van ser realitzades la setmana abans de la intervenció quirúrgica. La fenotipació clínica i antropomètrica d'aquests pacients va ser portada a terme de la mateixa manera que en l'anterior cohort, a excepció de la realització de CLAMP. Adjunt, es reflecteixen les principals característiques fenotípiques d'aquests pacients (*Taula 3*).

**Taula 3: Fenotipació clínica i analítica bàsica de la cohort 3.**

Paràmetres	Estudi transversal (N=132)
Edat (anys)	44.71 ± 9.35
Sexe (H/D) (%)	72 (54.5%) / 60 (45.5%)
Tabaquisme actiu (si/no)	37 (28%) / 95 (72%)
DM2 (si/no)	32(24,2%)/100 (75,5%)
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	38.08 ± 11.01
Masa grasa (%)	44.23 ± 12.90
TAS (mmHg)	133.57 ± 18.39
TAD (mmHg)	77.57 ± 10.86
Glucosa basal (mg/dL)	101.77 ± 35.10
HbA1c (%)	5.29 ± 0.94
Insulina basal (mcUI/mL)	12.51 ± 7.49
HOMA-IR	4.50 (0.67-18.5)
Colesterol total (mg / dL)	187.53 ± 34.04
LDL (mg / dL)	110.55 ± 32.62
HDL (mg / dL)	58.11 ± 32.43
Triglicèrids (mg / dL)	115.31 ± 69.39
PCR	1.78 (0.10-9.61)

**IMC:** Índex de massa corporal; **TAS:** Tensió arterial sistòlica; **TAD:** tensió arterial diastòlica; **HbA1c:** Hemoglobina glicosilada; **HDL:** Lipoproteïnes d'alta densitat; **LDL:** Lipoproteïnes de baixa densitat; **TG:** Triglicèrids; **PCR:** Proteïna-C reactiva. Els valors de les variables quantitatives s'expressen com valor mig i desviació estàndard ( $\pm$  SD) o com a valor promig i rang, per aquelles variables amb un valor de DS més gran que la mitjana. Les variables qualitatives s'expressen a través de percentatges (%).

**Cohort 4.** Per tal de verificar si l'acte quirúrgic de la CB implica o no un canvi en l'expressió d'aquests gens, es va reclutar una cohort constituïda per 16 pacients obesos mòrbids intervinguts de CB mitjançant BPG en Y de Roux. En aquesta cohort de pacients, es va obtenir una primera mostra de SAT just després de la primera insició quirúrgica i una segona mostra just abans de tancar la insició (transcorregut un període de 2 hores). La totalitat d'aquests pacients es va intervenir al mateix centre (*Hospital de la Vall d'Hebró*), a mans del mateix cirurgià (*Dr. Vilallonga*) i per la mateixa via d'abordatge, laparoscòpica. La fenotipació clínica i analítica bàsica es troba resumida a la taula anexas (*taula 4*).

**Taula 4: Fenotipació clínica i analítica bàsica estudi inici-final de la cirurgia bariàtrica (CB). Cohort 4.**

	<b>BPG (n=16)</b>
Sexe (D/H)	13/3
Edat (anys)	46 ± 10
HTA (No/Si)	9/7
Dislipèmia (No/Si)	10/6
DM2 (No/Si)	6/10
Tabaquisme (No/Si/Ex-)	10/3/3
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	44.97 ± 3.41
TAS (mmHg)	131.71 ± 14.47
TAD (mmHg)	80.93 ± 10.51
Glucosa (mg/dl)	116.79 ± 36.71
HbA1c (%)	6.40 ± 1.21
HOMA-IR	15.50 ± 19.65
Colesterol total (mg/dl)	189.78 ± 29.86
HDL (mg/dl)	46.73 ± 9.67
LDL (mg/dl)	116.17 ± 24.01
Triglicèrids (mg/dl)	130.89 ± 74.16

**IMC:** Índex de massa corporal; **TAS:** Tensió arterial sistòlica; **TAD:** tensió arterial diastòlica; **HbA1c:** Hemoglobina glicosilada; **HDL:** Lipoproteïnes d'alta densitat; **LDL:** Lipoproteïnes de baixa densitat; **TG:** Triglicèrids. Els valors de les variables quantitatives s'expressen com valor mig i desviació estàndard (± SD). Les variables qualitatives s'expressen a través del nombre total.

## 5.2. Resultats del primer objectiu: estudi dels canvis en l'expressió gènica de SAT després de la pèrdua de pes promoguda per la CB.

A 16 de les 25 pacients operades de cirurgia bariàtrica es va procedir a l'estudi de l'expressió gènica en SAT mitjançant tècniques de *Microarray*. Es va observar canvis estadísticament significatius en l'expressió de 5.018 dels 48.952 gens estudiats. D'aquests, 2.432 (48.5%) van veure incrementada la seva expressió després de la cirurgia i 2.586 (51.5%) van mostrar una disminució de la seva expressió.

Un recull d'aquells gens que més van veure modificada la seva expressió després de la CB es mostra a la taula adjunta (*Taula 5*).

**Taula 5: Recull dels gens que més veuen modificada la seva expressió (Log2 fold change) a l'estudi expressió gènica en teixit adipós subcutani (SAT) mitjançant tècniques de microarray. Estudi de 16 dones obesas mòrbides abans i després de la pèrdua de pes promoguda per la cirurgia bariàtrica (CB). Cohort 1.**

GEN	NOM GEN	Log2 fold change	p
SLC27A2	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	2,26	0.0002
ELOVL6	ELOVL fatty acid elongase 6	1,54	<0.0001
FASN	fatty acid synthase	1,52	<0.0001
STOX1	storkhead box 1	1,47	<0.0001
C6	complement component 6	1,29	0.0002
TF	transferrin	1,29	0.0001
PKP2	plakophilin 2	1,28	0.0001
OLFM2	olfactomedin 2	1,23	0.0001
ACLY	ATP citrate lyase	1,23	0.0001
CCL8	chemokine (C-C motif) ligand 8	-1,25	<0.0001
ITGAX	integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)	-1,26	0.0001
JUN	jun proto-oncogene	-1,26	0.0002
C3AR1	complement component 3a receptor 1	-1,28	<0.0001
CHI3L1	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	-1,29	0.0001
MMP9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	-1,29	0.0001
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	-1,29	0.0001
CXorf21	chromosome X open reading frame 21	-1,30	0.0001
IGSF6	immunoglobulin superfamily, member 6	-1,36	0.0006
JUNB	jun B proto-oncogene	-1,38	0.0001
RANBP3L	RAN binding protein 3-like	-1,38	0.0002
THBS1	thrombospondin 1	-1,41	0.0001

GEN	NOM GEN	Log <sub>2</sub> fold change	p
PLA2G7	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase)	-1,41	<b>0.0077</b>
CD69	CD69 molecule	-1,44	<b>&lt;0.0001</b>
IL8	interleukin 8	-1,44	<b>0.0014</b>
CLEC7A	C-type lectin domain family 7, member A	-1,45	<b>&lt;0.0001</b>
C5AR1	complement component 5a receptor 1	-1,54	<b>&lt;0.0001</b>
IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30	-1,56	<b>&lt;0.0001</b>
SPP1	secreted phosphoprotein 1	-1,58	<b>0.0002</b>
LYZ	lysozyme	-1,62	<b>&lt;0.0001</b>
EGR1	early growth response 1	-1,65	<b>0.0010</b>
RGS1	regulator of G-protein signaling 1	-1,71	<b>0.0001</b>
DUSP1	dual specificity phosphatase 1	-1,73	<b>&lt;0.0001</b>
MT1A	metallothionein 1A	-1,78	<b>0.0006</b>
AQP9	aquaporin 9	-2,16	<b>0.0001</b>
EGFL6	EGF-like-domain, multiple 6	-2,22	<b>0.0010</b>
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	-2,82	<b>0.0012</b>

Es recull a la taula una representació dels gens que més canvien després de la cirurgia. Els valors s'expressen a la taula com el logaritme del % de canvi que té lloc després de la cirurgia bariàtrica. D'aquells que mostren un canvi estadísticament significatiu, s'agafa com a punt de tall 1.2 del *log fold change*. Aquests gens es mostren ordenats des dels que més augmenten la seva expressió fins als que més la disminueixen. En negreta s'indica la significació estadística.

L'expressió gènica en teixit adipós dels gens que més veien modificada la seva expressió amb tècniques de microarray va ser estudiar mitjançant *RT-PCR* a la cohort de 25 dones obesas mòrbides intervingudes de CB (abans i després de la pèrdua de pes) i en els 25 pacients controls. Adjunt es recull una mostra dels gens que van experimentar un major canvi d'expressió en l'estudi longitudinal (N=25), així com la comparació entre l'expressió pre-CB vs el grup control (N=50) per aquests gens (**Taula 6**).

**Taula 6: Estudi expressió gènica en teixit adipós subcutàni (SAT) mitjançant reacció en cadena de la polimerasa en temps real (RT-PCR) en 25 pacients dones obesas mòrbides -abans i després de la pèrdua de pes promoguda per la cirurgia bariàtrica (CB)- i en un grup de 25 pacients control primes, aparellades per edat i sexe. Estudiats els gens que més canvien al microarray i una selecció d'altres gens d'interès. Cohort 1 i 2.**

Gen	Estudi longitudinal (N=25)		Estudi transversal (N=50)	
	Canvi expressió (%) Post-CB vs Pre-CB	p	Expressió control vs Pre-CB (%)	P
ELOVL6	1253.6	<b>&lt;0.0001</b>	199.6	<b>0.016</b>
SLC27A2	539.5	<b>0.001</b>	113.9	<b>0.003</b>
PKP2	269.6	<b>0.002</b>	220.3	<b>0.012</b>
ACLY	245.1	<b>&lt;0.0001</b>	43.1	<b>0.021</b>
OLFM2	150.0	<b>&lt;0.0001</b>	50.9	<b>0.012</b>
LYZ	-68.3	<b>0.001</b>	-70.0	<b>&lt;0.0001</b>
DUSP1	-82.6	<b>0.001</b>	185.4	<b>0.003</b>
EGR1	-83.6	<b>0.035</b>	533.5	<b>&lt;0.0001</b>
EGFL6	-80.2	<b>0.003</b>	-64.3	<b>0.016</b>
SPP1	-87.2	<b>&lt;0.0001</b>	-70.2	<b>0.001</b>
AQP9	-90.0	<b>0.002</b>	-56.1	<b>0.019</b>
FOS	-96.3	<b>0.006</b>	296.5	<b>0.003</b>
RGS1	-94.1	<b>0.014</b>	51.2	0.233
<b>Altres gens d'interès</b>				
GYS2	283.6	<b>0.002</b>	176.1	<b>0.003</b>
FASN	262.5	<b>&lt;0.0001</b>	43.2	<b>0.01</b>
SCD1	198.1	<b>&lt;0.0001</b>	11.6	0.709
LGALS12	145.9	<b>&lt;0.0001</b>	44.2	<b>0.006</b>
ACACA	136.4	<b>&lt;0.0001</b>	3.3	0.831
THRSP14	77.6	<b>0.004</b>	42.9	<b>0.043</b>
ACSL1	77.6	<b>0.001</b>	47.0	<b>0.033</b>
GLUT4	62.7	<b>0.002</b>	63.2	<b>0.001</b>
DECR1	51.7	<b>0.001</b>	50.7	<b>0.002</b>
ECI1	38.9	<b>0.005</b>	29.0	<b>0.035</b>
IRS1	37.5	<b>0.032</b>	42.1	<b>0.003</b>
KPNA2	-47.7	<b>0.001</b>	-29.1	<b>0.039</b>
IQGAP2	-50.9	<b>&lt;0.0001</b>	-51.6	<b>&lt;0.0001</b>
TNF- $\alpha$	-74.6	<b>&lt;0.0001</b>	17.5	0.366
PRG4	-80.9	<b>&lt;0.0001</b>	-69.4	<b>&lt;0.0001</b>
IL-6	-96.1	<b>0.003</b>	66.3	<b>0.001</b>

Els valors s'expressen a la taula com el % de canvi després de la cirurgia o en comparació amb el grup control. A la segona columna es reflexa el % de canvi que té lloc després de la pèrdua de pes en l'estudi longitudinal de 25 pacients. A la dreta de la taula es compara l'expressió gènica en obesitat (pre-cirurgia) vs pacients controls (N= 51). El % de canvi es calcula com: [expressió post-CB o bé Expressió grup control \* 100/valor promig pre-CB]\*100 . La comparació està realitzada mitjançant T-Student. Els gens s'ordenen segons el percentatge de canvi després de la CB. En negreta s'indica la significació estadística.



### **5.3. Resultats del segon objectiu. Aprofundir en l'estudi de 5 dels gens que més veuen modificada la seva expressió després de la pèrdua de pes promoguda per la CB.**

Després de la validació del *microarray* per *RT-PCR*, es va procedir a fer una selecció de 5 dels gens que més modificaven la seva expressió (en una o altre direcció) després de la cirurgia bariàtrica, per tal d'aprofundir en el seu estudi.

Es van seleccionar aquells gens que més modificaven la seva expressió, acostant-se així a l'expressió del grup control i amb una expressió quantificable en tots els casos.

Aquests 5 gens van ser:

- **Proteïna-G reguladora de senyal tipus-1 (RGS-1)**
- **Lysozyme (LYZ)**
- **Plakophilin-2 (PKP2)**
- **Olfactomedina-2 (OLFM-2)**
- **Transportador d'àcids grassos de la família 27 (SLC27A)**

Es va procedir a estudiar les relacions entre el percentatge de canvi d'aquests gens i el percentatge de canvi d'altres variables clíniques i analítiques a l'estudi longitudinal. A l'estudi transversal, es va estudiar les associacions amb variables clíniques i amb l'expressió gènica d'altres factors (*Taula 7*).

Totes les troballes són realitzades en l'estudi de pacients consecutius.

**Taula 7: Associació expressió gènica teixit adipós subcutani (SAT) dels 5 gens a estudi amb l'expressió gènica d'altres factors. Expressió determinada mitjançant reacció en cadena de la polimerasa en temps real (RT-PCR). Cohort 2.**

Gens Lipogènics/gota lipídica	RGS1		OLF2		LYZ		PKP2		SLC27A	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
ACC	<b>-0,235</b>	<b>0,036</b>	N/S	N/S	<b>-0,284</b>	<b>0,011</b>	N/S	N/S	0,204	0,07
BRCA1	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	<b>0,276</b>	<b>0,045</b>
FASN	N/S	N/S	0,244	0,068	N/S	N/S	<b>0,285</b>	<b>0,033</b>	<b>0,27</b>	<b>0,04</b>
SFRP1	N/S	N/S	<b>0,537</b>	<b>0,002</b>	N/S	N/S	N/S	N/S	0,315	0,09
<b>Gens Lipolítics/ gota lipídica</b>										
ABHD5	0,293	0,07	0,293	0,07	N/S	N/S	0,281	0,083	<b>0,343</b>	<b>0,03</b>
ADRP/PLIN2	<b>0,558</b>	<b>&lt;0,0001</b>	N/S	N/S	<b>-0,291</b>	<b>0,029</b>	N/S	N/S	N/S	N/S
FSP27	0,273	0,05	<b>0,449</b>	<b>0,001</b>	N/S	N/S	N/S	N/S	-0,252	0,071
TIP47	<b>0,322</b>	<b>0,02</b>	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
<b>Gens Pro inflamatoris</b>										
CD14	N/S	N/S	<b>-0,447</b>	<b>0,025</b>	0,389	0,055	<b>-0,408</b>	<b>0,048</b>	<b>-0,579</b>	<b>0,002</b>
CB2/CNR2	0,272	0,095	<b>-0,319</b>	<b>0,047</b>	<b>0,343</b>	<b>0,033</b>	<b>-0,472</b>	<b>0,003</b>	N/S	N/S
CLEC7A	<b>0,364</b>	<b>0,003</b>	N/S	N/S	<b>0,439</b>	<b>&lt;0,001</b>	N/S	N/S	N/S	N/S
HMGA2	<b>0,448</b>	<b>0,006</b>	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
HMGB1	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	<b>-0,355</b>	<b>0,015</b>	N/S	N/S
IL21R	<b>0,29</b>	<b>0,024</b>	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
IL33	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	<b>0,284</b>	<b>0,041</b>
IL6	<b>0,544</b>	<b>&lt;0,0001</b>	N/S	N/S	0,263	0,062	N/S	N/S	N/S	N/S
IL8	<b>0,611</b>	<b>&lt;0,0001</b>	N/S	N/S	N/S	N/S	<b>-0,405</b>	<b>0,012</b>	N/S	N/S
IRF-4	<b>0,282</b>	<b>0,024</b>	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
ITGAX	<b>0,5</b>	<b>0,001</b>	N/S	N/S	<b>0,555</b>	<b>&lt;0,0001</b>	N/S	N/S	-0,273	0,084
KIT	N/S	N/S	N/S	N/S	<b>0,393</b>	<b>0,001</b>	N/S	N/S	N/S	N/S
LEPTINA	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	<b>-0,376</b>	<b>0,011</b>
PEDF/SERPINF1	N/S	N/S	<b>0,271</b>	<b>0,036</b>	N/S	N/S	<b>0,285</b>	<b>0,028</b>	N/S	N/S
RBP4	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	<b>0,429</b>	<b>0,046</b>	N/S	N/S
SPP1	<b>0,372</b>	<b>&lt;0,0001</b>	N/S	N/S	<b>0,257</b>	<b>0,018</b>	N/S	N/S	<b>-0,342</b>	<b>0,001</b>
S100A9	<b>0,271</b>	<b>0,037</b>	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	-0,238	0,067
S1A00A8	<b>0,383</b>	<b>0,008</b>	N/S	N/S	N/S	N/S	-0,247	0,094	-0,262	0,076
TLR2	<b>0,371</b>	<b>0,011</b>	<b>-0,343</b>	<b>0,019</b>	N/S	N/S	<b>-0,336</b>	<b>0,023</b>	N/S	N/S
TNF $\alpha$	<b>0,552</b>	<b>0,002</b>	N/S	N/S	<b>0,28</b>	<b>0,034</b>	N/S	N/S	N/S	N/S
TNFRSR9	<b>0,397</b>	<b>&lt;0,0001</b>	N/S	N/S	<b>0,368</b>	<b>0,001</b>	N/S	N/S	N/S	N/S
<b>Gens antiinflamatoris</b>										
CD206/CD68	<b>-0,387</b>	<b>0,009</b>	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
IL10	<b>0,53</b>	<b>0,001</b>	N/S	N/S	<b>0,621</b>	<b>&lt;0,0001</b>	N/S	N/S	N/S	N/S
TIMP3	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	<b>0,379</b>	<b>0,016</b>	N/S	N/S

Acció insulina	RGS1		OLF2		LYZ		PKP2		SLC27A	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
CDK5	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	<b>0,343</b>	<b>0,016</b>
GLUT4	<b>-0,507</b>	<b>0,007</b>	<b>0,432</b>	<b>0,024</b>	<b>-0,522</b>	<b>0,005</b>	N/S	N/S	N/S	N/S
INSIG1	-0,31	0,066	<b>0,535</b>	<b>0,002</b>	N/S	N/S	<b>0,479</b>	<b>0,009</b>	N/S	N/S
IRS1	N/S	N/S	N/S	N/S	<b>-0,248</b>	<b>0,04</b>	N/S	N/S	<b>0,252</b>	<b>0,037</b>
<b>Hormones Tiroïdals</b>										
DIO-1	<b>0,387</b>	<b>0,012</b>	N/S	N/S	<b>0,354</b>	<b>0,023</b>	<b>-0,364</b>	<b>0,021</b>	<b>-0,317</b>	<b>0,043</b>
DIO-2	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	<b>-0,407</b>	<b>0,006</b>	<b>-0,357</b>	<b>0,017</b>
TRB2	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	<b>0,524</b>	<b>0,01</b>	<b>0,5</b>	<b>0,015</b>
<b>Mitocondrials/Teixit adipós marró</b>										
CO3	<b>-0,375</b>	<b>0,001</b>	N/S	N/S	<b>-0,443</b>	<b>&lt;0,001</b>	N/S	N/S	N/S	N/S
UCP-1	N/S	N/S	<b>-0,29</b>	<b>0,03</b>	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
RBL-1	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	<b>0,445</b>	<b>0,005</b>
TMEM26	<b>-0,268</b>	<b>0,013</b>	N/S	N/S	<b>-0,212</b>	<b>0,052</b>	<b>0,227</b>	<b>0,039</b>	<b>0,401</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Apoptòtics</b>										
ATF-6	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	<b>0,425</b>	<b>0,006</b>	<b>0,473</b>	<b>0,002</b>
BAX	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	<b>0,355</b>	<b>0,023</b>	N/S	N/S
<b>Ferro</b>										
ALAD	N/S	N/S	<b>0,336</b>	<b>0,048</b>	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
ENGL1	N/S	N/S	N/S	N/S	<b>-0,284</b>	<b>0,032</b>	0,265	0,051	N/S	N/S
EPOR	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	<b>-0,391</b>	<b>0,018</b>	N/S	N/S
FLVCR1	N/S	N/S	N/S	N/S	<b>0,42</b>	<b>0,002</b>	N/S	N/S	N/S	N/S
FLVCR2	0,247	0,083	N/S	N/S	<b>0,588</b>	<b>&lt;0,0001</b>	N/S	N/S	N/S	N/S
FP1	N/S	N/S	<b>-0,328</b>	<b>0,025</b>	0,291	0,05	N/S	N/S	N/S	N/S
HEPCIDINA	<b>0,362</b>	<b>0,013</b>	N/S	N/S	<b>0,429</b>	<b>0,003</b>	N/S	N/S	N/S	N/S
IREB2	N/S	N/S	0,281	0,062	N/S	N/S	<b>0,434</b>	<b>0,003</b>	<b>0,464</b>	<b>0,001</b>

Els gens de la primera columna, s'ordenen segons la seva relació amb el metabolisme lipídic ( lipogènics / lipolítics ), amb inflamació (pro-inflamatoris / antiinflamatoris), acció insulina, metabolisme de les hormones tiroïdals, acció mitocondrial i/o implicats en el metabolisme del teixit adipós marró, acció apoptòtica i metabolisme del ferro. Les associacions s'han estudiat seguint el model de correlació bivariant *d'Spearman*. 'R' correspon al *coeficient de correlació d'Spearman* i 'p' a la significació estadística. En negreta s'indica la significació estadística. En gris les tendències que no arriben a ser significatives. 'ns' = resultat no significatiu.

### 5.3.1. Proteïna-G reguladora de senyal tipus-1 (RGS-1)

#### Expressió RGS-1 estudi longitudinal (*Cohort 1 i 2*):

L'expressió de RGS-1 es va veure reduïda després de la cirurgia bariàtrica ( $p= 0.014$ ). No es van observar diferències estadísticament significatives entre l'expressió del grup pre-cirurgia i la del grup control (*Figura 8*).

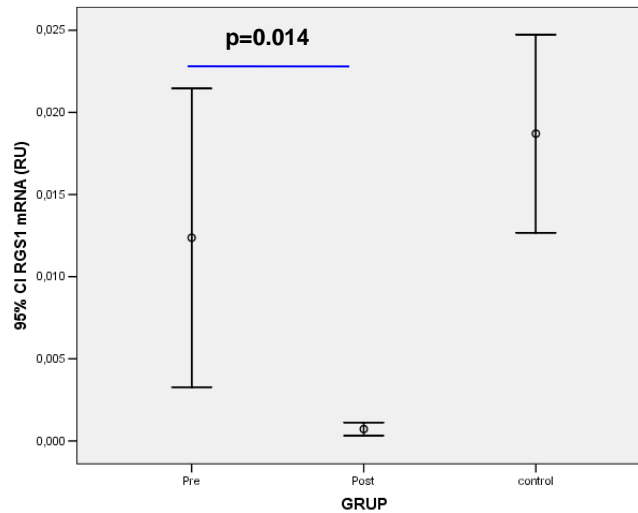


Figura 8: 95% de l'interval de confiança de l'expressió relativa d'RGS-1 en SAT determinada per RT-PCR abans i després de la CB i en el grup control. No s'observen diferències entre pacients pre-CB i el grup control.

#### Associacions clíniques

##### - Estudi longitudinal (*cohort 1*):

La disminució en l'expressió de RGS-1, a més d'associar-se de manera positiva amb la pèrdua de pes ( $r= 0.521$  ;  $p= 0.042$ ), va presentar una associació positiva amb la disminució de la concentració de triglicèrids en plasma ( $r=0.518$ ;  $p= 0.014$ ).

##### - Estudi transversal (*cohort 3*):

A l'estudi transversal, no es va observar una correlació entre l'expressió de RGS-1 i l'IMC, però sí una tendència positiva amb la concentració de triglicèrids en plasma ( $r= 0.172$ ;  $p= 0.055$ ).

### Associació amb l'expressió gènica d'altres factors (Cohort 3):

A l'estudi transversal, RGS-1 es va associar significativament i de manera positiva amb l'expressió de diferents gens pro-inflamatoris com són: interleuquines 6 i 8 (**Figura 9**), receptor d'interleuquina 21, TNF $\alpha$  (*factor de necrosis tumoral  $\alpha$* ) (**Figura 9**), TNFRSR9 (*receptor-interacting serine-threonine kinase 1*), CLEC7A (*C-type lectin domain family 7, member A*), HMGA2 (*high mobility group AT-hook 2*), IRF-4 (*interferon regulatory factor 4*), SPP1 (*secreted phosphoprotein 1/osteopontina*), TLR2 (*toll-like receptor 2*), S100A 8 i 9 (*S100 calcium binding protein*) (**Taula 7**).

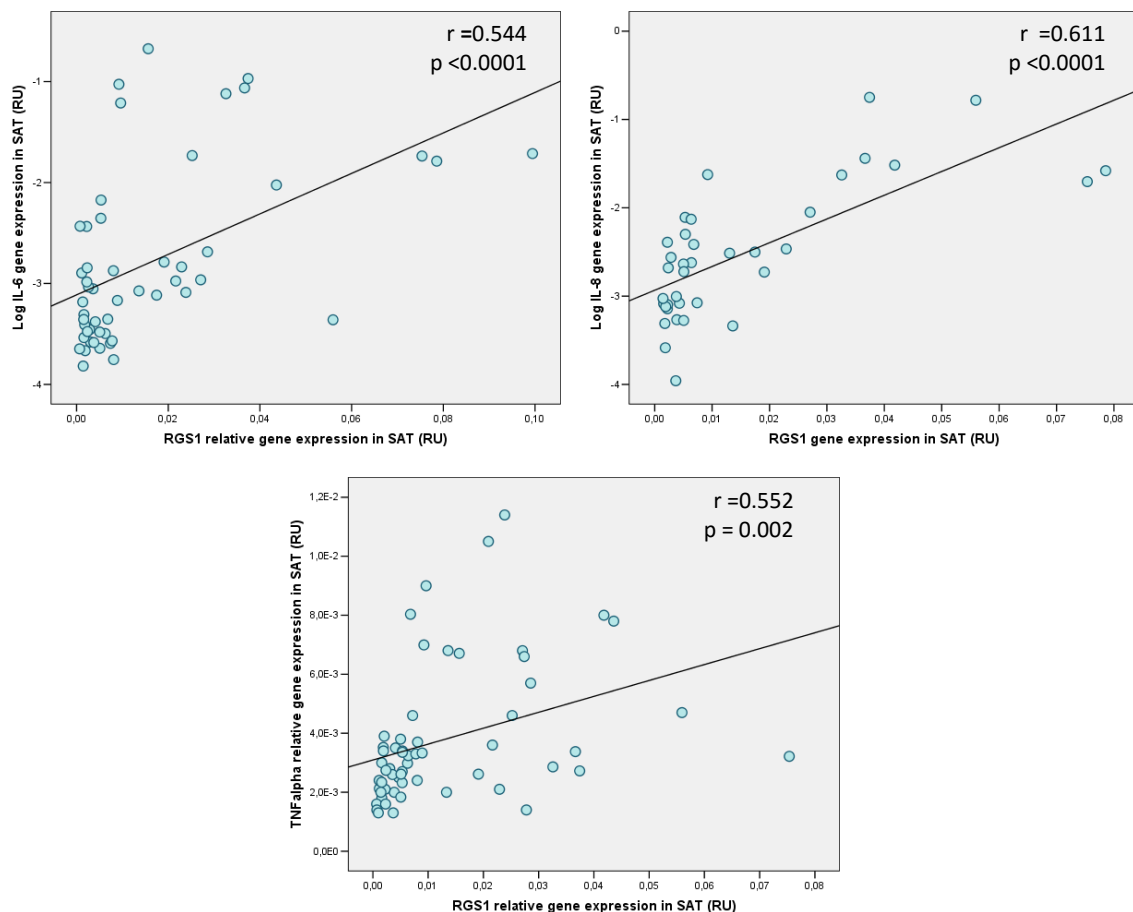


Figura 9: Correlació entre l'expressió de RGS-1 calculada a través de RT-PCR i l'expressió gènica d'altres factors pro-inflamatoris com són IL-6 (interleucina-6), IL-8 (Interleucina-8) i TNF- $\alpha$  (factor de necrosi tumoral- $\alpha$ ).

Es va observar una forta associació positiva entre RGS-1 i ITGAX (marcador de macròfags, també conegut com CD11c) ( $r = 0.500$ ;  $p < 0.001$ ). Separat per sexes, aquesta associació es va mantenir en els dos grups, essent més important en homes ( $r = 0.718$ ;  $p < 0.0001$ ) que en dones ( $r = 0.537$ ;  $p = 0.002$ ) (**Figura 10**).

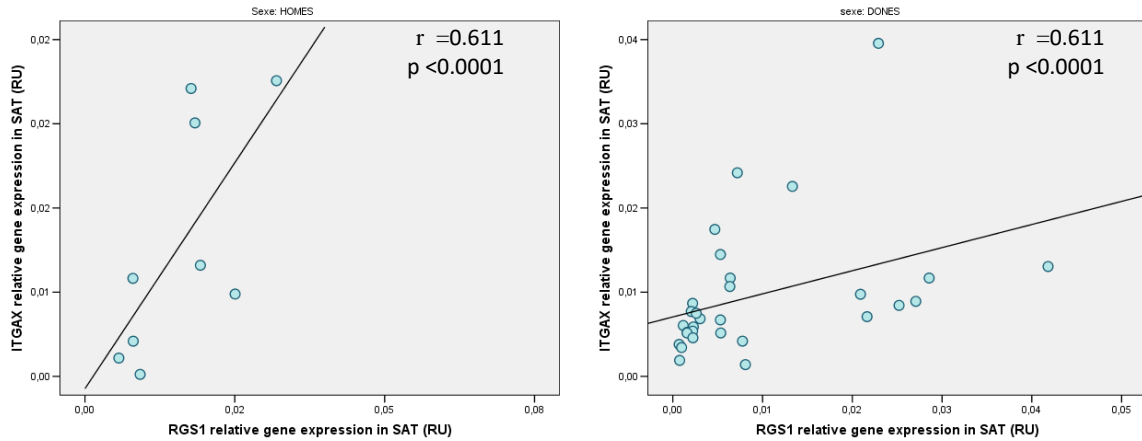


Figura 10: Correlació entre l'expressió de RGS-1 calculada a través de RT-PCR i l'expressió gènica del marcador de macròfags ITGAX separat per sexes (esquerre homes ; dreta dones).

De manera concordant, RGS-1 va mostrar una associació positiva amb Hefcidina ( $r = 0.362$ ;  $p = 0.013$ ), gen implicat en el flux del ferro des de l'enteròcit i directament relacionat amb inflamació i negativa amb el quocient CD206/CD68 ( $r = -0.387$ ;  $p = 0.009$ ).

Es va observar una associació positiva entre l'expressió d'RGS-1 i l'expressió del gen antiinflamatori IL-10 ( $r = 0.53$ ;  $p = 0.001$ ) (**Figura 11**).

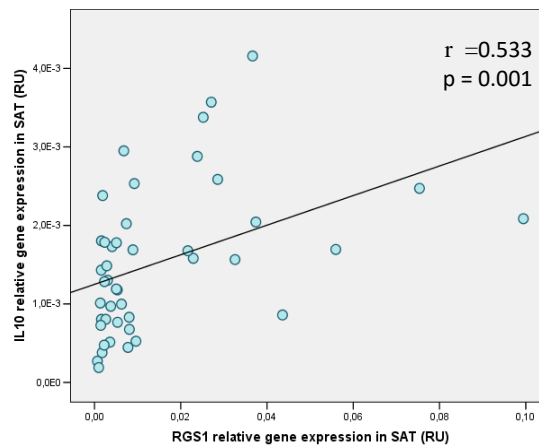


Figura 11: Correlació entre l'expressió de RGS-1 calculada a través de RT-PCR i l'expressió d'interleuquina 10.

RGS-1 també va mostrar una correlació negativa amb GLUT-4 (*glucose transporter member 4*), gen directament implicat amb la sensibilitat a la insulina ( $r = -0.507$ ;  $p = 0.007$ ) i amb el gen lipogènic ACC (*Acetyl CoA carboxylase*) ( $r = -0.235$ ;  $p = 0.036$ ) i positiva amb els gens lipolítics: ADRP (*Adipose differentiation-related protein*) ( $r = 0.558$ ;  $p < 0.0001$ ), TIP47 (*PLIN3*;

*Periolipin 3*) ( $r=0.558$ ;  $p=0.02$ ) (**Figura 12**) i una tendència sense arribar a ser significativa amb FSP27 (CIDEA; *cell death-inducing DFFA-like effector c*) i ABHD5 (*abhydrolase domain containing 5*).

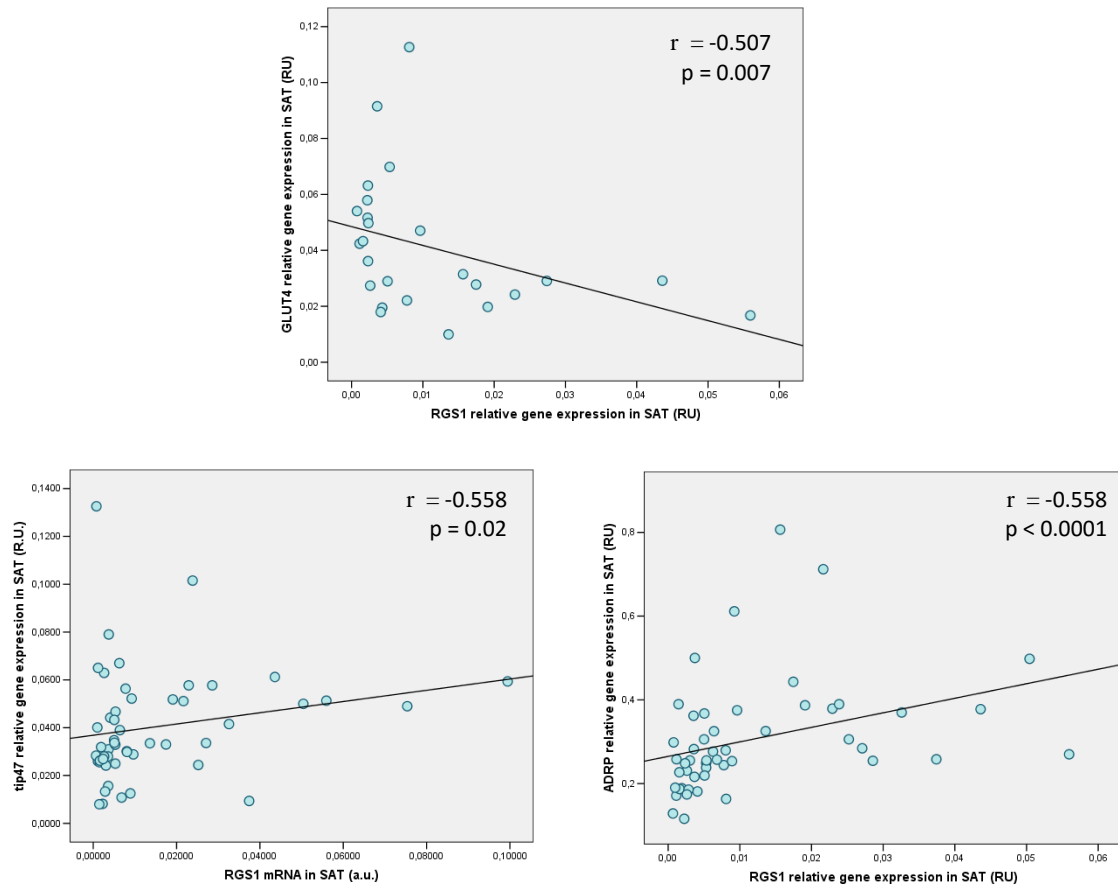


Figura 12: Correlació entre l'expressió de RGS-1 calculada a través de RT-PCR i GLUT-4 (a dalt) i amb l'expressió dels gens lipogènics tip47 i ADRP (a baix).

RGS-1 va mostrar una correlació negativa amb l'expressió de el gen mitocondrial CO3 (*cytochrome c oxidase III*) ( $r= -0.375$ ;  $p= 0.001$ ) i amb el marcador de teixit adipós beige TMEM26 (*transmembrane protein 26*) ( $r= -0.268$ ;  $p= 0.013$ ) (**Figura 13**).

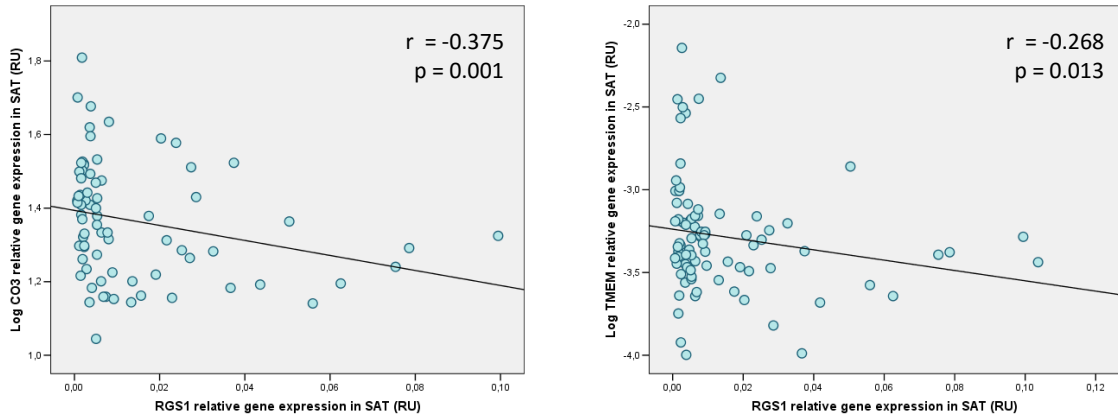


Figura 13: Correlació entre l'expressió de RGS-1 calculada a través de RT-PCR i l'expressió de CO3 i TMEM26.

RGS-1 va mostrar també una associació positiva amb DIO-1 (*Deiodinasa 1*) ( $r = 0.387$ ;  $p = 0.012$ ) (**Figura 14**).

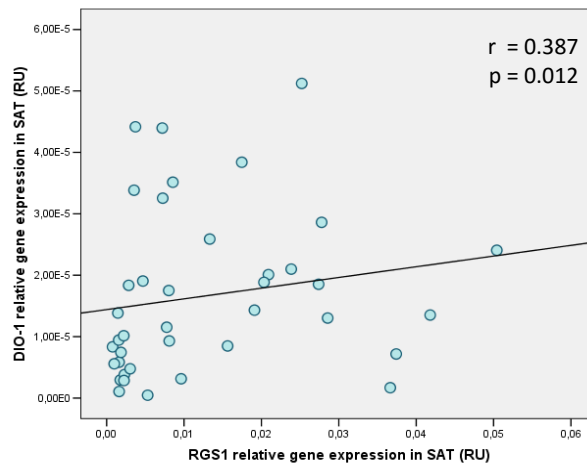


Figura 14: Correlació entre l'expressió de RGS-1 calculada a través de RT-PCR i l'expressió de DIO-1.



### 5.3.2. Lysozyme (LYZ).

#### Expressió LYZ estudi longitudinal (*Cohort 1 i 2*):

L'expressió de LYZ es va veure disminuïda després de la cirurgia bariàtrica ( $p < 0.0001$ ) assolint una expressió similar a la del grup control (*Figura 15*).

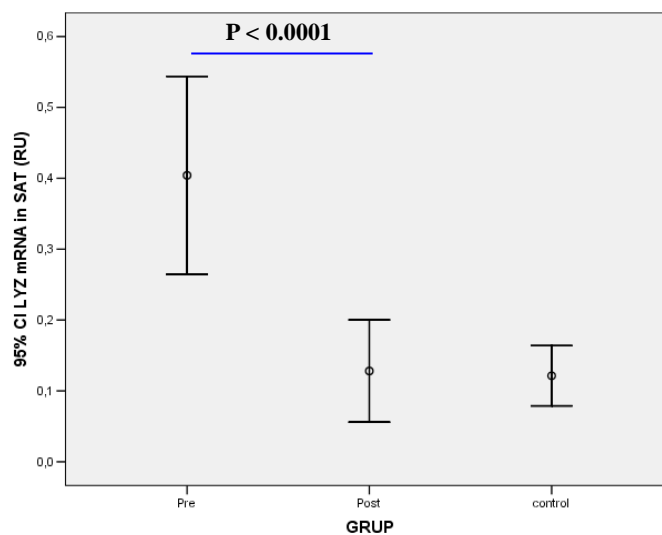


Figura 15: 95% de d'interval de confiança de l'expressió relativa LYS en SAT determinada per RT-PCR abans i després de la CB i en el grup control. No s'observen diferències entre pacients Post-CB i el grup control.

#### Associacions clíniques:

##### - Estudi longitudinal (*Cohort 1*):

La disminució de LYZ es va associar al percentatge de canvi de l'IMC ( $r = 0.513$ ;  $p = 0.007$ ).

##### - Estudi transversal (*Cohort 2*):

Es va observar una associació positiva entre LYZ i IMC ( $r = 0.426$ ;  $p < 0.0001$ ), concentració de triglicèrids circulants ( $r = 0.177$ ;  $p = 0.001$ ) (*Figura 16*), glucèmia plasmàtica basal ( $r = 0.274$ ;  $p < 0.0001$ ), insulina plasmàtica basal ( $r = 0.219$ ;  $p = 0.011$ ) i HOMA-IR ( $r = 0.319$ ;  $p < 0.0001$ ) i negativa amb la concentracions d'HDL ( $r = -0.178$ ;  $p = 0.049$ ).

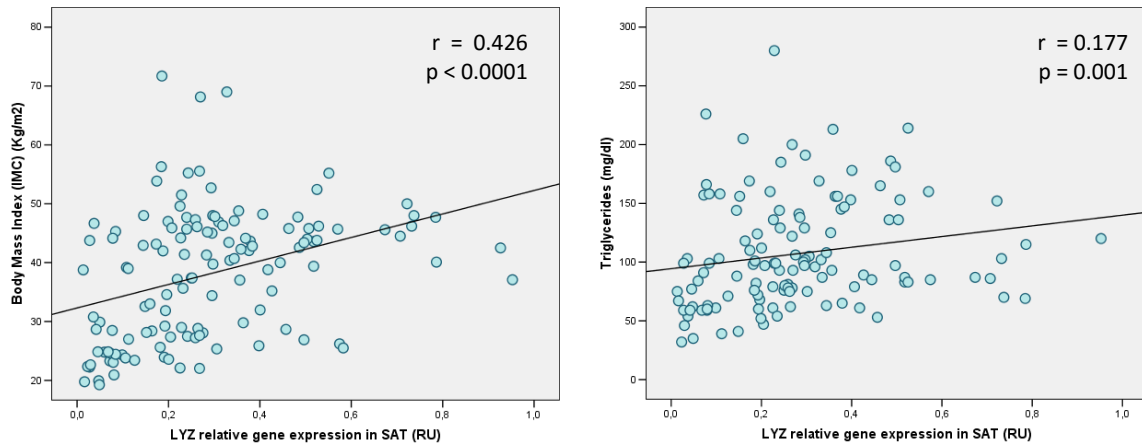


Figura 16: Correlació entre l'expressió de LYZ calculada a través de RT-PCR i l'índex de massa corporal (IMC) i la concentració de triglicèrids en plasma.

### Associació amb l'expressió gènica d'altres factors (*Cohort 3*) :

L'expressió de LYZ va mostrar una associació significativa i positiva amb diferents gens pro-inflamatoris tals com CLEC7A ( $r= 0.439$ ;  $p < 0.0001$ ); ITGAX ( $r=0.555$ ;  $p < 0.0001$ ); KIT ( $r= 0.393$ ;  $p= 0.001$ ); SPP1 ( $r= 0.257$ ;  $p= 0.018$ ); TNF- $\alpha$  ( $r= 0.280$ ;  $p= 0.034$ ) i TNFRSR9 ( $r= 0.368$ ;  $p= 0.001$ ). L'expressió de LYZ va mostrar també una tendència positiva amb l'expressió de CD14 i IL-6 sense arribar a ser estadísticament significativa ( $r= 0.389$ ;  $p= 0.055$  i  $r= 0.263$  i  $p=0.062$ , respectivament) (*Figura 17*).

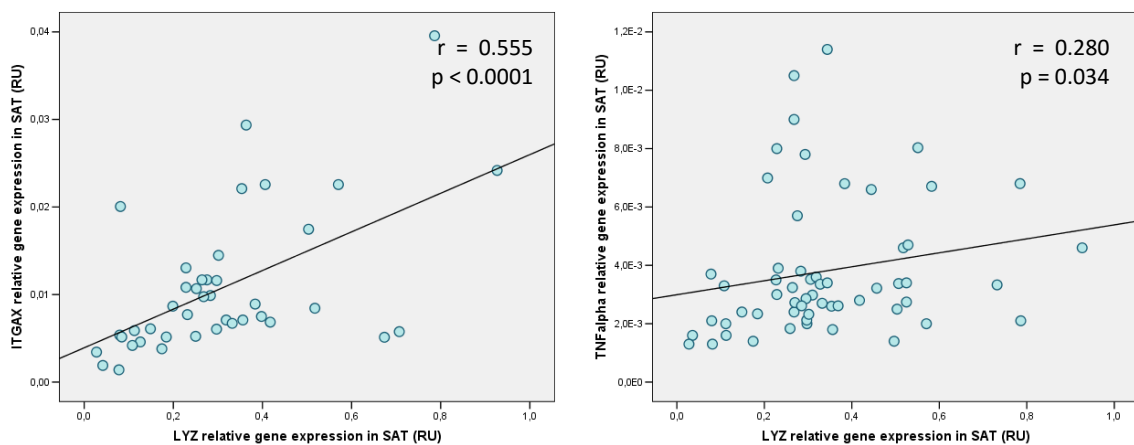


Figura 17: Correlació entre l'expressió de LYZ calculada a través de RT-PCR i l'expressió de ITGAX i TNF- $\alpha$ .

Igual que passava amb RGS1, es va observar una associació positiva entre l'expressió de LYZ i la de IL-10 ( $r = 0.621$ ;  $p < 0.0001$ ) (**Figura 18**).

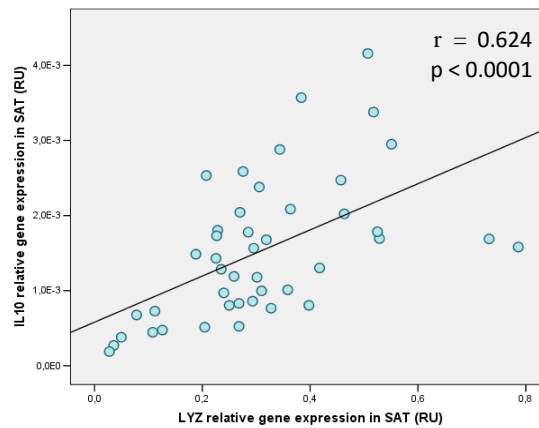


Figura 18: Correlació entre l'expressió de LYZ calculada a través de RT-PCR i l'expressió d' IL-10.

De manera concordant a les associacions observades amb gens pro-inflamatoris, l'expressió de LYZ va mostrar una correlació també positiva amb gens implicats en el metabolisme del ferro tals com: FLVCR1 i 2 ( $r = 0.420$ ;  $p = 0.002$  i  $r = 0.558$ ;  $p < 0.0001$ , respectivament) i IREB2 (*iron-responsive element binding protein 2*) ( $r = 0.429$ ;  $p = 0.003$ ) i negativa amb gens implicats en la sensibilitat a la insulina com són GLUT-4 ( $r = -0.522$ ;  $p = 0.005$ ) i IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*) ( $r = -0.248$ ;  $p < 0.04$ ) (**Figura 19**)

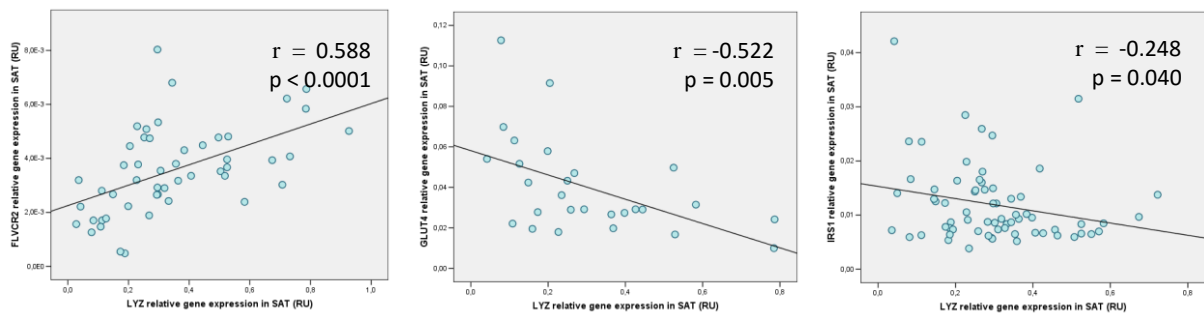


Figura 19: Correlació entre l'expressió de LYZ calculada a través de RT-PCR i l'expressió dels gens FLVCR2, GLUT-4 i IRS-1.

L'expressió de LYZ va mostrar també una correlació negativa amb el marcador de teixit adipós beige TMEM26 (*transmembrane protein 26*) ( $r = -0.215$ ;  $p = 0.052$ ), de manera concordant amb les associacions també negatives trobades amb CO3, gen implicat el metabolisme mitocondrial ( $r = -0.443$ ;  $p < 0.0001$ ) i amb el gen lipogènic ACC ( $r = -0.284$ ;  $p = 0.011$ ) (**Figura 20**).

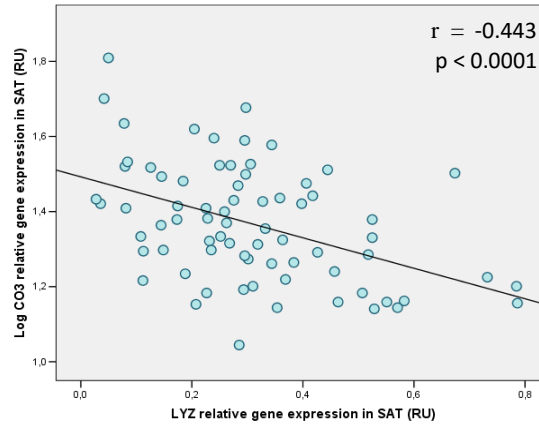


Figura 20: Correlació entre l'expressió de LYZ calculada a través de RT-PCR i el  $\log_{10}$  de l'expressió de CO3

### 5.3.3. Transportador d'àcids grassos de la família 27 (SLC27A2).

#### Expressió SLC27A2 estudi longitudinal (*Cohort 1 i 2*) :

L'expressió de SLC27A2 es va veure incrementada després de la cirurgia bariàtrica ( $p < 0.011$ ). No s'observaven diferències entre l'expressió del grup pre-cirurgia i el grup control (*Figura 21*).

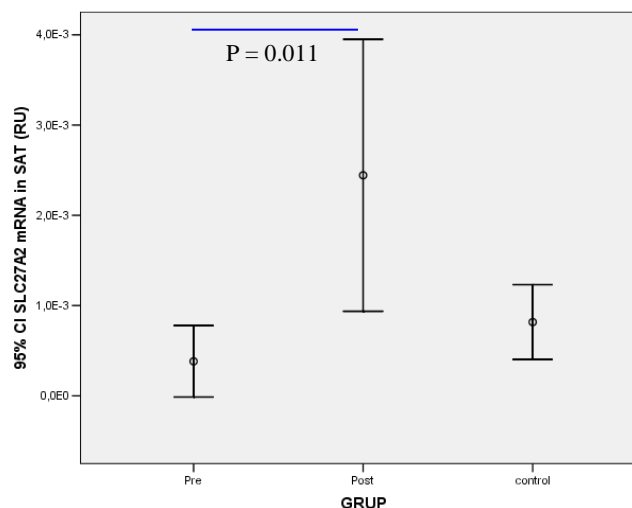


Figura 21: 95% de d'intervall de confiança de l'expressió relativa de SLC27A2 en SAT determinada per RT-PCR abans i després de la CB i en el grup control. No s'observen diferències entre pacients pre-CB i el grup control.

#### Associacions clíniques:

##### - Estudi longitudinal (*Cohort 1*) :

SLC27A2 va presentar una correlació negativa amb l'IMC ( $r = -0.458$ ;  $p = 0.008$ ) i positiva amb la sensibilitat perifèrica a la insulina determinada per CLAMP ( $r = 0.518$ ;  $p = 0.048$ ).

##### - Estudi transversal (*Cohort 1*) :

A l'estudi transversal, SLC27A2 va mostrar una associació negativa amb l'IMC ( $r = -0.274$ ;  $p < 0.0001$ ) i amb la concentració de triglicèrids circulants ( $r = -0.267$ ;  $p = 0.003$ ) (*Figura 22*).

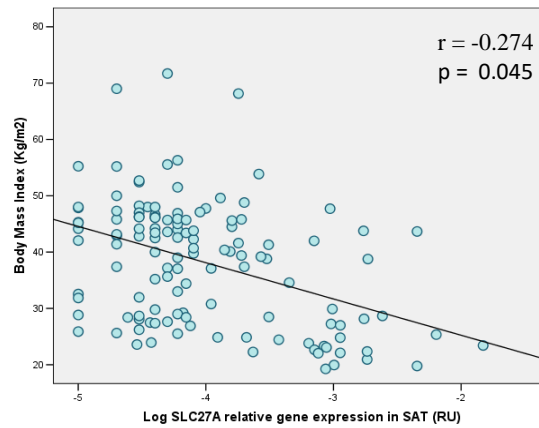


Figura 22: Associació entre l'expressió relativa de SLC27A2 en SAT determinada mitjançant RT-PCR i l'índex de massa corporal.

### Associació amb l'expressió gènica d'altres factors (*Cohort 3*):

L'expressió de SLC27A2 va mostrar una clara correlació positiva amb l'expressió del gen lipogènic BCRA1 (*breast cancer 1, early onset*) ( $r = 0.276$ ;  $p = 0.045$ ) (**Figura 23**). Es va observar una correlació també positiva amb altres gens lipogènics com són FASN (*fatty acid synthase*) ( $r = 0.27$ ;  $p = 0.04$ ) i una tendència també positiva tot i que sense arribar a ser significativa amb ACC ( $r = 0.204$ ;  $p = 0.07$ ) i SFRP1 (*secreted frizzled-related protein 1*) ( $r = 0.315$ ;  $p = 0.09$ ).

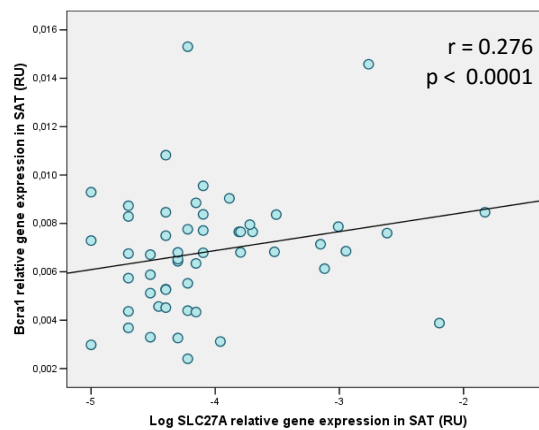


Figura 23: Associació entre l'expressió relativa de SLC27A2 en SAT determinada mitjançant RT-PCR i l'expressió de BCRA1.

SLC27A2 va presentar una correlació també positiva amb el gen lipolític ABHD5 (*abhydrolase domain containing 5*) ( $r = 0.343$ ;  $p = 0.03$ ) i amb gens implicats en el metabolisme del teixit adipós marró com són TMEM26 ( $r = 0.401$ ;  $p < 0.0001$ ) i RBL1 (*retinoblastoma like-1*) ( $r = 0.445$ ;  $p = 0.005$ ) i amb el gen pro-apoptòtic ATF-6 ( $r = 0.473$ ;  $p = 0.002$ ) (**Figura 24**).

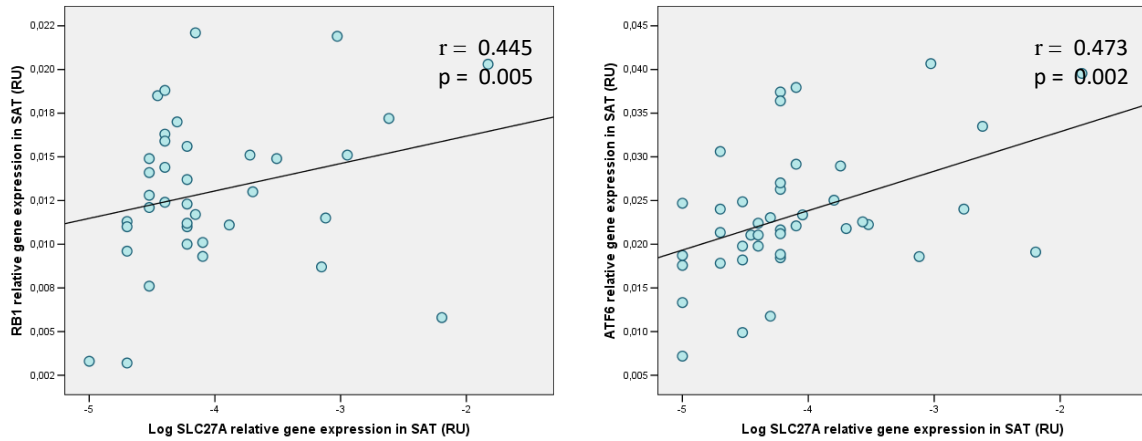


Figura 24: Associació entre l'expressió relativa de SLC27A en SAT determinada mitjançant RT-PCR i l'expressió de RBL1 i ATF6.

De manera concordant, SCL27A2es va associar negativament amb l'expressió dels gens pro-inflamatoris: CD14 ( $r = -0.579$ ;  $p = 0.002$ ), PEDF ( $r = -0.376$ ;  $p = 0.011$ ), SPP1 ( $r = -0.342$ ;  $p = 0.001$ ) (**Figura 25**) i implicats amb el metabolisme del ferro com IREB2 ( $r = 0.464$ ;  $p = 0.001$ ) i positivament amb l'expressió de CDK5 i IRS-1 ( $r = 0.343$ ;  $p = 0.016$  i  $r = 0.252$ ;  $p = 0.037$ , respectivament) (**Figura 26**), gens implicats en la sensibilitat a la insulina.

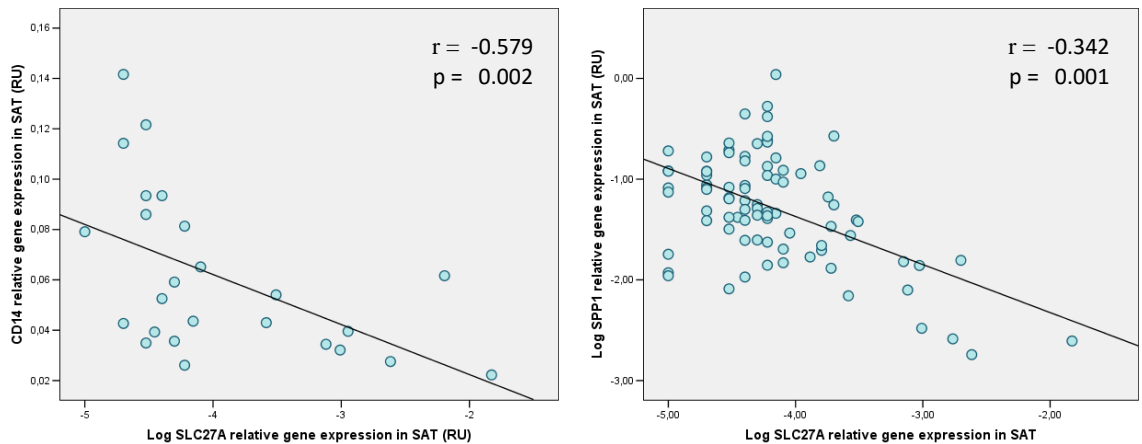


Figura 25: Associació entre l'expressió relativa de SLC27A en SAT determinada mitjançant RT-PCR i l'expressió de CD14 i SPP1.

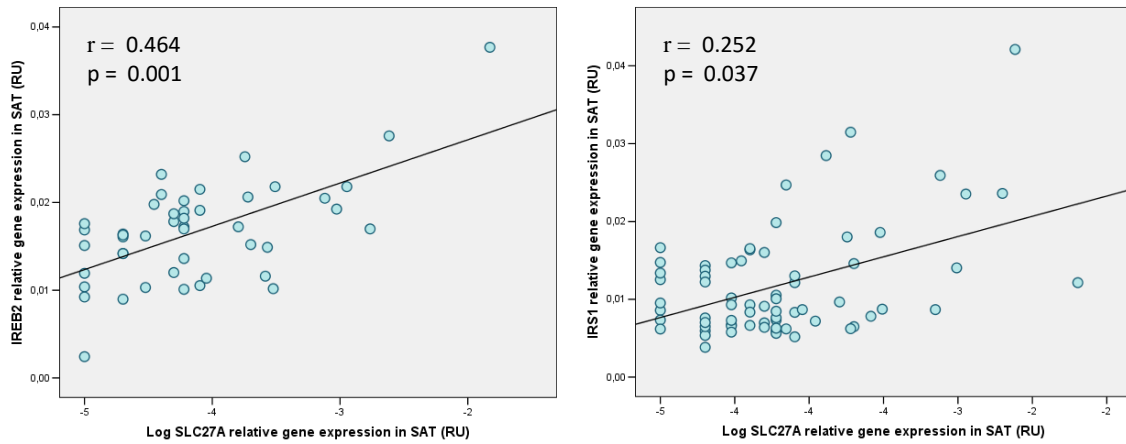


Figura 26: Associació entre l'expressió relativa de SLC27A en SAT determinada mitjançant RT-PCR i l'expressió de IREB2 i IRS1.

SCL27A2 s'associa negativament amb l'expressió dels gens que codifiquen per les Deiodinases 1 i 2, DIO-1 ( $r = -0.317$ ;  $p = 0.043$ ) i DIO-2 ( $r = -0.357$ ;  $p = 0.017$ ) i positivament amb el gen TRB2 que codifica pel receptor  $\beta 2$  d'hormones tiroïdals ( $r = 0.5$ ;  $p = 0.015$ ) (**Figura 27**).

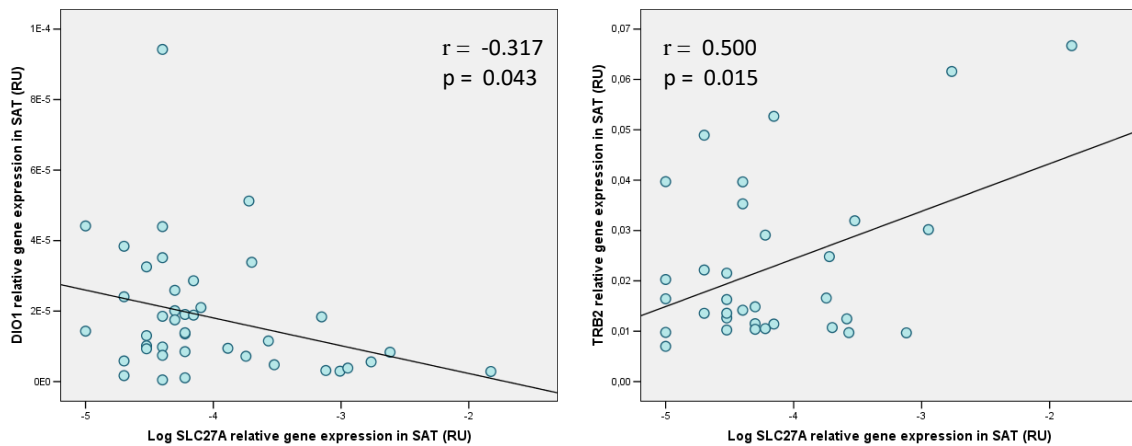


Figura 27: Associació entre l'expressió relativa de SLC27A en SAT determinada mitjançant RT-PCR i l'expressió de DIO1 i TRB2.

SLC27A2 va mostrar una correlació positiva amb CBS (*cystathionine-beta-synthase*) i CTH (*cystathionine gamma-lyase*) ( $r = 0.525$ ;  $p < 0.0001$  i  $r = 0.493$ ;  $p < 0.0001$ , respectivament), gens implicats en la via del sulfur, i amb ALMS-1 (*Alström-1*) ( $r = 0.492$ ;  $p < 0.0001$ ), gen clàssicament associat a obesitat (**Figura 28**).



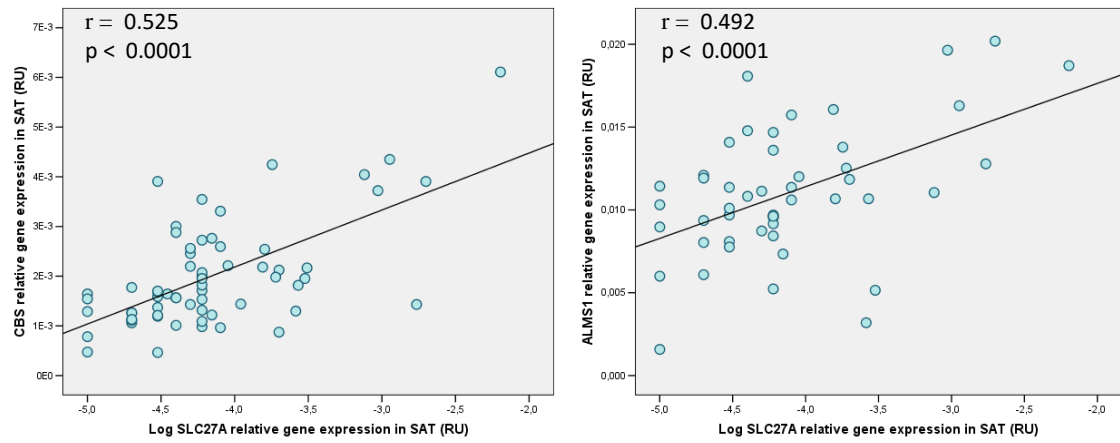


Figura 28: Associació entre l'expressió relativa de SLC27A2 en SAT determinada mitjançant RT-PCR i l'expressió de CBS i ALMS1.

### 5.3.4. Olfactomedina-2 (OLFM2).

#### Expressió Olfactomedina-2 estudi longitudinal (*Cohort 1 i 2*):

L'expressió d'OLFM2 es va veure incrementada després de la cirurgia bariàtrica ( $p < 0.0001$ ). L'expressió relativa d'OLFM2 mostrava diferències estadísticament significatives entre pacients pre-CB i el grup control ( $p=0.008$ ). Dos anys després de la CB, l'expressió d'OLFM2 en SAT va esdevenir superior a l'expressió del grup control ( $p=0.007$ ) (**Figura 29**).

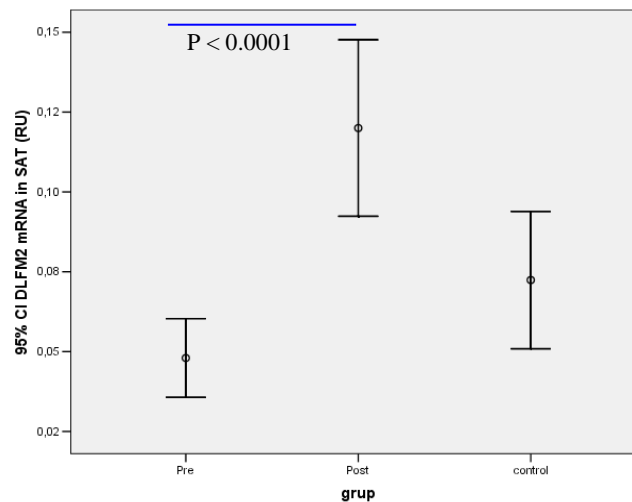


Figura 29: 95% d'interval de confiança de l'expressió relativad'OLFM2 en SAT determinada per RT-PCR abans i després de la CB i en el grup control.

#### Associacions clíniques:

##### - Estudi longitudinal (*Cohort 1*):

El percentatge de canvi en l'expressió d'OLFM2 va mostrar una associació positiva amb el percentatge de canvi de la concentració plasmàtica de colesterol total ( $r = 0.451$ ;  $p = 0.035$ ) i LDL ( $r = 0.548$ ;  $p = 0.032$ ).

##### - Estudi transversal (*Cohort 3*):

L'expressió d'OLFM2 va presentar una associació negativa amb l'edat ( $r = -0.264$ ;  $p < 0.0001$ ), que va mantenir-se separant la població per sexe ( $r = -0.406$ ;  $p = 0.050$  en homes vs  $r = -0.262$ ;  $p = 0.006$  en dones), però no separant per obesitat ( $BMI > 30$ ) ( $r = -0.436$ ;  $p < 0.0001$  en obesos vs  $r = -0.131$ ;  $p = 0.603$ ) (**Figura 30**).

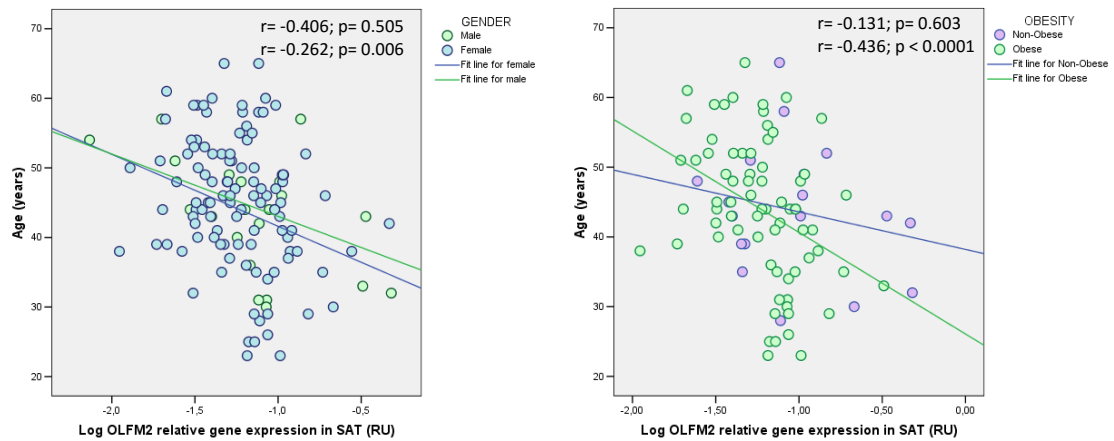


Figura 30: Associació entre l'expressió relativa d'OLFM2 en SAT determinada mitjançant RT-PCR i edat, separat per sexe (esquerre) i separat per obesitat (dreta).

OLFM2 va mostrar una associació negativa amb el valor de HOMA-IR ( $r = -0.316$ ;  $p = 0.049$ ) i amb les concentracions d'insulina plasmàtica basal, tot i que sense arribar a ser estadísticament significativa amb aquest darrer ( $r = -0.308$ ;  $p = 0.064$ ) (**Figura 31**).

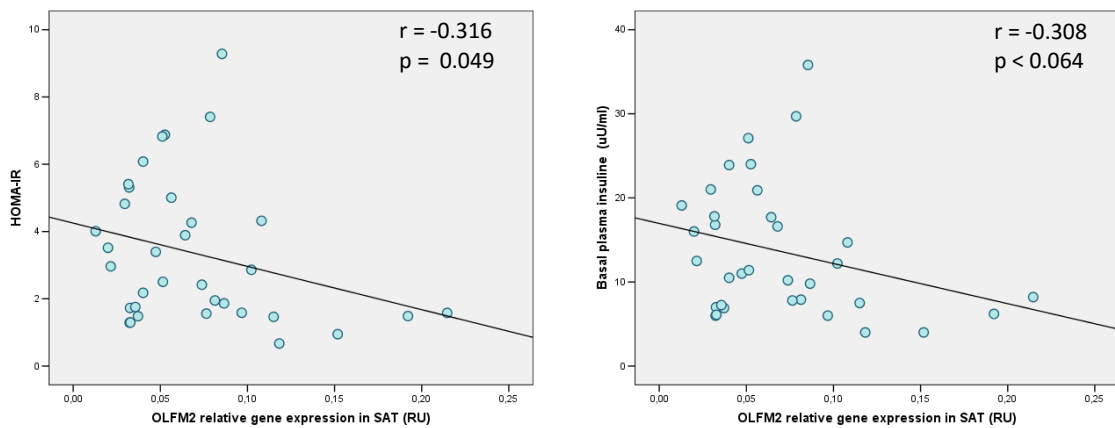


Figura 31: Associació entre l'expressió relativa d'OLFM2 en SAT determinada mitjançant RT-PCR i el valor de HOMA-IR, i associació entre OLFM2 i concentració d'insulina plasmàtica basal.

### Associació amb l'expressió gènica d'altres factors (*Cohort 3*):

L'expressió d'OLFM2 va associar-se positivament amb l'expressió del gen lipogènic SFRP1 (*secreted frizzled-related protein 1*) ( $r = 0.537$ ;  $p = 0.002$ ) i amb el gen lipolític FSP27 (*CIDEA; cell death-inducing DFFA-like effector c*) ( $r = 0.449$ ;  $p = 0.001$ ) (**Figura 32**). També s'observa una tendència positiva amb ABHD5 i FASN, malgrat no ser estadísticament significatives ( $r = 0.293$ ;  $p = 0.07$  i  $r = 0.244$ ;  $p = 0.068$ , respectivament).

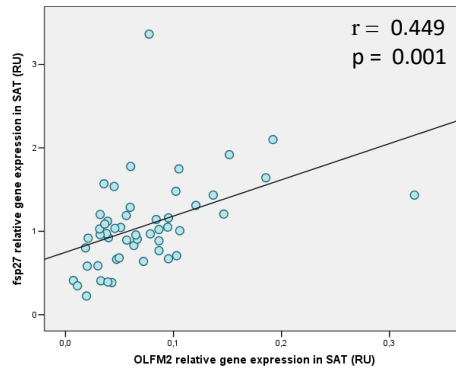


Figura 32: Associació entre l'expressió relativa d'OLFM2 en SAT determinada mitjançant RT-PCR i l'expressió del gen FSP27.

OLFM2 es va correlacionar positivament amb l'expressió de GLUT4 ( $r = 0.432$ ;  $p = 0.024$ ) i INSIG1 (*insulin induced gene 1*) ( $r = 0.535$ ;  $p = 0.002$ ), gens implicats en la sensibilitat a la insulina, i negativament amb l'expressió dels gens pro-inflamatoris: CD14 ( $r = -0.447$ ;  $p = 0.025$ ), CB2 ( $r = -0.319$ ;  $p = 0.047$ ) i TLR2 ( $r = -0.343$ ;  $p = 0.019$ ) i també amb FP1 (*ferroprotina-1*) ( $r = -0.328$ ;  $p = 0.025$ ) (**Figura 33**).

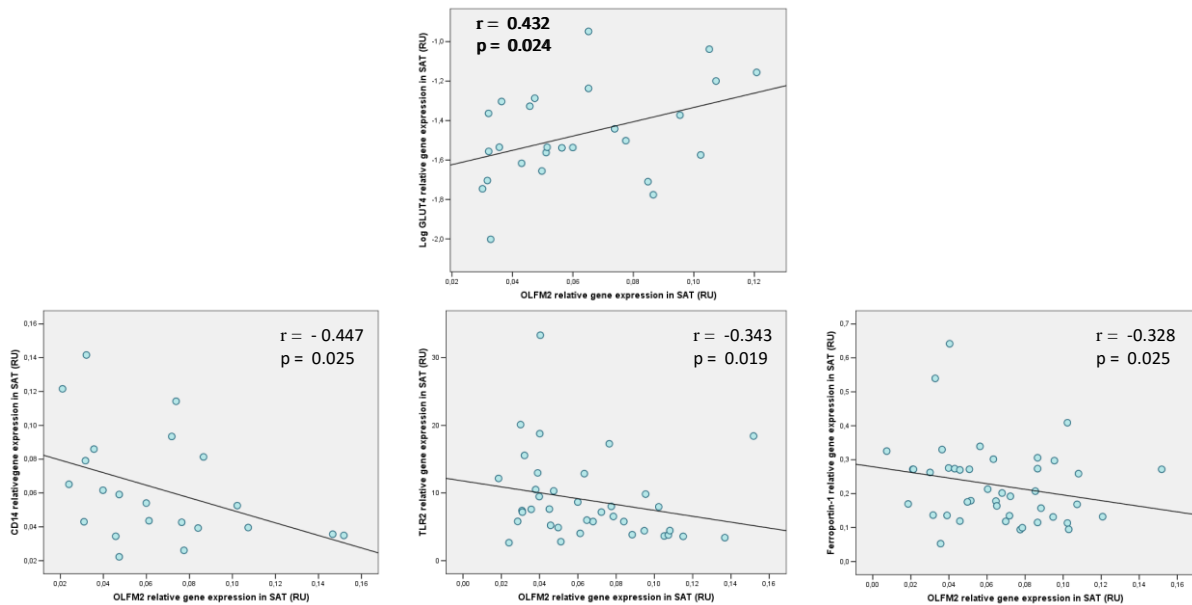


Figura 33: Associació positiva entre l'expressió relativa d'OLFM2 en SAT determinada mitjançant RT-PCR i l'expressió del gen GLUT-4 (dalt). Associació negativa entre l'expressió relativa d'OLFM2 en SAT determinada mitjançant RT-PCR i l'expressió dels gens CD14, TLR2, Ferroptina-1.

Es va observar una associació, en aquest cas positiva, amb l'expressió dels gens pro-inflamatoris: IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*) ( $r = 0.436$ ;  $p < 0.0001$ ), PEDF (*serpin peptidase inhibitor, SERPINF1*) ( $r = 0.271$ ;  $p = 0.036$ ) i amb el gen implicat en el metabolisme del ferro ALAD (*aminolevulinatase dehydratase*) ( $r = 0.336$ ;  $p = 0.048$ ) (**Figura 34**). Es va observar una

tendència també positiva amb IREB2 ( $r = 0.281$ ;  $p = 0.062$ ), malgrat no arribar a ser estadísticament significativa.

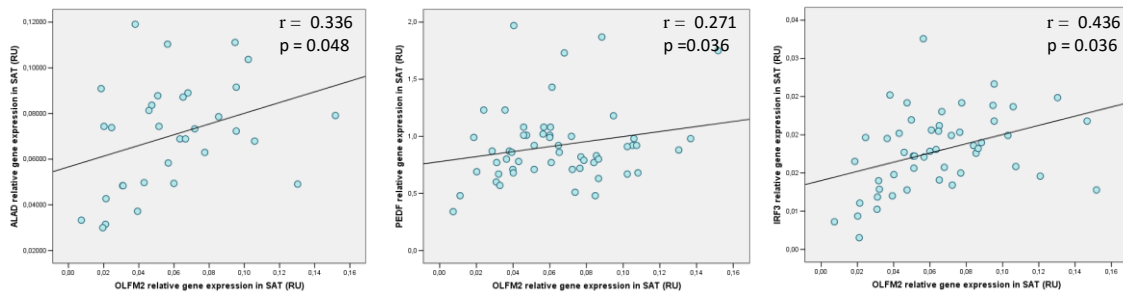


Figura 34: Associació positiva entre l'expressió relativa d'OLFM2 en SAT determinada mitjançant RT-PCR i l'expressió de ALAD, PEDF i IRF3.

OLFM2 va correlacionar positivament amb ACY1 (*Aminoacylase 1*), gen que codifica per l'enzim que hidrolitza els N-acetil aminoàcids a amino-àcids lliures alliberant àcid acètic ( $r = 0.439$ ;  $p < 0.0001$ ) (**Figura 35**).

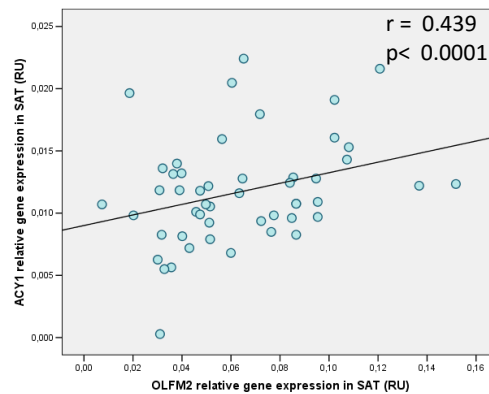


Figura 35: Associació entre l'expressió relativa d'OLFM2 en SAT determinada mitjançant RT-PCR i l'expressió d'ACY1.

### 5.3.5. Plakophilin-2 (PKP2).

#### Expressió de Plakophilin-2 estudi longitudinal (*Cohort 1 i 2*) :

L'expressió de PKP2 es va veure incrementada després de la cirurgia bariàtrica ( $p= 0.002$ ). No es van observar diferències entre l'expressió del grup post-cirurgia i la del grup control. (*Figura 36*).

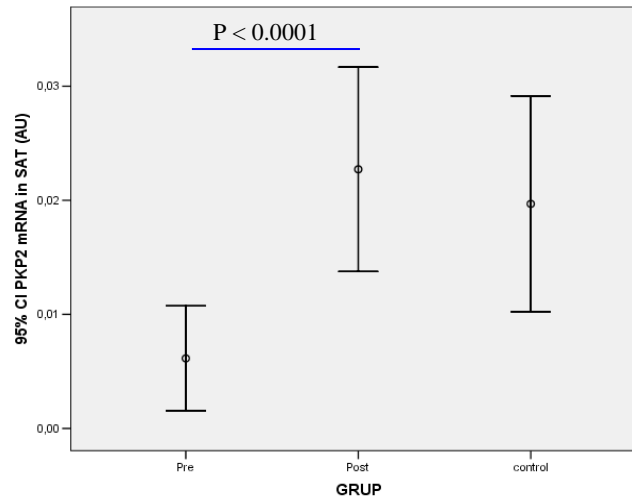


Figura 36: 95% de d'interval de confiança de l'expressió relativa de PKP2 en SAT determinada per RT-PCR abans i després de la CB i en el grup control. No s'observen diferències entre pacients post-CB i el grup control.

#### Associacions clíniques:

##### - Estudi longitudinal (*Cohort 1*):

El percentatge de canvi en l'expressió de PKP2 va mostrar una associació negativa amb el percentatge de canvi de l'IMC ( $r = -0.509$ ;  $p = 0.037$ ).

##### - Estudi transversal (*Cohort 3*):

L'expressió de PKP2 va associar-se de manera negativa amb l'IMC ( $r = -0.272$ ;  $p = 0.003$ ) (*Figura 37*) i amb la concentració plasmàtica de triglicèrids ( $r = -0.258$ ;  $p = 0.005$ ).

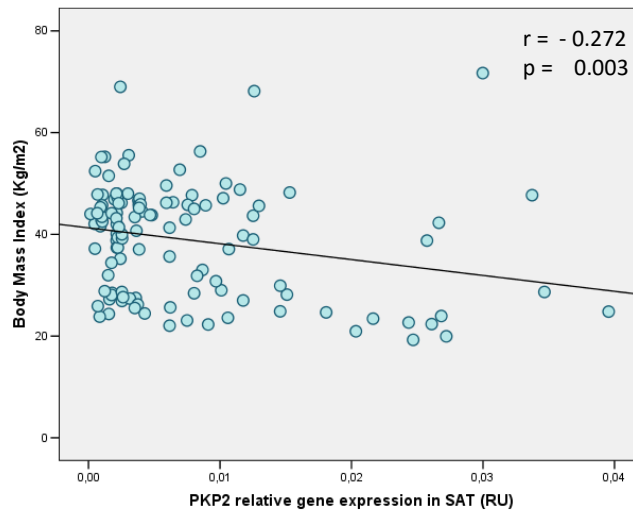


Figura 37: Associació entre l'expressió relativa de PKP2 en SAT determinada per RT-PCR i l'índex de massa corporal.

### Associació amb l'expressió gènica d'altres factors (*Cohort 3*):

L'expressió de PKP2 va mostrar una associació negativa amb els gens pro inflamatoris: CD14 ( $r = -0.408$ ;  $p = 0.048$ ), CB2 ( $r = -0.472$ ;  $p = 0.003$ ), HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*) ( $r = -0.355$ ;  $p = 0.015$ ), IL8 ( $r = -0.405$ ;  $p = 0.012$ ) i TLR2 ( $r = -0.336$ ;  $p = 0.023$ ) i amb el gen que codifica pel receptor d'eritropoetina, EPOR ( $r = -0.391$ ;  $p = 0.018$ ) (**Figura 38**).

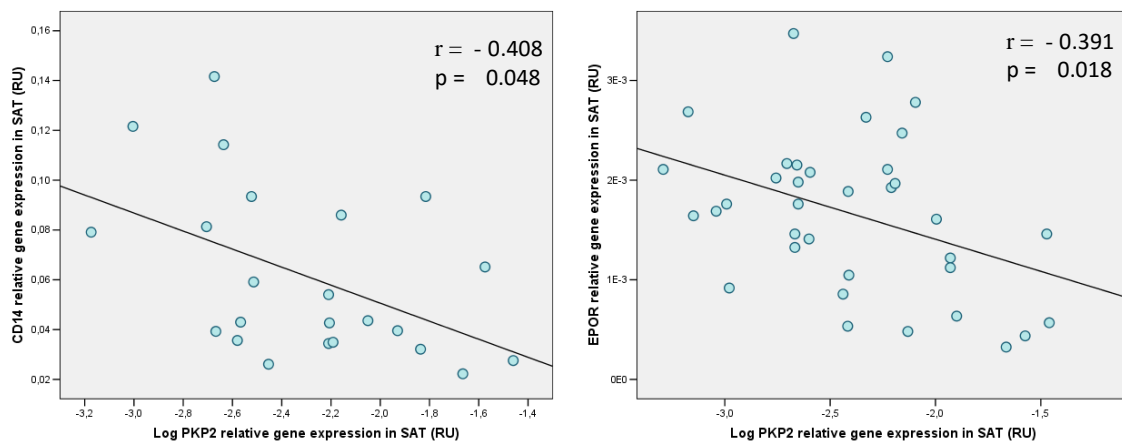


Figura 38: Associació entre l'expressió relativa de PKP2 en SAT determinada per RT-PCR i l'expressió gènica de CD14 i del receptor d'eritropoetina.

De manera concordant, l'expressió de PKP2 va associar-se positivament amb l'expressió del gen antiinflamatori TIMP3 (*metallopeptidase inhibitor 3*) ( $r=0.379$ ;  $p=0.016$ ) i amb INSIG-1 ( $r=0.479$ ;  $p=0.009$ ), gen implicat en la sensibilitat a la insulina (**Figura 39**).

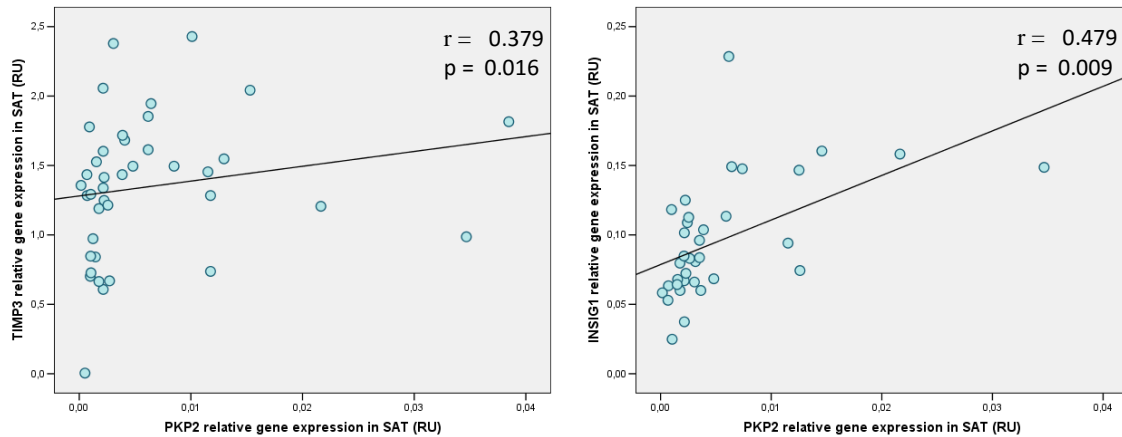


Figura 39: Associació entre l'expressió relativa de PKP2 en SAT determinada per RT-PCR i l'expressió gènica de TIMP3 i d'INSIG1.

En relació a gens implicats en el metabolisme lipídic, PKP2 va associar-se positivament amb l'expressió del gen lipogènic FASN ( $r=0.285$ ;  $p=0.033$ ) i amb el marcador de teixit adipós beige TMEM26 ( $r=0.227$ ;  $p=0.039$ ).

De manera semblant a les associacions observades per SLC27A, PKP2 va presentar una associació positiva amb l'expressió de les deiodinases 1 i 2 ( $r=-0.364$ ;  $p=0.021$  i  $r=-0.407$ ;  $p=0.006$ , respectivament) i negativa amb TRB2 ( $r=0.524$ ;  $p=0.010$ ) (**Figura 40**).

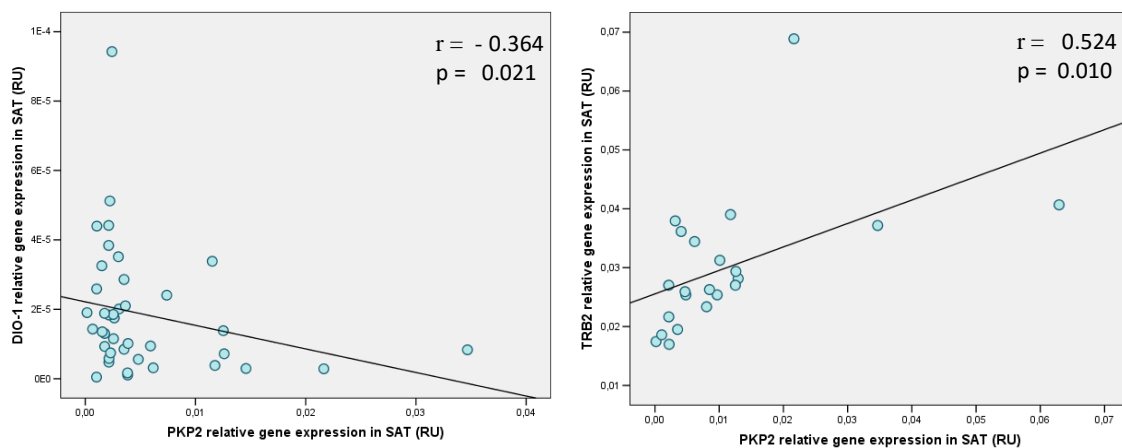


Figura 40: Associació entre l'expressió relativa de PKP2 en SAT determinada per RT-PCR i l'expressió gènica de deiodinasa-1 i de TRB2.



PKP2 va associar-se de manera positiva amb l'expressió dels gens apoptòtics ATF-6 ( $r=0.425$ ;  $p=0.006$ ) i BAX (*BCL2 associated X protein*) ( $r=0.355$ ;  $p=0.023$ ) (**Figura 41**).

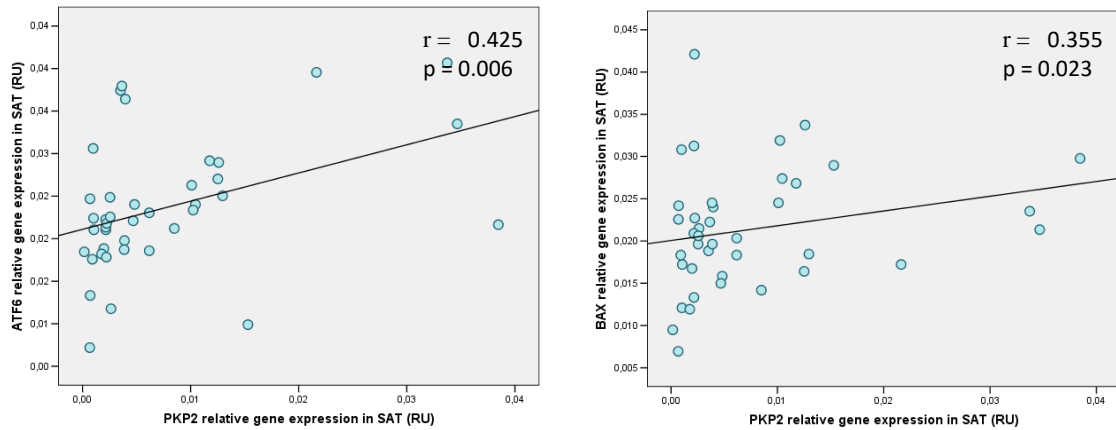


Figura 41: Associació entre l'expressió relativa de PKP2 en SAT determinada per RT-PCR i l'expressió gènica d'ATF6 i BAX.

A l'estudi mitjançant tècniques de *microarray*, es va observar una associació positiva entre expressió de PKP2 i expressió de col·lagen 6A6 ( $r=0.256$ ;  $p=0.03$ ). No es va observar associacions significatives entre l'expressió de PKP2 i la resta de col·làgens determinats al *microarray*.

### 5.3.6. Estudi del canvi en l'expressió de SAT de RGS-1, OLFM2, PKP2, LYZ i SLC27a2 promogut per l'acte quirúrgic:

Per tal de quantificar l'efecte de l'acte quirúrgic de la CB en l'expressió d'aquests gens, es va procedir a estudiar l'expressió en SAT a l'inici de la CB i al final d'aquesta (transcorregudes 2h) en una cohort de 16 pacients obesos mòrbids intervinguts de CB mitjançant BPG en Y de roux (**cohort 4**)(fenotipació clínica i analítica bàsica en taula anexa, Taula 4). En aquesta cohort de pacients, es va obtenir una primera mostra de SAT just després de la primera insició quirúrgica i una segona mostra just abans de tancar la darrera insició (transcorregut un període de 2 hores). La totalitat d'aquests pacients es va intervenir al mateix centre (*Hospital de la Vall d'Hebró*), a mans del mateix cirurgià (*Dr. Vilallonga*) i per la mateixa via d'abordatge, laparoscòpica.

L'estudi d'expressió gènica es va dur a terme mitjançant RT-PCR. Es va observar un increment estadísticament significatiu en l'expressió de PKP2 en resposta a l'acte quirúrgic ( $p=0.001$ ). No es van observar canvis estadísticament significatius en l'expressió dels altres 4 gens (RGS-1, OLFM2, PKP2, LYZ, SLC27A)(**Taula 8**). Es va analitzar l'expressió de IL-6 i IL-8 com a marcadors d'inflamació, observant canvis significatius en l'expressió dels 2 gens ( $p<0.00001$ ).

**Taula 8: Estudi expressió gènica en teixit adipós subcutàni (SAT) estudiat mitjançant reacció en cadena de la polimerasa en temps real (RT-PCR) en una cohort de 16 pacients obesos mòrbids -a l'inici i al final de la CB-, cohort 4.**

Gen	Inici-CB	Final-CB	P
RGS-1	0,019711± 0.005853	0,03468 ± 0.025951	0.250
OLFM2	0,042049 ± 0.025853	0,046038 ± 0.021769	0.297
PKP2	0,008945 ± 0.009137	0,014426 ± 0.009792	<b>0.001</b>
LYZ	0,334404 ± 0.148844	0,420891 ± 0.218896	0.092
SLC27A	0,000065 ± 0.000057	0,000068 ± 0.000053	0.595
IL-6	0.0056906 [0.00027-0.06745]	0.1550029 [0.00301-1.34723]	<b>&lt;0.00001</b>
IL-8	0.0051381 [0.00047-0.03590]	0.0837231 [0.00425-0.90125]	<b>&lt;0.00001</b>

Els valors s'expressen a la taula com expressió relativa (RU). Els valors s'expressen com valor mig i desviació estàndard ( $\pm$  SD). La comparació està realitzada mitjançant *t-Student* per a mostres aparellades. En negreta s'indica la significació estadística.

#### 5.4. Resultats del tercer objectiu: Estudiar els canvis en la sensibilitat a la insulina després de la pèrdua de pes promoguda per la CB i la seva associació amb els canvis en l'expressió gènica del teixit subcutani.

La sensibilitat a la insulina va ser evaluada a través de CLAMP euglucèmic hiperinsulinèmic abans i després de la cirurgia en 10 de les 25 pacients intervingudes de CB (*Cohort 1*). En aquestes, la mitjana del valor de M-CLAMP va passar de 4,87 a 6,50 ( $p=0.032$ ) (*Figura 42*).

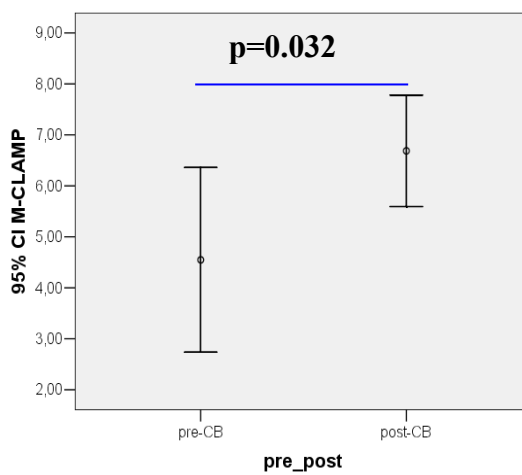


Figura 42: Comparació de mitjanes de M-CLAMP abans i després de la CB.

Es va procedir a estudiar l'associació entre la milloria de la sensibilitat a la insulina (*percentatge de canvi de M-CLAMP*) i els canvis en l'expressió gènica de SAT (*percentatge de canvi d'expressió relativa*). Es va incloure per aquest objectiu el grup de 10 pacients de qui es disposava d'estudi CLAMP abans i després de la CB. Es realitzar una selecció de gens àmpliament relacionats amb inflamació com són IL-6, MCR1, TNF- $\alpha$ , FNDC5, IL1R1 i sensibilitat a la insulina (GLUT4 i IRS1).

Es va observar una associació negativa entre l'increment en el valor de M-CLAMP i l'expressió dels gens pro-inflamatoris interleuquina 6 (IL-6) i factor de necrosi tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ( $r= -0.751$ ;  $p= 0.002$  i  $r= -0.773$ ;  $p= 0.025$ , respectivament) (*Figura 43*). De manera concordant, es va observar una associació, en aquets cas positiva, amb el marcador de macròfags (MCR-1) ( $r= 0.893$  ;  $p= 0.007$ ) i amb el receptor tipus 1 d'interleuquina 1 (IL1R1) ( $r= 0.683$  ;  $p= 0.042$ ) (*Figura 43*). Es va observar una tendència estadísticament no significativa entre la milloria de la sensibilitat a la insulina i l'expressió de GLUT4 i IRS1 ( $r= 0.608$ ;  $p= 0.062$  i  $r= 0.510$ ;  $p= 0.132$  , respectivament).

Taula 9: Associacions entre percentatge de canvi M-CLAMP i percentatge de canvi d'expressió gènica en SAT (determinada a través de RT-PCR) després de la CB.

Gen	Associació % canvi M-CLAMP % canvi Expressió (RT-PCR)	
	r	p
IL-6	-0.751	<b>0.002</b>
MRC1	0.893	<b>0.007</b>
TNF- $\alpha$	-0.733	<b>0.025</b>
FNDC5	0.683	<b>0.042</b>
IL1R1	0.683	<b>0.042</b>
GLUT4	0.608	0.062
IRS1	0.510	0.132

Associacions entre percentatge de canvi d'expressió (RT-PCR) i percentatge de canvi de M-CLAMP, estudiada seguint el model de correlació bivariant d'Spearman. 'R' correspon al coeficient de correlació d'Spearman i 'p' a la significació estadística. En negreta s'indica la significació estadística. Aquests gens es mostren ordenats des en funció de la significació estadística.

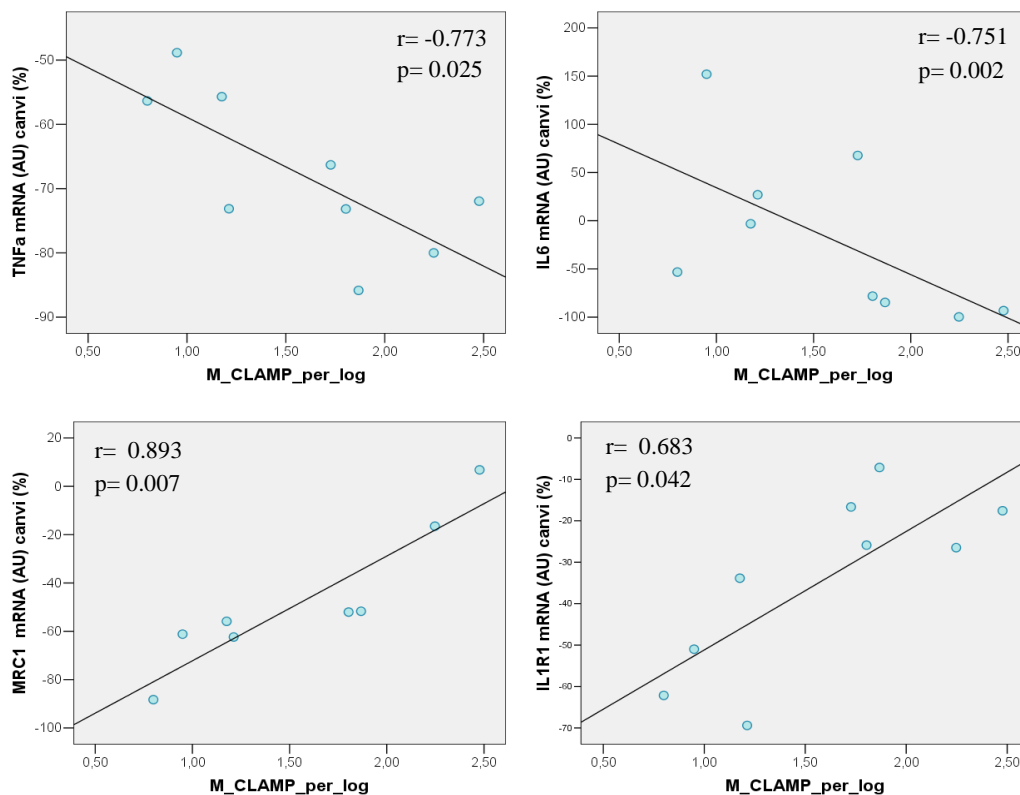


Figura 43: Associació entre percentatge de canvi de M-CLAMP (log(10) del percentatge de canvi) i el percentatge de canvi en l'expressió relativa de IL-6, TNF- $\alpha$ , Receptor de IL1 i MCR1, determinada per RT-PCR.

Es va estudiar també aquells gens que més veien modificada la seva expressió als resultats del *microarray* (**Taula 5**). Es va validar l'expressió d'aquests gens a través de *RT-PCR* i es va estudiar la correlació entre el percentatge de canvi d'aquests gens i el percentatge de canvi de M-CLAMP seguint el model de correlació bivariant d'*Spearman* (**Taula 10**).

**Taula 10: Associació entre percentatge de canvi de M-CLAMP i percentatge de canvi d'expressió relativa (RT-PCR).**

GEN	NOM GEN	Log canvi d'expressió al microarray (N=16)		Associació amb % canvi M-CLAMP (N=10)	
		Log <sub>2</sub> fold change	P	r	P
SLC27A2	solute carrier family 27(fatty acid transporter),member 2	2,26	<b>0.0002</b>	-0.067	0.865
ELOVL6	ELOVL fatty acid elongase 6	1,54	<b>&lt;0.0001</b>	-0.350	0.356
FASN	fatty acid synthase	1,52	<b>&lt;0.0001</b>	0.367	0.332
STOX1	storkhead box 1	1,47	<b>&lt;0.0001</b>	0.286	0.492
C6	complement component 6	1,29	<b>0.0002</b>	0.086	0.872
TF	transferrin	1,29	<b>0.0001</b>	0.150	0.700
PKP2	plakophilin 2	1,28	<b>0.0001</b>	0.300	0.624
OLFM2	olfactomedin 2	1,23	<b>0.0001</b>	0.533	0.139
ACLY	ATP citrate lyase	1,23	<b>0.0001</b>	-0.017	0.966
IL8	interleukin 8	-1,44	<b>0.0014</b>	-0.100	0.798
CLEC7A	C-type lectin domain family 7, member A	-1,45	<b>&lt;0.0001</b>	-0.300	0.433
SPP1	secreted phosphoprotein 1	-1,58	<b>0.0002</b>	0.067	0.865
LYZ	lysozyme	-1,62	<b>&lt;0.0001</b>	0.083	0.831
EGR1	early growth response 1	-1,65	<b>0.0010</b>	-0.233	0.546
RGS1	regulator of G-protein signaling 1	-1,71	<b>0.0001</b>	0.167	0.668
DUSP1	dual specificity phosphatase 1	-1,73	<b>&lt;0.0001</b>	0.150	0.700
MT1A	metallothionein 1A	-1,78	<b>0.0006</b>	-0.083	0.831
AQP9	aquaporin 9	-2,16	<b>0.0001</b>	-0.405	0.320
EGFL6	EGF-like-domain, multiple 6	-2,22	<b>0.0010</b>	0.267	0.488
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	-2,82	<b>0.0012</b>	0.017	0.966

A la primera columna es mostren els gens que més veuen modificada la seva expressió estudiada a través de *microarray*. Aquests gens es mostren ordenats des dels que més augmenten la seva expressió fins als que més la disminueixen. Els valors s'expressen com el logaritme del % de canvi que té lloc després de la cirurgia bariàtrica. Les 2 columnes de la dreta mostren les associacions entre percentatge de canvi d'expressió validat per *RT-PCR* i percentatge de canvi de M-CLAMP, estudiada seguint el model de correlació bivariant d'*Spearman*. 'R' correspon al *coeficient de correlació d'Spearman* i 'p' a la significació estadística. En negreta s'indica la significació estadística.

## 6. DISCUSSIÓ

---



La finalitat d'aquesta tesi era estudiar els canvis en l'expressió gènica del teixit adipós subcutani promoguts per la CB i l'associació d'aquests canvis amb paràmetres clínics i amb l'expressió gènica d'altres factors. Les troballes més importants en relació als objectius va ser, en primer lloc, l'existència de canvis estadísticament significatius en l'expressió de més de 5.000 gens. En segon lloc, fixant-nos en una selecció de 5 gens d'entre els que més van veure modificada la seva expressió i quantificables en tots els casos, es va observar una sòlida associació entre l'expressió d'aquests gens i l'expressió d'altres factors implicats en el metabolisme lipídic, inflamació i la sensibilitat a la insulina. En tercer lloc, es va observar també una sòlida associació entre l'expressió d'aquests 5 gens i alguns dels paràmetres clínics que més es modifiquen després de la CB. En quart lloc, es va corroborar una notable milloria de la sensibilitat a la insulina després de CB i es va observar una associació entre aquest canvi en la sensibilitat a la insulina i l'expressió d'alguns gens implicats en inflamació a nivell de SAT.

El conjunt d'aquestes troballes confirma la hipòtesi de que la cirurgia bariàtrica modifica l'expressió gènica del teixit adipós subcutani.

Els resultats presentats en aquesta tesi, són concordants amb les escasses publicacions existents que indaguen en aquest tema, tal com es detalla en els següents apartats.

Aquest estudi pot contribuir a entre l'efecte de la CB i a explicar els mecanismes pels quals té lloc la milloria de les comorbiditats associades a la obesitat, considerant les limitacions esmentades a l'apartat corresponent.



### **6.1. Objectiu 1: Canvis en l'expressió gènica del teixit adipós després de la cirurgia bariàtrica.**

La obesitat associa una sèrie d'alteracions metabòliques, entre elles un estat d'inflamació crònica de baix grau i de resistència a la insulina, resultat en part per la secreció de mediadors inflamatoris per part del teixit adipós blanc (*Clement K et al, 2007 & Pradhan A et al, 2007*).

La CB representa l'opció de tractament més eficaç tant per la obesitat en sí com per les comorbilitats associades. Així doncs, la CB representa un valuós model per comprendre millor els mecanismes fisiopatològics pels quals té lloc aquesta milloria del perfil metabòlic.

Juntament amb la milloria de la inflamació sistèmica, s'ha descrit una profunda remodelació de WAT després de la CB (*Eriksson-Holding D et al, 2015*), que inclou canvis en les característiques histològiques (milloria de la fibrosi del teixit adipós) (*Eriksson-Holding D et al, 2015*), canvis en l'expressió gènica (*Kong LC et al, 2013 and Johansen LE et al, 2012*) i modificacions en el control transcripcional de la inflamació (*Eriksson-Holding D et al, 2015*).

Malgrat la CB impliqui una llarga sèrie d'altres factors - modificacions de l'anatomia del tracte gastrointestinal, del pH gàstric, de la mobilitat intestinal, buidament gàstric, flux de sals biliars o síntesi d'hormones gastrointestinals, i sobretot, canvis en la dieta - l'estudi del canvi en l'expressió gènica del teixit adipós representa un camp nou en l'estudi d'aquests pacients i potser la primera pedra per entendre el canvi de moltes vies metabòliques.

Al present treball, l'expressió gènica a nivell del teixit adipós subcutani es va veure notablement modificada després de la pèrdua de pes promoguda per la CB. Més de 5.000 gens van veure modificada la seva expressió als estudis de *microarray*. De manera global, es va observar una caiguda en l'expressió de gens proinflamatoris i relacionats amb el metabolisme del ferro i un increment en l'expressió dels gens lipogènics i implicats en la sensibilitat a la insulina.

Actualment, existeixen 4 estudis publicats que han abordat el canvi en l'expressió gènica del teixit adipós subcutani promogut per la pèrdua de pes induïda per restricció calòrica en 2 d'ells (*Johanson LE et al 2012 i Campbell KL et al, 2013*) i per cirurgia bariàtrica en altres 2 treballs (*Dankel SN et al, 2010 i Kong LC et al, 2013*), estudiada mitjançant tècniques de *microarray* (*Taula 11*).

**Taula 11: Resum literatura existent on s'avalua a través de tècniques de microarray els canvis en l'expressió gènica en teixit adipós després de pèrdua de pes.**

Autor	Any	n	H/D	DM2/No	Edat	BMI basal	BMI post (%canvi)	Temps	Intervenció
<i>Dankel SN</i>	2010	9	-/9D	?	39.3±4.3	53.3 ± 4.3	33.1% ±5.0 (20%)	12 mesos	Derivació biliopancreàtica
<i>Johansson LE</i>	2012	9	3H/6D	No DM2	40±3.7	42.7 ± 1.4	34.9±1.9 (18.8%)	3 mesos	Dieta 1200Kcal
<i>Kong LC</i>	2013	8	8D	No DM2	39.3±10.9	47.6 ± 1.5	40.6% ±1.3 (14.9%)	3 mesos	Bypass
<i>Campbell KL</i>	2013	24	-/24D	No DM2	57,5±3.1	30.5 ± 3.4	27,26 (10.6%)	6 mesos	Dieta(8) /Dieta+Exercici (16)

Els estudis que més han centrat l'atenció en aquest treball han estat els que inclouen la CB com a mecanisme pel qual té lloc la pèrdua de pes (*Dankel SN et al, 2010 i Kong LC et al, 2013*). Ambdós autors descriuen una cohort de dones (N = 9 i N = 8, respectivament), estudiades abans i després de ser sotmeses a CB mitjançant derivació biliopancreàtica (*Dankel et al, 2010*) o mitjançant bypass gàstric (*Kong et al, 2013*), estudiades transcorreguts 12 mesos (*Dankel et al*) i 3 mesos després d'aquest (*Kong et al*) (Taula 11).

*Dankel SN et al, 2010* recullen en el seu treball l'estudi dels canvis en l'expressió gènica en teixit adipós subcutani de 9 dones obesas mòrbides intervingudes de cirurgia bariàtrica mitjançant derivació biliopancreàtica. Descriuen una cohort amb una edat de 39,3±4,3 anys i un IMC inicial de 53,3±4,3kg/m<sup>2</sup>. L'expressió gènica en SAT va ser estudiada en una primera mostra obtinguda durant la cirurgia bariàtrica i en una segona mostra obtinguda 12 mesos després (amb un IMC als 12 mesos de 31,1±5kg/m<sup>2</sup>).

L'anàlisi a través de *microarray* va mostrar canvis significatius en l'expressió de 621 gens després de la cirurgia, 469 dels quals disminuïen la seva expressió i 152 es sobre expressaven. IL-6, IL-8, IL1b, MCP1/CCL2, subunitat alfa del factor induïble per hipòxia (HIF1A) i cicloxigenasa-2 (PTGS2/COX2), tots ells gens directament vinculats a obesitat i inflamació, van disminuir la seva expressió després de la CB. D'altra banda, gens implicats en el metabolisme lipídic com són apolipoproteïna E (APOE), apolipoproteïna C1 (APOC1) i esterol regulador de la unió al factor de transcripció 1/*sterol regulatory element binding transcription factor 1* (SREBF1) van mostrar un increment significatiu en la seva expressió.

No es recull en el seu treball si entre aquestes 9 dones, algunes presentaven DM2. Si que es descriu la cohort inicial de 16 pacients que inclou les 9 dones amb *microarray*. D'aquests 16 subjectes (12 dones i 4 homes), 7 eren afectes de DM2. Un any després de la cirurgia bariàtrica, 6 dels 7 pacients afectes de DM2 havien presentat una resolució de la seva diabetis. A nivell de tota la cohort, l'índex HOMA va presentar una caiguda de 8.6 ±6.41 a 1.5±1.33 (p=0.0003).

*Dankel SN et al*, publiquen en els seus resultats de *microarray* l'expressió dels 5 gens que han centrat l'atenció del nostre estudi (PKP2, OLF2, RGS-1, SLC27A i LYZ). Malgrat observar-se una tendència al canvi en l'expressió d'aquests gens, en direcció concordant a les als resultats recollits en el present treball, aquest canvi és només estadísticament significatiu en el cas de RGS-1. La manca de significació en el seu estudi, pot ser atribuïble a la menor N reportada o al fet que no es portés a terme l'estudi d'expressió mitjançant *RT-PCR*. També la seva cohort és significativament més jove i més obesa que la que es recull a l'estudi longitudinal del present treball.

***Kong LC et al, 2013*** presenten en el seu treball una cohort de 8 dones obesas mòrbides amb BMI  $47.6 \pm 1.5 \text{Kg/m}^2$  i amb edat de  $39.3 \pm 10,9$  anys, cap d'elles afecte de DM2, estudiades abans i 3 mesos després d'intervenir-se de cirurgia bariàtrica mitjançant bypass gàstric. Es va realitzar estudi d'expressió gènica en teixit adipós mitjançant tècniques de *microarray* abans i 3 mesos després de la cirurgia. El seu *end-point* primari va ser l'estudi dels canvis en la microbiota del pacient obès i la seva relació amb els canvis en l'expressió gènica del teixit adipós subcutani. *Kong et al* van observar canvis en 14 generes de bactèries, cadascuna de les quals es relacionava amb els canvis en l'expressió d'entre 28 i 64 gens. Un total de 202 gens mostraven canvis en la seva expressió transcorreguts 3 mesos des de la cirurgia.

Alguns dels gens citats en el treball de *Kong et al* amb increment en la seva expressió van ser: C1Q-factor de necrosis tumoral relacionat amb la proteïna 2 (C1QTNF2), *bone morphogenetic protein 6* (BMP6) i transportador de soluts de la família 13 depenent de sodi/*solute carrier family 13 (sodium-dependent citrate transporter* (SLC13A); i amb disminució en la seva expressió: membre 1 de la família Acetil coenzim-A sintetasa de cadena curta/ *acyl-CoA synthetase short-chain family member 1* (ACSS-1), 24-dehidrocolesterol reductasa (DHCR24) i membre 33 de la família 25 transportadora de soluts/*solute carrier family 25 (pyrimidine nucleotide carrier), member 33* (SLC25A33).

No es parla en el seu treball de canvis en la sensibilitat a la insulina.

Malgrat no es tracti en la seva publicació, en els seus resultats de *microarray* (*supplemental information*) es recull una tendència al canvi en l'expressió de PKP2, OLF2, RGS-1, SLC27A i LYZ, de manera també concordant amb els canvis d'expressió descrits a la cohort de pacients descrita en el present treball. En aquest cas però, la significació estadística és significativa només en el cas de SCL27A2. Igual que en el treball de *Dankel SN et al*, aquesta manca de significació estadística podria ser explicada per la poca N (N=8) o per la manca de corroboració dels resultats

a través de *RT-PCR*. En aquest cas, però, també podria ser explicada pel poc temps transcorregut des de la cirurgia (3 mesos).

Existeixen 2 publicacions més on els canvis en l'expressió gènica de SAT són valorats a través de *microarray* després de la pèrdua de pes promoguda per dieta (*Johanson LE et al 2012* i *Campbell KL et al, 2013* ).

*Johansson LE et al, 2012* reporten una cohort de 9 pacients (3 homes i 6 dones), cap d'ells afectes de DM2, obesos mòrbids amb BMI de  $42.7 \pm 1.4 \text{Kg}$  i  $40 \pm 3.7$  anys d'edat, estudiats abans i després de pèrdua de pes promoguda per dieta hipocalòrica. Es va realitzar biòpsia de teixit adipós subcutani abans i després de perdre un 18 % del pes a través de dieta hipocalòrica de 1.200 Kcal ( $101 \pm 26$  dies post-inici dieta). Aquests pacients van ser seguits durant un període de 6 mesos després d'aconseguir-se la pèrdua de pes ( $167 \pm 37$  dies) -*fase de manteniment de pes*- repetint-se de nou la obtenció de mostra de teixit subcutani. Totes les biòpsies van ser obtingudes al finalitzar TTOG (75gr). L'estudi d'expressió gènica mitjançant tècniques de *microarray* va mostrar canvis en l'expressió de 2163 gens, 1054 dels quals es augmentaven i 1104 veien disminuïda la seva expressió després de la pèrdua de pes. Més de 3000 gens veien modificada la seva expressió finalitzada la fase de manteniment de pes. Destaquen en el seu treball CIDEA (cell death-inducing DFFA-like effector A), MMP9 (matrix metalloproteinase 9) i PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain containing 3) com 3 dels gens amb expressió significativament disminuïda després de la pèrdua de pes i SCD (estetoril Co-A desaturase), gen implicat en adipogènesi i sensibilitat a la insulina, com un dels gens amb una expressió més incrementada durant la fase de manteniment. *Johansson et al* descriuen la fase de pèrdua de pes i la fase de manteniment com a 2 esdeveniments biològicament diferents en quant a la fisiologia del teixit adipós.

Malgrat ser una cohort no afecte de DM2, es va observar una milloria a nivell de resistència a la insulina calculada a través de HOMA-IR després de la pèrdua de pes ( $p=0.0033$ ), que va seguir millorant durant la fase de manteniment de pes ( $p=0.038$ ). Una de les limitacions d'aquest estudi és que les mostres de SAT van ser extretes al finalitzar TTOG (75g), no en situació basal.

*Campbell KL et al, 2013* reporten en el seu treball una cohort de 45 dones post-menopàusiques amb obesitat /sobrepès (BMI de  $31.3 \pm 4.3 \text{Kg/m}^2$ ) randomitzades a un grup d'intervenció amb dieta ( $n=8$ ), un amb exercici ( $n=14$ ), un tercer amb dieta + exercici ( $n=16$ ) i un grup control de no intervenció ( $n=7$ ). Finalitzat el període de seguiment de 6 mesos, els 4 grups van presentar una pèrdua mitjana de pes de 8.8Kg, 2.5Kg, 7.9Kg i nul·la, respectivament. Es va realitzar estudi d'expressió gènica a través de tècniques de *microarray* a l'inici i als 6 mesos de seguiment a través de biòpsia de teixit adipós subcutani. *Campbell et al* destaquen en el seu

treball canvis en l'expressió de 9 gens en els grups amb dieta i dieta + exercici, respecte al grup control. Descriuen una disminució en l'expressió de 4 gens: 17-beta hidroxisteroid deshidrogenasa 1 (HSD17B1), Leptina (LEP), receptor insulina (INSR) i *telomeric repeat binding protein factor 1* (TERF1), i un increment en l'expressió de: *telomeric repeat binding factor 2* (TERF2), *telomeric repeat binding factor 2, interacting protein* (TERF2IP), IL-1b, receptor estrogènic (ESR1) i ciclooxygenasa-2 (PTGS2/COX2). Troballes contràries a les associacions descrites per **Dankel SN et al, 2010** respecte PTGS2/COX2 i pèrdua de pes. **Campbell KL et al, 2013** no troben diferències entre els pacients control i els randomitzats al grup d'exercici. Destaquen en el seu treball el fet inesperat de no trobar associacions entre la pèrdua de pes i l'expressió de gens pro-inflamatoris clàssicament associats a obesitat, tals com: TNF- $\alpha$ , IL-6 o MCP-1. Aquesta troballa és concordant amb un altre treball de **Tam et al, 2012** amb disseny experimental i *n* similars, on tampoc s'observaven canvis en l'expressió de gens pro-inflamatoris en SAT (estudiada mitjançant reacció en cadena de la polimerasa en temps real) malgrat pèrdua d'un 25% del pes amb dieta i exercici. Els autors d'un i altre treball hipotetitzen sobre la possibilitat d'un menor impacte del desblanç energètic sobre l'expressió d'aquests gens, contràriament al que reporten altres autors, si bé la poca *n* i el baix percentatge de pes perdut (5% en la majoria dels casos) impressionen ser causes plausibles de la manca de significació estadística.

El present treball contribueix al coneixement actual aportant una cohort més gran de pacients intervingudes mitjançant by-pass gàstric i estudiades per *microarray* (N = 16). A més a més, en aquestes 16, i 9 dones més, es va procedir a corroborar els canvis en l'expressió gènica dels gens més remarcables (tots els inclosos a la part de resultats) a través de *RT-PCR* (**Taula 8**).

L'estudi dels canvis en l'expressió gènica del present estudi, aprofundeix no només en l'estudi dels gens clàssicament vinculats a inflamació o al metabolisme lipídic i de la glucosa, sinó que estudia també el canvi de gens implicats en el metabolisme del ferro.

És conegut com l'acumulació de ferro a nivell del teixit adipós té un impacte directe en la disfunció de l'adipòcit, en la inflamació crònica d'aquest teixit (*Virtue S et al, 2010; Bourlier V et al, 2008 and Ortega FJ et al, 2010*) i en la resistència a la insulina i la DM2 (*Dekker LH et al, 2013; Jehn M et al, 2004 and Fernández-Real JM et al, 2005*). La insulina és un potent inductor de la captació de ferro per part de l'adipòcit alhora que interfereix en la seva acció (*Davis RJ et al, 1986*). Diferents revisions i metaanàlisi confirmen aquesta íntima relació entre el dipòsit de ferro i la DM2 (*Zhao Z et al, 2012 and Kunutsor SK et al, 2013*).

Més recentment, s'ha descrit una forta associació entre l'expressió de gens implicats en el metabolisme del ferro a nivell del teixit adipós i l'expressió de gens adipogènics (*Moreno-Navarrete JM et al, 2014*). S'ha descrit com l'expressió del gen que codifica per la proteïna transportadora del ferro, transferrina (TF) correlaciona positivament amb l'IMC i presenta una associació negativa amb l'expressió de gens adipogènics com adiponectina (ADIPOQ), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) o la sintasa d'àcids grassos (FASN) a nivell de SAT. Alhora, l'expressió de TF, s'associa negativament amb la sensibilitat perifèrica a la insulina estudiada a través de CLAMP i amb l'expressió de gens implicats en la captació i el metabolisme de la glucosa com són el receptor de glucosa tipus 4 (Glut-4) i el receptor d'insulina tipus 1 (IRS-1) (*Moreno-Navarrete JM et al, 2014*). Un altre exemple seria el cas de gen de la ferroprotina (SLC40A1), el qual exerceix un paper fonamental en l'exportació de ferro des de l'interior de la cèl·lula i el qual s'ha associat, en aquest cas positivament, amb l'expressió de gens adipogènics i implicats en el metabolisme de la glucosa, i positivament amb factors inflamatoris com TNF- $\alpha$  (*Moreno-Navarrete JM et al, 2014*).

## **6.2. Objectiu 2: Aprofundir en l'estudi d'una selecció de 5 gens dels que més veuen modificada la seva expressió després de la cirurgia bariàtrica i la seva associació amb paràmetres clínics i amb l'expressió d'altres factors.**

Després de la validació del *microarray* per *RT-PCR*, es va procedir a fer una selecció de 5 dels gens que més modificaven la seva expressió (en una o altre direcció) després de la cirurgia bariàtrica, per tal d'aprofundir en el seu estudi.

Es va prioritzar en aquesta selecció, el grup dels 10 gens que més veien modificada la seva expressió a l'estudi a través de *microarray*, seleccionant els que presentaven una expressió quantificable en tots els casos.

### **6.2.1. Proteïna reguladora de senyal tipus 1 (RGS-1)**

RGS-1 es troba en la posició 10 dels gens que més veuen modificada la seva expressió en SAT després de la CB. En aquest cas, RGS-1 veu regulada la seva expressió negativament, assolint una expressió significativament menor també respecte el grup control.

A l'estudi longitudinal, l'expressió de RGS-1 es veu significativament disminuïda després de la CB ( $p = 0.014$ ). La caiguda en l'expressió de RGS-1 es correlaciona clarament amb la disminució de l'IMC ( $p < 0.001$ ) a més de correlacionar-se també amb les concentracions plasmàtiques de triglicèrids, en concordança amb els resultats d'estudis animals de *Schioth HB et al, 2006* i *Perusse L et al 2005*, on s'observa el paper de RGS-1 en el metabolisme lipídic.

A l'estudi transversal, RGS-1 no mostra associació amb l'IMC, però sí una associació positiva amb l'expressió de diferents factors proinflamatoris, entre ells TNF- $\alpha$  ( $r = 0.552$ ;  $p = 0.002$ ) en analogia amb els treballs de *Moratz C et al, 2000* i negativa amb l'expressió de factors antiinflamatoris, com és el cas del quocient entre marcadors de macròfags CD206/CD68 ( $r = -0.387$ ;  $p = 0.009$ ). La presència del marcador de macròfags CD206 s'associa a un teixit adipós sà, amb una capacitat d'expansió conservada, mentre que CD68 correspon a un marcador de macròfags que incrementa d'acord amb el grau d'obesitat i amb la disfunció del teixit adipós (*Moreno-Navarrete et al, 2013*). Present sobretot a la fracció estroma vascular, CD68 representa un bon reflex del grau d'infiltració de macròfags al teixit adipós. Com a marcador de macròfags i de teixit adipós inflammat i disfuncional, CD68 s'ha relacionat positivament amb la concentració de glucosa plasmàtica basal i negativament amb l'expressió de gens adipogènics (*Moreno-Navarrete et al, 2013*). L'associació negativa entre RGS-1 i aquest quocient, podria contribuir a

reflexar el canvi post-CB a un teixit adipós menys disfuncional. En aquest sentit, l'associació positiva amb gens adipogènics per excel·lència com ACC, indicaria una major capacitat d'expansió d'aquest teixit, juntament a amb una major sensibilitat a la insulina d'acord a l'associació positiva amb GLUT-4. Aquestes troballes són concordants amb els estudis en models animals de *Huang X et al, 2008* i de *Choi MS et al, 2015*.

El gen RGS1 (*Regulator of G protein signaling*), també conegut com *IR20/BL34/IER1/IR20/HEL-S-87*, es troba situat al braç llarg del cromosoma 1 (posició 1q31) i codifica per la proteïna del mateix nom de la família de proteïna-G reguladores de senyal. Aquesta proteïna està present al citosol, en una posició distal al nucli i més pròxima a la membrana citosòlica. La funció d'aquesta proteïna és l'atenuació de la senyal d'activació de proteïnes G a través de la seva unió als complexos d'activació GTPasa (*Bansal G et al, 2007*). Actua frenant les vies de senyal portades a terme a través de proteïnes G.

Actualment es coneixen més de 20 proteïnes reguladores de senyal (RGS). La funció d'aquestes proteïnes és la regulació negativa de proteïnes G. Totes les RGS comparteixen una seqüència de 120 aminoàcids capaç d'unir-se a la subunitat  $\alpha$  dels heterodímers que conformen les proteïnes G i accelerar la hidròlisi del grup GTP a GDP alliberant un grup fosfat. Actuen com un activador GTPasa, retornant a la proteïna G sobre la que han actuat a la forma inactiva (*Figura 44*).

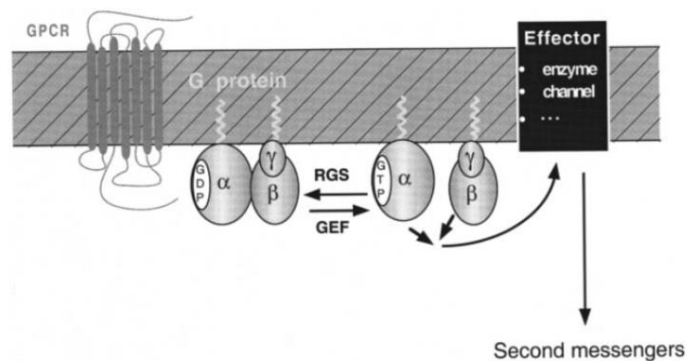


Figura 44: Esquema de l'actuació dels reguladors de proteïna G, promovent la hidròlisi d'un grup fosfat fet que dóna lloc a la separació de les subunitats  $\alpha$  i  $\beta$  amb la conseqüent inactivació del complex. **GDP**: Guanosina difosfat; **GEF**: Factor d'intercanvi de nucleòtids de guanina; **GPCR**: Receptor de membrana associat a proteïna-G; **GTP**: Guanosina trifosfat;

Font: De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar MG. *The regulator of G protein signaling family*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:235-71.



Seguidament, es discuteixen les associacions trobades amb obesitat i sistema immune en constant comparació amb la literatura existent.

### *RGS-1 i obesitat*

A dia d'avui, ha estat descrit el paper de més de 40 receptors acoblats a proteïnes G (GPCRs) en la regulació ponderal en models animals, així com en el metabolisme lipídic i de la glucosa (*Schioth HB et al, 2006 & Perusse L et al 2005*). S'han proposat diferents teories sobre el mecanisme pel qual té lloc aquest efecte: per la via de la melanocortina (*Adan RAH et al, 2006*), via receptors del neuropèptid Y (*Feletou M et al 2006*), via sistema endocannabioide (*Kirkham TC et al, 2006*), modulant l'activitat dels receptors de serotonina, adrenalina i histamina (*Kobori N et al, 2002*), via receptors nicotínics (*Tunaru S et al, 2003*), via control de la secreció d'hormones gastrointestinals com la Grelina o el GLP-1 (*Moratz C et al, 2000*) i via control del ritme circadià (*Huang X et al, 2008*).

Es disposa de molt poca informació que relacioni RGS-1 amb obesitat o amb la pèrdua de pes. Dues publicacions recents (*Dankel SN et al, 2010 i Kong LC et al, 2013*), valoren el canvi en l'expressió d'RGS-1 en els seus treballs d'expressió gènica en SAT post-CB. Aquests dos estudis, realitzats a través de microarray, observen una caiguda estadísticament significativa en l'expressió d'aquest factor (es pot observar el canvi d'expressió d'RGS-1 a les taules suplementàries on es detalla tota la informació del *microarray*). Malgrat cap dels dos treballs s'estengui en desenvolupar i discutir el canvi d'aquest factor, les seves troballes són plenament concordants amb els resultats del present treball.

En models animals, recentment s'ha descrit un increment en l'expressió de RGS-1 a nivell de SAT en ratolins alimentats amb dieta d'alt contingut en greix (*high fat diet, HFD*) (*Choi MS et al, 2015*). En el seu treball, *Choi MS et al* observen un increment ponderal en el grup de ratolins sotmesos a HFD respecte als alimentats amb dieta pobre en greix malgrat un idèntic aport calòric total. Mitjançant estudis de calorimetria indirecta, observen una disminució de la despesa energètica en el grup de ratolins sotmès a HFD, atribuint-se a aquest fet l'explicació de l'increment ponderal. Després de ser sotmesos durant 16 setmanes a HFD, aquest grup mostra un increment en l'expressió de RGS-1 ( $p < 0.0001$ ) així com una disminució en l'expressió de gens implicats en el metabolisme mitocondrial i un increment en l'expressió de gens pro-inflamatoris. En aquest treball, RGS-1 mostra una associació inversa amb la despesa energètica de manera concordant amb publicacions prèvies (*Huang X et al, 2008*) i encapçala el seu estudi al tractar-se del gen que més veu modificada la seva expressió després de la HFD en aquesta cohort murina.

*RGS-1 i immunitat*

El teixit adipós, òrgan amb un elevat contingut de macròfags, és capaç de generar una important resposta inflamatòria. Malgrat aculli diversos tipus cel·lulars implicats en la immunitat (innata i adaptativa), els macròfags representen el component majoritari (40-60%) i són els principals responsables de la producció de citoquines per part del teixit adipós. En condicions fisiològiques normals, els macròfags infiltrats al teixit adipós presenten una doble capacitat de resposta als estímuls: la via clàssica *-pro inflamatòria, M1-* o la via alternativa *-antiinflamatòria, M2-*. En situació d'obesitat, el teixit adipós hipertrofiat i disfuncional fa que l'activació dels macròfags tingui lloc per la via clàssica en detriment de la via alternativa. Aquests macròfags són capaços d'atrapar les cèl·lules progenitores del teixit adipós (s'observa una caiguda en l'expressió de gens adipogènics), afavorint així la hipertròfia dels adipòcits madurs, que esdevenen fibròtics i contribueixen a amplificar la inflamació crònica associada a obesitat (increment en l'expressió de factors pro-inflamatoris), un *bucle* difícil de trencar.

El teixit adipós, a banda de macròfags, acull un ampli ventall de cèl·lules implicades en el sistema immune, amb acció pro inflamatòria (Neutròfils, cèl·lules dendrítiques, macròfags M1, mastòcits i limfòcits Th1 i B) i amb acció antiinflamatòria (limfòcits T reguladors, TH2, macròfags M2 i eosinòfils). El nombre d'aquestes cèl·lules es veu severament incrementat amb la progressió a obesitat.

Respecte al paper d'RGS-1 en la immunitat innata i adaptativa, s'ha descrit la presència de receptors RGS1 a nivell del compartiment hematopoietic en *models animals (Moratz C et al, 2004)*, principalment a nivell de limfòcits B, on s'ha descrit el paper d'aquesta proteïna en la migració dels limfòcits. Ben ratolí *Rgs1 knockout (Moratz C et al, 2004)*. Estudis *in vitro* han pogut descriure diferents moduladors de l'expressió d'RGS1 a nivell de limfòcits B; així, s'ha observat com TNF- $\alpha$  representa un potent inductor de la seva expressió mentre Anti-CD40 (inhibidor de la coestimulació de LB) actua disminuint-la (*Moratz C et al, 2000*). Estudis en humans, han demostrat la presència de RGS-1 a la membrana de monòcits (*Denecke B et al 1999*) suggerint un paper d'aquesta proteïna en la inactivació de la resposta quimiotàctica dels monòcits (*Denecke B et al 1999*).

Un dels gens que mostra una associació positiva amb RGS-1 és ITGAX, conegut marcador de cèl·lules dendrítiques/macròfags (*Zhu XJ et al, 2012*), membres de la família de cèl·lules presentadores d'antigen. Es podria especular una concordança entre aquesta associació i l'estudi de *Moratz et al 2004* on es descriu RGS-1 com a factor implicat en la migració de

limfòcits B, atenent a que les cèl·lules dendrítiques actuen com a cèl·lules presentadores d'antigen a Limfòcits B.

La caiguda d'RGS1 després de la pèrdua de pes podria ser un altre reflex de la milloria de la situació d'inflamació crònica de baix grau associada a obesitat, contribuint a reflectir la disminució de la infiltració de cèl·lules del sistema immunitari al teixit adipós que té lloc després de la CB.

RGS-1 mostra una associació positiva amb IL-10 de manera concordant amb les associacions positives observades entre RGS-1 i citocines pro-inflamatòries (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL21R, IRF-4, etc). IL-10 és una citocina amb important activitat immunomoduladora, capaç d'inhibir la síntesi de citocines per part de les cèl·lules presentadores d'antigen i d'actuar directament a nivell de la proliferació i diferenciació de les cèl·lules T (Th1 i Th2). El fet que RGS-1, marcador de cèl·lules presentadores d'antigen, s'associï positivament amb IL-10 podria contribuir a reflectir la restauració de la resposta immunitària que té lloc després de la pèrdua de pes. Treballs previs han descrit ja una associació positiva entre IMC i concentració de IL-10 circulant en plasma (*Bassols J et al, 2010*), malgrat no es coneix encara el mecanisme pel qual té lloc aquesta associació, s'ha proposat la inflamació crònica de baix grau associada a obesitat com una de les causes més plausibles (*Bassols J et al, 2010*).

*RGS-1 i teixit adipós beige*

L'expressió d'RGS-1 en SAT s'associa negativament amb l'expressió del marcador de teixit adipós beige TMEM26 i amb el gen mitocondrial mtCO3.

Coneguda la presència de teixit adipós marró en la persona adulta, de manera inversament proporcional al IMC (*Cypess AM et al, 2009*) i conegut l'increment de teixit adipós marró després de la pèrdua de pes (*Vijgen GH et al, 2012*). L'expressió de RGS-1, podria correlacionar-se amb la distribució dels compartiments lipídics, especialment amb el teixit adipós beige.

Dins del teixit adipós marró, es poden diferenciar 2 tipus cel·lulars diferents, originats també a través de progenitors cel·lulars diferents: el *teixit adipós intercapsular* (iBAT), derivat de les cèl·lules pluripotencials del dermomioma, i el teixit adipós marró intercalat, també anomenat *teixit adipós beige*, originat a partir de cèl·lules progenitores presents a la fracció estroma-vascular del teixit adipós blanc.

S'ha descrit recentment el paper de les *proteïnes G* en el procés de diferenciació del teixit adipós blanc a marró en models animals (*Wang J et al, 2012*). *Wang et al* descriuen en el seu treball com ratolins portadors d'una mutació a nivell del receptor tipus 4 de proteïna G que condiciona una menor expressió d'aquesta proteïna (*Lgr4<sup>m/m</sup>*) mostren una major diferenciació a teixit adipós marró, amb el conseqüent increment en la despesa energètica i una resistència a obesitat, en comparació amb el model *wild-type*. En el present treball, s'observa una associació negativa entre RGS-1, gen implicat en l'atenuació de la senyal d'activació de proteïnes G i TMEM26, marcador de teixit adipós beige. Aquesta associació, és també concordant amb la correlació negativa entre RGS-1 i mtCO3 ja que la diferenciació a teixit adipós marró implica una major activitat mitocondrial. Es podria especular si aquestes associacions podrien representar un altre mecanisme a través del qual RGS-1 s'associaria a la despesa energètica basal, també en humans.

D'acord amb les troballes reportades en el present treball i la literatura existent, es podria proposar RGS-1 com a nou marcador d'infiltració de macròfags al teixit adipós subcutani.

La caiguda de RGS-1 després de la CB, contribuiria a reflexar la restauració de la resposta immune, la disminució de la inflamació crònica, la milloria de la resistència a la insulina i la redistribució dels compartiments de greix corporals, que tenen lloc després de la pèrdua de pes associada a obesitat.

### 6.2.2. Lysozyme (LYZ)

En el present treball, LYZ és un dels 10 gens que més veu reduïda la seva expressió després de la pèrdua de pes promoguda per la CB ( $p < 0.0001$ ). La seva expressió en SAT després de CB cau fins igualar-se a la del grup control.

A l'estudi longitudinal, l'expressió de LYZ mostra una associació significativament positiva amb l'IMC i amb la concentració de triglicèrids circulants en plasma.

A l'estudi transversal, l'expressió de LYZ s'associa a paràmetres metabòlics de resistència a al insulina (HOMA-IR) i a un perfil lipídic desfavorable, mostrant una associació positiva amb la concentració de triglicèrids circulants en plasma i negativa amb la concentració d'HDL.

A nivell d'expressió gènica, LYZ mostra una correlació positiva amb l'expressió d'una ampla varietat de factors clàssicament vinculats a inflamació com són CB2, ITGAX, CLEC7, KIT, TNF- $\alpha$ , TNFRSR9 o SPP1, i amb l'expressió de factors vinculats amb el metabolisme del ferro (Hepcidina, FLVRI i 2). Igual que en el cas de RGS-1, LYZ mostra una correlació positiva amb IL-10 i amb el gen adipògènica per excel·lència, ACC.

Paral·lelament, l'expressió de LYZ s'associa negativament amb l'expressió de GLUT-4 i IRS-1, gens implicats en el metabolisme de la glucosa i directament vinculats amb la sensibilitat a la insulina. LYZ mostra també una associació negativa amb l'expressió del marcador de teixit adipós beige TMEM26 i amb el gen mitocondrial CO3.

#### *Lyz i inflamació*

Fa més de 80 anys, *A Fleming* va postular en una conferència: "*I choose lysozyme as the subject for this address for two reasons: firstly, because I have a fatherly interest in the name and, secondly, because its importance in connection with natural immunity does not seem to be generally appreciated*". Actualment, disposem d'escasses publicacions que relacionin LYZ amb sobrepès/obesitat i que determinin l'expressió de LYZ a nivell del teixit adipós.

Des del descobriment d'aquest enzim (*A Fleming et al, 1922*), s'ha anat descrivint la seva presència en una ampla varietat d'òrgans i teixits - melsa, ronyó, pulmó, tracte gastrointestinal- i fluids -plasma, saliva, llàgrimes i llet materna- en humans (*Yazaki et al., 2003*).

La sobrepressió de LYZ ha estat descrita per diferents autors en relació amb patologies que impliquen una situació d'inflamació crònica. És el cas de patologies digestives com malaltia de Crohn, colitis ulcerosa, celiàquia, colitis colagenosa o limfocítica (*Rubio CA et al, 2014*) on s'ha descrit una sobre expressió de LYZ a nivell de la mucosa gastrointestinal, i en el cas de malalties sistèmiques com la sarcoïdosi o l'artritis reumatoïde on s'ha descrit un increment en la concentració de proteïna circulant.

Més recentment, s'ha descrit també una expressió incrementada de LYZ en situacions d'inflamació aguda com en els politraumatismes (*Klüter T et al, 2014*). En aquestes situacions, s'ha vist com els neutròfils, que entren en escena passats 10 minuts des del traumatisme i que s'acompanyen de l'activació de monòcits, impliquen un increment de l'expressió de LYZ i de l'alliberació d'aquest pèptid emmagatzemat a nivell dels grànuls dels neutròfils. Aquest increment de LYZ, s'observa especialment en situacions de fractures obertes on el contacte amb bacteries, principalment gram positives, podria promoure la seva alliberació (*Klüter T et al, 2014*).

S'ha publicat també un increment de la concentració plasmàtica de LYZ circulant en nens obesos respecte a no obesos (*Zemliakova ZM et al, 1979*) i una associació positiva entre els nivells circulants de LYZ i el perímetre de circumferència abdominal en dones adultes afectes de síndrome d'apnea del son (*Svensson M et al, 2012*).

A nivell del teixit adipós, s'ha descrit un increment de la concentració de la proteïna LYZ en pacients afectes de necrosis grassa pseudomembranosa. En biòpsies de SAT d'aquests pacients, es va observar un increment dels nivells de LYZ, en paral·lel a un increment també de la infiltració de macròfags en el teixit adipós i del marcador histiocitari CD68. Respecte a expressió gènica de LYZ a nivell de SAT, es disposa de la informació pública de dos estudis d'expressió gènica en SAT estudiada a través de microarray (*Dankel SN, 2010 & Kong LC, 2013*), on es detecta l'expressió d'aquest gen abans i després de la pèrdua de pes promoguda per la CB, sense observar un canvi significatiu en la seva expressió. La manca de canvi en l'expressió de LYZ en SAT observada per *Dankel et al* i *Kong LC et al* en comparació amb els resultats del present treball, podrien ser atribuïbles al baix nombre de subjectes estudiats en els 2 treballs (N = 9 en ambdues publicacions).

Les associacions trobades amb l'expressió de LYZ a nivell de SAT coincideixen amb les troballes prèvies que correlacionen LYZ amb estats pro-inflamatoris crònics com és el cas de l'artritis reumatoïde o la malaltia de Crohn (*Rubio CA et al, 2014*). En el present treball, però, LYZ es correlaciona amb una altre situació pro-inflamatòria crònica com és l'associada a obesitat.

La caiguda de LYZ post-CB podria reflexar la milloria de la inflamació crònica associada a obesitat i amb ella la milloria en la fisiologia de l'adipòcit i de la sensibilitat a la insulina.

Mitjançant l'estudi d'expressió gènica en mostres de SAT a l'inici i a al final de la CB(2 hores), s'exclou un increment en l'expressió de LYZ en resposta a l'estrès agut de la cirurgia, a diferència de l'increment que si que s'observa per IL-6 i IL-8. La manca d'un increment significatiu en l'expressió de LYZ podria explicar-se per la situació de d'asèpsia pròpia de l'acte quirúrgic.

La sobrepressió de LYZ a nivell de l'epiteli gastrointestinal de pacients afectes de malalties inflamatòries com el Crohn o la colitis ulcerosa, representa un mecanisme de defensa i de protecció individual a la situació d'inflamació crònica d'aquests pacients a nivell local (**Rubio CA, 2014**). Coneguda una major translocació bacteriana en aquests pacients (**O'Brien et al, 2014**), no sorprèn la major producció d'un enzim bactericida com és LYZ (**A Fleming et al, 1922**) en analogia amb la resposta de teixits interns de l'organisme al contacte amb bacteries descrit en fractures obertes (**Klüter T et al, 2014**).

En el pacient obès, s'ha descrit una disbiosi molt semblant a la observada en el pacient amb malaltia inflamatòria intestinal(**Le Chatelier E, 2013**). Ambdós pacients, mostren moltes similituds en la composició de la flora, malgrat les evidents diferències clíniques. S'ha descrit la presència de DNA bacterià circulant en plasma en un 30% dels subjectes afectes d'obesitat mòrbida (**Ortiz S et al, 2014**). En situació de sobrepès/obesitat, existeix una major presència de bacteries gramnegatives productores d'endotoxines com és el cas de LPS, capaces de travessar la barrera gastrointestinal contribuint a la generació d'un estat pro-inflamatori i d'insulinore resistència i de desencadenar la cascada immunològica (**Cani PD et al, 2007**). Aquesta endotoxèmia associada a obesitat dóna lloc a un increment en l'expressió de citocines pro-inflamatòries com són IL-1, IL,6, TNF- $\alpha$  o factor activador del plasminogen a nivell hepàtic, del múscul i del teixit adipós.

La caiguda de l'expressió de LYZ, podria reflexar una menor translocació bacteriana en relació a la pèrdua de pes, i potser també en relació a la disminució de la superfície a través de la qual pot tenir lloc aquesta translocació. Malgrat la distància existent entre SAT i l'epiteli gastrointestinal, el pas de les endotoxines a nivell sistèmic via torrent circulatori, pot justificar unes repercussions a nivell de tots els òrgans i teixits, pròxims i distals al tracte gastrointestinal.

Una publicació recent ha estudiat la translocació bacteriana en pacients obesos i els canvis en aquesta promoguts per la cirurgia bariàtrica (*Ortiz S et al, 2014*). S'ha observat en aquets treball com en un 30% dels pacients obesos mòrbids es pot detectar DNA bacterià circulant, i com aquesta xifra disminueix fins a un 5% als 6 i 12 mesos de la cirurgia bariàtrica. S'observa també com el canvi a nivell de translocació bacteriana és el factor clau que explica la milloria a nivell de la resistència ala insulina i la disminució de la producció de citoquines pro-inflamatòries. L'expressió de LYZ podria ser un marcador indirecte d'aquesta translocació bacteriana i de les seves repercussions a nivell sistèmic.



### 6.2.3. Solute carrier family 27 A2 (SCL27A2)

El gen SCL27A2 ocupa la primera posició entre els gens que més veuen incrementada la seva expressió a nivell de SAT després de la pèrdua de pes promoguda per la CB. En aquesta cohort de pacients, l'expressió de SCL27A2 en SAT abans de la CB no difereix respecte a la del grup control.

A l'estudi longitudinal, s'observa una associació negativa de SCL27A2 amb l'IMC i positiva amb la sensibilitat a la insulina determinada a través de CLAMP.

A l'estudi transversal, SCL27A2 mostra una correlació negativa amb l'IMC i positiva amb la sensibilitat a la insulina calculada a través de HOMA. A nivell d'expressió gènica, SCL27A2 mostra una associació positiva amb l'expressió de diferents gens lipogènics com són FASN i BRCA1, gens implicats en la sensibilitat a la insulina (CDK5 i IRS1), i marcadors de teixit adipós marró com són RBL-1 i TMEM26. Paral·lelament, SCL27A2 s'associa negativament amb gens pro-inflamatoris (IL-33, Leptina i SPP1).

Mitjançant l'estudi d'expressió gènica en mostres de SAT a l'inici i a al final de la CB (2 hores), s'exclou un canvi en l'expressió de SCL27A2 en resposta a l'estrès de la cirurgia que pogués justificar les diferències observades en els 2 punts de tall.

#### *SLC27A2 i àcids grassos de cadena llarga*

El gen SLC27A2, (també conegut com *VLCS/ FATP2/ VLACS/ ACSVLI/ FACVLI/ hFACVLI/ HsTI7226*) es troba situat al braç llarg del cromosoma 15 (posició 15q21.2) i representa un dels 6 membres de la família de proteïnes implicades en el transport i metabolisme d'àcids grassos de cadena llarga (LCFA). SLC27A2 codifica per 2 proteïnes diferents FATP2a i FATP2b. Mentre les 2 variants intervenen en el transport de LCFA, només FATP2b presenta activitat acetil-coA-sintetasa amb especial predilecció per LCFA de cadena molt llarga (VLCFA) (*Melton et al. , 2011*).

L'expressió de transportadors d'LCFA s'ha descrit en una ampla varietat d'òrgans i teixits, principalment a nivell del tracte gastrointestinal, gònades, sistema nerviós central, pell, i també teixit adipós. L'expressió del membre de la subfamília, SCL27A2, ha estat descrita a nivell d'òrgans com el fetge i el ronyó (*Schaffer JE, 1994; Schmuth M, 2005; Krammer J et al, 2011*) o la placenta (*Krammer et al, 2011; Mishima et al, 2011*).

El transport i metabolisme dels LCFA és bàsic per una àmplia varietat de processos cel·lulars entre els que s'inclou la síntesi de membrana, vies de transducció de senyal intracel·lulars, metabolisme energètic, modificacions post-translacionals i regulació de la transcripció d'alguns gens (*Anderson CM et al, 2013*). Algunes de les patologies associades a obesitat són degudes a un fluxe anormal de LCFA a òrgans com el cor, fetge o múscul, on l'acumulació aberrant de lípids condueix a una situació d'insulinorresistència i de mort cel·lular.

En models animals, s'ha vist com una expressió disminuïda de SLC27A2 dona lloc, a nivell hepàtic, a una menor oxidació dels VLCFA (àcids grassos de cadena molt llarga) sense observar-se canvis en l'activitat acetil-coA-sintetasa (*Falcon et al., 2010*). Paradoxalment, s'ha descrit també com una traducció disminuïda de FATP2 en ratolins, és capaç de revertir l'esteatosi hepàtica provocada per modificacions dietètiques i millorar la sensibilitat a la insulina (*Falcon et al., 2010*).

L'augment en l'expressió d'aquest transportador d'AG podria reflexar una situació més favorable a l'expansió del teixit adipós, disminuint així el dipòsit anòmal de greix en òrgans diana per l'esteatosi com són el fetge, el pàncrees i el múscul. Aquest canvi podria explicar l'associació negativa entre SLC27A2 i la concentració de triglicèrids circulants i l'associació positiva amb la sensibilitat a la insulina determinada per CLAMP. També seria concordant a nivell d'expressió gènica l'associació positiva amb els gens lipogènics, gens implicats en el metabolisme del teixit adipós beige i gens relacionats amb la sensibilitat a la insulina

Amb els resultats dels que disposem en el present treball, no es pot conèixer si aquest increment en la seva expressió s'acompanya o no d'un increment en la traducció de les 2 proteïnes per les que codifica - FATP2a i FATP2b- o per només una d'elles.

El fet que una disminució de FATP2a en ratolins s'associï a una millora de l'esteatosi hepàtica i de la sensibilitat a la insulina, 2 fets que s'observen també després de la pèrdua de pes, podria fer especular amb què fos FATP2a i no FATP2b qui incrementés la seva expressió, si bé resultats en models animals poden perfectament no ser extrapolables al model humà o dependre, en aquest darrer, de moltes variables impossibles de controlar.

L'increment de FATP2, podria facilitar la captació de d'àcids grassos circulants per part del teixit adipós, disminuït de manera indirecta la captació de LCFA per part d'òrgans susceptibles a l'esteatosi.

### *SLC27A2 i àcids biliars*

A més del paper en la homeòstasi lipídica, FATP2 sembla poder estar implicada en la síntesi d'àcids biliars. Estudis *in vitro* suggereixen que FATP2 pot estar implicada en la síntesi *de novo* d'àcids biliars (no en el reciclatge o reactivació), malgrat no s'hagi encara demostrat *in vivo* (*Mihalik et al., 2002*).

El paper dels àcids biliars en la milloria de la sensibilitat a la insulina ha aparegut recentment a la literatura a través del receptor nuclear FXR (*Farnesoid X receptor*) (*Ding L et al, 2014*). Aquesta proteïna apunta a ser una de les vies capaç de contribuir a explicar la milloria de la sensibilitat a la insulina que té lloc després de la cirurgia bariàtrica (*Zarrinpar A&Loomba R, 2014*). Els canvis en l'anatomia digestiva derivats de la cirurgia bariàtrica podrien incrementar l'expressió de FXR, disminuint la reabsorció d'àcids biliars i millorant així el perfil lípids i el metabolisme de la glucosa (*Zarrinpar A&Loomba R, 2014*) de confirmar-se el paper de SLC27A en la síntesi d'àcids biliars *in vivo*, aquest podria ser un altre via de regulació de FXR.

#### 6.2.4. Olfactomedina-2 (OLFM2)

OLFM2 és un dels gens que més veu modificada la seva expressió després de la CB. L'expressió d'OLFM2 passa, d'expressar-se menys al grup de pacients obesos en relació al grup control, a sobre expressar-se després de la CB assolint nivells d'expressió superiors al grup control.

A l'estudi longitudinal, s'observa una associació positiva entre el percentatge de canvi d'IMC i el percentatge de canvi d'OLFM2.

A l'estudi transversal, no es veu una associació significativa entre OLFM2 i IMC, però sí una associació negativa entre OLFM2 i edat; Aquesta associació negativa es manté separant per sexes però no separant en funció d'obesitat, mantenint-se únicament en el grup de pacients obesos. També s'observa una associació negativa amb la resistència a la insulina determinada per HOMA.

Respecte a les associacions observades amb l'expressió d'altres gens, OLFM2 va mostrar una associació positiva amb els gens lipogènics SFRP1 i FSP27 i amb gens implicats en la sensibilitat a la insulina com són GLUT-4 i INSIG-1, de manera concordant amb les associacions trobades amb HOMA-IR. Es va observar associacions, en aquest cas negatives, entre OLFM-2 i gens pro-inflamatoris (CD14, CB2, TLR2) i implicats en el metabolisme del ferro com és Ferroprotina-1.

El gen Olfactomedina-2 (OLFM2), també conegut com *NOE2*, *OlfC*, *NOELIN2* o *NOELIN2-V1*, es troba situat al braç curt del cromosoma 19 (posició 19p13.2) i codifica per la proteïna del mateix nom. OLFM-2 representa un dels 6 membres de la família de proteïnes categoritzades fins ara (*Zeng LC et al, 2005*). El nom d'Olfactomedina ve donat per tractar-se d'una proteïna detectada per primera vegada a nivell de l'epiteli olfatori de *Rana castebiana* (*Snyder DA et al, 1991*). Malgrat ser considerada inicialment una proteïna exclusiva de l'epiteli olfatori, estudis posteriors en models murins van detectar aquesta proteïna àmpliament distribuïda a nivell del cervell i la medul·la adrenal (*Danielson PE et al, 1994*).

Estudis en animals han demostrat una expressió molt important d'OLFM-2 durant el desenvolupament del sistema nerviós central i de les estructures derivades de la cresta neural (*Lee JA et al, 2008*), detectant-se una expressió incrementada de OLFM2 a nivell del bulb olfatori, còrtex piriforme i motor, nucli pontí i àrees primàries visuals i olfatives (*Nakaya et al, 2013 & Thiebaud N et al, 2014*). En ratolins, s'ha observat un pic en l'expressió d'OLFM2 durant el desenvolupament de les cèl·lules ganglionars de la retina (*Sultana A et al, 2011*) i una caiguda

de la seva expressió a partir del 6è dia de vida, mostrant una expressió molt escassa en el cervell dels ratolins adults. S'ha publicat recentment com ratolins *Olfm2-KO* mostren una menor activitat motora i exploradora, relacionada amb una funció olfactiva deteriorada, i una major ansietat (*Sultana A et al, 2011*).

OLFM2, juntament amb altres membres d'aquesta subfamília de proteïnes (OLFM1, OLFM3 i OLFM4) amb qui formen heterodímers, tindrien un paper clau en el desenvolupament retinià i del bulb olfactiv en humans, si bé el rol exacte de cada una d'elles no ha estat encara dilucidat (*Sultana A et al, 2011*).

S'ha descrit un major risc de glaucoma d'angle obert en població japonesa portadora de la mutació Arg144Gln del gen OLFM2 (*Funayama T et al, 2006*), si bé és amb OLFM-3 amb qui s'ha descrit una major relació amb aquest tipus de glaucoma (*Torrado et al, 2002*), així com amb edats de debut més precoces en pacients portadors d'algunes mutacions a nivell del gen OLFM3 (*Sarfarazi M et al, 1997 & Adam MF et al, 1997*).

Diversos estudis publicats fins ara mostren una associació entre obesitat i increment de la pressió intraocular, principal factor de risc per al desencadenament del glaucoma d'angle obert (*Klein BE, 1992; Jaen J, 2001*). S'ha demostrat com persones amb un BMI > 30 presenten unes xifres de pressió intraocular més elevades respecte al pacient no obès, independentment del sexe i la edat (*Jaen J, 2001*). Publicacions recents apunten a 2 teories complementaries per explicar l'associació entre obesitat i glaucoma d'angle obert, la teoria "mecànica" i la teoria "vascular". La teoria mecànica, apunta al paper del teixit adipós intraocular, incrementat en el pacient obès (*Halpen DL et al, 2002*). La teoria "vascular" apunta a la perfusió ocular subòptima associada a obesitat, derivada de la disfunció endotelial i la disautonomia associades a obesitat (*D'Amico DJ et al, 2003*).

Amb el coneixement del teixit adipós del que es disposa actualment, es podria pensar en un paper mecànic, però també metabòlic d'aquest teixit. Es podria pensar en un teixit adipós intracoanal disfuncional, i hipotetitzar en una possible associació entre expressió d'OLFM2 per part del teixit adipós intracoanal i el risc de glaucoma d'angle obert, si bé això són especulacions que caldria testar clínicament.

En humans, s'ha detectat l'expressió d'OLFM2 en altres òrgans i teixits com el pàncrees i la pròstata (*Kulkarni N et al, 2009*), fetge, gònades, sistema nerviós central, pell i teixit adipós (<http://www.proteinatlas.org>). S'ha publicat també uns patrons d'expressió d'OLFM2 i OLFM1 molt semblants (*Nakaya et al, 2013*).

Malgrat haver-se detectat l'expressió en teixit adipós, no es disposa a dia d'avui de cap publicació que abordi el possible paper d'OLFM2 en aquest teixit. Tampoc es coneix quin és el paper que juga aquesta proteïna en teixits no derivats de la cresta neural.

L'increment en l'expressió d'OLFM2 després de la pèrdua de pes promoguda per la CB s'acompanya del canvi, també significatiu, d'un altre membre d'aquesta subfamília, OLFM-4. En aquest cas, però, l'expressió d'OLFM4 disminueix després de la CB.

A dia d'avui, es disposa de nombroses publicacions on es relaciona la proteïna OLFM4 amb diverses neoplàsies sòlides com és el càncer gàstric (*Oue N et al, 2009; Luo Z et al, 2011; Yu L et al, 2011; Liu W et al, 2012*), pancreàtic (*Kobayashi D et al, 2007; Chen L et al., 2011*), colorectal(*Oue N et al, 2009; Grover PK et al, 2010; Yu L et al., 2011*) o de cèrvix (*Yu L et al., 2011*). A aquesta proteïna se li ha atribuït un efecte anti-apoptòtic(*Liu W et al, 201 & Yu L et al, 2011*) i s'ha associat directament amb una altre proteïna amb acció antiapoptòtica com és GRIM-19(*retinoid-interferon-induced-mortality-19*)(*Zhang X, 2004 & Moreira S et al, 2011*).

També s'ha descrit una expressió incrementada d'OLFM-4 en biòpsies gàstriques de pacients portadors d'*helicobacter pylori* i en biòpsies intestinals de pacients amb malaltia inflamatòria intestinal(*Liu W et al, 2004*).

A l'estudi inici-final de la CB, es descarta un canvi en l'expressió d'OLFM-2 en SAT motivat per l'estrès de la cirurgia.

### 6.2.5. Plakophilina-2 (PKP2)

L'expressió d'aquest gen en SAT es troba disminuïda a la cohort de pacients obesos i s'eleva després de la pèrdua de pes promoguda per la CB assolint nivells d'expressió equiparables als del grup control.

A l'estudi longitudinal, l'increment en de l'expressió de PKP2 es correlaciona positivament amb el percentatge de l'excés de pes perdut.

A l'estudi transversal, PKP2 s'associa negativament amb l'IMC i amb la concentració plasmàtica de triglicèrids. A nivell d'expressió gènica, PKP2 mostra una associació negativa amb l'expressió de gens proinflamatoris com és el marcador de macròfags CD14, CB2, IL-8 o TLR2 i positiva amb l'expressió del gen antiinflamatori TIMP3, d'INSIG-1 i amb la sintasa d'àcids grassos FASN. També s'observa una forta associació positiva entre PKP2 i l'expressió de deiodinases 1 i 2.

El gen Plakophilin 2 (PKP2), també conegut com *ARVD9*, es troba situat al braç curt del cromosoma 12 (*posició 12p11*) i codifica per la proteïna del mateix nom, present a nivell dels desmosomes i del nucli cel·lular, encarregada de regular l'activitat beta-catenina. Es tracta d'una proteïna implicada en els complexos d'unió cel·lular, essent un dels components de la cadena de proteïnes que uneixen E-Cadherina amb el citoesquelet d'actina. Alhora, està implicada també en la via de senyalització Wnt, via implicada en la activació i inactivació de diferents oncògens i gens supressors de tumors.

Es coneixen 3 membres d'aquesta família de proteïnes d'unió, PKP 1-3. Les PKP són proteïnes constituents dels desmosomes, orgànuls imprescindibles per l'estabilitat dels teixits. S'ha descrit la presència d'aquestes proteïnes principalment a nivell de miocardi i epidermis, teixits on la funció dels desmosomes és particularment important atenent a l'important estrès mecànic al que estan constantment sotmesos.

A nivell de l'epidermis, s'ha descrit l'expressió de les 3 proteïnes, essent més important l'expressió de PKP2 a la capa de cèl·lules basals (*Hatzfeld M et al, 2007 & Bass-Zubek AE et al, 2009*). S'ha relacionat mutacions a nivell de PKP1 amb la displàsia ectodèrmica en humans i mutacions de PKP3 amb alteracions a nivell dels fol·licles pilosos en ratolins (*Sklyarova T et al, 2008; McGrath JA et al, 2010*). A dia d'avui, no s'han descrit mutacions de PKP2 en relació a cap patologia cutània.

A nivell de miocardi, s'ha descrit el paper de PKP2 més enllà de la seva funció estructural, reportant-se una major prevalença de mutacions a nivell de PKP2 en pacients amb elevat risc arritmogènic i de mort sobtada, com són pacients amb miocardiopatia hipertròfica ventricular dreta (*Rasmussen TB et al, 2014*) i pacients afectes de síndrome de Brugada (*Cerrone M et al, 2014*). El mecanisme pel qual mutacions a nivell de les proteïnes d'unió intercel·lulars poden afectar l'activitat elèctrica del miocardi no ha estat encara dilucidat.

Fins al coneixement actual, no es disposa de treballs on s'hagi estudiat l'expressió de PKP2 a nivell del teixit adipós. El present treball semblaria ser el primer en explorar l'expressió d'aquest gen en el teixit adipós i intentar interpretar a què es degut el canvi en la seva expressió després de la CB.

Recentment, *Kazlauskas A et al, 2014 & Aritomito KI et al, 2014* descriuen el paper de PKP2 com a promotor de l'activació del receptor de creixement epidermoide (EGFR) a través de la fosforilació d'aquest. El factor de creixement epidermoide, s'ha relacionat amb el desenvolupament i la disseminació a distància de diverses neoplàsies sòlides com són el càncer de mama, de pròstata, de pulmó o tiroïdal. El descobriment de la relació entre PKP2 i EGFR ha obert la porta a poder especular sobre un nou target terapèutic per certs tipus de tumors, a través de la possibilitat d'antagonitzar PKP2.

Encara més recentment, *Wolf A et al, 2014* recullen els seu treball experimental in vitro amb cèl·lules de ratolí, com els nivells d'insulina en el medi es correlacionarien amb els nivells de Plakophilin 1 citoplasmàtics. Aquesta correlació s'observaria únicament en models de ratolins amb Akt2 conservada, de manera que la insulina promouria la translocació de PKP1 via fosforilació per Akt.

### *PKP2 i Fibrosis*

El perquè incrementa l'expressió d'un gen implicat en l'adhesió intercel·lular a nivell de SAT fa especular en una possible funció física, estructural, del teixit adipós.

És conegut com la fibrosis a nivell del teixit adipós incrementa la rigidesa d'aquest i redueix la seva capacitat d'expansió, fets que contribueixen a la disfunció metabòlica del teixit i afavoreixen el dipòsit ectòpic de greix en òrgans com el múscul, el cor o el fetge. S'ha descrit com la composició relativa de la matriu extracel·lular del teixit adipós, principalment a nivell de les ratios de les diferents subunitats de col·lagen, contribueixen a les propietats mecàniques de



tracció, resistència i elasticitat d'aquest teixit. Existeix controvèrsia en el paper del col·lagen en la fibrosi del teixit adipós. Si bé estudis inicials en models animals i humans, avalaven el dipòsit de col·lagen com a desencadenant d'aquesta fibrosi (*Alkhouli N et al, 2013*), publicacions més recents atribueixen propietats beneficioses a un tipus de col·lagen, Col6A3 (*Khant T et al, 2009 and McCulloch LJ et al, 2015*). S'ha descrit en humans com Col6A3 s'expressa de manera important en SAT i com incrementa la seva expressió després de la pèrdua de pes (*McCulloch LJ et al, 2015*), estudis in vitro observen també com l'expressió de Col6A3 es veu inhibida per Leptina, hormona amb acció pro-fibròtica (*McCulloch LJ et al, 2015*).

L'increment en l'expressió de PKP2 després de la CB, en paral·lel a l'increment en l'expressió de Col6A6 i la corroboració d'aquesta associació positiva a l'estudi transversal observada en aquest treball, suggereix PKP2 com un possible marcador de fibrosi a nivell de SAT, si bé faria falta estudis més amplis i dirigits per testar aquesta hipòtesi.

### **6.3. Estudi del canvi en l'expressió de SAT de RGS-1, OLFM2, PKP2, LYZ i SLC27A2, promogut per l'acte quirúrgic:**

Les mostres obtingudes durant la CB van ser extretes després de la inducció anestèsica i de la col·locació dels 3 trocars per la laparoscòpia; Aquest procés representa un estrès diferent a l'experimentat en el segon punt de tall (transcorreguts 18 mesos des de la CB) on la mostra va ser extreta després de la instil·lació d'un anestèsic local i de la realització d'una petita incisió periumbilical, no superior als 3cm.

Per tal de quantificar l'efecte de l'acte quirúrgic de la CB en l'expressió d'aquests gens, es va procedir a estudiar l'expressió en SAT a l'inici de la CB i al final d'aquesta (transcorregudes 2h) en una cohort de 16 pacients obesos mòrbids intervinguts de CB mitjançant BPG en Y de roux (**cohort 3**). En aquesta cohort de pacients, es va obtenir una primera mostra de SAT just després de la primera incisió quirúrgica i una segona mostra just abans de tancar la darrera incisió (transcorregut un període de 2 hores). La totalitat d'aquests pacients es va intervenir al mateix centre (*Hospital de la Vall d'Hebron*), a mans del mateix cirurgià (*Dr. Vilallonga*) i per la mateixa via d'abordatge, laparoscòpica. Aquests 3 fets, proporcionen una homogeneïtat immillorable a nivell del procediment quirúrgic.

L'estudi d'expressió gènica es va dur a terme mitjançant *RT-PCR*. No es va observar canvis en l'expressió de 4 dels 5 gens estudiats (RGS-1, OLF2, SLC27A i LYZ). On si que es va observar un canvi d'expressió estadísticament significatiu va ser a nivell de l'expressió de PKP2 ( $p=0.001$ ). Aquest gen, mostrà un increment de la seva expressió al finalitzar l'acte quirúrgic. Tenint en compte que PKP2 mostrava un increment de la seva expressió a l'estudi longitudinals als 2 anys, l'augment de la seva expressió durant la cirurgia reforça aquesta associació.

A més de l'estudi d'aquests 5 gens, es va testar el canvi en l'expressió de 2 marcadors clàssics d'inflamació com són IL-6 i IL-8. Es va observar en ambdós casos un increment estadísticament significatiu de la seva expressió a nivell de SAT ( $p < 0.00001$ ), tal i com era d'esperar. Aquesta troballa, proporciona encara més solidesa a l'absència de canvi d'expressió de RGS-1, OLFM2, SLC27A2 i LYZ en resposta a l'estrès agut de la cirurgia.

#### **6.4. Objectiu 3: Estudiar els canvis en la sensibilitat a la insulina després de la pèrdua de pes promoguda per la CB i la seva associació amb els canvis en l'expressió gènica del teixit subcutani.**

La CB com a opció de tractament per la DM2 va ser descrita per primera vegada l'any 1992 (*Porjes et al, 1992*); des de llavors, aquesta tècnica s'ha consolidat com una opció de tractament per al pacient obès contribuint a millorar o resoldre les comorbiditats associades a la obesitat, entre elles la insulinoresistència i la DM2. Diferents autors han demostrat una notable millora en la sensibilitat a la insulina en resposta a la cirurgia bariàtrica tant en pacients afectes de DM2 (*Kashyap SR, 2010; Promintzer-Schifferl M, 2011; Astiarraga, 2013*) com també en pacients normo-tolerants (*Briatore L et al, 2008; Jørgensen NB, 2012; Kohli R et al, 2013; Salinari S, 2013*).

En el present treball, la sensibilitat a la insulina va poder ser valorada mitjançant un CLAMP euglucèmic hiperinsulinèmic abans i després de la CB en 10 pacients. D'aquestes, 8 eren pacients amb una tolerància normal a la glucosa i 2 van ser diagnosticades de DM2 per TTOG el dia després de la realització del CLAMP. Les 2 pacients diagnosticades de DM2 no seguien cap tractament hipoglucemiant i presentaven uns valors d'HbA1c de 6.6 i 6.8% respectivament. La mitjana del valor de M-CLAMP va passar de 4,87 a 6,50 ( $p=0.032$ ) demostrant una milloria en la sensibilitat a la insulina en pacients no diabètiques, en concordança amb els estudis existents (*Briatore L et al, 2008; Jørgensen NB, 2012; Kohli R et al, 2013; Salinari S, 2013*).

La sensibilitat a la insulina no va poder ser valorada per CLAMP en el grup de pacients afectes de DM2. L'estudi de CLAMP està validat per a pacients no afectes de DM2 (*Kim JK et al, 2009*), i presenta importants limitacions en pacients DM2; Una d'elles seria que la dosi d'insulina a infondre durant la prova, podria no ser suficient per establir la glicèmia plasmàtica del pacient a 100mg/dL. Fins i tot retrasant la infusió de glucosa o anul·lant aquesta tal com s'ha descrit a la literatura (*Kashyap SR et al, 2010 & Astiarraga B et al, 2013*). A la vegada, el tractament farmacològic per la DM2 interfereix en la interpretació del CLAMP al estar actuant en molts casos sobre la resistència perifèrica a la insulina, i al mantenir el seu efecte malgrat suspendre'l durant 12-24 hores; és el cas de la Metformina (*Graham GG et al, 2011*), fàrmac de primera

elecció en el tractament de la DM2 i pautat en 7 de les 9 pacients estudiades afectes de DM2.

Existeix un nombre creixent de publicacions que recullen els canvis que tenen lloc després de la CB a nivell de la sensibilitat a la insulina, estudiada a través HOMA-IR en alguns d'ells i a través de CLAMP en la majoria (*taula 12*).

**Taula 12: Resum literatura existent on es valora la sensibilitat a la insulina a través de CLAMP abans i després de cirurgia bariàtrica.**

Autors	Revista	Any	N	Edat	IMC	Sexe	Cirurgia	Temps	Millòria HOMA	Millòria CLAMP
<i>Bojzen-Møller KN et al</i>	Diabetes	2014	10DM2/10 no-DM2	45±8	43±4	12D/8H	BPG-Y-Roux	1s-3m-1a	Millòria sig 1s (als 2 grups)	Millòria sig als 3 mesos en les 2 cohorts. No 1s
<i>Campos GM et al</i>	Surg Obes Relat Dis.	2014	22 NO DM2	44.3±11.2	48.4±6.7	3H/9D; 4H/6D	12GBP/10 dieta alone	2s-6m	Millòria 2s (als 2 grups)	Millòria sig només en by-pass
<i>de Weijer BA et al</i>	Obesity (Silver Spring).	2013	18 no DM2	40.5 [26-50]	42.9 [38.7-61.3]	18D	BPG-Y-Roux	2s	Millòria sig 2s	NS
<i>Astarraga B et al</i>	JCEM	2013	15DM2 no obesos	55±1	28.3±1	6H/9D	Der. Bilio-pancreatic	2m-1a	Millòria sig 2m	millòria sig en els 2 grups ab 2m i al any
<i>Kohli R et al</i>	JCEM	2013	18 no DM2	43±7/47±14	---	3H/15D	BPG-Y-Roux	Perdua 20% del pes	Millòria sig	no en parlen, malgrat fer CLAMP, no en parlen? <sup>2</sup>
<i>Sahiani S et al</i>	Ann Surg	2013	7DM2/7 no-DM2	42.1±5	42.5±4	8H/6D	BPG-Y-Roux	1m	Millòria sig 1m	Millòria sig en els 2 grups
<i>Jorgensen NB et al</i>	Am J Physiol Endocrinol Metab	2012	13DM2/12 no-DM2	52±9/43±13	43.1±5/41.5±4.8	7H/6D; 3H/9H	BPG-Y-Roux	1s-3m-1a	No millòria 1s. Millòria sig 3s i 1 any (als 2 grups)	No CLAMP
<i>Promintzer-Schiffert M et al</i>	Obesity (Silver Spring).	2011	6 DM2	42.5±2	49.3±3	1H/5D	BPG-Y-Roux	7m	Millòria sig 7m (als 2 grups)	NS
<i>Kashtyap SR et al</i>	Int J Obes	2010	16 DM2	52±14	47±9	9H/7D	BPG 9/Sleeve 7	1s-4s	Millòria sig 1s (només. BPG); sig 4s (als 2 grups)	Canvis sig només en BPG i només 4s
<i>Briatore L et al</i>	Obesity (Silver Spring).	2008	9DM2/12 no DM2	42.1±2.1/36.1±2.5	48.5±2.4	8H/13D	Der. Bilio-pancreatic	1m	Millòria sig 1m	No CLAMP
<i>Rubino F et al</i>	Ann Surg	2004	6DM2/4 no DM2	39.6±4	46.2	1H/9D	BPG-Y-Roux	3s	Millòria sig 3s (als 2 grups)	No CLAMP

Seguidament, es resumeix la informació més destacable recollida en cadascun d'aquests treballs:

**Kashyap SR et al, 2010**, descriuen una cohort de 16 pacients obesos mòrbids (9H/7D), intervinguts de cirurgia bariàtrica mitjançant BPG (n=9) i GV o BG (n=7), amb una edat mitja de  $52,14 \pm 14$  anys i un IMC promig de  $47,9 \text{ Kg/m}^2$ . En aquest sèrie, tots els pacients presentaven DM2 abans de la cirurgia amb una HbA1c mitja de  $7,2 \pm 0,4\%$  i amb un temps d'evolució des del diagnòstic DM2 de  $5 \pm 1$  anys. El tractament hipoglucemiant que seguien aquests pacients, era molt heterogeni. Incloent hipoglucemiant orals en 12, insulina en 2 i tractament únicament amb dieta en 2 més. Cap dels pacients seguia tractament amb anàlegs de GLP-1 o IDPP-4. *Kashyap et al*, descriuen una disminució en les xifres de glucosa basal entorn al 20% en ambdós grups transcorreguda una setmana, que segueix disminuint a la setmana 4 només a la cohort sotmesa a BPG, i una disminució de les concentracions d'insulina basal a la setmana i a les 4 setmanes, únicament a la cohort sotmesa a BPG, malgrat una pèrdua de pes similar en les 2 cohorts. *Kayshap et al* descriuen per tant, canvis significatius en el HOMA únicament en els pacients sotmesos a BPG (tant a la setmana com a les 4 setmanes). Valorada també sensibilitat perifèrica a la insulina a través de CLAMP hiperglucèmic, no s'observen canvis transcorreguts 7 dies de la cirurgia, però si transcorregudes 4 setmanes, únicament al grup sotmès a BPG. En aquest estudi, s'estudia també la secreció hormonal intestinal a través de la determinació de les concentracions plasmàtiques de GLP-1 i GIP, pre i postprandials, tan abans com transcorregudes 1 i 4 setmanes de la CB. Es descriu un increment en els nivells de GLP-1 únicament al grup sotmès a BPG.

Aquest estudi, presenta com a importants limitacions: 1. Els pacients no estaven randomitzats al procediment quirúrgic. 2. Es van utilitzar dues tècniques restrictives diferents, amb un diferent impacte en l'anatomia del pacient. 3. La cohort intervinguda de GBP presentava una major resistència a la insulina calculada a través de HOMA ( $p < 0.05$ ). 4. La heterogeneïtat en el tractament de la DM2 prèvia la cirurgia. I, sobretot, 5. el fet de que en 4 pacients es va mantenir Metformina i en un Tiazolindiona tant a la setmana com a les 4 setmanes (malgrat es retiraven 24h prèvies a l'estudi dels pacients); ambdós fàrmacs directament vinculats en la sensibilitat a la insulina (vida mitja  $> 24$ h).

**Astiarraga B et al, 2013**, descriuen una cohort de 15 pacients amb sobrepès (6H i 9D) amb una edat de  $55 \pm 1$  anys i amb IMC de  $28,3 \pm 0,6 \text{ Kg/m}^2$ , afectes de DM2 amb un

temps promig d'evolució de la malaltia de  $16\pm 2$  anys. Sotmesos tots ells a derivació biliopancreàtica. L'*end-point* primari era la resolució de la DM2, que va tenir lloc en 6 dels 15 pacients (40%). Els pacients van ser estudiats abans, als 2 i als 12 mesos de la cirurgia. Els autors reporten també una cohort de 15 pacients no sotmesos a CB i no diabètics, ajustada per edat, sexe i IMC. Es descriu una notable milloria de la sensibilitat a la insulina ja als 2 mesos de la CB, que es manté a l'any de la cirurgia. Malgrat aquesta milloria, els paràmetres de resistència a la insulina no s'igualen al grup control, tampoc comparant únicament el grup que presenta una resolució de la DM2.

Els autors atribueixen la baixa taxa de resolució de la diabetis i la no normalització dels paràmetres de resistència a la insulina a la llarga evolució de la DM2 en aquesta cohort i al fet de no tractar-se de pacients obesos com s'havia reportat fins llavors.

L'estudi presenta algunes limitacions importants com són: 1. Els pacients diabètics seguien diferents pautes de tractament hipoglucemiant previ a la cirurgia. 6 seguien tractament amb Metformina + SU i 9 seguien tractament amb hipoglucemiant orals + insulina (30UI/d de mitjana). 2. No es recull a l'article si els pacients que mostren una resolució de la DM2 post CB són aquells que no rebien tractament amb insulina.

Sí que es recull que no hi havia diferències en edat, temps d'evolució de la DM o IMC pre-cirurgia entre el grup que experimenta una resolució de la DM2 i el que no. S'observa una pèrdua de pes a l'any, superior en el grup que presenta una resolució de la diabetis, malgrat no ser significativa (16Kg vs 13Kg,  $p = ns$ ).

*Salinari S et al, 2013* descriuen el seu treball una cohort de 14 pacients obesos mòrbids (8H i 6D) amb una edat de  $42,1\pm 5$  anys i amb IMC de  $42,5 \pm 4$  Kg/m<sup>2</sup>, 7 d'ells afectes de DM2 amb un temps d'evolució de la malaltia d'entre 1 i 4 anys i un valor de HbA1c de  $8,1\pm 1,22\%$ . Els 14 pacients van ser intervinguts de cirurgia bariàtrica mitjançant BPG-Y-Roux. L'objectiu de l'estudi era dilucidar el mecanisme pel qual té lloc la milloria/resolució de la DM2 a través de la CB. Els pacients van ser estudiats abans i 1 mes després de la CB. No es van observar diferències en la pèrdua de pes 1 mes després de la CB en els 2 grups. Es descriu una notable milloria de la sensibilitat a la insulina transcorregut 1 mes de la CB amb canvis significatius tant en el HOMA com en M-CLAMP tant a la cohort de pacients diabètics com a la de normotolerants. *Salinari S et al*, van determinar les concentracions plasmàtiques tant de GLP-1 com de GIP, tant basals com estimulats mitjançant TTOG, així com l'àrea sota la corba. Transcorregut un mes de la CB, tots els pacients afectes de DM2 havien discontinuat tots els tractaments

hipoglucemians i complien criteris de remissió de la DM2. Es va observar un increment tan en els nivells basals com estimulats de GIP i GLP-1 en ambdues cohorts, essent més important el % de canvi en a cohort de pacients afectes de DM2 i assolint uns valors més elevats.

Els autors atribueixen la milloria de la sensibilitat a la insulina als canvis en la secreció incretina derivats de la CB. Aquest estudi presenta com a limitacions la poca N reclutada, el fet que no es recull el tractament hipoglucemiant que seguien els pacients afectes de DM2 i el poc temps d'evolució de la DM2 en aquesta cohort.

*De Weijer BA et al, 2013* reporten una cohort de 18 dones pre-menopàusiques obesas mòrbides, amb edat mitjana de 40,5 [26-50] anys, amb un IMC de 42,9 [38,7-61,3] Kg/m<sup>2</sup>, intervingudes totes elles mitjançant BPG-Y-Roux. Cap de les pacients incloses era afecte de DM2. Aquestes pacients van ser estudiades abans i 15 dies després de la CB. Transcorregudes 2 setmanes, la pèrdua de pes va ser de 7,8 [2-14] Kg. Es va observar canvis significatius a nivell de HOMA-IR, sense observar-se canvis significatius en la sensibilitat perifèrica a la insulina calculada a través de CLAMP. Aquest estudi presenta com a limitacions que la DM2 s'exclou en base a la història clínica, no es realitza TTOG ni determinació d'HbA1c abans de la inclusió a l'estudi.

*Campos GM et al, 2015* publiquen una sèrie de 22 pacients, obesos mòrbids no diabètics, candidats a CB. 12 d'aquests pacients són sotmesos a BPG-Y-Roux, els 10 restants són sotmesos a dieta amb una restricció calòrica equivalent al grup de cirurgia. L'*end-point* primari és discriminar l'efecte de la CB en la milloria de la sensibilitat a la insulina estudiada a través de CLAMP, exclouent l'efecte de la dieta i la pèrdua de pes. El grups sotmesos a BPG-Y-Roux i a dieta eren comparables en edat (47,4±0,6 vs 40,2±13,4 anys, p=0.16), IMC 48,4±6,8 vs 48,3±6,6 Kg/m<sup>2</sup>, respectivament ) i distribució per sexes. Transcorreguts 15 dies, la pèrdua de pes i el percentatge de l'excés de pes perdut va ser també comparable als 2 grups (9,9±2,4 vs 8,2±2,3; 12,7±2,4 vs 10,9±2,8 %). *Campos et al*, descriuen canvis en la sensibilitat perifèrica a la insulina calculada a través de CLAMP, només en el grup sotmès a BPG-Y-Roux.

Aquest estudi presenta com a limitacions: l'estudi no parla de si es randomitzen els pacients als dos grups d'intervenció o de quin és el criteri per distribuir als pacients als 2 grups. La DM s'exclou per la història clínica que refereix el pacient, sense realitzar-se TTOG o determinació de HbA1c. Parlen de que a les 2 cohorts es fa una restricció



calòrica equivalent, no descriuen la composició i d'aquesta ni el repartiment de les ingestes.

**Bojsen-Møller KN et al, 2014** Reporten l'estudi d'una cohort de 20 pacients, 10 d'ells afectes de DM2 i 10 no DM2, comparables en edat ( $43,6 \pm 3,4$  vs  $40,1 \pm 2,8$  anys.), IMC ( $118,9 \pm 7,1$  vs  $123,8 \pm 9,3$ ) i distribució per sexes. Intervingudes totes elles mitjançant BPG-Y-Roux per via laparoscòpica. Aquestes pacients van ser estudiades abans de la CB i en tres punts de tall després de la CB, als 7 dies, als 3 mesos i a l'any. Descriuen en el seu treball canvis significatius a nivell de HOMA-IR ja a la primera setmana en els 2 grups. La sensibilitat perifèrica a la insulina calculada a través de CLAMP va mostrar un canvi significatiu a partir dels 3 mesos en els dos grups, millorant en el tercer punt de tall als 12 mesos. Aquest estudi presenta com a limitacions que els pacients ja havien perdut un 9% (mitjançant dieta molt baixa en calories pre-CB), fet que podria haver modificat ja la seva sensibilitat perifèrica a la insulina o la resistència hepàtica respecte ala seva situació basal. No es recull tampoc quin tractament seguien els pacients afectes de DM2 ni el moment en que es va discontinuar aquests tractaments.

La literatura existent posa de manifest que malgrat la resolució de la DM2 té lloc poc temps després de la cirurgia, la sensibilitat a la insulina mostra un procés de canvi molt més lent, molt més lligat a la pèrdua de pes i, per tant, a la pèrdua de massa grassa.

El present treball contribueix a la literatura existent aportant a més, l'estudi de canvis en l'expressió gènica de SAT i la seva associació amb la milloria de la sensibilitat perifèrica a la insulina estudiada a través de CLAMP euglucèmic hiperinsulinèmic abans i després d'haver tingut lloc la màxima pèrdua de pes esperable en aquests pacients. Els primers gens als que es va testar aquesta associació van ser aquells que ocupaven els 20 primers llocs al llistat de gens que més veien modificada la seva expressió a l'estudi de *microarray*. El fet de no trobar associacions entre el percentatge de canvi d'aquests gens (*RT-PCR*) i el percentatge de CLAMP pot ser degut a la poca n ( $n = 10$ ) o al fet que aquests gens no tinguessin una relació directa amb la sensibilitat a la insulina. Ampliant la selecció de gens, si que es va observar associacions significatives entre el percentatge de canvi de M-CLAMP i el percentatge de canvi d'alguns gens que es coneix modifiquen amb la pèrdua de pes, i que estan àmpliament relacionats amb la sensibilitat la insulina (IL-6, MCR1, TNF- $\alpha$ , IL1R1, GLUT4). Aquestes associacions significatives podrien

podrien suggerir un menor efecte de la n, si bé per testar això caldria incrementar el nombre de pacients de cares a possibles futurs estudis.

### **6.5. Limitacions de l'estudi**

Els resultats del present treball fan referència a l'expressió gènica, faltaria comprovar si aquests canvis s'acompanyen també de canvis en la traducció a proteïna a nivell del teixit adipós i/o circulants.

Les mostres de teixit adipós subcutani extretes durant la CB van ser obtingudes després d'una inducció anestèsica general i en el context d'una intervenció quirúrgica. Aquest fet suposa un major component d'estrès en comparació amb les mostres obtingudes després de la pèrdua de pes, obtingudes després de la instil·lació d'un anestèsic local.

La *Cohort 1 i 2* estan conformades íntegrament per dones. Així, els canvis en l'expressió gènica de SAT que tenen lloc després de la pèrdua de pes promoguda per la CB, podrien no ser extrapolables a homes.

### **6.6. Fortaleses de l'estudi**

Com a punts forts de l'estudi cal destacar la homogeneïtat de les cohorts; el fet de que l'expressió gènica fos determinada mitjançant tècniques de *microarray*; que els resultats fossin validats mitjançant *RT-PCR*; La validació de les associacions trobades a l'estudi longitudinal en una cohort ampliada de pacients; L'exclusió de l'efecte de la CB *per se* sobre l'expressió gènica dels 5 gens que centralitzen el present estudi, a través de l'estudi de biòpsies de SAT a l'inici i al final de l'acte quirúrgic; i que la sensibilitat a la insulina fos estudiada a través d'un *gold standard* com és el CLAMP euglucèmic hiperinsulinèmic.



## **7. CONCLUSIONS**

---



- 1.1. L'expressió gènica del teixit adipós subcutani es veu modificada després de la pèrdua de pes promoguda per la CB.
- 1.2. La CB implica una caiguda en l'expressió de gens pro inflamatoris i relacionats amb el metabolisme del ferro i un increment en l'expressió del gens lipogènics i implicats en la sensibilitat a la insulina, a nivell de SAT.
- 1.3. Els gens OLFM2, SLC27A2, PKP2, LYZ i RGS-1 es troben entre els 10 gens que més veuen modificada la seva expressió a nivell de SAT després de la CB.
- 1.4. L'acte quirúrgic de la CB incrementa l'expressió de gens pro inflamatoris com són d'IL-6 i IL-8, no modificant l'expressió d'altres gens com són OLFM2, SLC27A2, LYZ o RGS-1.
- 1.5. PKP2 incrementa la seva expressió a nivell de SAT en resposta a l'estrès de l'acte quirúrgic. Aquest increment, reforça encara més l'increment observat als 2 anys de la CB ja que la mostra als 2 anys va ser extreta amb una biòpsia sota anestèsia local, i per tant amb un menor estrès.
- 1.6. La milloria de la sensibilitat a la insulina que té lloc després de la CB es correlaciona amb la caiguda en l'expressió de gens pro inflamatoris a nivell de SAT.



## 8. REFERÈNCIES

---





- Adam M. F**, Belmouden A, Binisti P, Brezin A. P. Valtot F, Belchetoille A, Dascotte J. C, Copin B, Gomez L, Chaventre A, Bach J. F, Garchon H. J. (1997) Recurrent mutations in a single exon encoding the evolutionary conserved olfactomedin-homology domain of TIGR in familial open-angle glaucoma. *Human Molecular Genetics* 6(12):2091-7.
- Alberti K.G**, Zimmet P, Shaw J. (2005) The metabolic syndrome, a new worldwide definition. *Lancet*. 366(9491):1059-62.
- Alkhouli N**, Mansfield J, Green E, Bell J, Knight B, Liversedge N, Tham J.C, Welbourn R, Shore A.C, Kos K, Winlove C.P. (2013) The mechanical properties of human adipose tissues and their relationships to the structure and composition of the extracellular matrix. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 305(12):E1427-35.
- Anderson C.M**, Stahl A. (2013) SLC27 fatty acid transport proteins. *Mol Aspects Med*. 34(2-3):516-28
- Andrews M**, Arredondo M. (2014) Association between ferritin, high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and relative abundance of Hepcidin mRNA with the risk of type 2 diabetes in obese subjects. *Nutr Hosp*. 1;30(3):577-84.
- Apovian C.M**, Aronne L.J, Bessesen D.H, McDonnell M.E, Murad M.H, Pagotto U, Ryan D.H, Still C.D. (2015) Endocrine Society. Pharmacological management of obesity: an endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 100(2):342-62.
- Arimoto K.I**, Burkart C, Yan M, Ran D, Weng S, Zhang D.E. (2014) Plakophilin-2 promotes tumor development by enhancing liganddependent and -independent epidermal growth factor receptor dimerization and activation. *Mol. Cell. Biol*. 34(20):3843–3854.
- Astiarraga B**, Gastaldelli A, Muscelli E, Baldi S, Camastra S, Mari A, Papadia F, Camerini G, Adami G, Scopinaro N, Ferrannini E (2013) Biliopancreatic diversion in nonobese patients with type 2 diabetes: impact and mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab*. 98(7):2765-73.
- Athyros V.G**, Tziomalos K, Katsiki N, Doumas M, Karagiannis A, Mikhailidis D.P. (2015) Cardiovascular risk across the histological spectrum and the clinical manifestations of non-alcoholic fatty liver disease: An update. *World J Gastroenterol*. 14;21(22):6820-34.
- Bansal G**, Druey K.M, Xie Z (2007) R4 RGS Proteins: Regulation of G Protein Signaling and Beyond. *Pharmacol Ther*. 116(3): 473–495.
- Bassols J**, Botas P, Moreno-Navarrete J.M, Delgado E, Ortega F, Ricart W, Fernandez-Real J.M (2010) Environmental and genetic factors influence the relationship between circulating IL-10 and obesity phenotypes. *Obesity*. 18(3):611-8.

- Bass-Zubek A.E**, Godsel L.M, Delmar M, Green K.J (2009) Plakophilins: multi-functional scaffolds for adhesion and signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 21(5):708–16.
- Berrington de Gonzalez A**, Hartge P, Cerhan J.R, Flint A.J, Hannan L, MacInnis R.J, Moore S.C, Tobias G.S, Anton-Culver H, Freeman L.B, Beeson W.L, Clipp S.L, English D.R, Folsom A.R, Freedman D.M, Giles G, Hakansson N, Henderson K.D, Hoffman-Bolton J, Hoppin J.A, Koenig K.L, Lee I.M, Linet M.S, Park Y, Pocobelli G, Schatzkin A, Sesso H.D, Weiderpass E, Willcox B.J, Wolk A (2010) Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N Engl J Med.* 363:2211–2219.
- Billington C.J**, Epstein L.H, Goodwin N.J, Hill J.O, Pi-Sunyer F.X, Rolls B.J, Stern J, Wadden T.A, Weinsier R.L, Wilson G.T, Wing R.R, Yanovski S.Z, Hubbard V.S, Hoofnagle J.H, Everhart J, Harrison B (2000) Overweight, obesity, and health risk. *Arch Intern Med.* 160(10): 898-904.
- Bjorntorp P** (1997) Body fat distribution, insulin resistance, and metabolic diseases Nutrition.*Nutrition.* 13(9): 795-803.
- Boivin A**, Brochu G, Marceau S, Marceau P, Hould F.S, Tchernof A (2007) Regional differences in adipose tissue metabolism in obese men. *Metabolism.* 56(4): 533-40.
- Bojsen-Møller K.N**, Dirksen C, Jørgensen N.B, Jacobsen S.H, Serup A.K, Albers P.H, Hansen D.L, Worm D, Naver L, Kristiansen V.B, Wojtaszewski J.F, Kiens B, Holst J.J, Richter E.A, Madsbad S (2014) Early enhancements of hepatic and later of peripheral insulin sensitivity combined with increased postprandial insulin secretion contribute to improved glycemic control after Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetes.* 63(5):1725-37.
- Bonora E**, Targher G, Alberiche M, Bonadonna R.C, Saggiani F, Zenere M.B, Monauni T, Muggeo M. (2000) Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care.* 23(1): 57-63.
- Bourlier V**, Zakaroff-Girard A, Miranville A (2008) Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation.* 117:806–815 40.
- Briatore L**, Salani B, Andraghetti G, Danovaro C, Sferrazzo E, Scopinaro N, Adami GF, Maggi D, Cordera R. (2008) Restoration of acute insulin response in T2DM subjects 1 month after biliopancreatic diversion. *Obesity (Silver Spring).* 16(1): 77–81.
- Buchwald H**, Avidor Y, Braunwald E, Jensen M.D, Pories W, Fahrbach K, Schoelles K. (2004) Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 292(14):1724–1737.
- Buse J.B**, Caprio S, Cefalu W.T, Ceriello A, Del Prato S, Inzucchi S.E, McLaughlin S, Phillips G.L, Robertson R.P, Rubino F, Kahn R, Kirkman M.S. (2009) How do we define cure of diabetes? *Diabetes Care.* 32(11):2133-5.

**Campbell K.L.**, Foster-Schubert K.E, Makar K.W, Kratz M, Hagman D, Schur E.A, Habermann N Horton M, Abbenhardt C, Kuan L.Y, Xiao L, Davison J, Morgan M, Wang C.Y, Duggan C, McTiernan A, Ulrich C.M. (2013) Gene expression changes in adipose tissue with diet- and/or exercise-induced weight loss. *Cancer Prev Res (Phila)*. 6(3):217-31.

**Campos G.M.**, Rabl C, Havel P.J, Rao M, Schwarz J.M, Schambelan M, Mulligan K (2014) Changes in post-prandial glucose and pancreatic hormones, and steady-state insulin and free fatty acids after gastric bypass surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 10(1):1-8.

**Canì P.D.**, Amar J, Iglesias M.A, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck A.M, Fava F, Tuohy K.M, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti J.F, Gibson G.R, Casteilla L, Delzenne N.M, Alessi M.C, Burcelin R (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 56(7):1761–1772.

**Cannon B.**, Nedergaard J (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84(1): 277-359

**Cerrone M.**, Lin X, Zhang M, Agullo-Pascual E, Pfenniger A, Chkourko Gusky H, Novelli V, Kim C, Tirasawadichai T, Judge D.P, Rothenberg E, Chen H.S, Napolitano C, Priori S.G, Delmar M. (2014) Missense mutations in plakophilin-2 cause sodium current deficit and associate with a Brugada syndrome phenotype. *Circulation*. 129(10):1092-103.

**Claus H.B.**, Kim J, Wessling-Resnick M, Téllez-Rojo M.M, Jayawardene I, Ettinger A.S, Hernández-Avila M, Schwartz J, Christiani D.C, Hu H, Wright R.O (2011) Associations of iron metabolism genes with blood manganese levels: a population-based study with validation data from animal models. *Environ Health*. 10(3):97-99.

**Clement K** and Langin D (2007) Regulation of inflammation-related genes in human adipose tissue. *J Intern Med*. 262(1):422–30.

**Choi M.S.**, Kim Y.J, Kwon E.Y, Ryoo J.Y, Kim S.R, Jung U.J (2015) High-fat diet decreases energy expenditure and expression of genes controlling lipid metabolism, mitochondrial function and skeletal system development in the adipose tissue, along with increased expression of extracellular matrix remodelling- and inflammation-related genes. *Br J Nutr*. 113(6):867-77.

**Conway J.M.**, Conway J.M, Yanovski S.Z, Avila N.A, Hubbard V.S (1995) Visceral adipose tissue differences in black and white women. *Am J Clin Nutr*. 61(4): 765-71.

**Cuspidi C.**, Sala C, Zanchetti A (2008) Metabolic syndrome and target organ damage: role of blood pressure. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 6(5): 731-43.

- Cuspidi C**, Valerio C, Sala C, Negri F, Esposito A, Masaidi M, Giudici V, Zanchetti A, Mancia G (2009) Metabolic syndrome and biventricular hypertrophy in essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 23(3): 168-75.
- Cypess A. M**, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine A.B, Kuo F.C, Palmer E.L, Tseng Y.H, Doria A, Kolodny G.M, Kahn C.R (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* 360(15):1509-17.
- D'Amico D.J**, Goldberg M.F, Hudson H, Jerdan J.A, Krueger D.S, Luna S.P, Robertson S.M, Russell S, Singerman L, Slakter J.S, Yannuzzi L, Zilliox P; Anecortave Acetate Clinical Study Group (2003) Anecortave acetate as monotherapy for treatment of subfoveal neovascularization in age-related macular degeneration: twelve-month clinical outcomes. *Ophthalmology.* 110(12):2372-83.
- Danielson P.E**, Forss-Petter S, Battenberg E.L, de Lecea L, Bloom F.E, Sutcliffe J.G. (1994) Four structurally distinct neuron-specific olfactomedin-related glycoproteins produced by differential promoter utilization and alternative mRNA splicing from a single gene. *J. Neurosci. Res.* 38(5), 468–478.
- Dankel S.N**, Fadnes D.J, Stavrum A.K, Stansberg C, Holdhus R, Hoang T, Veum V.L, Christensen B.J, Våge V, Sagen J.V, Steen V.M, Mellgren G (2010) Switch from stress response to homeobox transcription factors in adipose tissue after profound fat loss. *PLoS One.* 5:e11033.
- Davis R.J**, Corvera S, Czech M.P (1986) Insulin stimulates cellular iron uptake and causes the redistribution of intracellular transferrin receptors to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 261:8708– 8711.
- De Fronzo R.A**, Tobin J.D, Andres R (1979) Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol.* 237(1):214-35.
- De Weijer B.A**, Aarts E, Janssen I.M, Berends F.J, van de Laar A, Kaasjager K, Ackermans M.T, Fliers E, Serlie M.J (2013) Hepatic and peripheral insulin sensitivity do not improve 2 weeks after bariatric surgery. *Obesity (Silver Spring).* 21(1):1143-7.
- Denecke B**, Meyerdieks A, Böttger E.C (1999) RGS1 is expressed in monocytes and acts as a GTPase-activating protein for G-protein-coupled chemoattractant receptors. *J Biol Chem.* 274(38):26860-8.
- Dekker L.H** and Nicolaou M (2013) Sex differences in the association between serum ferritin and fasting glucose in type 2 diabetes among South Asian Surinamese, African Surinamese, and ethnic Dutch: the population-based SUNSET study. *Diabetes Care.* 36:965–971

**Deurenberg P**, Andreoli A, Borg P, Kukkonen-Harjula K, de Lorenzo A, van Marken Lichtenbelt W.D, Testolin G, Vigano R, Vollaard N (2001) The validity of predicted body fat percentage from body mass index and from impedance in samples of five European populations. *Eur J Clin Nutr.* 55(11): 973-9.

**Ding L**, Pang S, Sun Y, Tian Y, Yu L, Dang N (2014) Coordinated Actions of FXR and LXR in Metabolism: From Pathogenesis to Pharmacological Targets for Type 2 Diabetes. *Int J Endocrinol.* 2014:751859.

**Domecq J.P**, Prutsky G, Leppin A, Sonbol M.B, Altayar O, Undavalli C, Wang Z, Elraiyah T, Brito J.P, Mauck K.F, Lababidi M.H, Prokop L.J, Asi N, Wei J, Fidahussein S, Montori V.M, Murad M.H (2015) Clinical review: Drugs commonly associated with weight change: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 100(2):363-70.

**Eknoyan, G** (2008) Adolphe Quetelet (1796-1874) -the average man and indices of obesity. *Nephrol Dial Transplant.* 23(1): 47-51.

**Esposito K**, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R, Giugliano D (2003) Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA.* 289(11): 1799–1804.

**Eriksson-Holding D**, Andersson D.O, Bäckdahl J, Hoffstedt J, Rössner S, Thorell A, Arener E, Arner P and Rydén M (2015) Adipose tissue morphology predicts improved insulin sensitivity following moderate or pronounced weight loss. *Int J Obes.* 39(6):893-8.

**Expert Panel on Detection And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults** (2001) Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 285(19): 2486-97.

**Falcon A**, Doege H, Fluitt A, Tsang B, Watson N, Kay M.A, Stahl A (2010) FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299:E384–393.

**Feletou M**, Galizzi J.P, Levens N.R (2006) NPY receptors as drug targets for the central regulation of body weight. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 5(3):263-274.

**Fernández-Real J.M**, López-Bermejo A, Ricart W (2005) Iron stores, blood donation, and insulin sensitivity and secretion. *Clin Chem.* 51:1201–1205.

**Fernandez-Real J.M**, Vayreda M, Casamitjana R, Saez M, Ricart W (2001) Body mass index (BMI) and percent fat mass. A BMI > 27.5 kg/m<sup>2</sup> could be indicative of obesity in the Spanish population. *Med Clin (Barc)*. 117(18): 681-4.

**Flegal K.M**, Kit B.K, Orpana H, Graubard B.I (2013) Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 309(1):71-82.

**Funayama T**, Mashima Y, Ohtake Y, Ishikawa K, Fuse N, Yasuda N, Fukuchi T, Murakami A, Hotta Y, Shimada N; Glaucoma Gene Research Group (2006) SNPs and interaction analyses of noelin 2, myocilin, and optineurin genes in Japanese patients with open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 47(12):5368 –5375.

**Gomez-Ambrosi J**, Silva C, Galofré J.C, Escalada J, Santos S, Gil M.J, Valentí V, Rotellar F, Ramírez B, Salvador J, Frühbeck G (2011) Body adiposity and type 2 diabetes: increased risk with a high body fat percentage even having a normal BMI. *Obesity (Silver Spring)*. 19(7): 1439-44.

**Gomez-Ambrosi J**, Pastor C, Salvador J, Silva C, Rotellar F, Gil MJ, Catalán V, Rodríguez A, Cienfuegos JA, Frühbeck G (2007) Influence of waist circumference on the metabolic risk associated with impaired fasting glucose: effect of weight loss after gastric bypass. *Obes Surg* 17(5): 585-91.

**Graham G.G**, Punt J, Arora M, Day R.O, Doogue M.P, Duong J.K, Furlong T.J, Greenfield J.R, Greenup L.C, Kirkpatrick C.M, Ray J.E, Timmins P, Williams K.M (2011) Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet*. 50(2):81-98.

**Granel B**, Valleix S, Serratrice J, Chérin P, Texeira A, Disdier P, Weiller P.J, Grateau G (2006) Lysozyme amyloidosis: report of 4 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 85(1):66-73.

**Halpern D.L**, Grosskreutz C.L (2002) Glaucomatous optic neuropathy: mechanisms of disease. *Ophthalmol Clin North Am*. 15(1):61–8.

**Hatzfeld M** (2007) Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochim Biophys Acta*. 1773(1):69–77.

**Huang J**, Pashkov V, Kurrasch D, Yu K, Gold S, Wilkie T (2006) Feeding and fasting controls liver expression of a regulator of G protein signaling (Rgs16) in periportal hepatocytes. *Comp Hepatol*. 5(4) :8-19.

- Huang X**, Charbeneau R.A, Fu Y, Kaur K, Gerin I, MacDougald O.A, Neubig R.R (2008) Resistance to diet-induced obesity and improved insulin sensitivity in mice with a regulator of G protein signaling-insensitive G184S Gnai2 allele. *Diabetes*. 57(1):77-85.
- Jaén J**, Sanz I, López De Castro F, Pérez T, Ortega P, Corral R (2001) Glaucoma and ocular hypertension in primary care. *Aten Primaria*. 28(1):23–30.
- Jehn M**, Clark J.M, Guallar E (2004) Serum ferritin and risk of the metabolic syndrome in U.S. adults. *Diabetes Care*. 27:2422–2428
- Jørgensen N.B**, Jacobsen S.H, Dirksen C, Bojsen-Møller K.N, Naver L, Hvolris L, Clausen T.R, Wulff B.S, Worm D, Lindqvist Hansen D, Madsbad S, Holst J.J (2012) Acute and long-term effects of Roux-en-Y gastric bypass on glucose metabolism in subjects with Type 2 diabetes and normal glucose tolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 303(1):E122-31.
- Johansson L.E**, Danielsson A.P, Parikh H, Klintonberg M, Norström F, Groop L, Ridderstråle M (2012) Differential gene expression in adipose tissue from obese human subjects during weight loss and weight maintenance. *Am J Clin Nutr*. 96(5):196-207.
- Jørgensen N.B**, Jacobsen S.H, Dirksen C, Bojsen-Møller K.N, Naver L, Hvolris L, Clausen T.R, Wulff B.S, Worm D, Lindqvist Hansen D, Madsbad S, Holst J.J (2012) Acute and long-term effects of Roux-en-Y gastric bypass on glucose metabolism in subjects with Type 2 diabetes and normal glucose tolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 303(1):E122-31.
- Kashyap S.R**, Daud S, Kelly K.R, Gastaldelli A, Win H, Brethauer S, Kirvan J.P, Schauer P.R (2010) Acute effects of gastric bypass versus gastric restrictive surgery on  $\beta$ -cell function and insulinotropic hormones in severely obese patients with type 2 diabetes. *Int J Obes*. 34(3):462-471.
- Kaplan N.M**. (1989) The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med*. 149(7):1514-20.
- Kasai T**, Floras J.S, Bradley T.D (2012) Sleep apnea and cardiovascular disease: a bidirectional relationship. *Circulation*. 126(12):1495-510.
- Kazlauskas A**. (2014) Plakophilin-2 promotes activation of epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol*. 34:3778-9.
- Khan T**, Muise E.S, Iyengar P, Wang Z.V, Chandalia M, Abate N, Zhang B.B, Bonaldo P, Chua S, Scherer P.E (2009) Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol Cell Biol*. 29(6):1575-91.
- Kim J.K**. (2009) Hyperinsulinemic-euglycemic clamp to assess insulin sensitivity in vivo. *Methods in Molecular Biology*. 560(2): 221-38.



- Kirkham T.C.**, Tucci S.A (2006) Endocannabinoids in appetite control and the treatment of obesity. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 5(3):275–292.
- Kissebah, A.H.** and Krakower G.R (1994) Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev*. 74(4):761-811.
- Klein B.E.**, Klein R, Linton K.L (1992) Intraocular pressure in an American community. The Beaver Dam Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 33(7):2224–8.
- Klüter T.**, Fitschen-Oestern S, Lippross S, Weuster M, Mentlein R, Steubesand N, Neunaber C, Hildebrand F, Pufe T, Tohidnezhad M, Beyer A, Seekamp A, Varoga D (2014) The antimicrobial peptide lysozyme is induced after multiple trauma. *Mediators Inflamm*. 2014:303106.
- Kobori N.**, Clifton G.L, Dash P (2002) Altered expression of novel genes in the cerebral cortex following experimental brain injury. *Brain Res Mol Brain Res*. 104(1):148–158.
- Koehestanie P.**, de Jonge C, Berends F.J, Janssen I.M, Bouvy N.D, Greve J.W (2014) The effect of the endoscopic duodenal-jejunal bypass liner on obesity and type 2 diabetes mellitus, a multicenter randomized controlled trial. *Ann Surg*. 260(6):984-92.
- Kohli R.**, Bradley D, Setchell K.D, Eagon J.C, Abumrad N, Klein S (2013) Weight loss induced by Roux-en-Y gastric bypass but not laparoscopic adjustable gastric banding increases circulating bile acids. *J Clin Endocrinol Metab*. 98(4):E708-12.
- Kong L.C.**, Tap J, Aron-Wisnewskey J, Pelloux V, Basdevant A, Bouillot J.L, Zucker J.D, Doré J, Clément K (2013) Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. *Am J Clin Nutr*. 98(1):16-24.
- Krammer J.**, Digel M, Eehalt F, Stremmel W, Füllekrug J, Eehalt R (2011) Overexpression of CD36 and acyl-CoA synthetases FATP2, FATP4 and ACSL1 increases fatty acid uptake in human hepatoma cells. *Int J Med Sci*. 8(7):599-614.
- Kremen A.J.**, Linner J.H, Nelson C.H (1954) An experimental evaluation of the nutritional importance of proximal and distal small intestine. *Ann Surg*. 140(3):439-48.
- Kranendonk M.E.**, van Herwaarden J.A, Stupkova T, Jager W, Vink A, Moll F.L, Kalkhoven E, Visseren F.L (2015) Inflammatory characteristics of distinct abdominal adiposetissue depots relate differently to metabolic risk factors for cardiovascular disease: Distinct fat depots and vascular risk factors. *Atherosclerosis*. 239(2):419-427.
- Kulkarni N.H.**, Karavanich C.A., Atchley W.R., Anholt R.R (2000) Characterization and differential expression of a human gene family of olfactomedin-related proteins. *Genet. Res*. 76(1):41–50.

**Kunutsor S.K**, Apekey T.A, Walley J, Kain K (2013) Ferritin levels and risk of type 2 diabetes mellitus: an updated systematic review and meta-analysis of prospective evidence. *Diabetes Metab Res Rev.* 29:308–318.

**Kyle U.G**, Bosaeus I, De Lorenzo A.D, Deurenberg P, Elia M, Gómez J.M, Heitmann B.L, Kent-Smith L, Melchior J.C, Pirlich M, Scharfetter H, Schols A.M, Pichard C (2004) Composition of the ESPEN Working Group. Bioelectrical impedance analysis--part I: review of principles and methods. *Clin Nutr.* 23(5):1226-43.

**Kyle U.G**, Bosaeus I, De Lorenzo A.D, Deurenberg P, Elia M, Manuel Gómez J, Lilienthal Heitmann B, Kent-Smith L, Melchior J.C, Pirlich M, Scharfetter H, Schols A, Pichard C (2004) Bioelectrical impedance analysis-part II: utilization in clinical practice. *Clin Nutr.* 23(6):1430-53.

**Kim JK** (2009) Hyperinsulinemic-euglycemic clamp to assess insulin sensitivity in vivo. *Methods in Molecular Biology.* 560: 221-38.

**Lago, F**, Gomez R, Conde J, Scotece M, Gómez-Reino J.J, Gualillo O (2009) Cardiometabolic comorbidities and rheumatic diseases: Focus on the role of fat mass and adipokines. *Arthritis Care Res.* 43(1):11-8

**Lebovitz H.E** (2002) Insulin resistance and the insulin resistance syndrome. *Clinician's Manual on insulin resistance.* Science Press. 1-5.

**Le Chatelier E**, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto J.M, Kennedy S, Leonard P, Li J, Burgdorf K, Grarup N, Jørgensen T, Brandslund I, Nielsen H.B, Juncker A.S, Bertalan M, Levenez F, Pons N, Rasmussen S, Sunagawa S, Tap J, Tims S, Zoetendal E.G, Brunak S, Clément K, Doré J, Kleerebezem M, Kristiansen K, Renault P, Sicheritz-Ponten T, de Vos W.M, Zucker J.D, Raes J, Hansen T; MetaHIT consortium, Bork P, Wang J, Ehrlich S.D, Pedersen O (2013) Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature.* 500(7464):541-546.

**Lee J. A**, Anholt R. R, Cole G. J (2008) Olfactomedin-2 mediates development of the anterior central nervous system in zebrafish. *Mech. Dev.* 125(1-2):167–181.

**Lee M.J**, Wu Y, Fried S.K (2013) Adiposetissue heterogeneity: implication of depot differences in adiposetissue for obesity complications. *Mol Aspects Med.* 34(1):1-11.

**Lee Y.H**, Nair S, Rousseau E, Allison D.B, Page G.P, Tataranni P.A, Bogardus C, Permana P.A (2005) Microarray profiling of isolated abdominal subcutaneous adipocytes from obese vs nonobese Pima Indians: increased expression of inflammation-related genes. *Diabetologia.* 48(9):1776–1783.

- Lefebvre A.M**, Laville M, Vega N, Riou J.P, van Gaal L, Auwerx J, Vidal H (1998) Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes*. 47(1): 98-103.
- Liu W**, Chen L, Zhu J, Rodgers G.P (2006) The glycoprotein hGC-1 binds to cadherin and lectins. *Exp. Cell Res*. 312(10):1785–1797.
- Mason E.E**, Ito C (1969) Gastric bypass. *Ann Surgery*. 170(3): 329-339.
- Mathieu P**, Boulanger M.C, Després J.P (2014) Ectopic visceral fat: a clinical and molecular perspective on the cardiometabolic risk. *Rev Endocr Metab Disord*. 15(4):289-98.
- McCulloch L.J**, Rawling T.J, Sjöholm K, Franck N, Dankel S.N, Price E.J, Knight B, Liversedge N.H, Mellgren G, Nystrom F, Carlsson L.M, Kos K (2015) COL6A3 is regulated by leptin in human adipose tissue and reduced in obesity. *Endocrinology*. 156(1):134-46.
- McGrath J.A** and Mellerio J.E (2010) Ectodermal dysplasia-skin fragility syndrome. *Dermatol Clin*. 28(1):125–9.
- Melton E.M**, Cerny R.L, Watkins P.A, DiRusso C.C, Black P.N (2011) Human fatty acid transport protein 2a/very long chain acyl-CoA synthetase 1 (FATP2a/Acsvl1) has a preference in mediating the channeling of exogenous n-3 fatty acids into phosphatidylinositol. *J Biol Chem*. 286(35):30670–30679.
- Mihalik S.J**, Steinberg S.J, Pei Z, Park J, Kim D.G, Heinzer A.K, Dacremont G, Wanders R.J, Cuebas D.A, Smith K.D, Watkins P.A (2002) Participation of two members of the very long-chain acyl-CoA synthetase family in bile acid synthesis and recycling. *J Biol Chem*. 277(27):24771–24779
- Mingrone G**, Panunzi S, De Gaetano A, Guidone C, Iaconelli A, Leccesi L, Nanni G, Pomp A, Castagneto M, Ghirlanda G, Rubino F (2012) Bariatric surgery versus conventional medical therapy for type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 366(17):1577-85.
- Mishima T**, Miner J.H, Morizane M, Stahl A, Sadovsky Y (2011) The expression and function of fatty acid transport protein-2 and -4 in the murine placenta. *PLoS One*. 6(10):e25865.
- Montague C.T**, Prins J.B, Sanders L, Digby J.E, O'Rahilly S (1997) Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes*. 46(3): 342-7.
- Moratz C**, Hayman J.R, Gu H, Kehrl J.H (2004) Abnormal B-cell responses to chemokines, disturbed plasma cell localization, and distorted immune tissue architecture in Rgs1<sup>-/-</sup> mice. *Mol Cell Biol*. 24(13): 5767–5775.

- Moratz C**, Kang V.H, Druey K.M, Shi C.S, Scheschonka A, Murphy P.M, Kozasa T, Kehrl J.H (2000) Regulator of G protein signaling 1 (RGS1) markedly impairs Gi alpha signaling responses of B lymphocytes. *J Immuno.* 1164(4) :1829 –1838.
- Moreira S**, Correia M., Soares P, Máximo V (2011) GRIM-19 function in cancer development. *Mitochondrion.* 11(5): 693–699.
- Moreno-Navarrete J.M**, Novelle M.G, Catalán V, Ortega F, Moreno M, Gomez-Ambrosi J, Xifra G, Serrano M, Guerra E, Ricart W, Frühbeck G, Diéguez C, Fernández-Real J.M (2014) Insulin resistance modulates iron-related proteins in adipose tissue. *Diabetes Care.* 37:1092-100.
- Nakaya N**, Sultana A, Munasinghe J, Cheng A, Mattson M.P, Tomarev S.I (2013) Deletion in the N-terminal half of olfactomedin 1 modifies its interaction with synaptic proteins and causes brain dystrophy and abnormal behavior in mice. *Exp Neurol.* 250:205-18.
- Niedziela J**, Hudzik B, Niedziela N, Gąsior M, Gierlotka M, Wasilewski J, Myrda K, Lekston A, Poloński L, Rozentryt P (2014) The obesity paradox in acute coronary syndrome: a meta-analysis. *Eur J Epidemiol.* 29(11):801-12.
- O'Brien C.L**, Pavli P, Gordon D.M, Allison G.E (2014) Detection of bacterial DNA in lymph nodes of Crohn's disease patients using high throughput sequencing. *Gut.* 63(10):1596-606.
- Olufadi R** and Byrne C.D (2008) Clinical and laboratory diagnosis of the metabolic syndrome. *J Clin Pathol.* 61(6): 697-706.
- Ortega F.J**, Mayas D, Moreno-Navarrete J.M (2010) The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. *Obesity (Silver Spring).* 18:13–20
- Peral B**, Camafeita E, Fernández-Real J.M, López J.A (2009) Tackling the human adipose tissue proteome to gain insight into obesity and related pathologies. *Expert Rev Proteomics.* 6(4): 353-61.
- Perez-Perez R**, Ortega-Delgado F.J, García-Santos E, López J.A, Camafeita E, Ricart W, Fernández-Real J.M, Peral B (2009) Differential proteomics of omental and subcutaneous adipose tissue reflects their unlike biochemical and metabolic properties. *J Proteome Res.* 8(4): 1682-93.
- Perusse L**, Rankinen T, Zuberi A, Chagnon Y.C, Weisnagel S.J, Argyropoulos G, Walts B, Snyder E.E, Bouchard C (2005) The human obesity gene map: the 2004 update. *Obes Res.* 13(3):381-490.
- Picot J**, Jones J, Colquitt J.L, Gospodarevskaya E, Loveman E, Baxter L, Clegg A.J (2002) The clinical effectiveness and cost-effectiveness of surgery for people with morbid obesity: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 6(12): 1-153.

**Porjes W.J**, MacDonald K.G Jr, Flickinger E.G, Dohm G.L, Sinha M.K, Barakat H.A, May H.J, Khazanie P, Swanson M.S, Morgan E (1992) Is type II diabetes mellitus (NIDDM) a surgical disease? *Ann Surg.* 215(6):633-42.

**Porjes W.J**, Caro J.F, Flickinger E.G, Meelheim H.D, Swanson M (1987) The control of diabetes mellitus (NIDDM) in the morbidly obese with the Greenville Gastric Bypass. *Ann. Surg.* 206(3): 316–323.

**Porjes W.J**, MacDonald K.G Jr, Morgan E.J, Sinha M.K, Dohm G.L, Swanson M.S, Barakat H.A, Khazanie P.G, Leggett-Frazier N, Long S.D (1992) Surgical treatment of obesity and its effect on diabetes: 10-y follow-up. *Am J Clin Nutr.* 55(2 Suppl):582S-585S.

**Pradhan A** (2007) Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: inflammatory basis of glucose metabolic disorders. *Nutr Rev.* 65(12 Pt 2):S152-6.

**Promintzer-Schifferl M**, Prager G, Anderwald C, Mandl M, Esterbauer H, Shakeri-Leidenmühler S, Pacini G, Stadler M, Bischof MG, Ludvik B, Luger A, Krebs M (2011) Effects of gastric bypass surgery on insulin resistance and insulin secretion in nondiabetic obese patients. *Obesity (Silver Spring).* 19(7):1420-6.

**Rasmussen T.B**, Nissen P.H, Palmfeldt J, Gehmlich K, Dalager S, Jensen U.B, Kim W.Y, Heickendorff L, Mølgaard H, Jensen H.K, Baandrup U.T, Bross P, Mogensen J (2014) Truncating plakophilin-2 mutations in arrhythmogenic cardiomyopathy are associated with protein haploinsufficiency in both myocardium and epidermis. *Circ Cardiovasc Genet.*7(3):230-40.

**Ribaric G**, Buchwald J.N, McGlennon T.W (2014) Diabetes and weight in comparative studies of bariatric surgery vs conventional medical therapy: a systematic review and meta-analysis. *Obes Surg.* 24(3):437-55.

**Rodriguez A**, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G (2007) Visceral and subcutaneous adiposity: are both potential therapeutic targets for tackling the metabolic syndrome? *Curr Pharm Des.* 13(21): 2169-75.

**Rubino F**, Gagner M, Gentileschi P, Kini S, Fukuyama S, Feng J, Diamond E (2004) The early effect of the Roux-en-Y gastric bypass on hormones involved in body weight regulation and glucose metabolism. *Ann Surg.* 240(2):236–242.

**Rubio C.A** (2014) The Natural Antimicrobial Enzyme Lysozyme is Up-Regulated in Gastrointestinal Inflammatory Conditions. *Pathogens.* 3(1): 73-92.

**Ryo M**, Maeda K, Onda T, Katashima M, Okumiya A, Nishida M, Yamaguchi T, Funahashi T, Matsuzawa Y, Nakamura T, Shimomura I (2005) A new simple method for the measurement of visceral fat accumulation by bioelectrical impedance. *Diabetes Care.* 28(2): 451-3.

- Salinari S**, Bertuzzi A, Guidone C, Previti E, Rubino F, Mingrone G (2013) Insulin sensitivity and secretion changes after gastric bypass in normotolerant and diabetic obese subjects. *Ann Surg.* 257(3):462-8.
- Sarfarazi, M.** (1997) Recent advances in molecular genetics of glaucomas. *Human Molecular Genetics.*6(10):1667±1677.
- Schaffer J.E**, Lodish H.F (1994) Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell.* 79(3):427–436.
- Schena M**, Shalon D, Davis R.W, Brown P.O (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 270(5235):467-70.
- Scheuer S.H**, Færch K, Philipsen A, Jørgensen M.E, Johansen N.B, Carstensen B, Witte D.R, Andersen I, Lauritzen T, Andersen G.S (2015) Abdominal Fat Distribution and **Cardiovascular** Risk in Men and Women With Different Levels of Glucose Tolerance. *J Clin Endocrinol Metab.* 100:3340-7.
- Schioth H.B** (2006) G protein-coupled receptors in regulation of body weight. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 5(6):241-249.
- Schmuth M**, Ortegon A.M, Mao-Qiang M, Elias P.M, Feingold K.R, Stahl A (2005) Differential expression of fatty acid transport proteins in epidermis and skin appendages. *J Invest Dermatol.* 125(6):1174-1181.
- Schwingshackl L**, Dias S, Hoffmann G (2014) Impact of long-term lifestyle programmes on weight loss and cardiovascular risk factors in overweight/obese participants: a systematic review and network meta-analysis. *Syst Rev.* 3:130.
- Sklyarova T**, Bonné S, D'Hooge P, Denecker G, Goossens S, De Rycke R, Borgonie G, Bösl M, van Roy F, van Hengel J (2008) Plakophilin-3 -deficient mice develop hair coat abnormalities and are prone to cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol.* 128(6):1375–85.
- Smith U** (2015) Abdominal obesity: a marker of ectopic fat accumulation. *J Clin Invest.* 125(5):1790-2.
- Snyder D.A**, Rivers A.M, Yokoe H, Menco B.P, Anholt R.R (1991) Olfactomedin: purification, characterization and localization of a novel olfactory glycoprotein. *Biochemistry.* 30(38): 9143–9153.
- Stegenga H**, Haines A, Jones K, Wilding J, Guideline Development Group (2014) Identification, assessment, and management of overweight and obesity: summary of updated NICE guidance. *BMJ.* 27;349:g6608.

- Still C.D**, Wood G.C, Benotti P, Petrick A.T, Gabrielsen J, Strodel W.E, Ibele A, Seiler J, Irving B.A, Celaya M.P, Blackstone R, Gerhard G.S, Argyropoulos G (2014) Preoperative prediction of type 2 diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a retrospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2(1):38-45.
- Sultana A**, Nakaya N, Senatorov V.V, Tomarev S.I (2011) Olfactomedin 2: Expression in the Eye and Interaction with Other Olfactomedin Domain-Containing Proteins. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 52(5):2584-92.
- Sultana A**, Nakaya N, Dong L, Abu-Asab M, Qian H, Tomarev S.I (2014) Deletion of olfactomedin 2 induces changes in the AMPA receptor complex and impairs visual, olfactory, and motor functions in mice. *Exp Neurol.* 261:802-11.
- Svensson M**, Venge P, Janson C, Lindberg E (2012) Relationship between sleep-disordered breathing and markers of systemic inflammation in women from the general population. *J Sleep Res.* 21(2):147-54.
- Tam C.S**, Covington J.D, Ravussin E, Redman L.M, Pennington CALERIE Team (2012) Little evidence of systemic and adipose tissue inflammation in overweight individuals. *Front Genet.* 3:58.
- Tan C.S**, Ting W.S, Mohamad M.S, Chan W.H, Deris S, Shah Z.A (2014) A review of feature extraction software for microarray gene expression data. *Biomed Res Int.* 2014:213656.
- Tchernof A**, Després J.P (2013) Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev.* 93(1):359-404.
- Tchernof A**, Bélanger C, Morisset A.S, Richard C, Mailloux J, Laberge P, Dupont P (2006) Regional differences in adipose tissue metabolism in women: minor effect of obesity and body fat distribution. *Diabetes.* 55(5): 1353-60.
- Thiebaud N**, Johnson M.C, Butler J.L, Bell G.A, Ferguson K.L, Fadool A.R, Fadool J.C, Gale A.M, Gale D.S, Fadool D.A (2014) Hyperlipidemic diet causes loss of olfactory sensory neurons, reduces olfactory discrimination, and disrupts odor-reversal learning. *J Neurosci.* 34(20):6970-84.
- Timmons, J.A.** and Sundberg C.J (2006) Oligonucleotide microarray expression profiling: human skeletal muscle phenotype and aerobic exercise training. *IUBMB Life.* 58(1): 15-24.
- Toubal A**, Clement K, Fan R, Ancel P, Pelloux V, Rouault C, Veyrie N, Hartemann A, Treuter E, Venteclef N (2013) SMRT-GPS2 corepressor pathway dysregulation coincides with obesity-linked adipocyte inflammation. *J Clin Invest.* 123(1):362-79.

- Torrado M**, Trivedi R, Zinovieva R, Karavanova I, Tomarev S.I (2002) Optimedlin: a novel olfactomedin-related protein that interacts with myocilin. *Hum Mol Genet.* 11(11):1291-301.
- Tunaru S**, Kero J, Schaub A, Wufka C, Blaukat A, Pfeiffer K, Offermanns S (2003) PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nat Med.* 9(3):352-355.
- Turner R.C**, Holman R.R, Matthews D, Hockaday T.D, Peto J (1979) Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes: estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations. *Metabolism.* 28(11):1086-96.
- Vague J** (1947) La differenciation sexuelle, facteur determinant des formes de l' obesite. *Presse Med.* 55(30):339.
- Vijgen G.H**, Bouvy N.D, Teule G.J, Brans B, Hoeks J, Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt W.D (2012) Increase in brown adipose tissue activity after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 97(7):E1229-33.
- Virtue S**, Vidal-Puig A (2010) Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the metabolic syndrome—an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta.* 1801:338–349 39.
- Vohl M.C**, Sladek R, Robitaille J, Gurd S, Marceau P, Richard D, Hudson T.J, Tchernof A (2004) A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res.* 12(8): 1217-22.
- WHO**, World Health Organ Tech Rep Ser (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. 894:i-xii, 1-253.
- Wolf A**, Rietscher K, Glab M, Hüttelmaier S, Schutkowski M, Ihling C, Sinz A, Wingenfeld A, Mun A, Hatzfeld M (2013) Insulin signaling via Akt2 switches plakophilin 1 function from stabilizing cell adhesion to promoting cell proliferation. *Journal of Cell Science.* 126(8), 1832–1844.
- Wood L.D**, Parsons D.W, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary R.J, Shen D, Boca S.M, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ustyanksky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Karchin R, Wilson P.A, Kaminker J.S, Zhang Z, Croshaw R, Willis J, Dawson D, Shipitsin M, Willson J.K, Sukumar S, Polyak K, Park B.H, Pethiyagoda C.L, Pant P.V, Ballinger D.G, Sparks A.B, Hartigan J, Smith D.R, Suh E, Papadopoulos N, Buckhaults P, Markowitz S.D, Parmigiani G, Kinzler K.W, Velculescu V.E, Vogelstein B (2007) The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science.* 318(5853):1108–1113
- Yanovski S.Z** and Yanovski J.A (2014) Long-term drug treatment for obesity: a systematic and clinical review. *JAMA.* 311(1):74-86.



- Yazaki M**, Farrell S.A, Benson M.D (2003) A novel lysozyme mutation Phe57Ile associated with hereditary renal amyloidosis. *Kidney Int.* 63(5): 1652–1657.
- Zarrinpar A** and Loomba R (2012) Review article: the emerging interplay among the gastrointestinal tract, bile acids and incretins in the pathogenesis of diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 36(10):909-21.
- Zechmeister-Koss I**, Huić M, Fischer S, European Network for Health Technology Assessment (EUnetHTA) (2014) The duodenal-jejunal bypass liner for the treatment of type 2 diabetes mellitus and/or obesity: a systematic review. *Obes Surg.* 24(2):310-23.
- Zemliakova Z.M** and Kravets E.B (1979) Comparison of the clinical and immunological indices in children with diabetes mellitus and obesity. *Probl Endokrinol (Mosk).* 25(2):25-8.
- Zeng L.C**, Han Z.G, Ma W.J (2005) Elucidation of subfamily segregation and intramolecular coevolution of the olfactomedin-like proteins by comprehensive phylogenetic analysis and gene expression pattern assessment. *FEBS Lett.* 579(25): 5443–5453.
- Zhang X**, Huang Q, Yang Z, Li Y, Li C.Y (2004) GW112, a novel antiapoptotic protein that promotes tumor growth. *Cancer Res.* 64(7): 2474–2481.
- Zhao Z**, Li S, Liu G (2012). Body iron stores and heme-iron intake in relation to risk of type 2 diabetes: a systematic review and metaanalysis. *PLoS ONE.* 7:e41641 20.
- Zhu X.J**, Yang Z.F, Chen Y, Wang J, Rosmarin A.G (2012) PU.1 is essential for CD11c expression in CD8(+)/CD8(-) lymphoid and monocyte-derived dendritic cells during GM-CSF or FLT3L-induced differentiation. *PLoS One.* 7(12):e52141.

## 9. ANEXES

---



## 9.1. Document d'aprovació comitè ètic d'investigació clínica



Avinguda de França s/n  
17007 Girona  
Telèfon 972 940 200  
www.gencat.net/ics/trueta

**Marta Riera Juncà, Secretària del Comitè Ètic d' Investigació Clínica de l'Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta, amb domicili a Av. de França s/n 17007 Girona**

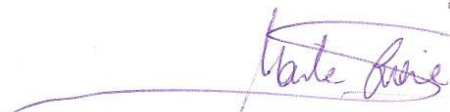
### CERTIFICA:

Que el Comitè Ètic d' Investigació Clínica de l'Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta, segons consta en l'acta de la reunió celebrada el dia 22/07/2013 ha avaluat el projecte següent:

**"Estudio de la mejora en la sensibilidad a la insulina a través de los cambios genómicos inducidos por la cirugía bariátrica en el tejido adiposo y los microRNAs circulantes"** amb el Dr. José Manuel Fernández-Real, com a investigador principal.

Que el document s'ajusta a les normes ètiques essencials i per tant, ha decidit la seva aprovació.

I, perquè consti, expedixo aquest certificat.

  
Hospital Universitari de Girona  
Doctor Josep Trueta  
Comitè Ètic  
d'Investigació Clínica  
Institut Català de la Salut

Girona, 27 de setembre de 2013



## 9.2. Activitat del doctorant en la investigació del teixit adipós.

### 9.2.1. Articles indexats a pubmed.

Metabolomics uncovers the role of adipose tissue PDXK in adipogenesis and systemic insulin sensitivity.

Moreno-Navarrete JM, Jove M, Ortega F, **Xifra G**, Ricart W, Obis È, Pamplona R, Portero-Otin M, Fernández-Real JM.

**Diabetologia.**

2016

Adipose tissue R2\* signal is increased in subjects with obesity: A preliminary MRI study.

Manuel Fernández-Real J, Blasco G, Puig J, Moreno M, **Xifra G**, Sánchez-Gonzalez J, Maria Alustiza J, Pedraza S, Ricart W, María Moreno-Navarrete J.

**Obesity** (Silver Spring).

2016

Obesity is associated with gene expression and imaging markers of iron accumulation in skeletal muscle.

Moreno-Navarrete JM, Blasco G, **Xifra G**, Karczewska-Kupczewska M, Stefanowicz M, Matulewicz N, Puig J, Ortega F, Ricart W, Straczkowski M, Fernández-Real JM.

**J Clin Endocrinol Metab.**

2016

CISD1 in association with obesity-associated dysfunctional adipogenesis in human visceral adiposetissue.

Moreno-Navarrete JM, Moreno M, Ortega F, Sabater M, **Xifra G**, Ricart W, Fernández-Real JM.

**Obesity** (Silver Spring).

2016

Bariatric surgery acutely changes the expression of inflammatory and lipogenic genes in obese adipose tissue.

Ortega FJ, Vilallonga R, **Xifra G**, Sabater M, Ricart W, Fernández-Real JM.

**Surg Obes Relat Dis.**

2015

Surgery-induced weight loss is associated with the downregulation of genes targeted by microRNAs in adipose tissue.

Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Nonell L, Puigdecamet E, Rodriguez-Hermosa JJ, Rovira O, **Xifra G**, Guerra E, Moreno M, Mayas D, Moreno-Castellanos N, Fernández-Formoso JA, Ricart W, Tinahones FJ, Torrents D, Malagón MM, Fernández-Real JM.

**J Clin Endocrinol Metab.**

2015

PRDM16 sustains white fat gene expression profile in human adipocytes in direct relation with insulin action.

Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Moreno M, **Xifra G**, Ricart W, Fernández-Real JM.

**Mol Cell Endocrinol.**

2015

Deleted in breast cancer 1 plays a functional role in adipocyte differentiation.

Moreno-Navarrete JM, Moreno M, Vidal M, Ortega F, Serrano M, **Xifra G**, Ricart W, Fernández-Real JM.

**Am J Physiol Endocrinol Metab.**

2015

Cytosolic aconitase activity sustains adipogenic capacity of adipose tissue connecting iron metabolism and adipogenesis.

Moreno M, Ortega F, **Xifra G**, Ricart W, Fernández-Real JM, Moreno-Navarrete JM.

**FASEB J**

2015

Insulin resistance modulates iron-related proteins in adipose tissue.

Moreno-Navarrete JM, Novelle MG, Catalán V, Ortega F, Moreno M, Gomez-Ambrosi J, **Xifra G**, Serrano M, Guerra E, Ricart W, Frühbeck G, Diéguez C, Fernández-Real JM.

**Diabetes Care.**

2014

A role for adipocyte-derived lipopolysaccharide-binding protein in inflammation- and obesity-associated adipose tissue dysfunction.

Moreno-Navarrete JM, Escoté X, Ortega F, Serino M, Campbell M, Michalski MC, Laville M, **Xifra G**, Luche E, Domingo P, Sabater M, Pardo G, Waget A, Salvador J, Giralt M, Rodriguez-Hermosa JJ, Camps M, Kolditz CI, Viguerie N, Galitzky J, Decaunes P, Ricart W, Frühbeck G, Villarroya F, Mingrone G, Langin D, Zorzano A, Vidal H, Vendrell J, Burcelin R, Vidal-Puig A, Fernández-Real JM.

**Diabetologia**

2013















