



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Cambios genéticos y epigenéticos en un modelo animal post cirugía bariátrica

TESIS DOCTORAL

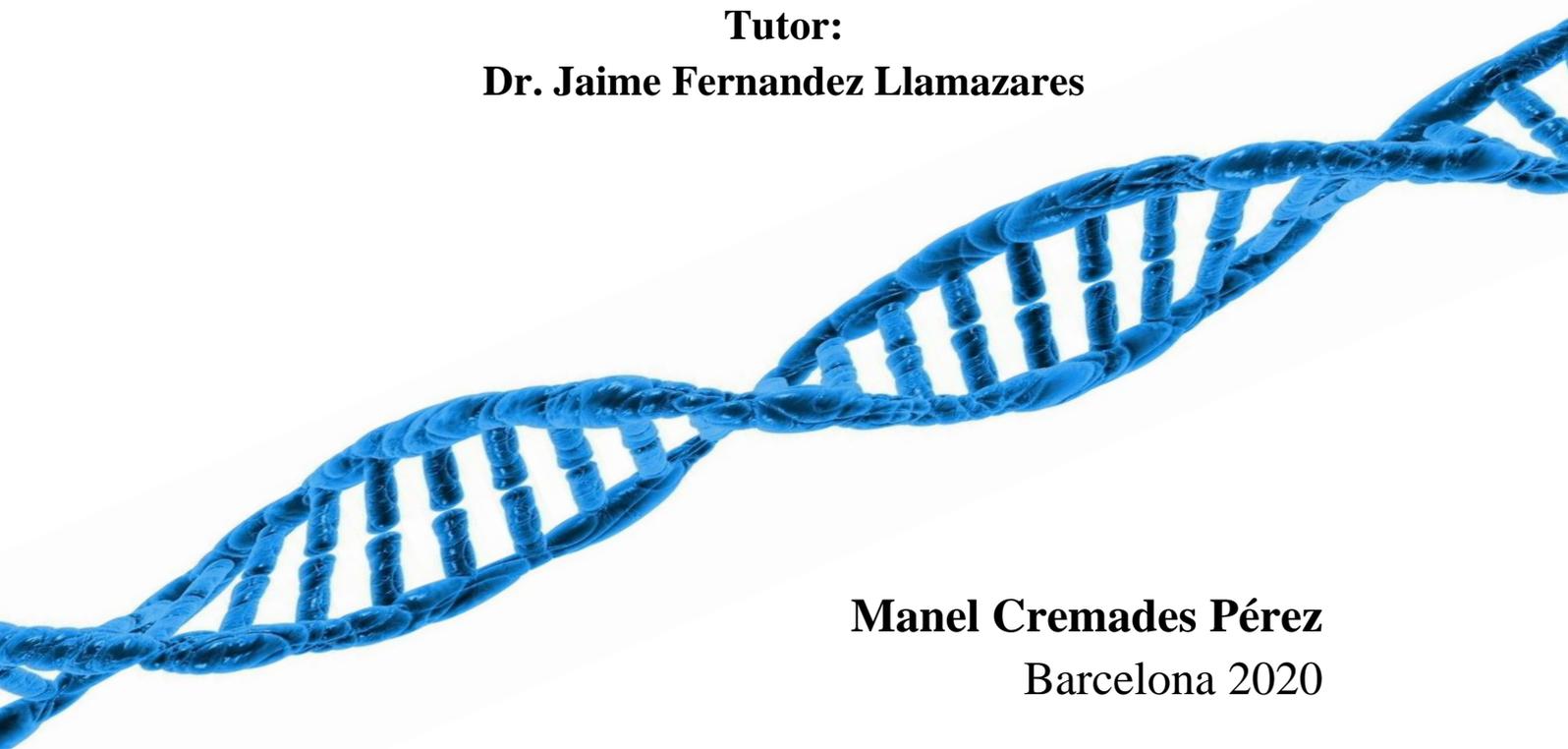
Directores:

Dr. Jaime Fernandez Llamazares

Dr. José Balibrea del Castillo

Tutor:

Dr. Jaime Fernandez Llamazares



Manel Cremades Pérez

Barcelona 2020

Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Cirugía

Programa de Doctorado en Cirugía y Ciencias Morfológicas



Universitat Autònoma de Barcelona

Cambios genéticos y epigenéticos en un modelo animal post cirugía bariátrica

Doctorando:

Manel Cremades Pérez

Directores:

Dr. Jaime Fernandez Llamazares

Dr. Jose María Balibrea del Castillo

Tutor:

Dr. Jaime Fernandez Llamazares

Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Cirugía

Programa de Doctorado en Cirugía y Ciencias Morfológicas



Agradecimientos

“Los logros de una organización son los resultados del esfuerzo combinado de cada individuo”, Vince Lombardi.

Si esta frase es cierta de forma general, en el caso de este trabajo se puede aplicar en toda su extensión. Haber llegado al final de este camino es gracias a la colaboración de un gran número de personas, cada una realizando aportaciones muy diferentes.

Quiero empezar mi agradecimiento haciendo referencia a mis directores y tutores de tesis, el Dr. Jose Maria Balibrea del Castillo y el Dr. Jaime Fernandez Llamazares. Ambos han sido necesarios en la planificación, seguimiento y guía de este proyecto, sabiendo mediante su experiencia y saber hacer, ayudarme a sortear y superar las dificultades que se han ido presentando, que no han sido pocas.

Sin embargo, si nos centramos en el aspecto más práctico, existe un grupo de personas con las que compartimos muchas horas, gran parte de ellas en horarios poco agradecidos, que incluyen tardes, noches y fines de semana, y que han sido imprescindibles para el desarrollo del proyecto. Se trata de Eider Talavera, Sergi Recasens, Anna Garcia y Marc Beisani. Gracias por vuestro esfuerzo a mi lado pues, de no ser así, no podría haber completado la cantidad de trabajo que el proyecto requería.

Además de ellos, no puedo dejar de agradecer la colaboración de Mireia Jordà, Edurne Pedrosa y la Dra. Silvia Pellitero junto con el equipo de profesionales del Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol. Sin duda, hay que destacar también su gran aportación en el proyecto.

Pero más allá del equipo puramente “laboral” existe otro equipo que iguala o supera en importancia a este primero. Se trata de todas aquellas personas cercanas que no colaboran directamente en el desarrollo del proyecto pero que, gracias a ellas, uno mantiene las fuerzas y el ánimo para llevarlo a cabo.

En este apartado, obligatoriamente, tengo que destacar un especial agradecimiento para mi familia. Mi madre, mi padre, Isabel y mis tres hermanos, Jordi, Xavier y Aleix me han brindado constantemente su apoyo además de ser un modelo a seguir. De esta forma, ha

sido mucho más fácil avanzar e ir completando etapa tras etapa de esta larga aventura. Soy lo que soy gracias a vosotros.

En este grupo también se encuentra mi pareja, la Dra. Ariadna Aguilar. No solamente ha estado allí siempre que la he necesitado, sino que ha tenido que soportar mis intensas jornadas de trabajo y el malhumor que, a veces, aparece cuando las cosas no salen como uno espera. Ella ha sido la compañera perfecta y necesaria para este viaje. Sin duda, una parte de esta tesis, de cómo está hecha, moldeada y de lo que transmite, es tuya. Siempre te estaré agradecido.

Por último, hay un tercer grupo de personas, que se sitúan entre el ámbito laboral y personal, que también forman parte del éxito del proyecto. Me refiero a mis compañeros de trabajo.

Debo empezar por el Dr. Joan Francesc Julián. A él le debo haber tenido la oportunidad, gracias a que confió en mi cuando acabé la residencia, de poder seguir trabajando con un grupo de profesionales extraordinarios. Además, pocas personas han sido tan constantes y me han brindado tanto soporte como lo ha hecho él. Sin duda, le debo también un sincero agradecimiento.

En el mismo sentido ha actuado siempre el Dr. David Parés, quien ha sabido desde un principio incentivarme para completar, exitosamente, este trabajo.

También quiero expresar mi agradecimiento a mis compañeros de servicio y residentes, a todos ellos, con especial énfasis para los Dr. Franc Espin, Dr. Jordi Navinés y Dr. Fernando Pardo. Difícilmente hubiera sido posible llevar a cabo una tesis como esta sin su ayuda y su colaboración.

Finalmente, agradezco a todos aquellos que no enumero pero que también me han apoyado a lo largo del camino. Como expresa la frase inicial, este logro es el resultado de unir todos los esfuerzos.

Barcelona, Enero 2020

Índice

Abreviaturas	7
Tablas y Figuras	11
Resumen.....	13
Introducción	17
Sobrepeso y obesidad	19
La obesidad: Una enfermedad relevante.....	22
Una enfermedad multifactorial	25
Genética vs factores ambientales	25
Denominador de la ecuación: Gasto energético.....	26
Numerador de la ecuación: Ingesta alimentaria	28
Regulación del metabolismo energético	29
Leptina	30
Grelina.....	33
Adiponectina	34
Glucagon Like Peptide 1	35
Visfatina	35
Proteína asociada al tejido graso y la obesidad.....	36
Insulina.....	36
Sustrato del Receptor de la Insulina 1	38
Glucagón	39
Ácido Graso Sintasa	41
Receptores activados por proliferadores de peroxisomas	41
Regulación del estado inflamatorio	42
El proceso inflamatorio	42
Relación estado inflamatorio – obesidad	46
Genética y epigenética en la obesidad	49
Genética	49
Epigenética.....	53
Tratamientos y sus resultados.....	58
La dieta como tratamiento de la obesidad.....	59
El tratamiento farmacológico	72
Cirugía bariátrica, el tratamiento actual realmente eficaz	75
Hipótesis del estudio	85
Objetivos.....	89

Material y Métodos	93
Muestra	95
El modelo experimental.....	96
Estructura del proyecto.....	97
Variables en estudio	103
Muestras analizadas.....	104
Análisis epigenético y de la expresión genética.....	106
Análisis de la expresión genética.....	106
Análisis del estado epigenético.....	107
Recopilación y análisis de datos	109
Resultados	111
Resultados de las intervenciones	113
Estudio de la variación ponderal	116
Esquema de los estudios ponderales realizados	116
Estudio de la distribución y similitud de los grupos	119
Comparación del peso medio de los grupos antes y después de las intervenciones	121
Comparación del peso medio entre los grupos antes y después de las intervenciones	125
Estudio de la expresión y metilación de genes	130
Resultados de expresión genética	134
Grupo Control	134
Obesas	135
VLCD.....	136
Sham	137
Sleeve:.....	138
Comparativa entre grupos de interés	139
Discusión	145
Resultados en el cambio ponderal	148
Cambios genéticos y epigenéticos:.....	152
<i>Control vs Obesas</i>	154
<i>Obesas vs VLCD</i>	155
<i>Obesas vs Sham</i>	158
<i>Obesas vs Sleeve</i>	160
<i>VLCD vs Sleeve</i>	163
<i>Fortalezas del estudio</i>	164
<i>Limitaciones del estudio</i>	164
<i>Relevancia clínica</i>	165

Conclusiones	167
Bibliografía	171
Anexos	189
1.- Dietas	191
2.- Tablas de pesos	197
3.- Cebadores	203
Cebadores utilizados para el estudio de la expresión genética.....	205
Cebadores utilizados para el estudio de la metilación	206

Abreviaturas

5-HT_{2c} – Subtipo de receptor 5-HT

Acrp30 – Adiponectina

ADN – Ácido Desoxiribonucleico

AgRP - péptido relacionado agouti

AMPK - Proteínquinasa dependiente de AMP

ARN – Ácido Ribonucleico

ATP – Adenosin Trifosfato

C/EBP – CCAAT/enhancer-binding protein

Ca⁺⁺ - Calcio

CART - Transcritos regulados por cocaína y anfetamina

ChREBP – Carbohydrate-responsive element-binding protein

DLP - Dislipemia

DM2 - Diabetes Mellitus 2

DNMT – ADN Metiltransferasa

ECF-A – Factor Quimiotáctico de Esosinófilos

EWAS – Estudios de Asociación del Epigenoma Completo

FAO – Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FASN – Ácido Graso Sintasa

FDA – Food and Drug Administration

FTO – Proteína asociada al tejido graso y la obesidad (Fat mass and obesity-associated protein)

GH – Hormona del crecimiento

GH-R – Receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento

GLP-1 – Glucagon Like Peptid 1

GLUT-4 – Transportador de glucosa tipo 4

GMP – Guanosin Monofosfato

Grb-2 – Growth factor receptro-bound protein 2

GWAS – Genome Wide Association Study

HDL – Lipoproteína de alta densidad

HIF-1 – Factor Inducible por la Hipoxia

HL – Hipotálamo Lateral

HOMA-IR – Homeostatic Model Assesment of Insuline Resistance

HTA - Hipertensión Arterial

HVM – Hipotálamo Ventromedial

IDR – Ingestas Dietéticas de Referencia

IgG – Inmunoglobulina G

IgM – Inmunoglobulina M

IgE – Inmunoglobulina E

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IMC - Índice de Masa Corporal

IRS-1 – Sustrato del Receptor de la Insulina 1

K⁺ - Potasio

LDL – Lipoproteína de baja densidad

LPL - Lipoproteinlipasa

LTB4 – Leucotrieno B4

MCP-1 – Proteína Quimioatrayente de Monocitos

MIF – Inhibidor de la Migración de Macrófagos

MMP2 – Matrix metaloproteinasa-2

MMP9 – Matrix metaloproteinasa-9

mTOR – Diana de rapamicina en células de mamífero

Na⁺ - Sodio

NADPH – Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato

NCF – Factor Quimiotáctico del Neutrófilo

NF-κB - Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NO – Óxido Nítrico

NPY – Neuropeptido Y

OCDE - Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

OMS – Organización Mundial de la Salud

PAF – Factor Activador de las Plaquetas

PAI-1 – Inhibidor del activador del plasminógeno-1

Pdx-1 – Pancreatic and Duodenal Homeobox 1

PGE2 – Prostaglandina E2

PI3K – Fosfoinositol 3-quinasa
PPAR- α - Receptor alfa activado por proliferador de peroxisoma
PPAR- γ - Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma
PTB – Phospho Tyrosine Binding
POMC – Proopiomelanocortina
S6K-1 - Ribosomal protein S6 kinase beta-1
SREBP - Proteína de unión al elemento regulador del esteroI
Th1 – Leucocitos T Helper 1
TNF- α – Factor de Necrosis Tumoral α
TRH . Hormona Liberadora de Tirotrópina
UE – Unión Europea
VEGF – Factor de Crecimiento Endotelial Vasculat
VLCD - Very Low Caloric Diet

Tablas y Figuras

Tablas

Tabla 1: Factores que regulan la síntesis de adiponectina	34
Tabla 2: Genes relacionados con enzimas y hormonas que interaccionan con el sistema del núcleo arcuato	51
Tabla 3: Expresión genética de los genes analizados por tejido	104
Tabla 4: Genes a los que se analizó el estado de metilación por tejidos	105
Tabla 5: Composición inicial y final de los grupos	114
Tabla 6: Medias de pesos en gramos	120
Tabla 7: Variación de peso entre t10 y t16 por grupos	123
Tabla 8: Comparación de variación ponderal entre grupos antes de las intervenciones	126
Tabla 9: Comparación de variación ponderal entre grupos después de las intervenciones	127
Tabla 10: Significación estadística según intervención, grupo y día de la intervención	128
Tabla 11: Comparaciones de interés	132
Tabla 12: Resultado de la expresión genética relativa en el grupo control	134
Tabla 13: Resultado de la expresión genética relativa en el grupo Obesas	135
Tabla 14: Resultado de la expresión genética relativa en el grupo VLCD	136
Tabla 15: Resultado de la expresión genética relativa en el grupo Sham	137
Tabla 16: Resultado de la expresión genética relativa en el grupo Sleeve	138
Tabla 17: Cambios de expresión y metilación entre los grupos Control - Obesas	139
Tabla 18: Cambios de expresión y metilación entre los grupos Obesas - VLCD.....	140
Tabla 19: Cambios de expresión y metilación entre los grupos Obesas – Sham	141
Tabla 20: Cambios de expresión y metilación entre los grupos Obesas - Sleeve.....	142
Tabla 21: Cambios de expresión y metilación entre los grupos VLCD – Sleeve	143
Tabla 22: Resultados comparativos entre grupos de interés de los cambios de expresión genética.....	144
Tabla 23: Resultados comparativos entre grupos de interés de los cambios epigenéticos	144
Tabla 24: Primers utilizados en la PCR de la expresión genética	205
Tabla 25: Primers utilizados en la PCR del estudio de la metilación del epigenoma	206

Figuras

Figura 1: Distribución del IMC	19
Figura 2: Distribución de la obesidad	20
Figura 3: Población adulta con sobre peso u obesidad en la UE	23
Figura 4: Síndrome metabólico	24
Figura 5: Acción de la leptina	31
Figura 6: ADN y epigenética	54
Figura 7: Metilación de la citosina.....	55
Figura 8: Derivación biliopancreática de Scopinaro	78
Figura 9: Derivación biliopancreática con cruce duodenal	79
Figura 10: Gastroplastia vertical anillada	79
Figura 11: Banda gástrica	80
Figura 12: Bypass gástrico	81
Figura 13: Gastrectomía vertical	82
Figura 14: Modelo de las ratas estabuladas en el proyecto	95
Figura 15: Estabulación por jaulas y dietas.....	99
Figura 16: Instantes previos a la intervención	100
Figura 17: Cierre de la pared abdominal post intervención	100
Figura 18: Remanente gástrico.....	101
Figura 19: Estomago normal	101
Figura 20: Gastrectomía vertical	101
Figura 21: Anastomosis yeyunoileal	101
Figura 22: Anastomosis esofagoyeyunal	101
Figura 23: Esquema del protocolo del estudio	102
Figura 24: Esquema Grupos - Tejidos - Genes	105
Figura 25: Esquema del estudio de la distribución	116
Figura 26: Esquema de la comparación del peso antes y despues del procedimiento	117
Figura 27: Esquema de la comparación del peso entre grupos	117
Figura 28: Distribución de peso en t10.....	119
Figura 29: Distribución de peso en t16.....	119
Figura 30: Comparación conjunta del peso antes (t10) y después de los procedimientos (t16)	123
Figura 31: Comparación del peso por grupos entre t10 y t16	124
Figura 32: Comparación evolutiva de los pesos post intervención (3 tiempos)	129
Figura 33: Grupos, tejidos y genes incluidos en el análisis de expresión y metilación genética	130
Figura 34: Esquema de resultados de expresión genética.....	133
Figura 35: Esquema de cambios de expresión y metilación entre los grupos Control - Obesas	139
Figura 36: Esquema de cambios de expresión y metilación entre los grupos Obesas - VLCD...140	
Figura 37: Esquema de cambios de expresión y metilación entre los grupos Obesas - Sham ..141	
Figura 38: Esquema de cambios de expresión y metilación entre los grupos Obesas - Sleeve.142	
Figura 39: Esquema de cambios de expresión y metilación entre los grupos VLCD - Sleeve....143	
Figura 40: Evolución ponderal post bypass gástrico.....	151

Resumen

Resumen

La obesidad es un problema de salud de primer orden que se encuentra en aumento, con una etiología multifactorial y asociada a un gran número de comorbilidades. Su tratamiento requiere un enfoque multimodal, ya que ninguno de los existentes, por si solo, mantiene buenos resultados a largo plazo. Entre ellos, la cirugía bariátrica es la medida que está ofreciendo mejores resultados, por su carácter restrictivo y/o malabsortivo, aunque, en gran medida, desconocemos que implicaciones tiene a nivel molecular.

El presente estudio tuvo como objetivo analizar, en un modelo animal con ratas, los posibles cambios en la expresión de determinados genes relacionados con el metabolismo energético y la inflamación después de cirugía bariátrica. Además, se analizó si estos cambios podían ser secundarios a alteraciones en el estado epigenético del ADN generados por la propia cirugía y su relación con la variación ponderal objetivada.

Se diseñó un proyecto con 42 ratas, 36 de las cuales obesas, divididas en 6 grupos y sometidas a diferentes intervenciones: control, dieta hipercalórica, dieta restrictiva hipocalórica, cirugía sham, gastrectomía vertical y bypass gástrico.

Tras las intervenciones se obtuvieron muestras de 5 tejidos (grasa subcutánea, grasa visceral, músculo, hígado y sangre) y se analizó la expresión de genes implicados en el control ponderal, el metabolismo intermediario y la respuesta inflamatoria (grelina, leptina, GLP-1, FASN, PPAR- γ , FTO, IRS1, TNF α y MCP1). En aquellos en los que se objetivó algún tipo de cambio de expresión se estudió posteriormente su estado epigenético.

En el análisis de los resultados se excluyó el grupo Bypass por mala evolución clínica en 5 de las 7 ratas. En el resto, al realizar comparaciones entre grupos, se objetivaron cambios de expresión significativos en los genes de la leptina, TNF α , FASN y MCP1 en grasa visceral, músculo e hígado.

Sin embargo, únicamente los cambios de FASN y MCP1 en hígado se asociaron a variaciones en el estado epigenético.

Introducción

Sobrepeso y obesidad

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud.

La forma más común de valorar si una persona presenta un nivel adecuado de peso o no, es calcular el Índice de Masa Corporal (IMC). Este valor se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2), de forma que se ajusta el peso a la estatura del individuo.

Su escala, tal como podemos ver en la Figura 1, es la siguiente:

Bajo peso < 18.5

Normal: 18.5 – 24.99

Sobrepeso: 25 – 30

Obesidad: > 30

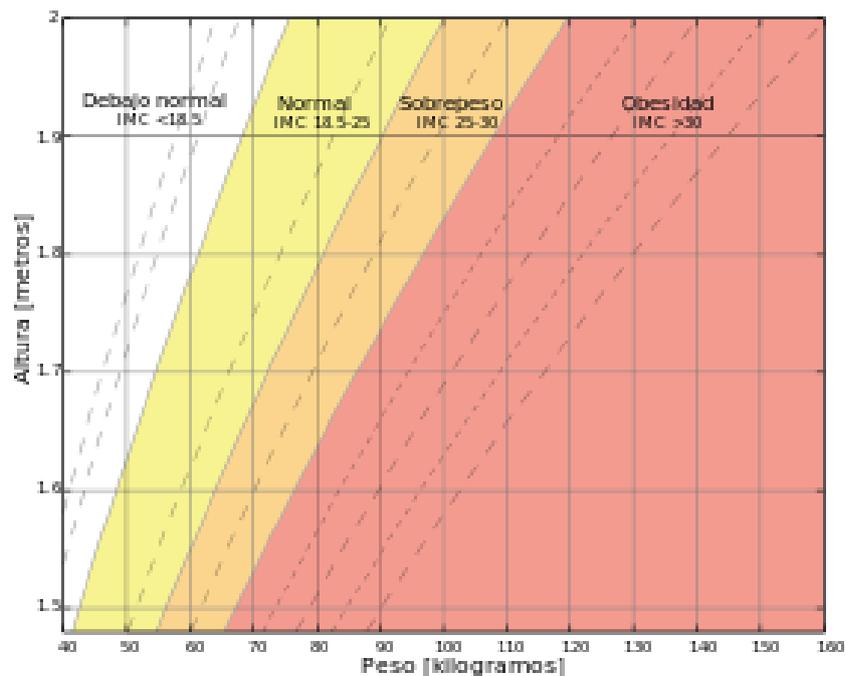


Figura 1: Distribución del IMC

A su vez, los apartados bajo peso y obesidad, se subdividen en diferentes subapartados.

En “Bajo peso” podemos encontrar Delgadez leve (IMC 17,0 hasta 18,4), Delgadez moderada (IMC 16,0 hasta 16,9) y Delgadez severa (IMC inferior a 16,0)

En el apartado “Obesidad” dividiremos a los sujetos en Obesidad clase I o leve (IMC 30,0 hasta 34,9), Obesidad clase II o media (IMC 35,0 hasta 39,9), Obesidad clase III o mórbida (IMC 40,0 hasta 49,9) y Obesidad clase IV o extrema (IMC 50,0 o superior).

Sin embargo, hay que considerar el IMC a título indicativo, porque es posible que no se corresponda con el mismo nivel de obesidad en diferentes individuos. Este hecho es debido a que el IMC no tiene en cuenta el origen del peso del individuo (músculo, agua, grasa...). Así, personas con musculatura muy desarrollada o con patologías que condicionen retención de líquidos, presentarán IMCs elevados sin que ello sea debido a la existencia de sobrepeso u obesidad. En un marco clínico, se deberían tomar en cuenta la raza, la etnia, la masa muscular, edad, sexo y otros factores que pudiesen afectar a la interpretación de este indicador.

Por este motivo, más allá de las medidas brutas de peso o IMC que nos sirven para hacer una aproximación rápida del estado del sujeto, existen otros indicadores relacionados con la obesidad que, por un lado, nos permiten detallar con mayor exactitud cuál es la causa y la distribución del sobrepeso (Figura 2) y, por otro lado, nos permiten valorar si ésta se asocia a mayor o menor riesgo de comorbilidades.

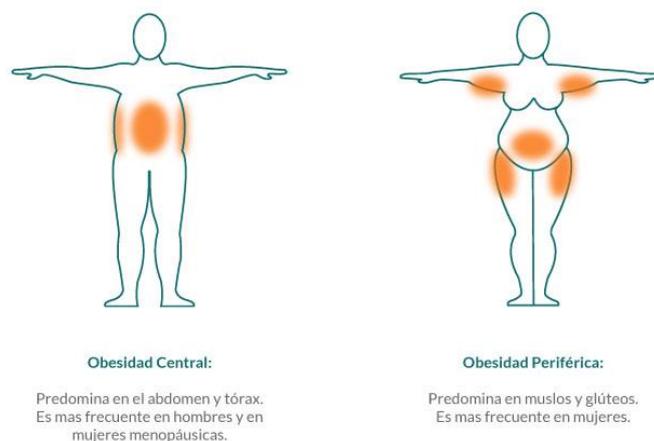


Figura 2: Distribución de la obesidad

Unos de estos indicadores, también utilizados de forma muy habitual, son el perímetro de la cintura y el índice cintura-cadera. La circunferencia de cintura absoluta (>102 cm en hombres y >88 cm en mujeres) o el índice cintura-cadera ($>0,9$ para hombres y $>0,85$ para mujeres)¹ son usados como medidas de obesidad central, factor que se asocia con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular que la obesidad periférica.^{2,3}

Finalmente, la alternativa más precisa pero menos accesible para determinar la obesidad, es medir el porcentaje de grasa corporal. Generalmente se acepta que un hombre con un porcentaje superior al 25 % y una mujer con porcentaje superior del 30 % de grasa corporal son obesos.

Sin embargo, su medición suele ser más compleja y por tanto no tan utilizada de forma habitual.

El método más simple para ello, que nos indica de forma indirecta la grasa corporal existente, es el método de los pliegues cutáneos. En éste se mide el grosor de un doble pliegue de piel y tejido adiposo subcutáneo comprimido para determinar la grasa subcutánea. Este método tiene el inconveniente de que, el espesor de tejido subcutáneo, varía ampliamente según la zona elegida. Por ello, para hacer una medición correcta, se requiere que se realice en al menos 3 puntos diferentes del mismo individuo de los 9 recomendados en el protocolo de la Conferencia de Consenso de Airlie en 1985. Dichas zonas son: pectoral, tricípital, subescapular, bicipital, medioaxilar, suprailíaco, abdominal, muslo y pantorrilla medios.

Otro método para medir la grasa corporal es la Impedancia Bioeléctrica. Esta técnica se basa en las diferentes propiedades eléctricas de los tejidos corporales. Mientras que tejidos como el hueso, el músculo o los vasos sanguíneos tienen una buena conductividad de la electricidad, la grasa carece de esta capacidad. Por tanto, analizando el comportamiento de una corriente eléctrica al atravesar los diferentes tejidos se puede acabar infiriendo la cantidad de grasa que hay en ellos.

En estudios de laboratorio también se utiliza el peso bajo el agua, que también nos permite hacer este análisis, pero su práctica en la clínica no es viable.

Finalmente, también existen otros métodos basados en el radiodiagnóstico, como la tomografía computarizada, la resonancia magnética y la absorciometría de rayos X de energía dual,⁴ pero su uso en práctica clínica tampoco es habitual.

La obesidad: Una enfermedad relevante

La obesidad representa un gran problema de salud, no solamente en las sociedades desarrolladas, como sucedía antiguamente, sino también en países subdesarrollados. Progresivamente, su prevalencia está aumentando en los países de ingresos bajos y medios, en particular en los entornos urbanos, ubicaciones donde se concentra gran parte de la población mundial. Por ahora, solamente en algunas regiones de África subsahariana y Asia esta condición no se cumple. Por tanto, globalmente, esto implica que en la actualidad el sobrepeso y la obesidad están relacionados con un mayor número de defunciones que la insuficiencia ponderal.

Según los datos de la Encuesta Nacional de Salud del año 2017,⁵ en España la obesidad sigue en aumento respecto a años anteriores. Así, en 2017, ya afectaba al 17,4% de la población adulta y, si consideramos obesidad y sobrepeso, este porcentaje aumenta a más de la mitad del total de la población (54,5%). La frecuencia de obesidad es mayor en hombres que en mujeres (18,2% vs 16,7%) excepto en mayores de 65 años, franja en que esa proporción se invierte. Este patrón se mantiene si nos centramos en el sobrepeso (44,3% hombres vs 30% mujeres) pero a diferencia de la obesidad, se mantiene en todos los grupos de edad.

A nivel internacional, según datos de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), más de la mitad (52%) de la población adulta en la Unión Europea tiene sobrepeso u obesidad. Las tasas varían dependiendo de los países, desde una tasa baja, en torno al 8% en Rumanía y Suiza, a más del 25% en Hungría y Reino Unido (26,1%). (Figura 3)

Otros datos significativos los encontramos en las cifras que ofrece la OMS.

Desde 1975, la obesidad se ha casi triplicado en todo el mundo. En 2016, más de 1900 millones de adultos (de 18 o más años) tenían sobrepeso y, dentro de este grupo, más de 650 millones eran obesos. El mismo año, el 39% de las personas adultas de 18 o más años tenían sobrepeso y el 13% eran obesas.⁶

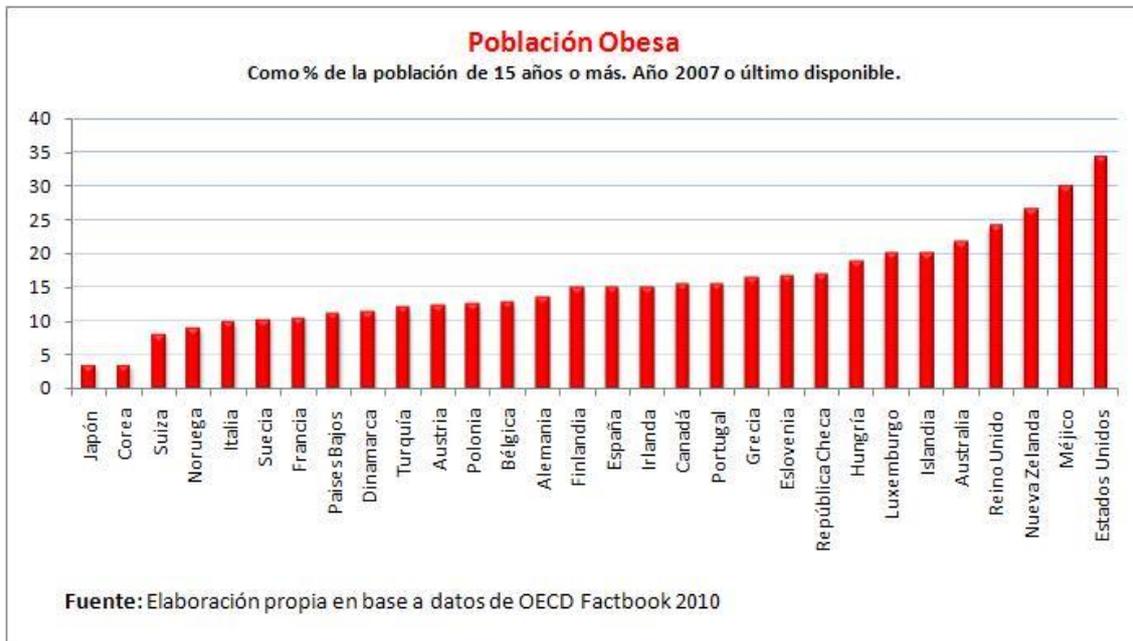


Figura 3: Población adulta con sobre peso u obesidad en la UE

Estamos pues ante una enfermedad con una prevalencia muy elevada, superior a la mayoría de las afecciones de primer orden en los sistemas sanitarios, y que tiene un claro agravante. A pesar de que, tal como comentaremos más adelante, las causas de la obesidad son múltiples y no se conocen todas con exactitud, se trata claramente de una enfermedad evitable a diferencia de la mayoría de los problemas sanitarios.

¿Y por qué es evitable? Porque la causa principal del sobrepeso y la obesidad es un desequilibrio energético entre las calorías consumidas con la ingesta de alimentos y las gastadas con el mantenimiento del metabolismo basal y la actividad física diaria.

A lo largo de las últimas décadas la facilidad al acceso a los alimentos, el aumento del sedentarismo, secundario a nuevas formas de trabajo y los nuevos modos de desplazamiento, una creciente urbanización y los malos hábitos alimentarios han facilitado un aumento en la proporción de población obesa, así como en el grado de ésta.

La importancia de la obesidad también radica, más allá de por su elevada prevalencia y su tendencia ascendente, en el hecho de que ésta se suele relacionar con la aparición de otras comorbilidades.

Debido a esta relación con otras enfermedades, actualmente el sobrepeso y la obesidad son el sexto factor principal de riesgo de defunción en el mundo. Cada año fallecen

alrededor de 3,4 millones de personas adultas como consecuencia del sobrepeso o la obesidad. Además, el 44% de la carga de diabetes, el 23% de la carga de cardiopatías isquémicas⁷ y entre el 7% y el 41% de la carga de algunos cánceres son atribuibles al sobrepeso y la obesidad,⁸ así como la aparición de síndrome metabólico (Figura 4).

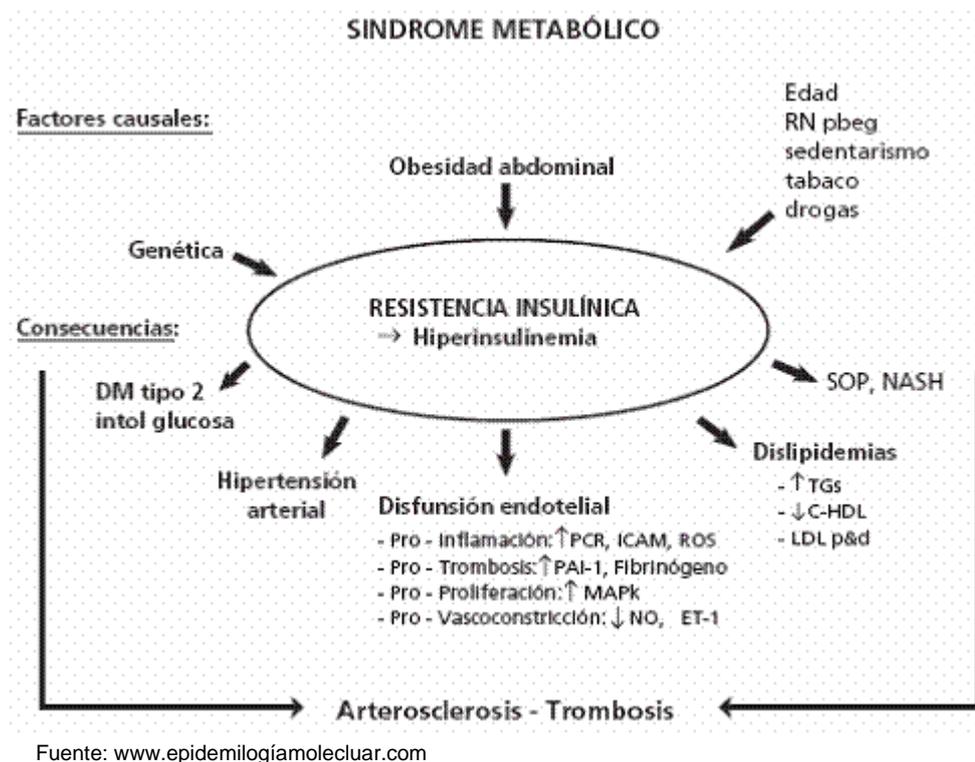


Figura 4: Síndrome metabólico

Consecuentemente, todo ello implica que la obesidad se relaciona con un importante impacto a nivel físico y psicológico de los individuos afectados.

Por tanto, supone, por su prevalencia y por sus implicaciones sanitarias y económicas, un importante reto para la sociedad, siendo objetivo de continuas investigaciones para averiguar sus condicionantes y sus posibles tratamientos.

Una enfermedad multifactorial

Tal como ya se ha introducido anteriormente, la obesidad es el resultado de una acumulación excesiva de la grasa corporal debida a un balance positivo en la ecuación ingesta/gasto energético.

Sin embargo, por qué se da esta situación tiene múltiples posibles causas.

Genética vs factores ambientales

De entrada, según la etiología principal de la obesidad, ésta se puede clasificar en los siguientes subtipos:

1. Obesidad exógena: La obesidad debida a factores externos o ambientales.
2. Obesidad endógena: La que tiene por causa alteraciones metabólicas.

Generalmente, los factores que pueden causar obesidad pueden ser atribuidos un 30 % a factores genéticos, un 40 % a factores no heredables y un 30 % a factores meramente sociales. Por tanto, la relación entre factores genéticos y ambientales es del 30 % y 70 % respectivamente. Estos porcentajes son aproximativos y bastante variables en la literatura médica de forma que es difícil de asegurar que impacto tiene cada uno de los factores en un individuo específico.

En relación a los factores genéticos, se calcula que existen más de 500 genes relacionados con el desarrollo de la obesidad, aunque solo unos pocos la originan de forma monogénica. La mayoría actúan de forma poligénica, interactuando a su vez con los factores ambientales. De hecho, es conocido el polimorfismo en varios genes que controlan el apetito y el metabolismo y que predisponen a la obesidad.⁹

Sin embargo, hay que entender que, la importancia de la herencia de padres a hijos no es únicamente genética. Es decir, el riesgo de sufrir obesidad es, en parte, debido a tendencias metabólicas de acumulación de grasa, pero también se debe a que los hábitos culturales, alimentarios y sedentarios, contribuyen a repetir los patrones de obesidad de padres a hijos. Con todo ello, se considera que en caso de tener padres obesos el riesgo de sufrir obesidad para un niño es 10 veces superior a lo normal.

Consecuentemente, es fácil de comprender que únicamente un 2-3 % de los casos de obesidad se debe a enfermedades endocrinas como el hipotiroidismo, síndrome de Cushing, hipogonadismo, lesiones hipotalámicas o deficiencia de la hormona de crecimiento.

A modo de ejemplo, en los años justo después de la Segunda Guerra Mundial hasta 1960, en Estados Unidos, el peso promedio por persona se incrementó, pero la obesidad no presentó un crecimiento notable. Sin embargo, en las dos / tres décadas posteriores y hasta día de hoy, el crecimiento en la tasa de obesidad se ha acelerado marcadamente, convirtiéndose en un problema de salud pública.

Por tanto, mientras que el conocimiento de las causas genéticas es central para comprender la obesidad, éstas, por sí solas, no pueden explicar la tendencia que presentan algunas sociedades hacia el sobrepeso y la obesidad.

Se postula pues que varios factores medioambientales y culturales estarían implicados en su desarrollo. Algunos ya conocidos, como algunas medicaciones o el abandono del hábito tabáquico y, otros, en fase de estudio como ciertas condiciones intrauterinas, el tipo de microbiota, la temperatura ambiental o la cantidad de horas de sueño.¹⁰

Denominador de la ecuación: Gasto energético

El gasto energético de un individuo se puede subdividir en 3 componentes diferentes:

- a) El metabolismo basal, que representa el gasto energético en reposo y que sería el que viene determinado de forma genética. Éste representa alrededor del 60% del gasto total.
- b) El consumo secundario a los procesos de digestión y el metabolismo de los alimentos, que corresponde aproximadamente al 10% del gasto total.
- c) El grado de actividad física. Representa, de media, un 30% del consumo total y es el único factor claramente modificable de los tres. Este componente está claramente relacionado con la aparición de sobrepeso u obesidad en la sociedad actual.

De los tres factores, el primero y el segundo no son modificables de forma voluntaria.

En relación al tercer factor, por norma general, la población obesa suele ser menos activa y, por tanto, este componente del consumo energético total suele ser más bajo.

Sin embargo, cabe destacar que esta relación no necesariamente se cumple a la inversa. El cambio de peso no afecta a los niveles de actividad ya que, pacientes que han conseguido disminuir de forma importante sus niveles de sobrepeso, no han presentado de forma generalizada un aumento en su actividad diaria.¹¹

¿Pero qué entendemos por actividad física? Para comprender los cambios que se están dando en la población actual, hay que diferenciar la actividad física involuntaria de la actividad física voluntaria o programable.

La actividad física involuntaria es aquella que realizamos de forma inconsciente por el simple hecho de realizar actividades del día a día. Son un ejemplo los cambios de postura y la actividad asociada al movimiento como caminar, hablar o cumplir con las necesidades físicas y fisiológicas diarias.

Por otro lado, la actividad física voluntaria sería aquella relacionada con el ejercicio físico, bien debido a actividades deportivas como a actividades relacionadas con actividades cotidianas (subir escaleras, realizar la compra, trabajos que requieren esfuerzo físico...).

Si de nuevo nos fijamos en los datos de la Encuesta Nacional de Salud del 2017,⁵ en nuestra sociedad, y por extensión en todas aquellas con características económicas, demográficas y culturales similares, la vida laboral es principalmente sedentaria. Este patrón se observa ya desde el año 2011.

Desafortunadamente, prácticamente el 40% de la población complementa esta poca actividad en la vida laboral con una vida sedentaria en su tiempo libre. El aumento del tiempo dedicado a actividades como ver la televisión, utilizar ordenadores, jugar a videojuegos, leer... explica esta situación. Concretamente, se calcula que el 35,3% de la población española entre 15 y 69 años no alcanza los niveles de actividad física saludable recomendado por la OMS. Sin embargo, gracias al aumento de la información que dispone la población y, a campañas de concienciación, estos porcentajes tienen en los últimos años una tendencia descendente.

Numerador de la ecuación: Ingesta alimentaria

En los años 50, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la OMS, realizaron las primeras tablas de Recomendaciones Nutricionales a nivel mundial. Estas recomendaciones se crearon con el objetivo de evitar carencias nutricionales en la población y sirvieron de referencia hasta la década de los 90.

Posteriormente, en 1994, la Food and Nutrition Board inició la revisión de las recomendaciones existentes, generando las Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR), basadas en conocimientos científicos más actualizados. Con estas nuevas guías, no solamente se pretendía evitar carencias, sino también incorporar nuevos valores para prevenir enfermedades más frecuentes, y graves, que las propias enfermedades por deficiencia, como podría ser la obesidad, DM2, DLP...

De estas tablas podemos extraer la cantidad recomendada de cada tipo de nutriente que se debe ingerir en relación a la edad y el sexo del individuo, lo que se conoce como Ingesta Adecuada. También nos informan de la cantidad diaria de agua y de energía necesaria que, a modo de ejemplo, para un hombre adulto serían aproximadamente unas 2900 Kcal/día y para una mujer adulta 2200 Kcal/día.¹² En resumen, se indica que una Ingesta Adecuada asociada a una actividad física diaria es imprescindible para mantener un peso saludable.

Con el objetivo de promover esta Ingesta Adecuada entre la población de un país en concreto, se elaboran Guías Alimentarias que son útiles a nivel nacional.¹³ Son documentos sencillos de promoción de la salud nutricional, que deben ser de fácil cumplimiento, lenguaje adecuado, enfoque positivo, confeccionados por organismos oficiales o entidades científicas, e incorporan consejos sobre estilos de vida saludable.¹⁴ El desarrollo de estas guías es una parte importante en la generación de políticas nutricionales y en la difusión de información consistente sobre alimentación y estilo de vida saludable. Con ellas, la población y los profesionales sanitarios deben conseguir un mayor estado de salud.¹⁵

Gracias al esfuerzo realizado en este sentido, se puede conseguir que la población siga unas normas dietéticas adecuadas. A modo de ejemplo, tal como se puede objetivar en el Informe del consumo de alimentación en España del año 2017,¹⁶ el mayor consumo de

alimentos per cápita en dicho año fue de hortalizas y verduras, seguido de fruta y, en tercera posición, carne, relegando los productos procesado, bollería, aperitivos... a las últimas posiciones de la lista.

Sin embargo, a pesar de ello, la disminución del coste relativo de los alimentos básicos fomenta la ingesta excesiva de nutrientes gracias a la facilidad de acceso que tiene la población.

Así, tal como se ha explicado, la combinación de un consumo excesivo de nutrientes y el estilo de vida sedentaria, son la principal causa de la rápida aceleración de la obesidad y, de forma más acentuada, en la sociedad occidental.

Regulación del metabolismo energético

A nivel fisiopatológico el sobrepeso y la obesidad han sido ampliamente estudiados. Su comprensión todavía no es completa, además de resultar altamente compleja, ya que existen multitud de hormonas y enzimas relacionadas con el metabolismo energético.

Además, estas hormonas y enzimas no actúan habitualmente de forma lineal, influyendo una en otra, sino que en muchas ocasiones una sola enzima puede desencadenar varios procesos diferentes.

Esto implica que, por un lado, se conoce solo parcialmente los mecanismos que influyen en procesos como el mantenimiento de la temperatura corporal, el metabolismo basal, la sensación de saciedad o de hambre... Y, por otro lado, todavía no somos capaces de hacer modificaciones a demanda en estos sistemas.

Actualmente, por ejemplo, no tenemos la capacidad de aumentar o disminuir el metabolismo basal, para producir más o menos consumo energético o disminuir la sensación de hambre que tiene un individuo en un momento concreto.

En todo caso vamos a repasar lo que sí conocemos y que va a tener un posterior interés en este proyecto.

Leptina

También conocida como proteína *OB*, es producida en su mayoría por los adipocitos del tejido subcutáneo (80%), aunque también se expresa en el hipotálamo, el ovario y la placenta. La regulación de la secreción es a largo plazo, mediada por la variación del nivel de masa corporal y efectos estimulantes de la insulina.

Su función principalmente estaría relacionada con señalar las reservas de grasa almacenadas en el organismo, actuando por tanto como un lipostato,¹⁷ y mediar en el control del apetito a largo plazo.

El aumento de la proporción de masa de tejido adiposo, más allá de un punto de equilibrio, produce un aumento de la síntesis y secreción de leptina. Estos mayores niveles de leptina estimulan varios efectos compensadores en el hipotálamo. Concretamente parece generar una inhibición a nivel del núcleo arcuato. Esta acción tiene, como consecuencia, una disminución del apetito por estimulación de péptidos anorexigénicos y la supresión de la producción de péptidos orexigénicos, un aumento del gasto energético, mediante un incremento de la tasa de metabolismo basal y la temperatura corporal, así como la modificación del punto de equilibrio hormonal para reducir la lipogénesis y aumentar la lipólisis en el tejido adiposo.

Del mismo modo, en casos de ayuno, anorexia o desnutrición, los niveles de leptina son bajos, demostrando que su secreción está claramente influenciada por el estado nutricional.^{18,19} De hecho, se ha sugerido que la pérdida ponderal presente en determinadas enfermedades se debe a un aumento patológico de los niveles de leptina.

Si profundizamos en el mecanismo de acción, el circuito comienza, precisamente, en el núcleo arcuato del hipotálamo, que tiene salidas al hipotálamo lateral (HL) y ventromedial (HVM), los centros de control de la alimentación y la saciedad en el cerebro respectivamente.²⁰

El núcleo arcuato contiene dos grupos distintos de neuronas.²¹ El primer grupo coexpresa neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado agouti (AgRP), y recibe señales estimuladoras del hipotálamo lateral y señales inhibitorias del hipotálamo ventromedial. El segundo grupo coexpresa proopiomelanocortina (POMC) y transcritos regulados por cocaína y anfetamina (CART), y recibe señales estimuladoras del hipotálamo ventromedial y señales inhibitorias del hipotálamo lateral. (Figura 5)

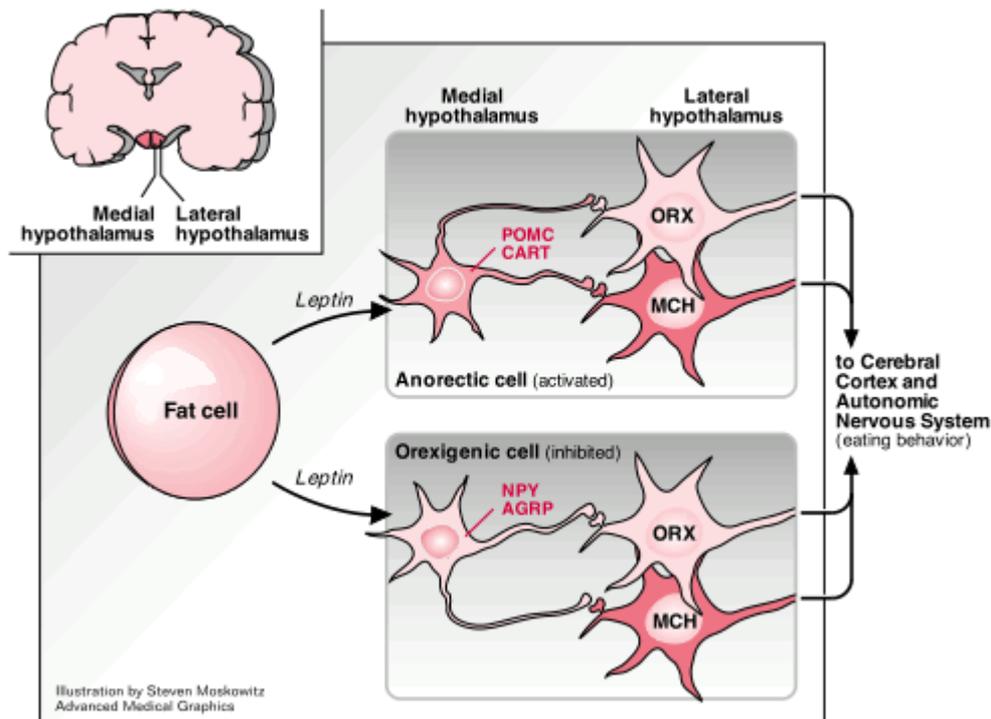


Figura 5: Acción de la leptina

Consecuentemente, las neuronas NPY/AgRP estimulan la alimentación e inhiben la saciedad, mientras que las neuronas POMC/CART, estimula la saciedad e inhiben la alimentación.

Ambos grupos de neuronas del núcleo arcuato son reguladas, en parte, por la leptina. La leptina inhibe el grupo NPY/AgRP, mientras que estimula el grupo POMC/CART. Por lo tanto, una deficiencia en la señalización por leptina, vía deficiencia de leptina o resistencia a la leptina, conduce a una sobrealimentación y puede explicar algunas formas de obesidad genética y adquirida

Como se ha comentado anteriormente, otro efecto con el que está relacionado la leptina, es el control del metabolismo basal. Esta relación vendría determinada por la capacidad de la leptina para aumentar, de forma directa e indirecta, los niveles de hormona liberadora de tirotropina (TRH) y, por tanto, la síntesis de hormonas tiroideas. La acción directa está mediada por la acción directa de la leptina en el hipotálamo lateral.²² La acción indirecta es secundaria a la capacidad de la leptina de inhibir la producción de glucocorticoides en las glándulas suprarrenales.²³

Dado que el cortisol, entre otros, reduce la producción a nivel de células del núcleo paraventricular de los niveles de TRH, la leptina aumentaría de forma indirecta sus niveles, incrementando la síntesis de hormonas tiroideas. Éstas, como ya es conocido, están relacionadas con el aumento del metabolismo basal, de la termogénesis y de la actividad simpática.

Más allá de la relación con el control de la ingesta y del metabolismo, la leptina también se ha relacionado con el estado proinflamatorio crónico que presentan los obesos,²⁴ probablemente por la similitud estructural que tiene con una citocina.

El mecanismo de acción de este proceso no se conoce con claridad, pero la leptina es capaz de controlar la producción de mediadores proinflamatorios como TNF- α e Interleucina 1 (IL-1), así como promover la diferenciación de los leucocitos T helper 1 (Th1). Debido a este efecto, puede modular, entre otras, la aparición y la progresión de enfermedades autoinmunitarias.²⁵ También se ha descrito su relación con la síntesis de endotelina-1, óxido nítrico sintasa (NO), MCP-1, la proliferación y migración de las células endoteliales y la agregación plaquetaria.²⁶

Por otro lado, la leptina parece aumentar la sensibilidad insulínica mediante la activación de proteínas cinasas del AMP. Esta activación condicionaría una disminución del malonil-CoA intracelular, un aumento de la oxidación de ácidos grasos y un descenso de la lipogénesis.²⁷ Es lógico, por tanto, deducir que su disminución contribuiría a la resistencia insulínica. Sin embargo, no queda del todo claro cuál es su papel en los pacientes obesos ya que, éstos, presentan niveles elevados de leptina y a la vez suelen presentar diferentes grados de resistencia insulínica.²⁸

Ante todo lo descrito, se ha postulado que la administración exógena de leptina, en forma de fármaco, podría producir varios efectos beneficiosos con relación al control ponderal y metabólico en los pacientes obesos. Desgraciadamente se ha demostrado que el estado de hiperleptinemia y la resistencia natural a la leptina de estos pacientes disminuye en gran medida la eficacia de este tipo de tratamiento. Además, independientemente de esta resistencia natural, los pacientes tratados con leptina exógena han acabado desarrollando en la mayoría de los casos anticuerpos contra el fármaco²⁹ que, obviamente, también ha contribuido a disminuir su efecto.

Grelina

Por otro lado, tenemos la grelina. Se trata de una hormona sintetizada a nivel de las células endocrinas del tracto digestivo.

Para que esta hormona sea activa, debe unirse a un ácido graso saturado denominado ácido octanóico. Este proceso se realiza por la enzima grelina O-acetiltransferasa, que se encuentra mayoritariamente en las células parietales gástricas. La grelina octanoilada interviene en la regulación del apetito y la homeostasis nutricional.³⁰

Se trata del ligando natural del receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento (GHS-R) a nivel hipotalámico, hecho que a su vez aumentará la producción de hormona del crecimiento (GH), a nivel de la hipófisis.³¹ La unión de la grelina al GHS-R, modula el apetito a corto plazo, induciendo la sensación de hambre y generando una señal que indica necesidad de nutrientes. Por tanto, los niveles circulantes varían de forma destacable, según si hay alimento en el estómago o no, aumentando antes de las comidas y disminuyendo tras la ingesta. Su efecto es básicamente orexigénico.³⁰

Sin embargo, experimentos sobre animales han demostrado que, la acción de la grelina sobre el hipotálamo, va más allá de una simple regulación de la ingesta. Aumenta la acumulación de lípidos en el tejido adiposo y en el hígado y disminuye la termogénesis, induciendo un balance energético positivo y favoreciendo la acumulación de grasa.³¹

Además, cumple otras funciones más allá del tejido cerebral. Estimula la secreción de prolactina y hormona adrenocorticotropa por parte de la glándula pituitaria, disminuye la secreción de insulina por parte de las células beta del páncreas y estimula la gluconeogénesis en el hígado, disminuye la presión arterial, aumenta la función cardíaca, estimula la secreción de ácido gástrico y la motilidad gástrica y, finalmente, regula el metabolismo óseo estimulando la diferenciación de osteoblastos y aumentando la densidad mineral ósea.^{30,31}

Adicionalmente, la ghrelina se produce también a nivel de las células cerebrales. Concretamente en grupos celulares ubicados en el hipotálamo, entre las zonas dorsal, ventral paraventricular y del núcleo arcuato,³² aunque su relevancia funcional está todavía por acabar de determinar.

Adiponectina

La adiponectina o Apcr30 es una hormona sintetizada exclusivamente por el tejido adiposo, cuya secreción llega mayoritariamente a la circulación sistémica y participa en el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos.³¹

Su acción aumenta la sensibilidad a la insulina en diversos tejidos como hígado, músculo esquelético y tejido adiposo.

Esta hormona presenta niveles circulantes inversamente proporcionales al índice de masa corporal (IMC) y el porcentaje de grasa corporal. Por ello, las concentraciones se encuentran reducidas en la obesidad, diabetes mellitus de tipo 2 y la enfermedad arterial coronaria.³³

Para ejercer su acción, existen 2 receptores conocidos de la adiponectina, llamados AdipoR1 y AdipoR2, que se expresan en tejidos sensibles a la insulina. El primero se encuentra, principalmente, en el músculo esquelético y, el segundo, en el hígado, aunque también se pueden encontrar en otros tejidos, como el páncreas o tejido adiposo.³⁴

La unión de la adiponectina a sus receptores aumenta la actividad de AMPK y el receptor alfa activado por proliferador de peroxisoma (PPAR- α), favoreciendo la oxidación de ácidos grasos y la entrada de glucosa en los tejidos.³⁵

Su síntesis está regulada por diferentes factores que se describen en la Tabla 1.

Factores que afectan a la concentración plasmática de adiponectina en humanos

Factor	Concentración de adiponectina
Obesidad	↓
Sexo	↓ (varones), ↑ (mujeres)
Edad	↓
Etnia	↑ (caucásicos) / ↓ (indoasiáticos)
Ritmo circadiano	↓ (noche)
Pérdida de peso por	
Dieta	↑
Bypass gástrico	↑
Tamaño de los adipocitos	↓
Resistencia a la insulina	↓
Diabetes tipo 2	↓
Enfermedad coronaria arterial	↓
Diabetes gestacional	↓
Tratamiento con TZD	↑
TNF- α , IL-6	↓
Catecolaminas	↓
Glucocorticoides	↓

TZD: tiazolidinedionas; TNF- α : factor de necrosis tumoral α ; IL-6: interleucina 6.

Tabla 1: Factores que regulan la síntesis de adiponectina

Glucagon Like Peptide 1

También contamos con el Glucagon Like Peptide 1 o GLP-1, cuya fuente principal de síntesis en el organismo son las células L del intestino, y que depende de la ingesta y de la presencia de nutrientes en su luz.³⁶

Presenta varias funciones, todas ellas relacionadas con el control de la ingesta y la homeostasis de la glucosa: aumenta la secreción de insulina por parte del páncreas y suprime la secreción de glucagón, incrementa la masa de las células beta y la expresión del gen de la insulina, inhibe la secreción de ácido gástrico y el vaciamiento gástrico y aumenta la sensación de saciedad.^{36,37}

Por ello, se han desarrollado análogos de GLP-1 que tienen utilidad clínica en el tratamiento de la DM tipo 2.³¹

Visfatina

Dentro del mismo grupo que la leptina y la adiponectina (adipocinas) tenemos la visfatina.

Se trata de una citoquina que se expresa mayoritariamente en el tejido graso visceral, no así en el tejido adiposo subcutáneo, y se relaciona también con la regulación del metabolismo y la homeostasis energética.

Se postula que sus niveles circulantes se correlacionan con la obesidad y el desarrollo de DM tipo 2,^{38,39,40} aunque hay estudios contradictorios en este sentido.^{41,42}

A nivel funcional, se sugiere una función endocrina para la visfatina parecida a la función de la insulina, es decir, que produciría un aumento de la captación de glucosa y de acumulo de triglicéridos, además de estimular genes adipogénicos y lipogénicos como el PPAR- γ , C/EBP y FASN.⁴⁰

Sin embargo, también en este caso existen estudios contradictorios que no permiten asegurar con detalle su función.⁴³

Proteína asociada al tejido graso y la obesidad

También disponemos de la proteína Fat mass and Obesity-associated protein o FTO, relacionada con el control de la ingesta y el consumo energético.⁴⁴

Tal es su relación que, se ha objetivado, que según el polimorfismo de dicho gen puede aumentar el riesgo de sufrir obesidad en 1.67 veces respecto al resto de la población.⁴⁵ Este riesgo no se distribuye de forma homogénea con la edad, sino que resulta más evidente en edades tempranas comprendidas entre los 7 y 20 años.⁴⁶

La actividad de FTO parece mediada por la desmetilación oxidativa del ADN,⁴⁷ y su codificación se produce en todos los tejidos, siendo más importante a nivel del cerebro e hipotálamo.⁴⁸

Una vez se produce esta proteína, se ha objetivado en varios estudios que existe una relación directa entre su presencia en los tejidos, principalmente la existencia de mRNA en tejido graso subcutáneo, y el Índice de Masa Corporal (IMC)^{49,50,51} y una relación inversa con la lipólisis del tejido graso.⁵²

Sin embargo, el mecanismo concreto por el que la proteína FTO acaba influyendo en la obesidad y, por tanto, en el control de la ingesta y del consumo metabólico, no es conocido con detalle.

Insulina

Otra hormona relacionada con el metabolismo energético es la insulina, ampliamente estudiada y conocida.

Se trata de una hormona producida y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, que componen su porción endocrina. Estos islotes son estructuras numerosas, de tamaño variable, que se encuentran distribuidas por todo el páncreas, especialmente en la cola, y representan apenas el 2% del volumen total de este órgano. Dentro de los islotes, destacan las células α y β pancreáticas encargadas de la síntesis y secreción de glucagón e insulina respectivamente, siendo estas 2 hormonas las principales reguladoras de la homeostasis y el metabolismo de la glucosa.⁵³

Su producción se realiza en diversas etapas, pasando del precursor inicial, la preproinsulina a proinsulina y, finalmente, a la insulina propiamente dicha.⁵⁴

Posteriormente, su secreción depende de la acción de varios estímulos, entre ellos, la ingesta de proteínas, carbohidratos y su paso a la sangre a partir de los alimentos digeridos. Muchos carbohidratos producen glucosa, aumentando sus niveles en el plasma sanguíneo y, estimulando de inmediato la liberación de insulina a la circulación portal.⁵⁵ Por tanto, las mayores concentraciones de insulina se encuentran en los intervalos postprandiales. Por otro lado, también se ha demostrado que, la hormona de crecimiento, es capaz de aumentar la secreción de insulina humana.⁵⁵

A nivel funcional, la insulina destaca por ser una hormona muy polivalente. Principalmente se conoce por su función anabólica, permitiendo que haya en las células glucosa suficiente para los procesos de síntesis pertinentes y estimulando la síntesis de proteínas y triglicéridos.

Para ello, promueve diferentes efectos a corto plazo en el metabolismo:⁵⁴

- Estímulo de la captación de glucosa, mediante el favorecimiento de la traslocación de los glucotransportadores GLUT-4 a la membrana plasmática en músculo y tejido adiposo
- Estímulo de la síntesis de glucógeno (gluconeogénesis) e inhibición de su degradación (glucogenólisis) en hígado y músculo
- Estímulo del metabolismo oxidativo de la glucosa (glucólisis)
- Inhibición de la gluconeogénesis hepática
- Estímulo de la captación y almacenamiento de grasas por el tejido adiposo
- Favorece la síntesis de triacilgliceroles (triglicéridos). Para ello, estimula la producción de acetil-CoA y estimula la síntesis de ácidos grasos a partir de la acetil-CoA.
- Inhibición de la lipólisis en tejido adiposo

Los principales efectos a medio y largo plazo de la insulina son:⁵⁴

- Efectos sobre la captación/retención de iones y el metabolismo hidroelectrolítico, principalmente aumentando la retención de sodio a nivel renal y la recaptación celular de potasio y aminoácidos
- Estímulo a la síntesis e inhibición de la degradación de proteínas

- Efectos sobre la expresión génica (transcripción)
- Efectos sobre el recambio del mRNA
- Estímulo del crecimiento, proliferación y diferenciación celulares

Además de estos efectos sobre el metabolismo, la insulina actúa sobre el control de la ingesta y de la acumulación de materia grasa.

Dicho control se realiza mediante receptores ubicados en el cerebro, principalmente en el bulbo olfatorio, el hipocampo, la corteza cerebral y, el núcleo arcuato del hipotálamo.⁵⁶ Por ejemplo, la inhibición a nivel experimental de los receptores a nivel hipotalámico, produce un rápido estado de hiperfagia asociada a un incremento de la expresión de Neuropéptido Y y AgRP.⁵⁷ En cambio, este mismo proceso realizado sobre los receptores a nivel de las neuronas POMC, no supuso ninguna alteración.⁵⁸

Sin embargo, a pesar de la existencia de estos circuitos, la desaparición de estos receptores específicos no implica cambios relevantes.⁵⁹

En general, los procesos se inician con la unión de la insulina con su receptor. Éste es una proteína tetramérica con dos subunidades alfa extracelulares y dos subunidades beta, que tienen una pequeña porción extracelular, una porción transmembranal y, una porción intracelular (o intracitoplásmica).⁶⁰

Los tejidos con mayor abundancia de receptores de insulina son el parénquima hepático y el tejido adiposo.

Cuando la insulina se une a las subunidades alfa, la actividad inhibitoria de éstas sobre las subunidades beta se pierde.⁶⁰ En ese momento, las subunidades beta ejercen su acción catalítica de tirosín-cinasas, las dos subunidades se transfosforilan (la una fosforila a la otra y viceversa) en 6-7 residuos de tirosina.

Sin esta actividad tirosín-cinasa del receptor de insulina, no se da ninguno de los efectos biológicos de la insulina.

Sustrato del Receptor de la Insulina 1

Anteriormente se pensó que la mayor parte de la acción insulínica estaba mediada por cambios en la concentración intracelular de nucleótidos (AMPc, GMPc) o flujos iónicos.

Pero actualmente se sabe que la mayoría de sus efectos están mediados por la fosforilación de sus sustratos endógenos (IRS, Insulin Receptor Substrates). Se han identificado cuatro IRS, pero los más estudiados han sido el IRS-1 y el IRS-2, que son ubicuos, mientras que IRS-3 está restringido al tejido adiposo y IRS-4 a riñón y encéfalo.⁶¹

El IRS-1 es una proteína rica en regiones de unión a tirosinas fosforiladas o regiones PTB (PhosphoTyrosine Binding), que le permiten unirse al receptor y ser fosforilado por él en sus residuos de tirosina.^{61,62}

Una vez el IRS-1 es fosforilado, liga a dos moléculas de gran importancia en la respuesta biológica a la insulina: PI3K y Grb-2.^{61,62,63}

Si bien no se ha podido esclarecer del todo la importancia relativa y las funciones de IRS-1 e IRS-2, estudios realizados con knock-out genéticos de ambos genes han mostrado que, en términos generales, los animales sin IRS-1 tienen baja talla, peso y desarrollo; mientras que los animales sin IRS-2 son diabéticos e insulinoresistentes.^{64,65,66}

Así, al parecer IRS-1 media primordialmente los efectos "tróficos", de la insulina; mientras que IRS-2 está más involucrado con los efectos "metabólicos" de la hormona.

Glucagón

El glucagón es un polipéptido de 29 aminoácidos que, tal como se ha comentado con anterioridad, está producido por las células α de los islotes de Langerhans del páncreas.

Al igual que en el caso de la insulina, su síntesis es el producto del procesamiento de un precursor, el proglucagón. Parte de esta molécula compone el péptido señal y, el resto, otro precursor llamado proglucagón. El proglucagón, a su vez, contiene además de glucagón las secuencias del Péptido Similar al Glucagón (GLP, Glucagon-Like Peptide) tipo 1 y tipo 2, la oxintomodulina y la glicentina.⁵³

Su secreción, al igual que la de insulina, se encuentra estrechamente regulada por los niveles de glucosa en plasma. De esta manera, una disminución en los niveles de glucemia estimula la actividad del canal de potasio (K^+) dependiente de ATP (KATP), modificando el potencial de membrana celular y permitiendo la apertura de canales de sodio (Na^+) y

calcio (Ca^{++}). El aumento en la concentración intracelular de estos dos iones despolariza la membrana, incrementando la conductancia al Ca^{++} , el cual favorece la exocitosis de los gránulos de glucagón. En el caso contrario, al aumentar la glucemia, se produce un incremento en la concentración intracelular de ATP, lo cual condiciona el cierre de los canales de KATP , produciéndose el cese del potencial de acción inducido por Na^+ y Ca^{++} y, por consiguiente, disminuye la secreción de glucagón.^{67,68}

Otro elemento que reduce su secreción es la estimulación de las células α por parte de la insulina ya que, tal como veremos, estas dos moléculas son prácticamente antagónicas a nivel funcional.⁶⁹

Además de la glucosa y la insulina, existen otros factores capaces de regular la secreción de glucagón, entre ellos: GLP-1, GLP-2, ácidos grasos, el sistema nervioso autónomo y los aminoácidos circulantes.^{70,71}

En relación a sus efectos, éstos son mediados por la unión a su receptor, el cual pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G y consta de 7 dominios transmembrana, siendo expresado principalmente en el hígado y en el riñón y, en menor proporción, a nivel del corazón, adipocitos, páncreas endocrino, cerebro, retina y tracto gastrointestinal. Además, cabe destacar que, en el páncreas endocrino, el receptor de glucagón se expresa fundamentalmente en la célula β pancreática, lo cual sugiere que existe una fuerte interacción paracrina bidireccional entre la célula α y la célula β pancreática.^{72,73}

A nivel hepático, el glucagón aumenta la liberación de glucosa mediante la inhibición de la síntesis de glucógeno y la estimulación de la glucogenólisis y la gluconeogénesis. Además, favorece la captación de algunos aminoácidos como, por ejemplo, la alanina, la glicina y la prolina, que sirven de sustrato para la gluconeogénesis.^{67,74}

En el adipocito, la lipasa es la responsable de la degradación de triglicéridos a ácidos grasos no esterificados y glicerol. En este caso, el glucagón, aunque no modifica los niveles de esta enzima, sí aumenta la liberación de glicerol por parte del adipocito, pudiendo éste servir también como sustrato de la gluconeogénesis.^{67,74}

Finalmente, el glucagón también inhibe la lipogénesis al reducir las concentraciones de malonil-CoA por un mecanismo dual: por un lado, inhibe la glucólisis, y por otro, inhibe la acetil-CoA carboxilasa. Al disminuir los niveles de malonil-CoA se favorece la cetosis mediante la activación de la enzima carnitina-palmitoil-transferasa, que permite la

entrada de ácidos grasos en las mitocondrias. En el interior de éstas, los ácidos grasos serán oxidados a cuerpos cetónicos, que pueden ser usados como sustrato energético del sistema nervioso central en circunstancias como el ayuno prolongado.^{67,74}

Ácido Graso Sintasa

Otra enzima que también tiene su papel en el control del metabolismo es la enzima ácido graso sintasa o FASN (por sus iniciales en inglés). En humanos, está codificada por el gen FASN⁷⁵ y se encuentra principalmente en el tejido graso y el hígado, aunque también la podemos encontrar en la próstata, pulmones y cerebro.

Se trata de un complejo multienzimático que participa en la biosíntesis de ácidos grasos (lipogénesis) de cadena larga, principalmente el ácido palmítico, a partir de una serie de reacciones descarboxilativas de acetil-CoA y malonil-CoA en presencia de NADPH.⁷⁶ Posteriormente, estos ácidos grasos son almacenados en forma de triacilglicerol en el tejido graso, siendo utilizado como reserva energética.⁷⁷

Su expresión se ve reducida, prácticamente en su totalidad, en relación con el ayuno, mientras que, con la ingesta, especialmente de carbohidratos, su expresión incrementa de forma substancial. Esta variación en la producción relacionada con la ingesta parece ser mediada en gran medida por la insulina, cuya presencia estimula la expresión de FASN, y el glucagón, que promueve el efecto contrario.^{77,78}

Receptores activados por proliferadores de peroxisomas

En relación a la síntesis de ácidos grasos, también contamos con los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs).

Se trata de una familia de factores de transcripción nucleares que pertenecen a la superfamilia de receptores esteroideos e incluye diferentes subtipos: PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ 1 y PPAR γ 2.^{79,80}

Se localizan en la mayoría de los tejidos. En particular, el PPAR α se expresa, principalmente, en tejidos donde es muy importante el catabolismo de ácidos grasos y de glucosa para la producción de energía, como el tejido hepático, músculo estriado y

cardíaco, así como en otros tejidos del sistema cardiovascular, pero también su presencia es importante en riñón, tejido adiposo, intestino delgado y cerebro.^{80,81,82}

Su función, como factores de transcripción, es regular la expresión genética.

Intervienen en importantes procesos, tales como la diferenciación celular, el desarrollo de órganos y tejidos, el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas y en la tumorigénesis.^{79,80}

Los ligandos naturales de los PPARs, es decir, aquellos que activan su función, son los ácidos grasos poliinsaturados y algunos eicosanoides. Sin embargo, también los activan compuestos como los fibratos y las tiazolidinedionas.⁸⁰

Regulación del estado inflamatorio

El proceso inflamatorio

La inflamación y su proceso de iniciación y regulación representan una respuesta fisiológica de los tejidos que ha sido ampliamente estudiada y donde influyen una gran cantidad de células y mediadores diferentes.

Partiendo de la base, la inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas.

Los aspectos básicos que se destacan en el proceso inflamatorio son, en primer lugar, la focalización de la respuesta, que tiende a circunscribir la zona de lucha contra el agente agresor. En segundo lugar, la respuesta inflamatoria es inmediata, de urgencia y, por tanto, preponderantemente inespecífica, aunque puede favorecer el desarrollo posterior de una respuesta específica. En tercer lugar, el foco inflamatorio atrae a las células inmunes de los tejidos cercanos. Para todo ello, las alteraciones vasculares van a permitir la llegada desde la sangre de moléculas inmunes.⁸³

Clínicamente, el proceso inflamatorio local se identifica mediante cuatro signos clásicos que son el calor, el rubor, el tumor y el dolor. Las dos primeras debidas al acúmulo sanguíneo en el foco inflamatorio, el tumor secundario al edema y acúmulo de células

inmunes, mientras que el dolor es producido por mediadores que actúan sobre terminaciones nerviosas.

De forma resumida se puede dividir el proceso inflamatorio en cinco etapas.⁸³

- 1.- Liberación de mediadores: Moléculas mayoritariamente sintetizadas y liberadas por los mastocitos bajo ciertos estímulos
- 2.- Efecto de los mediadores: Los mediadores producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.
- 3.- Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio. Proceden en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco.
- 4.- Regulación del proceso inflamatorio. Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso.
- 5.- Reparación. Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria.

Por tanto, el proceso se inicia con la liberación de ciertos mediadores y, aunque todos los tejidos al lesionarse van a liberar mediadores de la inflamación, la fuente principal de los mismos es el mastocito. La liberación de los mediadores puede ser debida a la lesión directa sobre la célula o a su activación por el complemento (C3a y C5a) o inmunoglobulinas como la IgE. Cuando éstos se activan liberan gránulos del citoplasma que contienen los mediadores ya preformados y sintetizan otros de novo que actuarán sobre los vasos sanguíneos adyacentes.⁸⁴

Estos mediadores, que se encontraban preformados en los gránulos, son principalmente histamina, enzimas proteolíticas, el factor quimiotáctico del eosinófilo (ECF), factor quimiotáctico del neutrófilo (NCF) y heparina.⁸⁵

Por otro lado, los que se generan de novo, son principalmente la PGE₂, la prostaglandina más importante en el proceso inflamatorio, el LTB₄, que es un factor quimiotáctico para eosinófilos, neutrófilos, mastocitos y macrófagos, y el PAF o factor activador de las

plaquetas, que produce su agregación y la liberación de otros mediadores relacionados con el proceso de coagulación.⁸⁵

Desde el punto de vista cronológico, los mediadores de la inflamación van a producir básicamente dos efectos.

En una primera fase inicial, alteraciones vasculares que facilitan el trasvase de moléculas desde la sangre al foco inflamatorio, así como la producción de edema. En una segunda fase, más tardía, las propias alteraciones vasculares, así como la liberación en el foco de factores quimiotácticos, determinan la llegada de células inmunes procedentes de la sangre y de los tejidos circundantes.^{84,86}

- Fase inicial

En esta primera fase ocurre la aparición de inmunoglobulinas, factores del complemento, quininas, proteínas de la fase aguda y factores de coagulación.

Las inmunoglobulinas se unen al agente agresor. La IgM y la IgG activan el complemento por la vía clásica mientras que la IgG, además, se une a receptores de los fagocitos potenciando la fagocitosis.⁸⁶

Por otro lado, el complemento, además de activarse por la vía clásica tal como se ha comentado anteriormente, puede activarse por una vía alternativa mediada por los productos liberados por gérmenes.

A partir de este punto, independientemente de la vía de activación, cuando alcanza la vía común produce la lisis del elemento agresor, sea un germen o una célula extraña. Además, C3a y C5a actúan sobre receptores de membrana de los basófilos y los mastocitos, induciendo más liberación de mediadores inflamatorios. C5a también tiene la propiedad de ser un potente quimiotáctico mientras que C3b potencia la fagocitosis.⁸⁷

De las proteínas de la fase aguda destacar la proteína C reactiva que tiene la capacidad de fijar determinados gérmenes y activar el complemento por la vía clásica.⁸⁴

- Fase tardía

En esta segunda fase, tal como hemos comentado, se produce la llegada de células inmunes.

Los neutrófilos son de las primeras células en llegar al foco inflamatorio. Producen la eliminación del germen mediante fagocitosis o liberando factores que producen la muerte extracelular.⁸⁶

Los monocitos y macrófagos llegan de forma más tardía. Tienen funciones parecidas a las de los neutrófilos pero actúan, además, como células presentadoras del antígeno a las células específicas T y B, iniciando la respuesta específica, y liberan IL-1.⁸⁴

Seguidamente encontraremos a los linfocitos T y B que, potenciados por macrófagos y monocitos, inician la respuesta específica. Los de tipo B sintetizan IgE que puede potenciar el proceso inflamatorio. Los tipos T producen linfoquinas que también promoverán el mantenimiento del proceso inflamatorio.⁸⁷

Los basófilos, junto con los mastocitos, contribuyen a la liberación de mediadores.

Los eosinófilos, además de tener actividad citotóxica, principalmente en infecciones parasitarias, tienen una función reguladora en el proceso inflamatorio.

Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio se encuentra estrechamente regulado, evitando así una respuesta exagerada o perjudicial.

Parte de los mediadores que producen activación, al variar su concentración o actuar sobre distintos receptores, van a producir inhibición, consiguiendo, de esta forma, un equilibrio o modulación de la respuesta inflamatoria.^{84,86,87}

Algunos de los factores más relevantes en este proceso son la histamina, la prostaglandina E, los agonistas autonómicos, la heparina y los propios eosinófilos.

Una vez las causas de la agresión han desaparecido se inicia el proceso de reparación, mediado principalmente por la llegada de fibroblastos.

Relación estado inflamatorio – obesidad

Es sabido que la obesidad se relaciona con un estado proinflamatorio y una tendencia a la resistencia insulínica, no presentes en el individuo delgado.⁸⁸

El exceso progresivo de tejido graso puede producir secundariamente alteraciones de la regulación, metabolización y secreción de diferentes hormonas,⁸⁹ ya que el tejido adiposo es un tejido endocrino complejo y metabólicamente muy activo, que desempeña un papel fundamental sobre las cascadas inflamatorias, procoagulantes, antifibrinolíticas y vasoactivas, lo que sugiere una influencia directa sobre el proceso inflamatorio⁹⁰ y un virtual estado de inflamación crónica.

A nivel fisiopatológico, cuando el balance energético es positivo, se produce un almacenamiento de energía en el adipocito. Este proceso se inicia en el tejido graso subcutáneo que aumenta principalmente a partir de hiperplasia, es decir, a partir de la proliferación y diferenciación de pre-adipocitos. Cuando este tejido es incapaz de almacenar todo el excedente se incrementan los depósitos a nivel de la grasa visceral, principalmente por hipertrofia, es decir, aumentando el tamaño de los adipocitos.⁹⁰

Estos cambios producen alteraciones a nivel intracelular, principalmente a nivel del retículo endoplasmático rugoso y de las mitocondrias. Las consecuencias celulares de estas alteraciones incluyen la resistencia molecular y la hiperproducción de ácidos grasos libres, adipocitocinas y mediadores inflamatorios, promoviendo una disfunción sistémica, que determinan las consecuencias clínicas y las complicaciones de la obesidad.⁹¹

Al mismo tiempo, este aumento en el número y tamaño de los adipocitos requiere de una mayor cantidad de oxígeno, produciéndose un estado de cierta hipoxia. Esta hipoxia afecta algunas de las funciones biológicas normales, tales como: la angiogénesis, la apoptosis, la inflamación y ocurre un cambio en el metabolismo celular.⁸⁸

Todo ello parece inducido por HIF-1 que, en estas circunstancias, se acumula en el núcleo y es responsable de la activación de los genes de eritropoyetina, factor de crecimiento del endotelio vascular, enzimas glucolíticas y transportadores de glucosa, que controlan el ajuste metabólico durante la generación de energía en el ambiente hipóxico.⁹²

Los trastornos metabólicos más importantes asociados a la obesidad incluyen, la resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hipertensión, dislipidemia, DM tipo 2 y un alto riesgo de enfermedades cardiovasculares.⁹³

Entre los trastornos metabólicos, la resistencia a la insulina es un estado caracterizado por disminución de la acción de la insulina y está asociada con alteraciones en la homeostasis de la glucosa y lípidos.

Existe un modelo para su valoración, el modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina o HOMA-IR. Utiliza valores de glucosa e insulina en ayunas para su cálculo. Concretamente valora si existe una resistencia periférica a la acción de la insulina y evalúa, indirectamente, la función de las células beta del páncreas. En condiciones normales, existe un equilibrio entre la producción hepática de glucosa y la secreción de insulina por las células beta del páncreas. Cuando se presenta resistencia a la insulina, se considera que existe una disminución de la función biológica de esta hormona, que obliga a generar un incremento en sus concentraciones plasmáticas con el fin de mantener la homeostasis. Además, se le considera un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares como la HTA y la cardiopatía isquémica, para el desarrollo de DM2, y sirve como predictor del Síndrome Metabólico.

Estudios realizados en adipocitos han demostrado que, en zonas de hipoxia relativa, ésta inhibe el proceso de señalización de la insulina a través del HIF y que, además, provoca cambios en la expresión de algunas adipocinas y citocinas inflamatorias.⁹⁴ Se ha observado que en estas zonas de tejido adiposo, en el paciente obeso, aumenta la secreción de adipocitocinas proinflamatorias como: factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), matriz de metaloproteinasas (MMP2 y MMP9), IL-6, PAI-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y leptina.⁹⁵

Paralelamente, la escasez de O₂ provoca la muerte celular de los adipocitos más periféricos, que se traduce en un aumento de la reacción inflamatoria.⁹⁰

Asimismo, aunque el adipocito es el elemento clave de los cambios y remodelado del tejido adiposo, los macrófagos presentes en el tejido adiposo desempeñan también un papel fundamental. Se ha descrito el fenómeno de "cambio fenotípico", definido como una transformación en el estado de polarización de los macrófagos, es decir, la transformación de un estado antiinflamatorio M2 (la forma predominante durante el

balance negativo de energía), a una forma M1 más proinflamatoria.⁹⁰ Se presenta, por tanto, una infiltración masiva de macrófagos M1 en el tejido adiposo, secundaria al incremento de la secreción de la proteína quimioatrayente de monocitos o MCP-1, que juega un papel crucial en la respuesta inflamatoria en la obesidad.

MCP-1 pertenece a la familia de quimiocinas. Se trata de citocinas con actividad quimioatrayente cuya función, ejercida mediante la unión a receptores transmembrana acoplados a proteínas G, está relacionada fundamentalmente con el tránsito de células del sistema inmune. Es sintetizada y secretada por distintos tipos celulares, como células de músculo liso vascular, endotelio, monocitos o macrófagos entre otros. Está implicada en el reclutamiento o migración de leucocitos, más concretamente de monocitos, a los focos donde está teniendo lugar la respuesta inflamatoria. Además, es el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células β activadas, uno de los mayores inductores de la expresión de esta adipocina.⁹⁶

Todos estos eventos ocurridos en el adipocito: la hipoxia en el tejido adiposo, la muerte celular de los adipocitos periféricos, la infiltración de células inmunes, la transformación de los macrófagos M2 a macrófagos M1, la infiltración de estos últimos en el tejido adiposo, la angiogénesis y la sobreproducción de matriz extracelular, producen una disregulación de la homeostasis, debido al aumento de la secreción de adipocitocinas proinflamatorias, principalmente IL-6, IL-10 y TNF- α .

Por otro lado, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una proteína del grupo de las citocinas liberadas por las células del sistema inmunitario que interviene en la inflamación y la apoptosis. Su estimulación está relacionada con otros mediadores celulares como IL-1 y endotoxinas bacterianas. El TNF- α ejerce distintas funciones en diferentes órganos, como la activación de la producción de otros mediadores como, por ejemplo, las interleucinas 1 a la 6. Además, suprime el apetito, por lo que también es conocida como caquexina. En el hígado estimula la reacción inflamatoria aguda, activando la síntesis de proteína C reactiva y otros mediadores celulares y, en otros órganos, aumenta la resistencia a la insulina. También promueve el reclutamiento de células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento, provocando la activación de linfocitos T y B. Aumenta la activación y adhesión plaquetarias y, probablemente, la oclusión vascular sea la causa de la necrosis tumoral. Aunque localmente los efectos del TNF- α son

beneficiosos, cuando actúa por todo el organismo tales efectos son perjudiciales, provocando síndromes como el shock séptico y la coagulación intravascular diseminada.

Otros elementos implicados en las reacciones inflamatorias que ya hemos ido nombrando son las interleucinas. Éstas son un conjunto de citocinas sintetizadas principalmente por los leucocitos, aunque en algunos casos también pueden intervenir células endoteliales, del estroma del timo o de la médula ósea.

Su principal función es regular los eventos relacionados con estas poblaciones de células del sistema inmunitario, como su activación, diferenciación o proliferación, la secreción de anticuerpos, la quimiotaxis y la regulación de otras citocinas y factores. Hasta la fecha se han identificado no menos de 33 clases diferentes de interleucinas con funciones específicas según el tipo.

Por último, también se objetiva en el individuo obeso un descenso de adipocitocinas antiinflamatorias, tales como, la adiponectina (que suprime la síntesis de varias citocinas proinflamatorias, como TNF- α) y el interferón gamma. Esta disregulación se debe a la inhibición que ejerce la adiponectina sobre la activación del NF- κ B, principal regulador de la transcripción de citocinas.⁹⁷

Por tanto, resumiendo, tanto los cambios celulares producidos por la hipertrofia/hiperplasia de los adipocitos como el estado de hipoxia en el que se encuentran parecen ser los causantes principales del estado proinflamatorio y el síndrome metabólico que acompañan habitualmente a la obesidad.

Genética y epigenética en la obesidad

Genética

Tal como hemos comentado anteriormente, un porcentaje nada despreciable de los pacientes con obesidad tiene algún factor genético relacionado. En muchos casos, este factor genético es debido a mutaciones o cambios en la secuencia del ADN. En otras ocasiones no se trata de alteraciones, entendiendo como tal mutaciones o defectos en la secuencia, sino que, dependiendo del número de copias de un gen concreto, tendremos

más o menos riesgo de sufrir obesidad. Así sucede, por ejemplo, con el gen que transcribe la amilasa salivar.⁹⁸

Estas alteraciones causantes de enfermedades que asocian la obesidad como uno de sus rasgos, son alteraciones a nivel de la secuencia del genoma. La secuencia genómica está siendo ampliamente estudiada y ha presentado importantes avances en relación a su interpretación.

Sin embargo, para profundizar en este aspecto, debemos de nuevo dividir la etiología de la obesidad en tres grupos diferentes:

- La obesidad común o multifactorial
- La obesidad monogénica no sindrómica
- La obesidad sindrómica

1.- La obesidad común o multifactorial

Se trata del grupo más frecuente y del que ya hemos hablado anteriormente en el apartado específico sobre obesidad. En este caso, la etiología de la obesidad es compartida entre los factores endógenos, relacionados en último término con factores genéticos, y los exógenos, que incluye los hábitos de vida como dietas inadecuadas, sedentarismo... En muchos casos, dado que estos hábitos son compartidos por la mayoría de los miembros de una familia, se tiende a pensar en la causa genética, cuando lo que comparten son los malos hábitos sociales, laborales y/o circunstancias familiares.

Dada la convergencia de muchos factores en este grupo como etiología de la obesidad, resulta difícil precisar que impacto tiene la genética. Por ello, no existe un consenso en la literatura y podemos encontrar porcentajes atribuibles a ésta muy variables, que van desde el 30 al 50%,⁹⁹ dejando el resto para los factores externos mencionados.

En esta población, los genes que intervienen no presentan propiamente mutaciones o errores, sino que tienen variaciones relativamente benignas y comunes, usualmente un polimorfismo de nucleótido único. Por tanto, ninguno de estos genes por sí solo es causa de obesidad. Es la suma o combinación de estas variantes lo que da la propensión genética que, interactuando con los factores ambientales mencionados, determina el fenotipo. En eso consiste la herencia multifactorial. Esto ha sido corroborado con estudios de gemelos

uni y bivitelinos y otros estudios que comparan la contribución genética y los factores ambientales.^{100,101}

Por otro lado, el número de genes que se han identificado y relacionado con el control de los hábitos alimentarios y la regulación del peso corporal es muy extenso.

A modo de ejemplo, Ignatieva et al publicaron un listado de 578 genes implicados.⁹ Muchos de ellos relacionados con la síntesis de hormonas y enzimas que, posteriormente, estarán relacionados con procesos metabólicos, pero ninguno de ellos tenía poder predictivo significativo de forma individual en sus diferentes variantes.

2.- La obesidad monogénica no sindrómica

Se trata de pacientes con obesidad severa secundaria a la herencia de determinados genes de forma mendeliana.

Se han identificado, de momento, 11 genes (Tabla 2) relacionados con enzimas y hormonas que interaccionan con el sistema del núcleo arcuato hipotalámico ya descrito previamente.

GEN	NOMBRE
LEP	Leptina
LEPR	Receptor de Leptina
CRHR1	Receptor 1 de hormona liberadora de corticotropina
CRHR2	Receptor 2 de hormona liberadora de corticotropina
GPR24	Hormona concentradora de melanina
PCSK1	Prohormona convertasa 1
POMC	Propiomelanocortina
MC3R	Receptor 3 de melanocortina
MC4R	Receptor 4 de melanocortina
NTRK2	Receptor del factor neurotrófico cerebral Trkb
SIM1	Single minded homolog 1

Tabla 2: Genes relacionados con enzimas y hormonas que interaccionan con el sistema del núcleo arcuato

Su mutación establece la presencia de obesidad extrema, hereditaria, no sindrómica. Son genes principalmente involucrados en el sistema hipotalámico de regulación del apetito.^{9,102}

3.- La obesidad sindrómica

El término se refiere a aquellos casos en los que la obesidad moderada o extrema es una característica más dentro del conjunto que conforma un síndrome. La causa es siempre genética, puede ser monogénica o poligénica, y puede ser una alteración cromosómica u otras formas más complejas de herencia.

Dentro de los síndromes que tienen como rasgo la obesidad, han sido identificadas algunas enfermedades como, por ejemplo, el síndrome de Prader-Willi, el síndrome de Bardet-Biedl o el síndrome de Cohen.¹⁰³

El primero es el síndrome más frecuente en la obesidad, con una frecuencia de 1 en 10000 a 1 en 30000 nacimientos. La causa de este síndrome es la pérdida o inactivación (por mecanismos epigenéticos) de una pequeña región del cromosoma 15 de origen paterno. El recién nacido presenta inicialmente hipotonía severa, dificultad para alimentarse, genitales poco desarrollados y ojos almendrados. Posteriormente, entre los 6 meses y los 3 años la hipotonía comienza a mejorar, el niño empieza a comer de forma intensa y se desarrolla una conducta adictiva por la comida, ya que las personas con este síndrome no presentan sensación de saciedad. El fenotipo de estos pacientes incluye talla corta, obesidad mórbida, manos y pies pequeños, genitales pequeños, conducta obsesiva, rechazo a la actividad física y retraso mental de grado leve a moderado.¹⁰⁴ Estudios recientes han investigado la relación de esta ausencia de saciedad con la leptina (que es la hormona que normalmente contribuye a moderar la ingesta provocando la sensación de saciedad), encontrándose que, contrariamente a lo que se esperaría, la leptina está elevada, sugiriendo más bien una posible resistencia a la leptina, que aún no está demostrada.¹⁰⁵

El Sd. de Bardet-Biedl se presenta con distrofia de la retina y otras patologías oculares que conllevan ceguera a partir de los 20 años en la mayoría de los pacientes afectados. También presenta polidactilia y trastornos anatómicos a nivel renal. Se conocen 8 loci

independientes relacionados con este síndrome, siendo la mayoría de herencia autosómica recesiva.¹⁰³

Por último, el Sd. de Cohen cursa con obesidad y retraso mental, microcefalia, una facies característica, con ojos levemente inclinados hacia abajo, incisivos superiores prominentes, paladar angosto, orejas grandes y problemas visuales varios. La causa es la presencia de mutaciones en ambos alelos del gen COH1, situado en el cromosoma 8p, siendo de herencia autosómica recesiva.¹⁰³

En general, en estos síndromes, la obesidad se da por aumento de la ingesta calórica debido a una falta de sensación de saciedad, que se relaciona con la alteración de alguno de los múltiples factores que actúan en el hipotálamo regulando la ingesta.¹⁰³

Epigenética

Sin embargo, la expresión genética y por tanto el fenotipo de un individuo no depende únicamente de su secuencia genética. Hay otro gran campo que se está explorando: la epigenética.

- Definición y mecanismos de acción

El término epigenética fue utilizado por primera vez en los años cincuenta, con la finalidad de describir los mecanismos por los cuales, los organismos pluricelulares, eran capaces de desarrollar distintos tejidos a partir de la misma información genética. Se acuñó por primera vez gracias a Conrad Waddington, derivado de la combinación entre “genética” y “epigénesis”.

El uso actual del término consiste en indicar cambios heredables en la estructura y organización del ADN que no involucran cambios en la secuencia y que modulan la expresión génica.

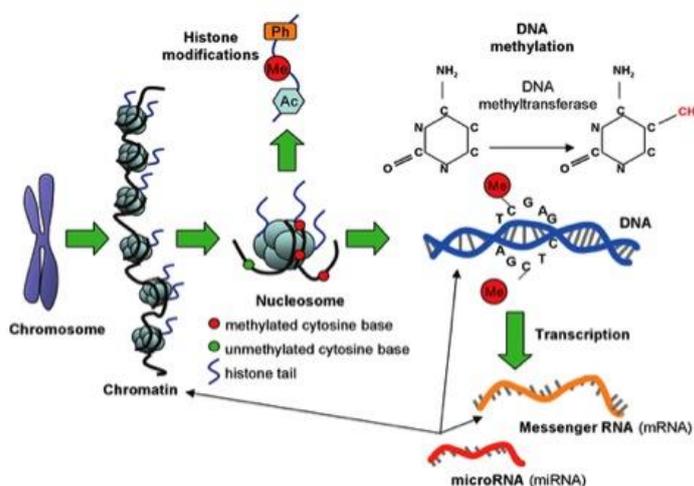
Así, mientras la secuencia en si se mantiene estable en todas las células del cuerpo de un individuo, el epigenoma es diferente entre los distintos subtipos celulares.¹⁰⁶

En los mamíferos el ADN está empaquetado como cromatina en el núcleo y reorganizada en 2 zonas estructurales diferentes que se denominan heterocromatina y eucromatina. La

heterocromatina está integrada por la mayor parte del material nuclear, incluyendo a los telómeros y las regiones con un gran número de secuencias repetitivas con un bajo contenido génico. Por otro lado, la eucromatina es la parte transcripcionalmente activa y contiene la mayoría de los genes.

Las unidades básicas de la cromatina son los nucleosomas. Se trata de 147 pares de bases a los que envuelven un octámero de histonas y constituyen el núcleo del nucleosoma. Estas histonas son las que pueden sufrir modificaciones de distinta índole: metilación de los residuos de lisina (clave para la activación o represión transcripcional) y arginina, acetilación en residuos de lisina, ubiquitinación y sumoilación de lisinas y fosforilación de serinas y treoninas.¹⁰⁷ (Figura 6)

Figure 1. Epigenetic modifications.



Relton CL, Davey Smith G (2010) Epigenetic Epidemiology of Common Complex Disease: Prospects for Prediction, Prevention, and Treatment. *PLoS Med* 7(10): e1000356. doi:10.1371/journal.pmed.1000356
<http://www.plosmedicine.org/article/info:doi/10.1371/journal.pmed.1000356>

PLoS MEDICINE

Figura 6: ADN y epigenética

Las modificaciones del ADN y de las histonas repercuten directamente en el grado de condensación de la cromatina, favoreciendo o no, el anclaje de la maquinaria transcripcional y su posterior repercusión sobre el fenotipo.

Hasta la fecha, se han identificado unos veinte mecanismos epigenéticos, los cuales son muy importantes en la regulación de la transcripción y por ello, también en la expresión génica.

Estos mecanismos incluyen la metilación del ADN, las modificaciones postraduccionales de las histonas, cambios que afectan al plegamiento de la cromatina (eucromatina vs heterocromatina) o a la estabilidad de los cromosomas y, en general, aquellos procesos que afectan a los patrones de expresión génica sin alterar o estar mediados por la secuencia del ADN (ARNs no codificantes, transposones y chaperonas entre otros), los complejos de remodelado de cromatina basados en ATP y los complejos proteicos Polycomb y Trithorax.¹⁰⁸

Uno de los más relevantes y estudiados hasta la actualidad es la metilación del ADN. Se trata de la unión covalente de un grupo metilo en posición 5' a una citosina, convirtiéndose en una 5-metilcitosina por medio de una ADN metiltransferasa (DNMT) y seguida de guanina (dinucleótido CpG), lo que da lugar a dos residuos de citosina metilados dispuestos de forma diagonal y opuestos a las hebras complementarias de ADN. (Figura 7)

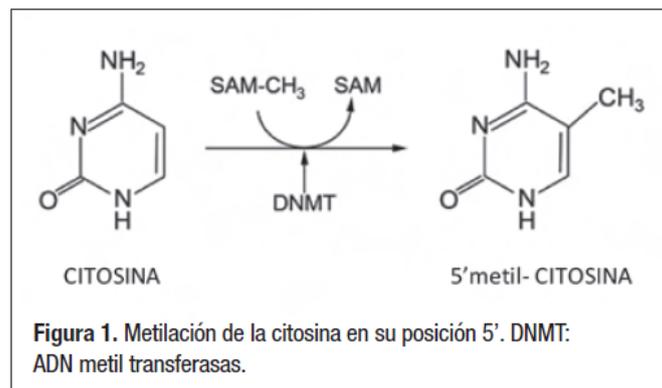


Figura 7: Metilación de la citosina

Existen distintas DNMT que pueden participar en este proceso, bien mediante las DNMTs de novo, que son las que van a incorporar el patrón inicial de grupos metilo sobre una secuencia de ADN sin metilar, o mediante las DNMTs de mantenimiento, que van a copiar el patrón de metilación de una cadena de ADN existente tras la replicación celular. Algunos de estos dinucleótidos CpGs se encuentran en mayor concentración en regiones

llamadas islas CpG, con frecuencia en las zonas promotoras y desmetiladas. Existen otros dinucleótidos con la misma estructura, pero que no se encuentran en esas islas, que suelen encontrarse metilados.¹⁰⁷

Aproximadamente, entre el 60 y el 90% de todas las secuencias CpG dispersas en el genoma están metiladas, mientras que las correspondientes a las islas CpG localizadas en la mayoría de los genes de mantenimiento celular no lo están. En general, las islas CpG se localizan entre la región central del promotor y el sitio de inicio de la transcripción, observándose represión en la expresión del gen cuando se encuentran hipermetiladas.¹⁰⁷

Actualmente, no se conoce la función precisa de la metilación en citosinas sobre la expresión génica, a la vez que se sabe que tiene un papel crucial en su control, en la diferenciación celular y el desarrollo embrionario. Algunas investigaciones han sugerido que el grupo metilo tiene la capacidad de interceptar a los factores de transcripción y evitar con ello que se unan al ADN.¹⁰⁷

Por regla general los genes metilados (sobre todo en la región promotora) suelen ser menos accesibles, lo que conlleva una menor expresión génica. Así mismo, la metilación en regiones intragénicas puede modular la expresión al actuar como promotores alternativos. Pero este punto no está claro actualmente ya que hay varios estudios contradictorios.¹⁰⁷

Esto explica como unas células específicas de un tejido concreto expresan unos tipos de genes de forma más o menos constante en las diferentes generaciones celulares.¹⁰⁹

- Estímulos sobre el epigenoma y obesidad

Actualmente el estudio del epigenoma de la obesidad se centra, principalmente, en el análisis a gran escala de los patrones de metilación del ADN, particularmente debido a la estabilidad en el ADN extraído en comparación con otras marcas epigenéticas, tales como modificaciones de histonas. Además, debido a su plasticidad biológica, es un biomarcador atractivo con gran potencial de utilidad clínica.

Una de las herramientas que está ayudando a poder conocer las características epigenéticas de los individuos obesos son los estudios de tipo EWAS (Estudios de Asociación del Epigenoma Completo), similares a los GWAS (Genome wide association

study), que se caracterizan por analizar miles o millones de CpGs en un determinado número de individuos.

Estos análisis permiten identificar sitios genéticos diferencialmente metilados (DMP) según la condición experimental. Por ello, en los últimos años, está aumentando este tipo de trabajos realizados en grandes estudios poblacionales, en los que se han identificado genes diferencialmente metilados en personas obesas y no obesas.¹¹⁰

De esta manera, mediante uno de los primeros grandes EWAS, Dick et al hallaron en 2014 cinco zonas CpG diferencialmente metiladas en tres loci genéticos asociados con IMC. Con estos hallazgos se pudo establecer una relación entre la metilación del intrón del gen *HIF3A*, relacionado con la respuesta adaptativa a la hipoxia, y el incremento del Índice de Masa Corporal de los sujetos.¹¹¹

Este resultado ha sido replicado en varios estudios en sangre¹¹²⁻¹¹³, y uno en el tejido adiposo.¹¹⁴ Además, se encontraron resultados similares en la cohorte ALSPAC de Bristol, en el Reino Unido.¹¹⁵

Otro estudio EWAS de interés es el estudio GOLDN, en el que se identificaron 8 regiones diferencialmente metiladas asociadas a IMC y a perímetro de la cintura.¹¹⁶

En el mismo sentido, un estudio de Marchi et al¹¹⁷ demuestra como existe una relación inversa entre la metilación del promotor del gen de la leptina y su posterior expresión a nivel del tejido adiposo e hígado. En el mismo estudio se evidenció que la posterior desmetilación se seguía de una nueva expresión de leptina y, por tanto, que los cambios epigenéticos son dinámicos y reversibles, tal como se ha descrito previamente. Posteriormente, se extrapolo el estudio a pacientes operados de cirugía bariátrica. Dichos pacientes presentaron cambios en los niveles de leptina en su organismo relacionados con la pérdida ponderal, no hallándose, sin embargo, relación con la presencia o no de metilaciones en dichas zonas promotoras del gen de la leptina.

Otro EWAS de IMC que se realizó en individuos europeos fue publicado recientemente por Mendelson y Cols.¹¹⁸ Ciento treinta y cinco CpGs fueron identificados inicialmente como DMP asociados al IMC. Ochenta y tres DMP replicados en al menos una de las tres cohortes de replicación adicionales, ARIC (n=2,096), GOLDN (n=992), y la cohorte de Investigación prospectiva de la Vasculatura en Uppsala Seniors (PIVUS) (n=967).

La mayoría de las DMPs descritas en estos estudios que están asociadas al IMC pertenecen a genes relacionados con el metabolismo lipídico, y actúan disregulando el mismo, así como el metabolismo basal y la regulación del apetito.

Sin embargo, a comienzos de la última década, los estudios epigenéticos de obesidad principalmente se han centrado en el estudio de genes candidatos en lugar de medidas totales del epigenoma, como la metilación del ADN global.¹¹⁹

Este tipo de estudios en genes concretos puede ser útil en enfermedades como las neoplasias, en las cuales, la hipometilación relacionada con un gen específico es lo suficientemente fuerte como para impulsar la variación global. Sin embargo, el estudio de genes candidatos en enfermedades complejas y multifactoriales, no ha sido particularmente fructífera, con resultados débiles e inconsistentes. Apenas se han conseguido validar resultados de algunos genes involucrados en el metabolismo por estudios globales de metilación de todo el genoma.¹²⁰

Por otro lado, a favor de la relación entre cambios epigenéticos y obesidad, se ha observado que los hijos de mujeres expuestas a determinados factores externos durante el embarazo tienen más riesgo de presentar obesidad, tanto en el nacimiento como en edades más tardías. Probablemente estos hechos se deban a cambios epigenéticos que son heredables.^{121,122} Dichas variaciones epigenéticas podrían responder a cambios relacionados con la disponibilidad de nutrientes, ejercicio físico y edad, entre otros.

Sin embargo, todavía la evidencia científica de cómo la epigenética influencia en el desarrollo de enfermedades crónicas como la obesidad o la diabetes es baja. Es por este motivo que hay un gran interés científico en este amplio campo de investigación.^{111,123}

Tratamientos y sus resultados

Hoy en día es un hecho que el enfoque que hay que realizar para tratar la obesidad debe ser multimodal. Es decir, no existe un único tratamiento que pueda ofrecer, por si solo, resultados satisfactorios a largo plazo. Para ello debemos servirnos de las ventajas que nos ofrecen cada uno de ellos y aplicarlos adecuadamente en el momento necesario, bien de forma individual o bien asociados entre ellos.

Sin embargo, sí que es cierto que la efectividad de los tratamientos es diferente.

Seguidamente vamos a revisar los resultados de los tres principales tratamientos de los que disponemos: dieta, tratamiento farmacológico y tratamiento quirúrgico.

La dieta como tratamiento de la obesidad ^{124,125,126}

Tal como se ha comentado con anterioridad, la obesidad es una enfermedad heterogénea y multifactorial. Sin embargo, ya hemos incidido en la importancia que tiene el concepto del balance entre la energía ingerida y el gasto calórico para su desarrollo.

Por este motivo, la dieta, que es el factor que nos va a determinar la energía ingerida, es de vital importancia en el tratamiento de cualquier paciente con sobrepeso u obesidad, sea cual sea su etiología.

Hay que diferenciar las pautas con las que se pretende corregir el sobrepeso y la obesidad en el adulto, de las que se emplean en el niño o adolescente, dado que las medidas restrictivas podrían afectar negativamente al crecimiento y a la conducta de estos últimos.

Dadas las características del individuo obeso y considerando, siempre dentro de lo posible, sus características sociales, culturales y genéticas, el tratamiento se orientará a:

1.- Reducir el ingreso energético y/o incrementar el gasto energético. Este aspecto se consigue mediante:

- Consumo de dietas hipocalóricas
- Disminución del apetito
- Incremento de las señales de saciedad
- Aumento del efecto termogénico de los alimentos

2.- Reducción de la absorción de macronutrientes y/o energía. Esto se logra:

- Incrementando la velocidad del tránsito intestinal
- Disminuyendo la digestión y absorción de lípidos
- Reduciendo la absorción y digestión de los hidratos de carbono

- Disminuyendo la absorción y digestión de las proteínas

3.- Produciendo efectos metabólicos

- Modificando la respuesta glucémica e insulinémica de la dieta
- Normalizando la insulinemia del paciente
- Disminuyendo la lipogénesis en el tejido adiposo
- Incrementando la actividad metabólica general.

4.- Aunque la información científica es limitada, el tratamiento además se orientará a:

- Normalizar o mejorar la calidad de la microflora intestinal y su relación con el hospedador
- La búsqueda de beneficios epigenéticos y en la interacción dieta-genoma.

En relación a algunos aspectos cualitativos de las dietas hay que recordar algunos conceptos:

- *Energía*

La reducción del aporte energético es clave en el tratamiento, sobre todo cuando el aumento del gasto energético a través de, por ejemplo, la actividad física, está limitado por las condiciones clínicas o sociales de los individuos.

Por ello, una forma de clasificar los tipos de dietas es según el grado de restricción energética.

Actualmente se considera como más adecuadas las restricciones del orden de un 25% del ingreso energético diario o de 500 y 1000 kcal menos/día. Sin embargo, la dieta deberá contener todo tipo de ingredientes que aseguren una nutrición correcta.

La restricción calórica, además de iniciar un balance negativo energético, implica una reducción de la tasa metabólica y, por tanto, de daños al azar en diferentes moléculas biológicas.

Este aspecto incide en la relación que existe entre la obesidad, con la producción de radicales libres, con la inflamación, que ya se ha comentado previamente. Es conocido, tal como se ha puesto en evidencia en muchos modelos experimentales, que la restricción calórica induce una menor producción mitocondrial de radicales libres y, por ende, de daño oxidativo en el ADN nuclear y mitocondrial y a otras moléculas.

La reducción calórica, por otra parte, se ha señalado como un agente estresante suave, que incrementa ligera, pero de forma continua, los niveles de corticoides, permitiendo al individuo una mejor adaptación a factores deletéreos, a través de elevar la actividad de genes que protegen a las células de la acción de agentes dañinos.

Se ha propuesto que la restricción calórica, a través de la desacetilación de histonas, silenciaría regiones del genoma mediante cambios epigenéticos, haciéndolas inaccesibles para factores de transcripción y, por tanto, convirtiéndolas transcripcionalmente en inactivas.

Por otro lado, el ayuno disminuye los niveles de mRNA de insulina, aspecto de indudable importancia en la hiperinsulinemia que presentan los pacientes obesos.

Los beneficios de la reducción de energía se explican, además, porque una sobrecarga de nutrientes produce una hiperestimulación del complejo mTOR y de S6K-1, altamente implicados en la síntesis proteica y en la lipogénesis, pero cuya hiperexpresión conduce a inhibición de IRS-1 por hiperfosforilación, promoviendo resistencia a la insulina.

- *Número y reparto de comidas*

Debe respetarse el horario y número de comidas para evitar fenómenos de tipo rebote.

El ayuno prolongado que se promueve al saltarse una o varias comidas aumenta la eficacia de mecanismos de reserva de energía y de almacenamiento de grasa.

Además, la reducción del número de comidas hace muy dificultoso cubrir objetivos nutricionales.

De hecho, el reparto de la energía y nutrientes en un mayor número de comidas mejora la respuesta insulinémica a la dieta y reduce, por tanto, el estatus hiperinsulinémico y la resistencia a la insulina del obeso.

- *Bebidas*

La ingesta de agua o de bebidas analcohólicas de contenido energético nulo o muy reducido en cantidades elevadas será obligada y abundante, ya que ayuda a mejorar la hidratación corporal, y facilita la eliminación de residuos.

Además, el consumo de bebidas antes de las comidas tiene un efecto levemente saciante y, disminuir su disponibilidad durante la comida, tendría un valor coadyuvante potencial, ya que tiende a comerse menos cuando no se dispone de líquido.

- *Bebidas estimulantes.*

El café, el té y el cacao son bebidas que contienen bases xánticas, sustancias de acción estimulante central que incrementan el nivel de catecolaminas y la liberación de ácidos grasos.

En algunos casos las dietas muy restrictivas conducen a una situación “aletargante” que debe ser evitada si se pretende mantener el gasto energético lo más elevado posible.

No obstante, la ingesta continua y en concentraciones elevadas de estas bebidas crearía dependencia y tolerancia, por lo que su consumo debe ser, ante todo, moderado.

Además, se han observado efectos antioxidantes de indudable importancia en el consumo de café y té. En cambio, el consumo de cacao se realiza habitualmente de forma azucarada y con leche, lo que eleva considerablemente la densidad energética de este alimento y desaconseja su ingesta de forma rutinaria.

- *Hidratos de Carbono*

En contra de muchas de las dietas que actualmente son difundidas y seguidas, debe asegurarse una ingesta adecuada y suficiente de hidratos de carbono al día (no menos de 100 g).

Además, los alimentos ricos en hidratos de carbono complejos contienen agua y fibra, suelen ser más voluminosos y contribuyen a ejercer efectos de saciedad.

Por otro lado, tienen un mayor efecto termogénico (elevación del metabolismo basal en un 10-15%) que las grasas, lo que ayuda a incrementar el gasto de energía.

Si nos fijamos en los diferentes tipos de alimentos que contienen hidratos de carbono, atendiendo al índice glucémico, se cree que son mejores las legumbres, verduras y la mayoría de las frutas que otros alimentos como el pan y las patatas.

En cambio, se debe evitar el consumo de fructosa por sus efectos deletéreos en el metabolismo lipoproteico, en la resistencia a la insulina y porque promueven una menor liberación de leptina en el tejido adiposo.

Inciendo en el aspecto inicial, nuestro organismo, para un correcto funcionamiento, necesita alrededor del 50% de la energía procedente de hidratos de carbono.

Estos macronutrientes se almacenan limitadamente en forma de glucógeno hepático (100-120g) y muscular (200-500g). Seguidamente, la posible conversión metabólica de hidratos de carbono en grasa es relativamente ineficiente (75%), estimándose que la transformación de hidratos de carbono en lípidos no excede los 12g/día.

Por último, debemos destacar que la glucosa participa en el control de la expresión génica de la insulina a través de diferentes factores de transcripción. Por ello, defectos en estos factores de transcripción se han asociado a DM2 o hiperglucemia crónica.

A modo de ejemplo, se ha objetivado que el factor Pdx-1 en condiciones de hipo o normoglucemia se asocia con desacetilasas de histonas, reduciendo la expresión de insulina, mientras que la hiperglucemia se asocia con hiperacetilación e hipermetilación de diferentes histonas.

- *Fibra dietética.*

Debido a la importante restricción calórica y de hidratos de carbono que se somete a los individuos obesos que inician una dieta, es difícil alcanzar las cantidades recomendadas para la población no obesa de 20-30 gramos/día. Por ello parece razonable suplementar la dieta con fibras saciantes y moduladoras de la insulinemia.

Sin embargo, habrá que tener en cuenta las posibles interacciones nutriente-fibra, además de las posibles interacciones medicamentos-fibra que puedan producirse.

Si bien se aconseja elevar el contenido de fibras saciantes, también es cierto que la deficiencia del consumo de fibras hidrófilas implicaría una reducción del volumen fecal y tendencia a estreñimiento, situación ya de por sí común en la obesidad y en la restricción del consumo de alimentos. Por ello debe ingerirse diariamente una mezcla adecuada de fibra, tanto soluble como insoluble, dado que la ingesta de un sólo tipo de fibra al día no es recomendable.

- *Lípidos.*

Las grasas deben representar un aporte del 30-35% kcal/día totales. Esto es conveniente dada la alta eficacia de transformación de la grasa dietética en grasa corporal (97%), a los leves efectos termogénicos (3-5%) y saciantes de las mismas, y a la alta palatabilidad que tienen.

Por tanto, hay que priorizar dietas bajas en lípidos y, especialmente, si son grasas saturadas, que no deberían representar más del 10% de la dieta.

Teniendo esto en cuenta, hay que limitar el consumo de alimentos como carne y leche entera, intentando en todo momento priorizar las grasas de origen vegetal.

La limitación del consumo de grasa saturada se debe a diferentes aspectos.

Las grasas saturadas incrementan la palatabilidad de los alimentos, reducen la señal de leptina, promueven resistencia a la insulina, inducen un menor efecto termogénico que las grasas insaturadas por lo que contribuyen en la creación y estabilidad de los depósitos grasos.

Sin embargo, las grasas insaturadas presentan ciertos beneficios debido a la relación que tienen algunos ácidos grasos poliinsaturados con factores de transcripción como PPAR, SREBP, ChREBP, NF-kB, etc.

En el caso de PPAR- α , ya hemos descrito que su activación estimula la oxidación de los ácidos grasos para su uso como sustrato energético en tejidos como hígado, corazón, riñones o tejido adiposo marrón.

Por otro lado, otros ácidos grasos poliinsaturados como el omega-6 y el omega-3, promueven la activación de PPAR γ , que induce la transcripción de LPL y de

transportadores de ácidos grasos, activa la diferenciación de los adipocitos, aumenta la expresión de adiponectina e inhibe la formación de citoquinas proinflamatorias, ayudando a disminuir el estado proinflamatorio que ya hemos descrito que presentan los individuos obesos.

Otro aspecto interesante es que, en la obesidad, se producen niveles elevados de colesterol ligado a LDL que se incrementan, a su vez, por el consumo de grasas saturadas.

Finalmente, también debe reducirse, todo lo posible, el aporte de ácidos grasos trans (<1% de la energía), dada la conocida relación de estos ácidos grasos con el incremento de la resistencia a la insulina y el empeoramiento de perfil lipoproteico (elevan LDL y posiblemente VLDL y reducen los niveles de HDL).

- Proteínas

De forma general, las proteínas deberían representar alrededor del 20% del aporte calórico total de la dieta.

Para ello, se deben consumir alimentos con un alto valor proteicos como pescados, mariscos, carnes magras, huevos o leche, vigilando de no excedernos con ello con la ingesta de grasas.

Esto nos va a producir un elevado efecto termogénico, evita un catabolismo excesivo de la masa magra y aporta una sensación adecuada de saciedad.

Además, los aminoácidos regulan la expresión génica modulando la transcripción y la traducción de determinados genes.

Algunos, por ejemplo, modifican la traducción de la proteína ribosómica S6. Esto promueve, mediante la vía de la cinasa mTOR, efectos anabolizantes de aminoácidos, insulina y otros factores.

Por tanto, modulan la síntesis proteica, crecimiento de células beta y el mantenimiento del músculo esquelético, entre otros.

Sin embargo, también es conocido que, una ingesta excesiva de triptófano acompañado de una reducción de hidratos de carbono produce una elevación de los niveles de serotonina, incrementando el apetito y la avidez por hidratos de carbono.

- *Alcohol*

El alcohol, debido a su elevado contenido calórico, debe reducirse lo máximo posible en las dietas.

Concretamente, las bebidas de alta graduación deberían eliminarse por completo.

También es conocido el efecto negativo que tiene el consumo excesivo de alcohol sobre el metabolismo de los triglicéridos y el incremento de la tensión arterial.

Sin embargo, es frecuente oír a nivel social que reducidas cantidades de alcohol es beneficioso para el organismo. Esto es debido a que bebidas con baja graduación alcohólica contienen polifenoles y otras sustancias antioxidantes, que elevan el efecto termogénico y mejoran el perfil lipoproteico.

- *Minerales*

Es importante valorar la conveniencia de suplementar la dieta con minerales, dada la dificultad de cubrir las recomendaciones diarias al reducir el aporte de alimentos.

Hay que tener en cuenta que muchos minerales modulan la expresión génica y están implicados en mecanismos de óxido reducción.

- *Vitaminas*

Igual que en el caso anterior, es importante valorar la conveniencia de suplementar la dieta con vitaminas.

Sin embargo, se debe evitar el consumo aislado e indiscriminado de ellas, dada la utilización secuencial y coordinada de algunas de ellas en la utilización energética de los macronutrientes, mediante la modulación de la expresión génica a través de unión a receptores específicos o a factores de transcripción, que pueden cambiar la susceptibilidad a hormonas esteroideas.

Seguidamente, una vez hemos descrito y conocemos las características generales de los diferentes nutrientes, hay que fijar cuatro objetivos para llevar a cabo una correcta dieta.

Estos son el peso final deseable, el ritmo de adelgazamiento, hacer un planteamiento terapéutico y mantener el peso perdido.

El Peso final deseable es el peso más adecuado para garantizar la máxima expectativa de vida y de salud. También es aquel en el que el sujeto, por razones personales, se encuentra fisiológicamente mejor y lo considera como más deseable.

Se establecerá relacionando el peso en Kg con la talla en metros y teniendo en cuenta las peculiaridades del paciente. Por tanto, estamos hablando del cálculo del IMC que ya se ha descrito en apartados anteriores. Hay que recordar que la mayor expectativa de vida se consigue con un IMC entre 20 y 25 kg/m².

Pero a la hora de fijar este objetivo es importante hacerlo de una forma realista, teniendo en cuenta que es preferible fijar objetivos menos ambiciosos pero consiguiendo resultados, que fijar objetivos óptimos pero con alto riesgo de fracaso o abandono.

Otro de los aspectos importantes es el Ritmo de adelgazamiento.

Para ello hay que conocer el tipo de obesidad que se trata, y tener en cuenta que las pérdidas que acontecen durante las primeras semanas orientarán sobre la capacidad del paciente a reducir su peso o la idoneidad del tratamiento.

Unas pérdidas adecuadas serían, durante el primer mes, de unos 6 kg (1,5 kg/semana) y de 2-4 kg/mes en los meses siguientes, ya que durante las primeras semanas se pierden cantidades importantes de agua y glucógeno y menos de grasa. Posteriormente las pérdidas son preferentemente en forma de grasa. El ritmo de pérdida deberá estar normalmente comprendido entre 0,5 kg/semana y 1 kg/semana.

Estas pérdidas se consiguen mediante restricciones entre 500 kcal/día y 1000 kcal/día respecto a la ingesta o, mejor, respecto del gasto energético.

No son convenientes pautas que originen pérdidas superiores a 1 kg/semana, ya que se pierden además de grasa, importantes cantidades de tejido magro, con la consiguiente caída de la tasa metabólica basal que dificultaría la eficacia del tratamiento.

Además, se origina un efecto rebote mayor, con ganancia de peso más rápida, cuando se aplican restricciones muy bruscas que cuando son paulatinas.

Tampoco se recomiendan disminuciones de peso menores de 0,5 kg/semana, pues el tratamiento se alargaría excesivamente y se corre el riesgo de desmotivar al paciente.

No obstante, en algunos pacientes con obesidades moderadas, puede estudiarse la conveniencia de empezar por restricciones menos severas, ya que en algunos casos se pueden obtener disminuciones de peso acertadas, o bien se aplican restricciones mayores en caso de no conseguir perder peso de la forma esperada.

Seguidamente hay que realizar un Planteamiento terapéutico.

Ya hemos comentado que el tratamiento de la obesidad es multifactorial y por ello, a la dieta, que será parte fundamental, habrá que valorar asociarle otros métodos coadyuvantes, como el ejercicio físico o tratamientos médico-quirúrgicos.

A partir de aquí, habrá que fijar la Pauta dietética para lo que se tendrán en cuenta los siguientes aspectos:

- a. Fijar la tasa energética diaria
- b. Aspectos cualitativos y cuantitativos de la dieta a utilizar
- c. Plan alimentario

- *Fijación de la tasa energética diaria*

Se deducirá a partir de realizar una encuesta dietética y del sobrepeso encontrado.

En el caso de obesidades leves se acudirá, en principio, a Regímenes cualitativos, mientras que para obesidades moderadas y graves se aplicarán Restricciones calóricas moderadas o severas. Antes se utilizaban dietas excesivamente restrictivas, pero, se prefieren las restricciones ya comentadas de 500 a 1000 kcal respecto al gasto energético o, en su defecto, respecto a la ingesta habitual.

Se valorará la aplicación de reducciones calóricas más importantes, pudiendo fijar, en casos favorables, una tasa de 21 kcal/kg de peso teórico (deseable)/día en el caso de obesidades moderadas, y restricciones más severas, de 15-17 kcal/kg de peso teórico y día, para obesidades graves u obesidades moderadas en individuos con antecedentes de obesidad.

En algunas situaciones, se podría estudiar la conveniencia de reforzar el tratamiento con la aplicación de un día de ayuno modificado o la utilización de fórmulas completas o similares.

Además, normalmente estas dietas incluyen un listado de alimentos altamente restringidos, limitados o permitidos, que se incluirán en las diferentes dietas a utilizar.

- *Aspectos cualitativos y cuantitativos*

Muchas de las dietas de adelgazamiento se basan en la restricción severa o moderada (20-25% de la energía), pero las pérdidas de peso y el control de este, una vez disminuido, están influenciados no sólo por la energía consumida, sino también por la composición y el reparto de la dieta a lo largo del día.

Aunque existen multitud de dietas restrictivas, comentaremos algunos aspectos nutricionales de carácter general.

Los tratamientos dietéticos restrictivos podemos clasificarlos dentro de dos grandes grupos: Ayuno y Dietas hipocalóricas.

1.- Ayuno: Las dietas restrictivas de tipo ayuno se prescribirán sólo en casos particulares de obesidades graves o extremas, consisten en regímenes de menos de 500 kcal.

2.- Regímenes hipocalóricos: Son las dietas comentadas en las que se limitan, en un principio, algunos alimentos con un contenido calórico entre 500-1000 kcal menos de lo habitual o, en su caso, del gasto energético.

2.1.- Regímenes restrictivos cualitativos. Son dietas semilibres, donde no se cuantifica el alimento a consumir, ni se determina el balance calórico del individuo. El peso se controlará frecuentemente, no siendo necesario realizar restricciones hipocalóricas si se consigue el objetivo de perder peso. La dieta consistirá en consejos dietéticos orientativos, donde se instará a la reducción de un determinado alimento o bebida.

2.2.- Regímenes hipocalóricos hiperprotéicos. Son muy útiles en el inicio del tratamiento. No se deberían seguir durante más de una semana, ya que son hiperuricémicos, y no son equilibrados desde el punto de vista nutricional. En dietas hiperprotéicas con poco aporte de hidratos de carbono, puede producirse hipoglucemia, elevación de los cuerpos

cetónicos y, lo que es paradójico, incremento de la degradación de la masa magra. Son bien admitidos, presentan un elevado efecto termogénico e inducen saciedad.

2.3.- Regímenes hipocalóricos hiperhidrocarbonados. Presentan una contribución calórica por parte de los hidratos de carbono muy elevada (75-80% de las kcal totales). Sacian rápidamente, pero la sensación de hambre aparece también pronto después de las comidas. Su contenido en fibra es elevado, por lo que evitan y resuelven el estreñimiento. Proporcionan energía con rapidez y aportan algunas vitaminas en cantidades importantes. Debe vigilarse el aporte de ácidos grasos esenciales.

2.4.- Regímenes hipocalóricos hipohidrocarbonados. Estos regímenes son muy populares, pues consiguen pérdidas ponderales interesantes y son anorexígenos. Sin embargo, son desaconsejables debido a su bajo contenido en hidratos de carbono, fibra y algunas vitaminas. Son cetogénicos y acidóticos, hiperuricémicos e hiperlipemiantes, acelerando la pérdida elevada de agua intracelular y de electrolitos. También son desaconsejables por el efecto rebote que generan cuando se abandonan.

2.5.- Regímenes balanceados o equilibrados. En la actualidad existe una general aceptación entre los profesionales de la salud que son los más aconsejables, dado el equilibrio entre los macronutrientes que aportan y porque ayudan a reeducar nutricionalmente al paciente, aunque las pérdidas de peso sean menores a las producidas en otros regímenes de adelgazamiento.

Se trata de dietas tipo mediterráneo pero con una restricción moderada de energía (entre 500 y 1000 kcal/día menos). Es obligatorio el consumo de agua y bebidas analcohólicas tipo "light" en cantidades que superen los dos litros diarios. Las proteínas aportarán entre el 15-30% de las kcal totales, los hidratos de carbono del 40-55% y las grasas del 30-35%. El aporte de fibra será variado y de 20-30 gramos/día, ingiriéndose minerales y vitaminas en cantidades que cubran las recomendaciones. Las comidas se distribuirán en 4 o más tomas.

Una de las características primordiales de las dietas mediterráneas es su sostenibilidad, pudiendo consumirse sin riesgos para la salud de ningún tipo durante toda la vida.

La dieta mediterránea es variada, rica en nutrientes y sin exceso de energía y en su estructura se encuentran componentes de probado beneficio para la prevención de enfermedades degenerativas y en particular de la obesidad y del síndrome metabólico.

Por tanto, existe evidencia de que los regímenes balanceados o equilibrados, basados en la dieta mediterránea, pueden ser muy adecuados.

Según Garaulet et al. la disminución de la ingesta de grasas en general, y de grasas saturadas en particular, el aumento de la ingesta de cereales, en detrimento del consumo de carnes grasas, el consumo de pescado y un aumento de la ingesta de verduras y frutas, son las características típicas de una dieta equilibrada y más aún de la Mediterránea.¹²⁷

- Plan alimentario

No sólo es importante la cantidad de energía diaria que ingerimos, sino también el modo y la distribución en que lo hacemos a lo largo del día.

Ello se debe a que la respuesta del organismo a los nutrientes no es homogénea.

Por ejemplo, la respuesta insulinémica a un mismo alimento es más elevada por la mañana que a otras horas del día y, por tanto, la repercusión es diferente.

Por otro lado, para evitar en cierta manera el efecto lipogénico que produce la insulina, se ha recomendado evitar la ingesta de alimentos con alto poder glucémico al mismo tiempo que alimentos ricos en grasas saturadas.

Igualmente, es importante la información y concienciación del paciente en relación a los riesgos de la obesidad, orientarlo bien sobre los objetivos del tratamiento y plantear la adaptación del menú familiar a la dieta, de forma que sea más fácil su seguimiento.

- Mantenimiento del peso perdido

Entre el 80 y el 90% los pacientes que pierden cantidades significativas de peso en el tratamiento de la obesidad vuelven a ganarlo al cabo de un tiempo. Con la finalidad de encontrar una explicación a este hecho se han sugerido varias hipótesis.

La primera de ellas señala que, cuando el paciente obeso pierde una cantidad significativa de peso, se disminuye también su tasa metabólica, lo que conlleva la necesidad de menos requerimientos energéticos diarios. Esta nueva situación determina que, manteniendo una misma dieta que ha funcionado correctamente con anterioridad, le sea más difícil seguir perdiendo peso o incluso que puedan ganar.

Otra posibilidad que se plantea es que en el ayuno parcial o total promovido por la dieta, se eleva la eficacia termodinámica del organismo, de tal forma que, puede mantenerse un peso nuevo, algo menor, con ingestas energéticas significativamente inferiores respecto a las que se seguían originalmente.

En esta nueva situación se produce, en el tejido adiposo marrón, una disminución de la génesis y actividad de la termogenina, dando lugar a sujetos muy eficientes termodinámicamente.

Estos resultados señalan que, debido a la eficacia termodinámica, incluso después de años con una ingesta energética ligeramente superior a la del tratamiento hipocalórico puede ocurrir ganancia ponderal.

Otra opción relaciona la disminución del tamaño del tejido adiposo y la consecuente reducción en la producción de leptina, con la tendencia a ganar peso de nuevo para resarcir los depósitos.

Por tanto, dado que existe una adaptación del organismo a las nuevas circunstancias dietéticas mediante cambios a nivel metabólico, se requiere ir adaptando la dieta según la evolución observada del paciente.

El tratamiento farmacológico

Ante la problemática de la obesidad, que tal como hemos apuntado con anterioridad se ha ido incrementando a lo largo de las últimas décadas, ha habido un interés creciente por encontrar tratamientos farmacológicos para su tratamiento y prevención.

Utilizaremos fármacos en el paciente con $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ o $> 27 \text{ kg/m}^2$ asociado a comorbilidades mayores, cuando tras 3-6 meses en un programa estructurado no pierda $> 5\%$ del peso inicial.¹²⁸ Si una vez iniciado, éste es bien tolerado y la pérdida ponderal supera el 5% del peso inicial, el tratamiento debe continuarse de forma crónica mientras persista la indicación.¹²⁹

Inicialmente, los medicamentos desarrollados para disminuir el peso incluyeron catárticos, laxantes y eméticos, aunque posteriormente, las dianas terapéuticas se ampliaron significativamente.

Sin embargo, gran parte de los fármacos inicialmente utilizados como hormonas tiroideas, el dinitrofenol, anfetaminas, simpaticomiméticos (Benedrina), inhibidores tricíclicos de los receptores de noradrenalina (Mazindol), agentes serotoninérgicos (Fenfluramine), así como varios laxantes y diuréticos, fueron descartados debido a los efectos secundarios que presentaban.¹³⁰

Seguidamente, la combinación entre diferentes productos como (fentermina + fenfluramina o efedrina + cafeína) también fueron abandonados debido a consecuencias adversas.¹³¹

Posteriormente, intentos focalizándose en mecanismos de control de la ingesta, como los relacionados con NPY, agonistas de los receptores de melanocortina o vías ligadas a la leptina/ghrelina, tampoco fueron satisfactorios.

A modo de ejemplo tenemos la Sibutramina o el Rimonabant, un antagonista de los receptores cannabinoides, que fueron retirados debido a un aumento en el número de suicidios y del aumento del riesgo cardiovascular respectivamente.^{132,133}

Otros fármacos, en cambio, han tenido mejor fortuna.

Desde 1999 hasta 2014 cinco fármacos han sido desarrollados y aprobados para su uso como tratamiento de la obesidad¹³⁴ con resultados clínicamente satisfactorios.^{135,136}

Cabe destacar que, tomando como referencia la Food and Drug Administration (FDA) como agente regulador, para que un fármaco se considere clínicamente relevante debe demostrar, mediante estudios clínicos, que consigue una reducción del peso corporal al año de al menos el 5% del total.

Por ejemplo, el Orlistat, es un inhibidor potente, específico y de larga acción de lipasas gastrointestinales. Actúa en el lumen del estómago y del intestino delgado mediante la formación de enlace covalente con el sitio activo de serina de lipasas gástrica y pancreática. La enzima inactivada no hidroliza la grasa de la dieta, disminuyendo su absorción. Su efecto es moderado, consiguiendo al año, en aproximadamente un tercio de los pacientes tratados, una reducción superior al 5% del peso corporal.¹³⁷ Además, a este efecto moderado, hay que sumarle una serie de efectos secundarios relacionados con esta malabsorción de las grasas, como dolor abdominal, aumento del número de deposiciones y esteatorrea.

Otro de los fármacos en uso es la Liraglutida, un agonista del GLP-1, usado como antidiabético pero, a la vez, como agente supresor del apetito. En ensayos clínicos ha demostrado una reducción del peso de entre el 5,4 y el 5,9%, con una proporción de pacientes logrando una reducción superior al 5% del peso corporal al año del 50 al 73%.¹³⁶ Igual que con el Orlistat, se pueden producir alteraciones a nivel gastrointestinal y se han descrito episodios de hipoglicemia.¹³⁸

También disponemos de la Lorcaserina, un fármaco que reduce el consumo de alimentos y promueve la saciedad por activación selectiva de los receptores 5-HT_{2C} sobre las neuronas anorexigénicas POMC localizadas en el hipotálamo. En términos de eficacia, se estima que produce pérdidas de peso entre el 3.0 y el 3.6% después de 1 año de tratamiento, con alrededor del 25% de los pacientes perdiendo >5% de peso corporal. Además, se ha asociado a efectos beneficiosos ante el síndrome metabólico.¹³⁹

Los otros dos fármacos fueron inicialmente desarrollados con la finalidad de tratar patologías neurológicas.

Estamos hablando del Bupropion, un antidepresivo, y el Topiramato, un fármaco antiepiléptico, que administrados en conjunción con la Naltrexona, un antagonista de los receptores opioides, o la Fentermina, un estimulante central e isómero de la meta-anfetamina, demostraron tener un efecto positivo sobre el control del peso.¹⁴⁰

Concretamente, la combinación de Fentermina y Topiramato se ha demostrado útil en la reducción del apetito. Para ello, la Fentermina incrementa los niveles de norepinefrina y, en menor medida, de dopamina, mientras que, el Topiramato, parece ser el responsable de aumentar el consumo energético.¹⁴¹ Su efecto parece ser algo más potente que los previamente mencionados, consiguiendo una reducción del peso corporal de, aproximadamente, el 9% al cabo de 1 año de tratamiento, con una proporción de pacientes perdiendo más del 5% que oscila entre el 40 y el 70%. Sin embargo, también tiene efectos secundarios indeseables como sequedad bucal, parestesias, estreñimiento o insomnio, además de estar contraindicado en mujeres embarazadas.¹⁴²

Por último, la opción de combinar Bupropion y Naltrexona produce un efecto más moderado, consiguiendo una disminución de peso aproximada entre el 3,2 y el 5,2%, logrando que, entre un 44 y un 67% de los pacientes, disminuyan más del 5% del peso corporal. Para ello, el Bupropion, mediante la estimulación de neuronas POMC, liberaría

hormona estimuladora de alfa-melanocitos, lo que resultaría en una reducción del peso por disminución de la ingesta y aumento del consumo energético. Sin embargo, concomitantemente, las neuronas POMC liberarían betaendorfinas, que activarían un feedback negativo sobre las mismas neuronas POMC, ejerciendo un control sobre la vía metabólica y, por tanto, disminuyendo su eficacia. La Naltrexona sería la encargada de bloquear este feedback negativo y mejorar el efecto del tratamiento.¹⁴³ Obviamente, este tratamiento también presenta efectos secundarios como náuseas, vómitos y cefalea.¹⁴⁴

Por tanto, podemos observar que actualmente no disponemos de una gran variedad de tratamientos farmacológicos para combatir la obesidad y, además, su efecto, en el mejor de los casos, podría considerarse moderado, no siendo capaz ninguno de ellos de producir reducciones ponderales realmente significativas. Todo ello asociado a unos posibles efectos secundarios que pueden disminuir la adherencia al tratamiento de los pacientes.

Pero esta situación conlleva dos consecuencias diferentes.

Por un lado, se mantiene el esfuerzo e interés en desarrollar fármacos más eficaces y con menos efectos adversos y, por otro, nos obliga, tal como hemos comentado en ocasiones anteriores, a combinar un posible tratamiento médico con otras medidas como la dieta, el ejercicio físico y, en aquellos casos que se cumplan los criterios adecuados, con cirugía.

Algunos de los fármacos en desarrollo buscan limitar la absorción de energía, como el Cetilistat, un inhibidor de la lipasa que comparte target con el Orlistat, o la Dapagliflozina y el Empagliflozin, fármacos antidiabéticos que se están valorando para su uso contra la obesidad.¹⁴⁵

Cirugía bariátrica, el tratamiento actual realmente eficaz

Hasta el momento, hemos podido constatar que el tratamiento de la obesidad por medio de la dieta, el ejercicio y los tratamientos farmacológicos tiene resultados clínicos positivos pero, en muchos casos, limitados y difícilmente consolidables en el tiempo.

En el caso de la dieta y el ejercicio, por la dificultad de conseguir una adecuada adherencia al tratamiento por parte de los pacientes, ya que los resultados obtenidos no son inmediatos y requieren de una perseverancia considerable. Además, en ocasiones, debido

a limitaciones clínicas o socioeconómicas, es complejo que puedan seguir las pautas prescritas de una forma correcta.

Por otro lado, también hemos visto que el tratamiento farmacológico tiene una eficacia clínica limitada y que, en ocasiones, va asociado a efectos adversos que pueden disminuir la calidad de vida de nuestros pacientes.

En este punto es en el que entra en juego el tratamiento quirúrgico que, tal como veremos seguidamente, es relevante en el tratamiento y control de la obesidad.

Debemos tener como referencia la idea de que un tratamiento quirúrgico, para que sea considerado satisfactorio, el paciente debe perder alrededor del 75% del sobrepeso que sufriría respecto a su peso ideal. Por tanto, de entrada, estamos hablando de objetivos mucho mayores que en los tratamientos dietéticos o farmacológicos.

De hecho, si comparamos, los tratamientos no quirúrgicos suelen tener peores resultados que aquellos que incluyen cirugía bariátrica.¹⁴⁶

A pesar de que existen varias opciones quirúrgicas con resultados diferentes entre ellas, si tomamos el grupo cirugía como referencia, los resultados de estas intervenciones parecen ser mejores en cuanto a pérdida de exceso de peso, disminución de la circunferencia de la cintura, tasa de remisión de DM2, tasa de remisión de síndrome metabólico, mejoría en la calidad de vida y reducción en el uso de medicamentos. También la reducción de concentración de triglicéridos y el aumento de la concentración de HDL resultan mayores. Sin embargo, las diferencias no parecen resultar significativas en cuanto a disminución de la tensión arterial (TA), concentración de colesterol total o de colesterol LDL.^{147,148}

En todo caso, antes de indicar cualquiera de ellos debemos excluir enfermedades que conlleven obesidad como uno de sus síntomas, algunas ya comentadas previamente. De ser así nuestro objetivo virará hacia el tratamiento de ésta.

Descartado este punto, debe realizarse un estudio en profundidad de cuál es la situación del paciente en cuanto a hábitos dietéticos y actividad diaria. A partir de aquí, el paciente debe iniciar un protocolo que incluya un tratamiento dietético adecuado junto con unos hábitos de vida que promuevan el ejercicio físico. De nuevo, el tratamiento multimodal ya comentado.

Esto es relevante, ya que si el paciente no adapta su ingesta de energía y su actividad física, es muy difícil que se puedan mantener los buenos resultados que aparecerán tras la cirugía. Es muy probable que tras una mejoría inicial notable acabe habiendo un fracaso terapéutico con un aumento significativo de peso.¹⁴⁹

Una vez realizado este proceso, la cirugía bariátrica está indicada, según el último consenso de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad, cuando el IMC ≥ 40 kg/m² o en formas menos graves de obesidad (IMC 35-40 kg/m²) con comorbilidades graves asociadas, en sujetos entre 18 y 60 años (individualizando adolescentes y edad avanzada).¹²⁹

Recientemente también se ha añadido el concepto de cirugía metabólica, entendiendo aquella que se realiza en pacientes con obesidad menos severa pero que tiene, como objetivo principal, el control y reducción de riesgo de comorbilidades, como la enfermedad cardiovascular o la DM2. En estos casos se acepta incluir a pacientes con IMC >30 kg/m².¹⁵⁰

También hay contraindicaciones a estos procedimientos. Estos incluyen sufrir patología psiquiátrica o no ser capaz de comprender el procedimiento al que va a ser sometido el paciente, enfermedad neoplásica activa o endocrinopatías no tratadas de forma adecuada, riesgo trombótico elevado, tratamientos crónicos con esteroides o enfermedades cardíacas, hepáticas o respiratorias severas.¹⁵⁰

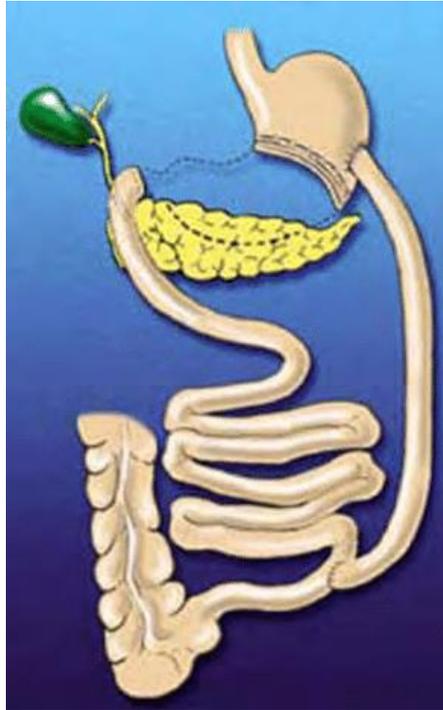
Finalmente, cabe destacar que existen múltiples intervenciones de cirugía bariátrica, cada una de ellas con peculiaridades que hacen que sean más o menos indicadas para cada tipo de paciente.

Básicamente se dividen según si su efecto es restrictivo, es decir, limitan la ingesta de una forma física, o malabsortivo, reduciendo el tramo intestinal que el alimento ingerido y las enzimas encargadas de digerirlo comparten, disminuyendo así gran parte de su absorción.

Inicialmente se experimentó con técnicas malabsortivas basadas en el bypass yeyuno-iléal, abandonadas por las graves secuelas hepáticas y nutricionales.

Más tarde, Scopinaro, en 1979 propuso una técnica de derivación biliopancreática basada en la creación de tres tramos de intestino delgado: en el primero circula el bolo alimentario sin unirse a los jugos biliopancreáticos (unos 200 cm), en el segundo circulan únicamente

las secreciones biliopancreáticas y, en el tercero (tramo común, de unos 50 cm), se une el alimento a las secreciones biliopancreáticas, donde se produce la digestión de las grasas. A esto se añade una gastrectomía subtotal, dejando un remanente gástrico de unos 200 ml. Se suele asociar colecistectomía, ya que se producen con frecuencia litiasis biliares en el seguimiento. (Figura 8)

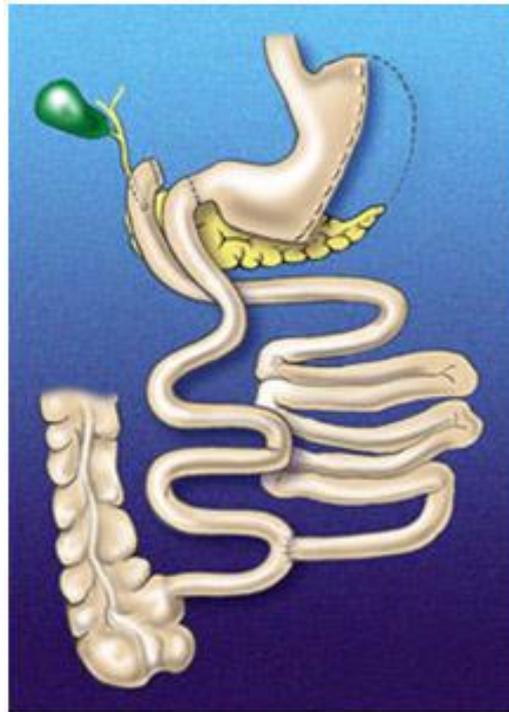


(American Society for Bariatric Surgery)

Figura 8: Derivación biliopancreática de Scopinaro

De los trabajos de De Meester (1987) y Hinder (1992) surge otra técnica malabsortiva descrita por Marceau:¹⁵¹ la derivación biliopancreática con cruce duodenal. (Figura 9)

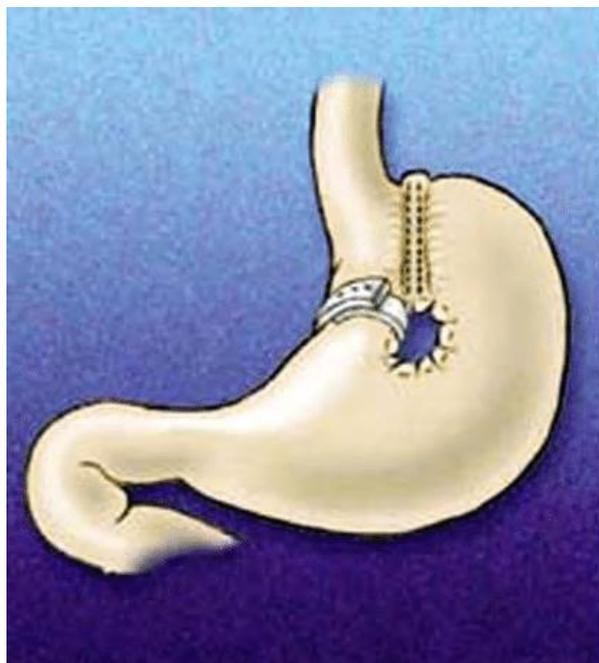
Consiste en la realización de una gastrectomía longitudinal siguiendo la curvatura menor con preservación del píloro, creando un canal alimentario de unos 150 cm, un canal biliopancreático y un canal común de unos 75-100cm.



(American Society for Bariatric Surgery)

Figura 9: Derivación biliopancreática con cruce duodenal

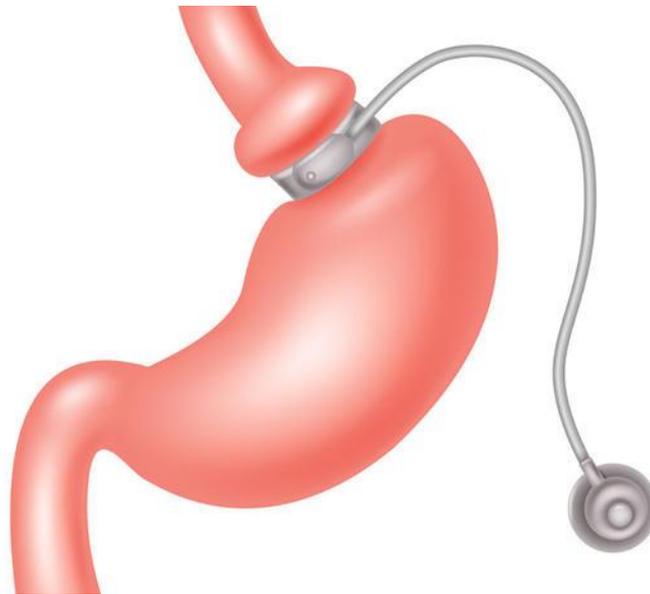
Por otro lado, basándose en las resecciones gástricas clásicas, Mason y Printen (1971) describieron la primera técnica puramente restrictiva, que tras varias modificaciones, el propio Mason en 1980 detalla de forma definitiva: la gastroplastia vertical anillada¹⁵² (Figura 10).



(American Society for Bariatric Surgery)

Figura 10: Gastroplastia vertical anillada

En 1992, y con el inicio de la laparoscopia, se propone una nueva técnica restrictiva: la banda gástrica.¹⁵³ Consiste en la creación de un pequeño reservorio gástrico con un “neopíloro” estrecho, limitado por una banda de material plástico, cuya presión se puede regular desde un dispositivo colocado en el subcutáneo. (Figura 11)



(www.intraobes.es)

Figura 11: Banda gástrica

Otra técnica propuesta por Larrad en 1989 consistió en una variante de la técnica de Scopinaro, creando un canal biliopancreático más corto (50cm) y uno alimentario más largo (unos 300cm), siendo el tramo común de 50cm. Esta modificación redujo el riesgo de malnutrición proteica, aunque los resultados ponderales fueron más discretos que con la técnica original de Scopinaro.¹⁵⁴

La búsqueda de una técnica que combinase ambos mecanismos (restrictivo y malabsortivo) derivó en las propuestas iniciales de Mason e Ito, que sufrieron modificaciones hasta llegar al bypass gástrico actual (Figura 12).

Se realiza un pequeño reservorio gástrico al que se anastomosa un asa intestinal (tramo alimentario) de unos 100-200cm con un tramo común de unos 300 cm.

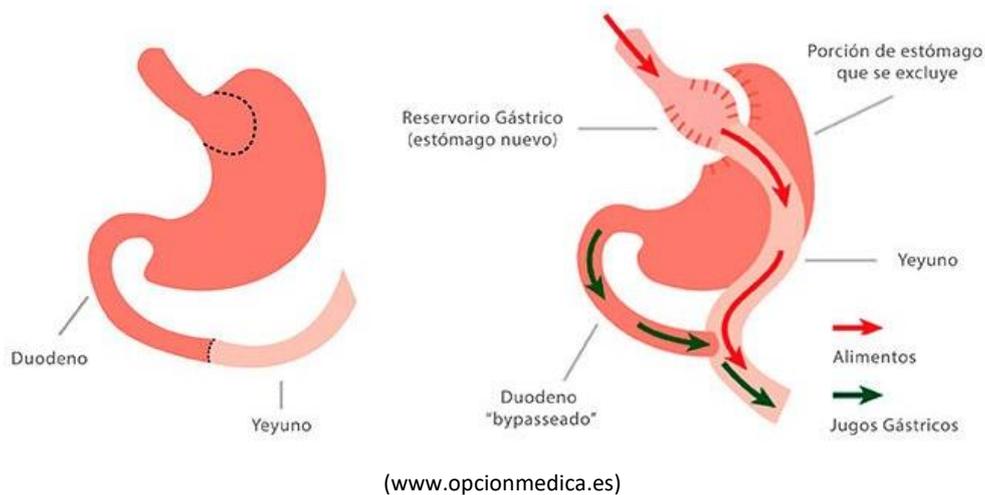


Figura 12: Bypass gástrico

En paralelo, Capella en 1991¹⁵⁵ y Fobi en 1989¹⁵⁶ propusieron la colocación de un anillo en la boca de salida para aumentar el efecto restrictivo a largo plazo.

Con el avance de la tecnología y el desarrollo de las técnicas quirúrgicas, la realización del bypass gástrico por vía laparoscópica se popularizó en 1994 por Wittgrove,¹⁵⁷ con varios tipos de anastomosis (manual, mecánica circular y mecánica lineal) y pequeñas variaciones (variación en la longitud de asas alimentaria y biliopancreática, con o sin banda).

Otra alternativa basada en la misma técnica, el bypass gástrico distal en el que el canal común se reduce a 75-100cm, ha sido poco utilizada debido a que provoca una gran restricción asociada a una importante malabsorción, siendo una de las técnicas más peligrosas para el desarrollo de malnutrición proteico-calórica.

Finalmente, una de las innovaciones más recientes, propuesta por Gagner en 2002¹⁵⁸ ha sido la realización de técnicas malabsortivas o mixtas en dos tiempos quirúrgicos.

En un primer tiempo se realiza la parte gástrica, es decir, una gastrectomía vertical (Figura 13) y en un segundo tiempo (pasados unos 12 meses) se realiza el componente malabsortivo, que puede ser un bypass gástrico o un cruce duodenal.

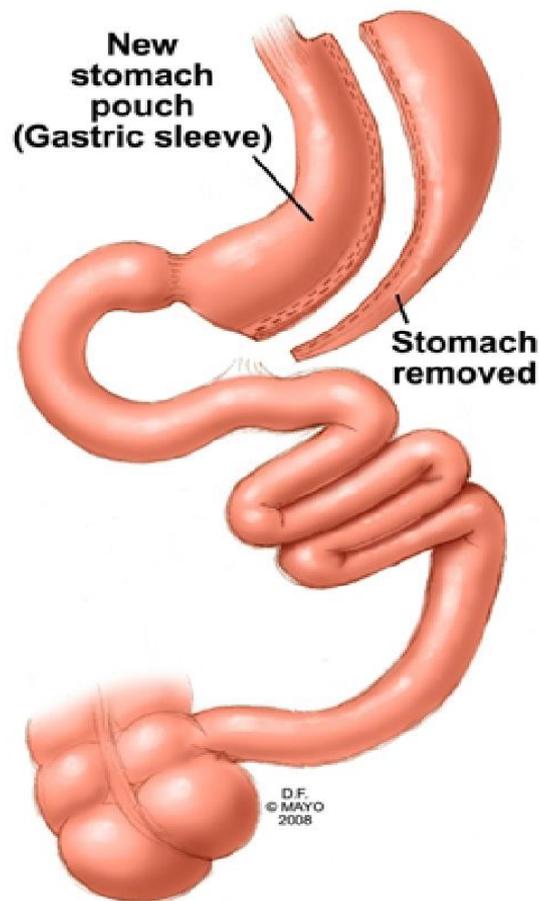


Figura 13: Gastrectomía vertical

El objetivo principal de este planteamiento es reducir la mortalidad postoperatoria asociada a los procedimientos complejos, especialmente en los pacientes superobesos y de alto riesgo (que podía llegar al 6%).

Sin embargo, la gastrectomía vertical por sí sola ha adquirido cada vez más protagonismo en los últimos años y muchos equipos la utilizan en la actualidad como técnica única.

Ante tanta variedad de intervenciones posibles, el tipo de intervención quirúrgica se deberá decidir teniendo en cuenta las características del paciente. Principalmente, lo que deberemos valorar será el patrón alimentario, el IMC, las comorbilidades del paciente y el riesgo quirúrgico asociado.

- *Principales procedimientos y su efectividad clínica:*

El “Gold Standard” de la cirugía bariátrica ha sido y sigue siendo a nivel mundial el bypass gástrico.¹⁵⁹

Esta intervención parece presentar, a pesar de tener un componente malabsortivo, gran parte de su efecto gracias al componente restrictivo.

Tiene buenos resultados tanto en reducción de peso como en la resolución de comorbilidades como la DM2 o HTA.¹⁶⁰ De hecho, se ha descrito una tasa de resolución de la HTA del 85% pasados 3 meses de la intervención.¹⁶¹

Además, estos efectos parecen mantenerse relativamente estables a lo largo del tiempo, tal como apuntan Puzifferri et al en una revisión sistemática a los dos años de la intervención.¹⁶²

Su tasa de complicaciones postoperatorias inmediatas, si se realiza en centros con experiencia, es inferior en general al 2%. En cambio, las complicaciones a largo plazo llegan al 20%, incluyendo úlceras marginales, obstrucciones, estenosis, colelitiasis, eventraciones, sd. malabsortivos (raros) y ganancia ponderal.¹⁶³

La segunda técnica por excelencia, en la actualidad, es el Sleeve gástrico o Gastrectomía vertical.

Esta técnica, inicialmente pensada como un primer tiempo en pacientes con alto riesgo quirúrgico ha ganado mucha popularidad convirtiéndose en una de las técnicas más realizadas en España.¹⁵⁹ Sus buenos resultados y su simplicidad técnica han favorecido su auge.

Esta técnica es 100% restrictiva y se basa en realizar una gastrectomía vertical.

Sus resultados son prácticamente comparables al Bypass gástrico en cuanto a reducción del sobrepeso que oscila entre el 60% y el 83% a los 6 meses según la serie.¹⁶³

La resolución de comorbilidades también es buena, aunque parece que el Bypass gástrico ofrece una leve mejoría en este apartado.

En cuanto a las complicaciones, este tipo de intervenciones suele asociar las tasas más bajas de todas. La mortalidad se situó alrededor del 0,1% y las complicaciones inmediatas suelen ser inferiores al 1 – 2%. Sus resultados a largo plazo son aún desconocidos.

Las intervenciones mixtas con componente mayoritariamente malabsortivo como el cruce duodenal, la derivación biliopancreática de Scopinaro y la derivación biliopancreática de Larrad, a pesar de presentar muy buenos resultados y, lo más importante, mantenidos en el tiempo, se reservan para casos de obesidad refractaria a las intervenciones descritas previamente o para superobesos.

Esto se debe a que sus tasas de complicaciones, sobre todo relacionadas con los efectos malabsortivos, no son despreciables. En la derivación biliopancreática se han descrito tasas de malnutrición proteica de entre el 3 y el 17,8% según la serie. También existe disminución de la absorción de calcio que empeora hasta los 4 años post intervención. Posteriormente estos valores tienden a mejorar. El déficit de vitamina B12 y de ácido fólico es frecuente y se ha descrito entre el 9 y el 70% de los pacientes.¹⁶³

Hipótesis del estudio

Hipótesis del estudio

1. La cirugía bariátrica genera cambios de expresión en genes relacionados con el metabolismo energético que pueden ser explicados por variaciones epigenéticas.

Objetivos

Objetivos

Objetivos generales

El objetivo del proyecto es estudiar la presencia de variaciones de expresión genética y del estado epigenético en un modelo experimental de ratas obesas antes y después de cirugía bariátrica.

Objetivos particulares

- 1.- Estudiaremos en grasa subcutánea de ratas obesas sometidas a cirugía bariátrica los cambios ponderales y en la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético y su estado epigenético.
- 2.- Estudiaremos en grasa visceral de ratas obesas sometidas a cirugía bariátrica los cambios ponderales y en la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético y su estado epigenético.
- 3.- Estudiaremos en músculo de ratas obesas sometidas a cirugía bariátrica los cambios ponderales y en la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético y su estado epigenético.
- 4.- Estudiaremos en hígado de ratas obesas sometidas a cirugía bariátrica los cambios ponderales y en la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético y su estado epigenético.
- 5.- Estudiaremos en sangre de ratas obesas sometidas a cirugía bariátrica los cambios ponderales y en la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético y su estado epigenético.

Material y Métodos

Material y métodos

Los genes relacionados con la obesidad en humanos se han identificado en investigaciones que, en gran parte, toman como referencia experimentos previos en ratones. Esto es debido a que, en algunos aspectos, el genoma murino es similares al humano y puede orientar los principales targets a investigar posteriormente en estudios con pacientes.¹⁶⁴

Por ello, hemos diseñado un estudio experimental con ratas, a las que se les ha practicado diferentes intervenciones, con la finalidad de comparar los cambios a nivel epigenético y de expresión genética de mediadores relacionados con el gasto energético y el estado inflamatorio.

Muestra

Para realizar el estudio experimental se han utilizado 42 ratas tipo Wistar, machos, de peso inicial medio de 252,5g con un rango de 215 – 303. (Proveedor Harlan S.A., Barcelona). Para el cálculo de la “n” se han tomado como referencia estudios previos existentes en la literatura relacionados con estudios genéticos y epigenéticos.



Figura 14: Modelo de las ratas estabuladas en el proyecto

Los animales han sido estabulados (Figura 14) en el estabulario del Hospital Germans Trias i Pujol de forma convencional con luz, agua y condiciones ambientales según estándares habituales.

El modelo experimental

El modelo seleccionado de ratas se basa en la regla de las 3 erres (Reemplazo, Reducción, Refinamiento)

Dichas reglas promueven el Reemplazo de los estudios experimentales con animales por otros modelos teóricos o audiovisuales, la Reducción en el número de animales utilizados, siendo estos los mínimos posibles para obtener los resultados deseados, y el Refinamiento de las actuaciones sobre los animales, disminuyendo al máximo el sufrimiento que estos padecen a lo largo de todo el proceso.

En nuestro caso, utilizar humanos para el estudio hubiera sido óptimo de cara a obtener una validez externa elevada. Sin embargo, a nivel ético, no hubiera sido posible dada la necesidad de obtener múltiples biopsias de diferentes órganos y en diferentes momentos, con la agresividad y los efectos secundarios que ello implica.

Por otro lado, la substitución del modelo animal por un modelo teórico tampoco hubiera sido posible dado que no se tiene suficiente conocimiento de la relación entre la expresión genética, la epigenética, la obesidad y los diferentes tratamientos implementados.

Por todo ello se optó por realizar un estudio experimental con modelo animal, seleccionando la rata por los siguientes motivos. En primer lugar, el coste de adquisición es bajo en comparación con otros animales de mayor tamaño. En segundo lugar, su anatomía es bien conocida y ha sido ampliamente estudiada, hecho que nos ha permitido realizar las técnicas quirúrgicas necesarias basándonos en modelos ya descritos en la literatura médica.

El número de animales utilizado ha sido el mínimo necesario para obtener resultados con diferencias significativas en caso de que estas existieran. Para ello hemos tomado como referencia otros trabajos ya publicados relacionados con estudios epigenéticos.

En referencia al refinamiento de los procedimientos, se ha procurado que los animales no sufrieran a lo largo del estudio. Por ello, se han estabulado en condiciones óptimas, se han administrado analgésicos y antibióticos siempre que ha sido necesario y han sido intervenidas bajo anestesia general.

Este apartado es importante ya que puede tener implicaciones en los resultados obtenidos en el estudio.

Hay que tener en cuenta que los cambios a nivel epigenético son producidos por gran cantidad de factores, muchos de ellos relacionados con estímulos externos. En nuestro caso, por ejemplo, un mayor nivel de estrés producido por el dolor de la cirugía podría generar cambios epigenéticos no visibles en el grupo de tratamiento dietético, siendo por tanto un factor de confusión no controlado y derivando en resultados y conclusiones erróneas.

Otros ejemplos de factores que se han intentado controlar en el estudio son: Raza, sexo, edad, tipo de estabulación, dieta, dolor y operador.

Estructura del proyecto

Nuestro proyecto es la rama experimental de un estudio mayor, que también engloba una rama de estudio sobre pacientes humanos, realizado en el Hospital Germans Trias i Pujol con la financiación de una beca FIS (FIS-2012/15) del Instituto Carlos III.

Tras la redacción del proyecto y la aceptación por parte del comité de ética experimental del hospital, se adquirieron los animales y las diferentes dietas que se utilizarían en el estudio.

Los animales de experimentación se estabularon y distribuyeron en 6 grupos, con 7 componentes en cada uno de ellos, según el tipo de intervención que se les realizaría posteriormente.

Los diferentes grupos fueron:

1.- Grupo Control: 7 ratas estabuladas de forma convencional con dieta de mantenimiento (Anexo 1), con un aporte máximo de 20g/día y un peso inicial medio de 240,2g. (Anexo 2)



2.- Grupo Obesas: 7 ratas estabuladas de forma convencional con dieta hipercalórica rica en grasas (Anexo 1), ad libitum, con un peso inicial medio de 241,1g (Anexo 2)



3.- Grupo VLCD: 7 ratas estabuladas de forma convencional, inicialmente con dieta hipercalórica ad libitum, con un peso inicial medio de 237,7g. (Anexo 2) Tras alcanzar el objetivo de ganancia ponderal, se le cambió a una dieta restrictiva hipocalórica (Anexo 1), con un aporte máximo de 7g/día.



4.- Grupo Sham: 7 ratas estabuladas de forma convencional con dieta hipercalórica ad libitum y un peso inicial medio de 262,5g. (Anexo 2) Tras alcanzar el objetivo de ganancia ponderal se les sometió a un estrés quirúrgico (manipulación de asas intestinales) no asociado a técnicas de cirugía bariátrica.

5.- Grupo Sleeve: 7 ratas estabuladas de forma convencional con dieta hipercalórica ad libitum y un peso inicial medio de 267,5g. (Anexo 2). Tras alcanzar el objetivo de ganancia ponderal se sometió a los animales a un Sleeve gástrico.

6.- Grupo Bypass: 7 ratas estabuladas de forma convencional con dieta hipercalórica ad libitum y un peso inicial medio de 265,1g. (Anexo 2). Tras alcanzar el objetivo de ganancia ponderal se sometió a los animales a un Bypass gástrico.

Para minimizar factores de confusión, los animales que formaban parte de los tres grupos en los que había que realizar una intervención quirúrgica fueron estabulados de forma aleatoria, pero habiendo siempre un representante de cada grupo en cada jaula. (Figura 15) De esta forma se pretende eliminar posibles alteraciones secundarias a factores ambientales.



Figura 15: Estabulación por jaulas y dietas

Tras iniciar el seguimiento de los animales con las respectivas dietas se estableció un mínimo de ganancia ponderal para considerar a las ratas obesas de $>20-30\%$ respecto del grupo control con dieta normal.

Este objetivo se alcanzó la semana 10 (t10) desde el inicio del estudio, alcanzando un peso promedio los grupos de intervención de 484,1g frente a los 404,1g del grupo control. (Anexo 2)

Seguidamente se realizaron las diferentes intervenciones previstas para cada grupo, ya especificadas previamente.

Para mantener las mismas condiciones ambientales en todos los grupos, cada día que se llevaron a cabo intervenciones quirúrgicas, se realizaron por un único investigador y se incluyó un animal de cada grupo. (Sham; Sleeve; Bypass)

Como único medio anestésico durante las intervenciones quirúrgicas se utilizó Isoflurane inhalado con una concentración del 5% durante la inducción y del 1 – 2%, según necesidad, para el mantenimiento.

En todo momento se contó con el soporte de un técnico de laboratorio para el mantenimiento óptimo del estado de los animales durante las cirugías.

Preoperatoriamente se rasuró el abdomen de los animales, se desinfecto la superficie con povidona iodada y se administró Meloxicam o Dexketoprofeno subcutáneo para la analgesia, así como Amoxicilina Clavulánico subcutánea como profilaxis antibiótica.

En la intervención Sham (grupo 4) se procedió a realizar una laparotomía media, una movilización de las vísceras intraabdominales sin resecciones asociadas y un posterior cierre de la pared abdominal. (Figuras 16 – 17)



Figura 16: Instantes previos a la intervención



Figura 17: Cierre de la pared abdominal post intervención

En la intervención Sleeve Gástrico (grupo 5), tras acceder a la cavidad abdominal mediante una laparotomía media, se procedió a realizar una gastrectomía vertical resecaando entre el 80 – 90% del estómago, tal como se describe en la literatura.¹⁶⁵ (Figuras 18 – 19 – 20)



Figura 18: Estómago normal



Figura 19: Gastrectomía vertical



Figura 20: Remanente gástrico

Finalmente, en los animales sometidos a un Bypass Gástrico (grupo 6), tras acceder a la cavidad abdominal mediante una laparotomía media, se procedió a realizar un bypass con una asa biliopancreática de aproximadamente 10 – 12 cm. con anastomosis al asa alimentaria a unos 20 cm. de ciego.¹⁶⁶ (Figuras 21 – 22)

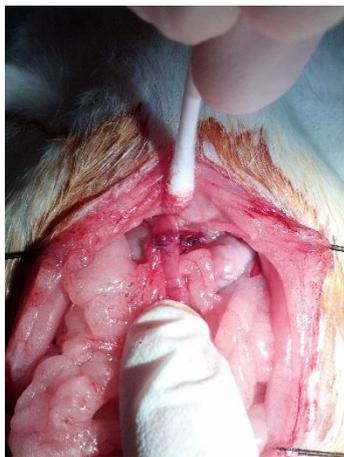


Figura 21: Anastomosis esofagoyeyunal

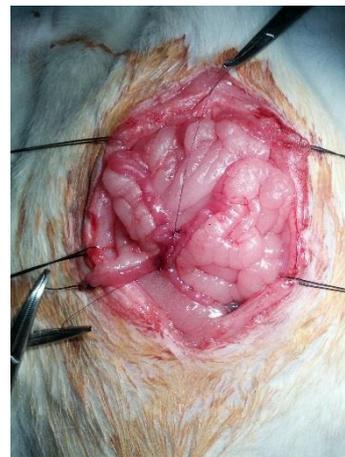


Figura 22: Anastomosis yeyunoileal

Tras las intervenciones quirúrgicas todos los animales se dejaron en ayunas durante 12 - 24h y se les administró, de nuevo, Amoxicilina Clavulánico subcutánea.

Posteriormente se reinició la ingesta ad libitum en los animales Sham. En los Sleeve y Bypass se inició dieta líquida enriquecida con glucosa que se mantuvo entre 24 y 48h más según evolución clínica del animal.

También se siguió administrando analgesia subcutánea a todos los grupos según necesidad del animal.

Tras las intervenciones quirúrgicas, una vez reiniciada la ingesta, la dieta que se administró a los 3 grupos fue dieta normal (20g/día).

Seguidamente se mantuvo a los 6 grupos en observación a lo largo de 6 semanas con controles semanales de evolución ponderal.

Pasado el tiempo establecido, 16 semanas desde el inicio del estudio (t16), los animales fueron sacrificados y se obtuvieron las diferentes muestras que incluían: *grasa subcutánea*, *grasa visceral*, *músculo*, *hígado* y *sangre*. Todas ellas se conservaron en isopentano y en RNA Later.

En resumen, el esquema del protocolo seguido ha sido el siguiente (Figura 23):

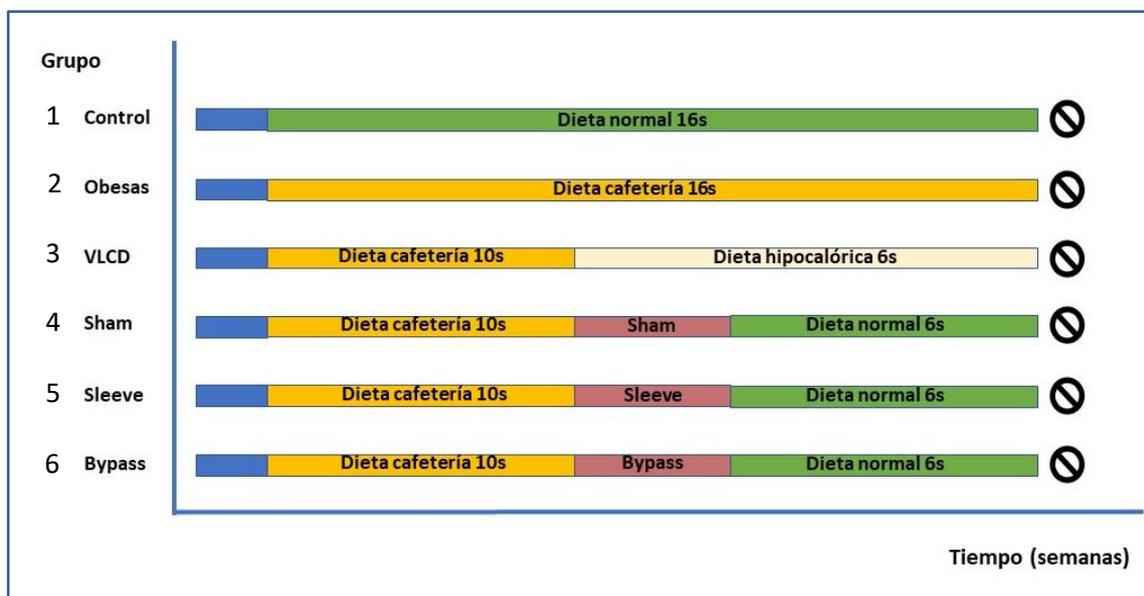


Figura 23: Esquema del protocolo del estudio

De los diferentes tipos de grasa se obtuvieron cuatro muestras para conservar en isopentano y tres en RNA Later. Del resto de tejidos, tres en isopentano y dos en RNA Later.

Esto es debido a que, en una prueba piloto realizada durante la fase de aumento ponderal con un animal no perteneciente a los grupos de estudio, se objetivó que la integridad y

pureza de las muestras era superior si se conservaban en isopentano. Además, las grasas fueron las que obtuvieron peores resultados por lo que se decidió aumentar el número de muestras.

Las muestras conservadas en isopentano, una vez congeladas, se mantuvieron a -80°C . Por otro lado, las conservadas en RNA Later se dejaron a 4°C durante 24h y posteriormente se congelaron a -80°C .

El posterior procesamiento y análisis de la expresión genética y la metilación de las muestras de los diferentes tejidos se realizó en el Instituto de Investigación Germans Trias y Pujol

VARIABLES EN ESTUDIO

Dada la imposibilidad de realizar un estudio de la expresión genética y de la metilación de todo el genoma debido a limitaciones presupuestarias, se decidió, seleccionar algunos genes concretos relacionados con el metabolismo energético y la respuesta inflamatoria.

Se valoraron todos los descritos en la introducción de este trabajo. Finalmente, basándonos en la literatura existente y en el posible rendimiento para el estudio, las variables seleccionadas y estudiadas a nivel clínico, genético y epigenético fueron las siguientes:

- **Resultados clínicos**
Pérdida ponderal según método de intervención.

- **Determinaciones en sueros y tejidos de la expresión genética y metilación del ADN:**
 - Relacionados con la ingesta y ganancia ponderal: **Grelina, Leptina, PPAR-g y FTO.**
 - Relacionados con la respuesta inflamatoria (9): **TNF-alfa, MCP-1.**
 - Relacionados con el metabolismo de hidratos de carbono (6): **IRS-1**
 - Relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos: **FAS, NFAS**

Muestras analizadas

Para valorar la conveniencia de realizar el estudio epigenético de los genes mencionados se procedió, previamente, a valorar la expresión genética de los mismos en cada uno de los tejidos. El objetivo era ahorrar el estudio epigenético de aquellos genes que ya de entrada no se expresan en alguno de los tejidos estudiados. (Tabla 3)

GENE	GS	GV	Múscul	Fetge	Sang
Fas (cell surface death receptor)	Low	SÍ	NO	SÍ	Low
Fasn (Fatty acid synthase)	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	Low
Fto (fat mass and obesity associated gene)	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	NO
Irs1 (insulin receptor substrate 1)	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
Leptin	SÍ	SÍ	SÍ	NO	NO
Mcp1 (Chemokine (C-C Motif) Ligand 2 or Monocyte Chemotactic Protein 1)	Low	NO	SÍ	SÍ	Low
Pparg1 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
Tnf alpha (tumor necrosis factor)	NO	NO	Low	Low	Low
Ghrl (ghrelin/obestatin prepropeptide):	no analitzat per problemes tècnics				

Tabla 3: Expresión genética de los genes analizados por tejido

Como se puede observar, algunos genes, efectivamente no se expresaron en algunos tejidos y, en el caso del gen de la Grelina, no se pudo proceder a su análisis por dificultades con la puesta a punto del primer.

Por tanto, y a modo de resumen, los grupos de ratas, tejidos y genes finalmente incluidos en el análisis final al concluir la fase experimental son los que se representan en la Figura 24.



Figura 24: Esquema Grupos - Tejidos - Genes

Una vez seleccionados los tejidos y los genes a estudio, se procedió a realizar el estudio epigenético en aquellos genes que presentaron diferencias significativas a nivel de la expresión (Tabla 4), tal como veremos posteriormente en el apartado Resultados.

GENE	GS	GV	Múscul	Fetge	Sang
Fas (cell surface death receptor)				X	
Fasn (Fatty acid synthase)			X	X	X
Irs1 (insulin receptor substrate 1)	X			X	X
Leptin		X			
Mcp1 (Chemokine (C-C Motif) Ligand 2 or Monocyte Chemotactic Protein 1)			X	X	
Pparg1 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)		X			

Tabla 4: Genes a los que se analizó el estado de metilación por tejidos

Por el contrario, aquellos genes que no presentaron diferencias a nivel de expresión no se estudiaron a nivel epigenético asumiendo que no se encontrarían variaciones significativas.

Análisis epigenético y de la expresión genética

Análisis de la expresión genética

Para el análisis de la expresión genética se utilizan diferentes técnicas, la mayoría basadas en el estudio del ARN mensajero.¹⁶⁷ Éste representa el paso intermedio entre la información contenida en el ADN y la proteína final que codifica y, a partir de él, se puede obtener el ADN original mediante una transcriptasa inversa.

Para el aislamiento del RNA, éste fue extraído de los tejidos utilizando el Kit “Special Chemagic Total RNA” y el “Chemagic Magnetic Separation Module I” (PerkinElmer chemagen Technologie GmbH). Cada espécimen fue cuantificado mediante un espectrofotómetro Epoch (BioTek) y su integridad determinada con el 2200 TapeStation System (Agilent Technologies).

Seguidamente, se utilizó la “Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa” o qPCR por sus siglas en inglés. Como describiremos más adelante, se trata de una variante de la PCR convencional que, además, permite realizar una cuantificación en tiempo real de ADN gracias a técnicas de fluorescencia.¹⁶⁸

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

La expresión genética fue analizada mediante qPCR en un “LightCycler® 480 Real-Time PCR System” tipo Multiwell Plate 384 (Roche).

La qPCR se realizó por triplicado con un volumen final de 10 uL de la siguiente manera: 5 uL de LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche), 1 uM de primer de avance, 1 uM de primer reverso y 1 uL de 1/10 cDNA diluido.

Los primers o cebadores utilizados, pensados para abarcar todas las isoformas del gen, se diseñaron con instrumentos de Tecnología de DNA Integrada (Integrated DNA Technologies - IDT) y se detallan en el Anexo 3, Tabla 24.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 10 min a 95°C seguida de 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 20 segundos a la temperatura correspondiente de hibridación de los primers o cebadores, para que se puedan unir al

ADN y puedan delimitar el segmento a duplicar, y 20 segundos a 72°C, que es la temperatura óptima de trabajo de la polimerasa para que se incorporen los nuevos nucleótidos, para formar los amplicones o cadenas de nueva formación. El proceso se finaliza con un ciclo final de fusión o “melting”: 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 70°C y se asciende hasta los 96°C mientras se monitoriza de forma continua la fluorescencia para valorar cuantitativamente las copias de ADN.

Pero hay que destacar que, en la qPCR, todas las curvas de fluorescencia se saturarán en el mismo nivel, dado que partirán de concentraciones controladas e iguales de los reactivos necesarios para funcionar.

Por tanto, la información cuantitativa vendrá determinada por el número de ciclos requeridos para que la fluorescencia alcance cierto nivel previamente definido por el investigador. A este número de ciclos se le llama CT (cycle threshold) o umbral de ciclo.

A mayor concentración inicial de la secuencia de ADN diana, menos ciclos serán requeridos para que la fluorescencia supere dicho umbral, y, por tanto, menor será el CT.

Si este valor de CT para cada uno de los genes estudiados es comparado con otro CT definido por un mismo gen o secuencia control, obtendremos unos valores de expresión relativa, que son los resultados que hemos obtenido en este trabajo.

La comparación con los genes de referencia se realizó utilizando 2 genes independientes, el gliceraldehid-3-fosfato-deshidrogenasa (Gapdh) y la subunidad 26S del proteosoma ATPasa 4 (Psmc4).

Análisis del estado epigenético

El estudio del estado epigenético se realizó mediante el análisis de la metilación del epigenoma. Para ello, existen diferentes técnicas, siendo la utilizada en nuestro caso la pirosecuenciación por bisulfito. Ésta permite generar resultados cuantitativos y precisos, aunque las secuencias a analizar tienen que ser cortas, dado que provoca una importante degeneración del ADN.¹⁶⁹

Inicialmente el ADN se extrajo de los tejidos utilizando el kit “Maxell 12 Genomic DNA Purification” (Promega). Cada muestra fue cuantificada utilizando un espectrofotómetro

Epoch (BioTek) y su integridad determinada utilizando el “2200 TapeStation System” (Agilent Technologies).

Seguidamente, el procedimiento consta de dos pasos, la conversión de la secuencia a bisulfito y la pirosecuenciación.

Por tanto, para el primer paso, 300ng de ADN genómico fue convertido a bisulfito utilizando el kit “EZ DNA Methylation-Gold” (Zymo Research). El bisulfito provoca una desaminación de las citocinas, que se convierten en uracilo, siempre que éstas no estén metiladas.

A continuación, se realizaron dos PCRs independientes para cada secuencia a estudio a partir del ADN convertido a bisulfito, manteniéndose únicamente las citocinas que estaban metiladas, ya que los uracilos son substituidos por timinas. Este proceso se realizó mediante el uso de “IMMOLASE™ hot-start DNA Polymerase” (Bioline).

Se preparó un volumen final de 30 μ L para cada reacción de la siguiente manera: 1x ImmoBuffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, 100 nM de primer de avance, 100 nM de primer reverso, 0.02 U/ μ L IMMOLASE™ ADN Polimerasa y 1 μ L del ADN convertido a bisulfito.

Los cebadores fueron diseñados evitando pares CpG (citosina-guanina) para asegurar una ampliación metilación independiente. Las secuencias de los primers utilizados se enumeran en el Anexo 3, Tabla 25.

Las condiciones de la PCR fueron: 95°C durante 10 min, seguido de 30 ciclos con desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, una hibridación a la temperatura correspondiente de los primers durante 30 segundos, 30 segundos a 72°C para iniciar la acción de la polimerasa, acabando con 1 ciclo final de fusión o “melting” a 72°C durante 8 min.

Finalizado el primer paso, se puede realizar la pirosecuenciación.

Este consiste en la secuenciación, nucleótido a nucleótido, de la cadena complementaria a la cadena previamente convertida y ampliada mediante PCR. El elongamiento de la nueva cadena se controla mediante la adición de cada uno de los 4 desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP) por separado, uno a uno. Cuando el dNTP complementario introducido en la reacción es correcto, la polimerasa lo incorpora, liberando un pirofosfato (PPi). Este

PPi origina un adenosín trifosfato (ATP) gracias a la enzima sulfúrilasa y otra enzima, la luciferasa, consume este ATP generando luz, que puede ser cuantificada. En cambio, si el dNTP introducido no es el adecuado, es degradado por la apirasa sin emitir energía. De este modo, cada vez que se incorpore una guanina y se pueda detectar la emisión de luz, se puede saber que existe complementariamente una citosina metilada.

Las reacciones de pirosecuenciación y la cuantificación de la metilación en nuestro estudio se realizaron con un “PyroMark Q24 System” versión 2.0.6 (QIAGEN).

Finalmente, los resultados de la pirosecuenciación bisulfato se presentan como el porcentaje de metilación de las regiones CpG estudiadas, con rango desde 0% (ninguna metilación detectada) hasta 100% (completamente metilado).

Esto es debido a que, para una célula concreta, el estado de la metilación de un sitio CpG es una variable dicotómica (Sí/No). Sin embargo, al analizar un tejido, donde habrá gran cantidad de células, el estado de la metilación para un sitio CpG concreto puede variar de unas a otras, siendo el porcentaje la representación de células metiladas en un CpG concreto.

Cabe tener en cuenta, para el posterior análisis de los resultados, que diferencias inferiores al 5% de la metilación habrá que valorarlas con cautela, ya que este margen es el límite habitual de sensibilidad para estas pruebas.

Recopilación y análisis de datos

Los datos obtenidos mediante el control ponderal de los diferentes animales fueron recogidos semanalmente por parte del personal del estabulario, bajo supervisión y monitorización por parte del investigador principal. Estos datos se registraron en cuadernos para luego ser introducidos en la base de datos del proyecto.

Posteriormente, su análisis se realizó mediante el programa SPSS (IBM SPSS Statistics Versión 24) y con el soporte de la unidad de Epidemiología y Salud Pública del Hospital de Sant Pau i la Santa Creu de Barcelona.

Por otro lado, el análisis de los datos obtenidos tras el estudio genético y epigenético de las muestras de tejidos y sangre se llevó a cabo en la Fundación Instituto de Investigación

en Ciencias de la Salud Germans Trias i Pujol, contando con el soporte de la unidad de Epidemiología y Salud Pública y el Servicio de Endocrinología del Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona).

Resultados

Resultados de las intervenciones

Una vez alcanzado el objetivo de ganancia ponderal se realizaron las diferentes intervenciones que se han descrito en el apartado anterior.

Estas intervenciones se realizaron siguiendo los estándares descritos en la literatura. Sin embargo, no todos los animales presentaron una evolución clínica satisfactoria ni antes ni después de las mismas, lo que tuvo un impacto en la estructura de los grupos inicialmente previstos.

Los resultados obtenidos en el ámbito clínico fueron los siguientes:

- Los grupos Control, Obesas y VLCD (grupos 1, 2 y 3) siguieron una evolución clínica satisfactoria, tal como era de esperar. En los dos primeros grupos no se realiza ninguna intervención mientras que en el tercero únicamente se modifica el tipo de dieta, hecho que tiene un impacto clínico muy bajo en los animales de este grupo.
- Una de las ratas del grupo Sham (grupo 4) falleció durante el proceso de estabulación, antes incluso de poder realizar la intervención prevista. Tras su muerte se realizó una autopsia sin que fuéramos capaces de identificar ninguna causa específica de la defunción. El resto de las ratas del grupo fueron intervenidas sin incidencias y con postoperatorios satisfactorios.
- Las intervenciones tipo Sleeve (grupo 5) se realizaron sin que se presentaran incidencias intraoperatorias destacables. Los tiempos operatorios oscilaron entre los 45 y 60 minutos.

Tampoco se registraron complicaciones postoperatorias importantes, consiguiendo una supervivencia del 100% de los animales hasta la fecha establecida para el sacrificio.

Cabe destacar, sin embargo, que dos de los animales presentaron una evolución clínica subóptima. Éstas se presentaron marcadamente más postradas y con una ingesta muy escasa tras la cirugía. Al realizar el sacrificio, al final del proyecto, se objetivó la presencia de un absceso intraabdominal con extensión a la pared

abdominal en uno de los animales y un absceso intraabdominal adyacente a la sección gástrica en el otro.

- Durante las intervenciones tipo Bypass (grupo 6) dos de los animales fallecieron. Estos fallecimientos no se produjeron por incidencias a nivel de la técnica quirúrgica, ya que no hubo eventos adversos intraoperatorios destacables, y se han atribuido a complicaciones del procedimiento anestésico.

Probablemente este hecho esté relacionado con que estas intervenciones, de complejidad mayor que las de los grupos Sham y Sleeve, presentaron tiempos quirúrgicos substancialmente mayores. Los tiempos operatorios de este grupo oscilaron entre los 90 y 120 minutos por animal, duplicando el tiempo requerido en el grupo Sleeve.

De los animales restantes, tres más fallecieron por complicaciones postoperatorias.

Tras realizar las autopsias se objetivo que dos de los animales presentaron una dehiscencia de sutura a nivel de la anastomosis yeyunoileal y el otro una dehiscencia de la sutura a nivel de la anastomosis esofagoyeyunal.

Por tanto, el total de animales que llegaron a poder ser sacrificados y analizados al final del proyecto fue de 36 de los 42 iniciales.

Grupo	Animales iniciales	Animales finales
Control	7	7
Obesas	7	7
VLCD	7	7
Sham	7	6
Sleeve	7	7
Bypass	7	2
TOTAL	42	36

Tabla 5: Composición inicial y final de los grupos

En resumen, los grupos Control, Obesas, VLCD y Sleeve (grupos 1, 2, 3 y 5) se mantuvieron sin alteraciones hasta el final del proyecto. El grupo Sham (grupo 4) mantuvo 6 de los 7 animales iniciales mientras que el grupo Bypass (grupo 6) se vio claramente alterado al sobrevivir únicamente 2 de los 7 animales iniciales. (Tabla 5)

Todos los animales que sobrevivieron fueron sacrificados al mes y medio de las intervenciones (t16) para el posterior análisis de los tejidos.

Sin embargo, dado que la “n” final del grupo Bypass (grupo 6) se vio claramente disminuida, pudiendo no ser estadísticamente representativa, se decidió no incluir este grupo en el análisis final de la expresión y metilación genética.

Estudio de la variación ponderal

La tabla con los pesos semanales de cada uno de los animales se adjunta en el Anexo 2. En la misma se muestran resaltados los pesos que se utilizaron posteriormente para realizar el estudio comparativo.

Esquema de los estudios ponderales realizados

Con el objetivo de poder correlacionar los cambios en la expresión y metilación genética con resultados a nivel clínico se realizó un estudio comparativo de la evolución ponderal de los diferentes grupos.

Estos estudios comparativos se describen de forma esquemática en las siguientes ilustraciones.

- Estudio de la distribución y similitud de los grupos en t0, t10 y t16

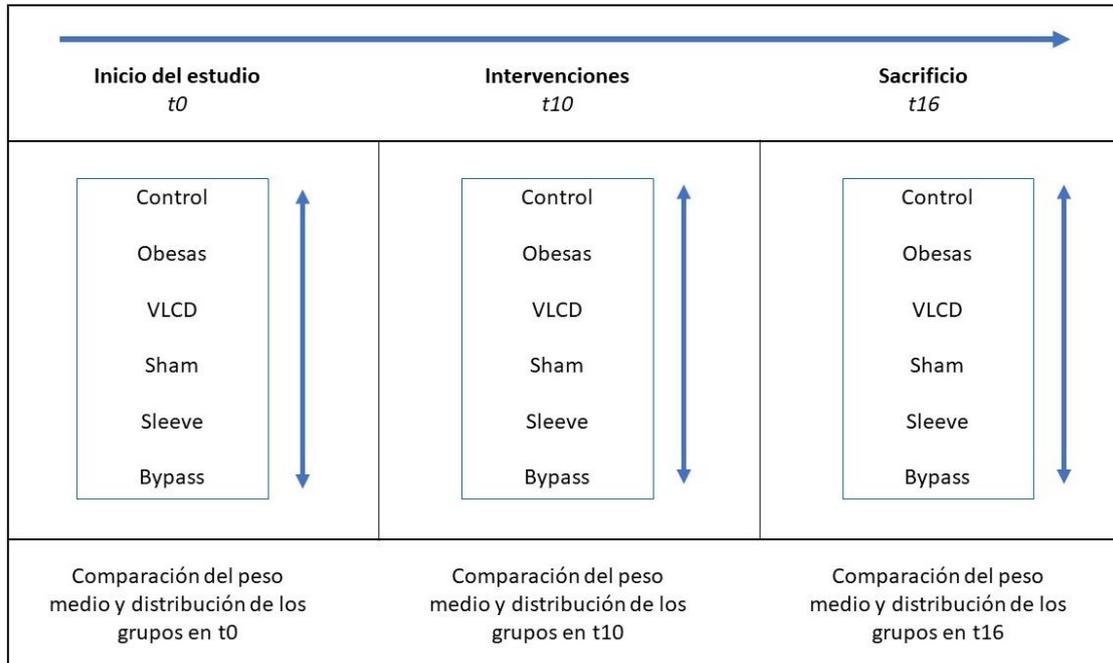


Figura 25: Esquema del estudio de la distribución

- **Comparación del peso medio de los grupos antes y después de las intervenciones**

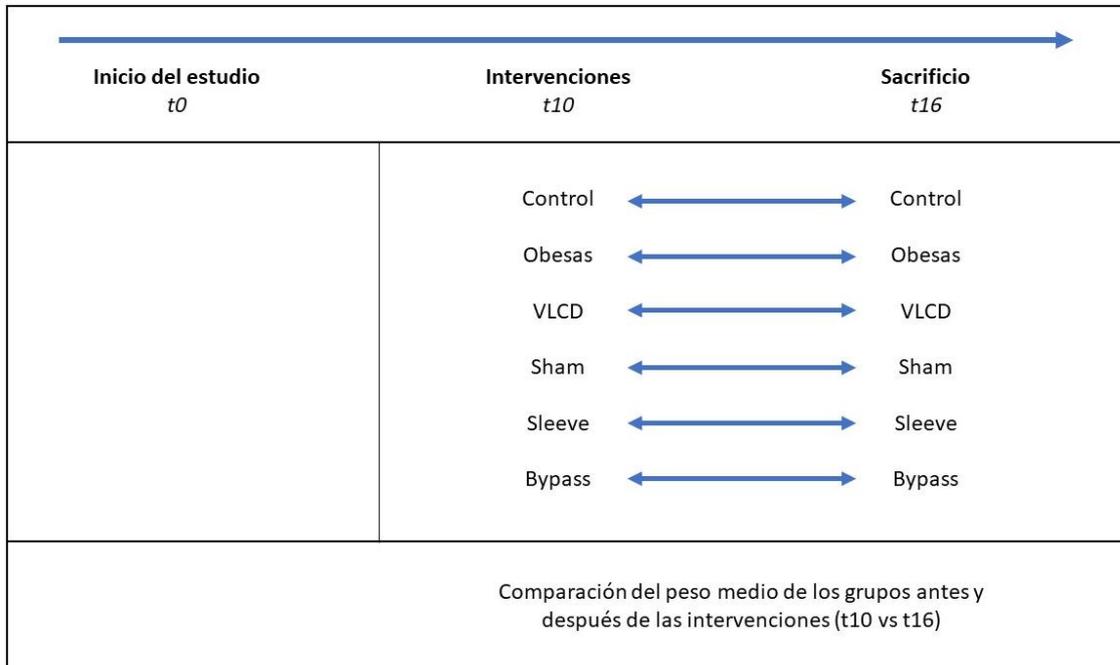


Figura 26: Esquema de la comparación del peso antes y después del procedimiento

- **Comparación del peso medio entre los grupos antes y después de las intervenciones**

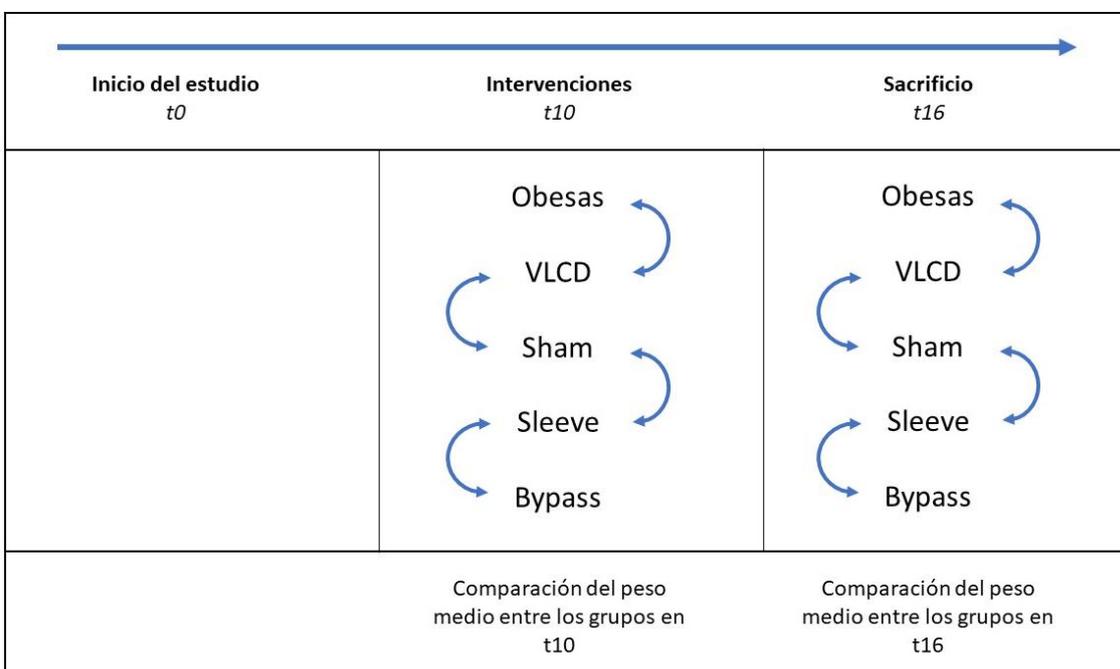


Figura 27: Esquema de la comparación del peso entre grupos

Por tanto, en este apartado analizaremos los resultados ponderales, medidos en gramos, de los diferentes grupos, sin entrar a valorar el análisis de los tejidos ni el análisis genético/epigenético.

Grupos	Tejidos	Genes
1 Control	1 Grasa Subcutánea	1 FAS
2 Obesas	2 Grasa Visceral	2 FASN
2 VLCD	3 Músculo	3 FTO
4 Sham	4 Hígado	4 IRS1
5 Sleeve	5 Sangre	5 Leptina
6 Bypass		6 MCP1
		7 PPAR γ
		8 TNF α

Figura 24: Esquema Grupos - Tejidos - Genes

Estudio de la distribución y similitud de los grupos

Con intención de realizar el estudio inferencial posterior analizamos la distribución de pesos de los diferentes grupos en t0, t10 y t16.

Globalmente, tanto en t0, inicio del proyecto, en t10 (semana 10), momento en que se inician las intervenciones previstas, como en t16 (semana 16), antes del sacrificio, la distribución de la media de los pesos de las ratas siguió una distribución normal (Figuras 28 y 29), posibilitando el uso de tests paramétricos durante el estudio.

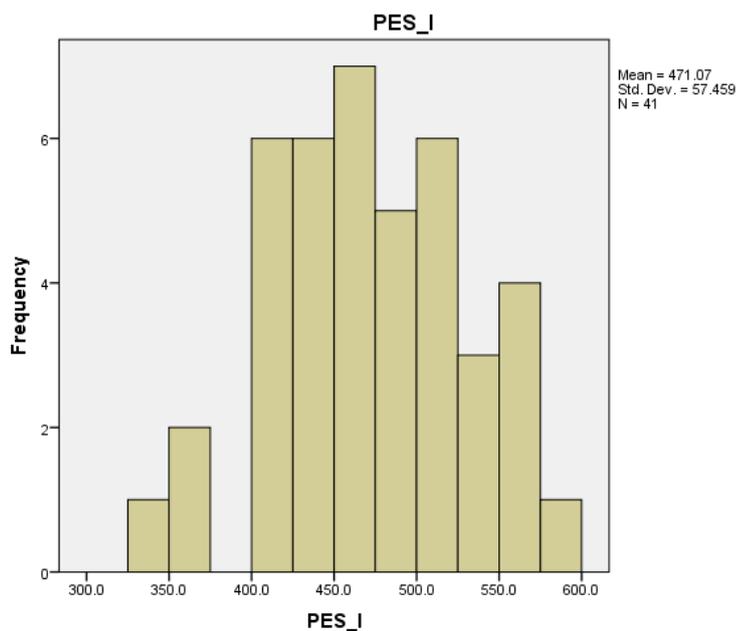


Figura 28: Distribución de peso en t10

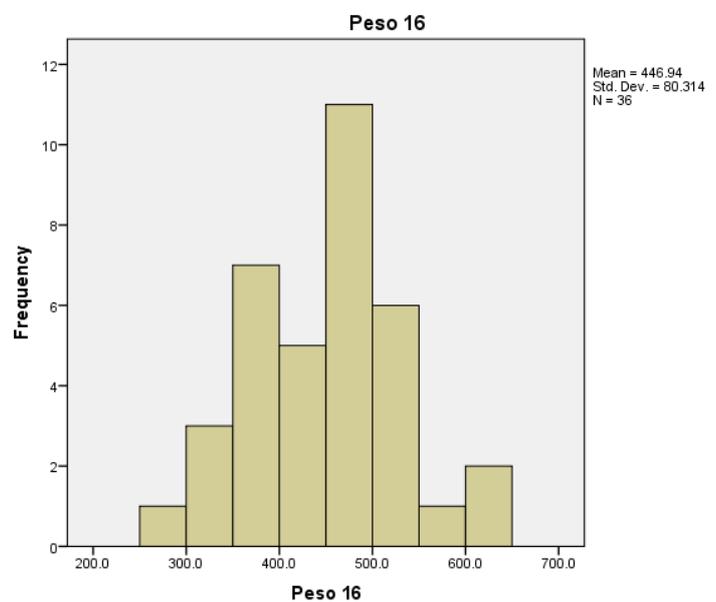


Figura 29: Distribución de peso en t16

Seguidamente, analizamos si globalmente existían diferencias significativas del peso entre los grupos al iniciar el proyecto (t_0), antes de las intervenciones (t_{10}) y antes del sacrificio (t_{16}).

Podemos objetivar en la Tabla 6 que, comparando las medias de los pesos de los grupos (ANOVA) en t_0 , existen diferencias significativas ($p=0,012$), con unos valores marcadamente superiores en los grupos Sham y Sleeve.

Este hecho probablemente se deba a una distribución inicial desigual de las ratas con mayor peso en los diferentes grupos debido al azar.

Grupo	Media en t_0	Media en t_{10}	Media en t_{10} sin control	Media en t_{final}
Control	240,29	404,14	---	437,00
Obesas	241,14	489,43	489,43	544,29
VLCD	238,71	481,29	481,29	483,57
Sham	262,57	458,50	454,00	417,50
Sleeve	267,57	492,14	485,29	375,71
Bypass	252,57	504,50	495,86	350,50
Valor P	0,012	0,011	0,630	<0,001

Tabla 6: Medias de pesos en gramos

Sin embargo, estas diferencias se corrigen durante el periodo de dieta hipercalórica para conseguir los animales obesos.

Si observamos las medias de peso de los grupos en t_{10} , antes de las intervenciones, existen diferencias significativas ($p=0,011$) debido a que el grupo Control presenta una media claramente inferior al resto de grupos. Esto era de esperar al ser el único grupo que recibe dieta normal durante el periodo inicial.

Realizando un nuevo análisis excluyendo el grupo Control no existen diferencias significativas en la media del peso de los grupos a estudio en t_{10} ($p=0,630$). Por tanto, partimos de grupos bastante homogéneos antes de iniciar la fase experimental del proyecto.

Comparación del peso medio de los grupos antes y después de las intervenciones

Seguidamente, antes de realizar el estudio de los posibles cambios a nivel genético y epigenético, se analizaron los resultados de la variación ponderal de los diferentes grupos antes y después de las intervenciones.

- **Análisis descriptivo**

La evolución de cada uno de ellos se había previsto por los resultados ya descritos en la literatura, tanto en modelo experimental como en modelo humano, que previamente se ha comentado en la introducción de este trabajo.

Sin embargo, nuestros resultados eran necesarios para su correlación con los resultados posteriores a nivel genético y epigenético y para inferir posibles conclusiones.

Nuestros grupos, de forma descriptiva, evolucionaron de la siguiente manera:

- 1.- El grupo Control, como era de esperar, presentó desde el inicio del estudio una ganancia ponderal mantenida hasta el día del sacrificio.
- 2.- El grupo de ratas Obesas presentó, también como era previsible, una ganancia ponderal continuada hasta el final del estudio, pero a un ritmo superior al del grupo control. Al finalizar el estudio este fue el grupo que presentó un peso medio superior.
- 3.- El grupo VLCD presentó una ganancia ponderal inicial similar a la del grupo de ratas Obesas durante el periodo de alimentación con dieta hipercalórica ad libitum. Posteriormente, tras iniciar la dieta restrictiva, VLCD, las ratas dejan de aumentar su masa y pasan a mantenerse con un peso estable. Al finalizar el estudio el peso medio de este grupo se sitúa por debajo del grupo de ratas Obesas, pero sin llegar a reducir los valores hasta los niveles que se objetivan en los grupos de intervención quirúrgica.
- 4.- El grupo de ratas Sham también presentó una ganancia ponderal durante la primera parte del estudio, situándose con un peso medio parecido a los grupos previos antes de la intervención. Posteriormente, tras realizar la operación asignada, presenta una pérdida

ponderal que se mantuvo hasta el sacrificio final, con un peso medio inferior al grupo VLCD, pero superior a los grupos sometidos a cirugía bariátrica.

5.- El grupo Sleeve gástrico presentó también una ganancia ponderal durante la primera fase de ingesta hipercalórica. Seguidamente, tras la gastrectomía vertical, se objetivó una pronunciada pérdida de peso con un peso medio final significativamente inferior al resto de grupos salvo el grupo Bypass.

6.- Finalmente, el grupo Bypass siguió un patrón muy parecido al grupo Sleeve a lo largo de todo el estudio, con un aumento de peso durante la fase de ingesta hipercalórica, seguido de una significativa disminución tras la cirugía. De hecho, el peso medio final de este grupo es el más bajo de todos al finalizar el estudio.

Sin embargo, cabe destacar que, debido a los malos resultados clínicos obtenidos, nos estamos refiriendo a un grupo formado únicamente por dos animales, hecho que no nos permite asegurar que su evolución sea realmente representativa.

- Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se tomaron como referencia los pesos previos a la intervención de cada grupo y los datos obtenidos el día del sacrificio.

El protocolo se diseñó, para estandarizar los diferentes procesos y disminuir posibles factores de confusión, de forma que todos los animales fueran sacrificados al cabo de 6 semanas exactas desde el momento de la intervención.

Al analizar la evolución de todos los grupos conjuntamente antes y después de las intervenciones (t_{10} vs t_{final}) encontramos diferencias significativas con una $p = 0,014$.

Podemos observar estos resultados de una forma más gráfica en la Figura 30, donde se representa la evolución ponderal de los diferentes grupos.

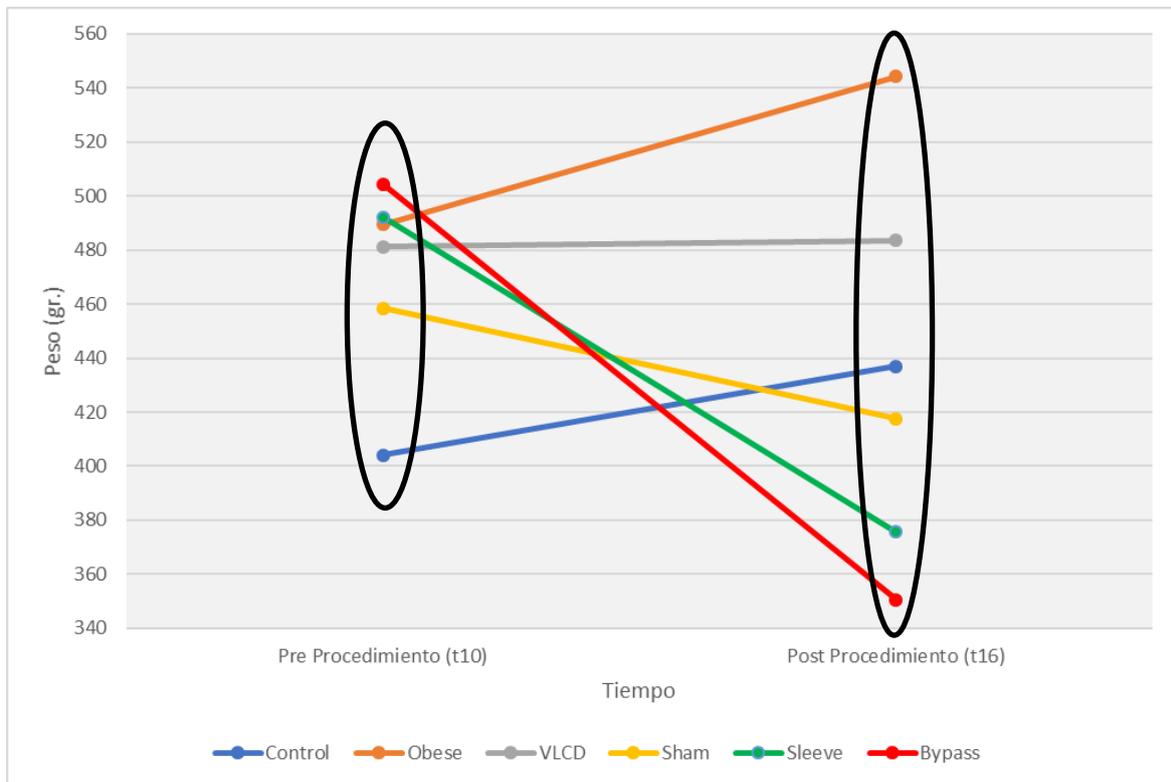


Figura 30: Comparación conjunta del peso antes (t10) y después de los procedimientos (t16)

Sin embargo, esta medida, por si sola, nos aporta poca información ya que era previsible que hubiese cambios significativos antes y después de las intervenciones. Resulta más interesante si miramos las diferencias existentes grupo por grupo. (Tabla 7)

Grupo	Diferencia media ($t_{16} - t_{10}$)	Error Std.	Sig.	Intervalo de confianza del 95%
				Límite inferior
Control	32.857*	8.563	.001	15.370
Obesas	54.857*	8.563	.000	37.370
VLCD	2.286	8.563	.791	-15.201
Sham	-41.000*	9.249	.000	-59.888
Sleeve	-116.429*	8.563	.000	-133.916
Bypass	-154.000*	16.019	.000	-186.716

Tabla 7: Variación de peso entre t10 y t16 por grupos

Como podremos observar, tal como ya hemos adelantado en el apartado descriptivo, encontramos que existen diferencias significativas en la variación ponderal de todos los grupos salvo en el grupo VLCD. (Figura 31)

Este es el único grupo que, una vez realizada la intervención prevista, mantiene un peso más o menos estable a lo largo del tiempo.

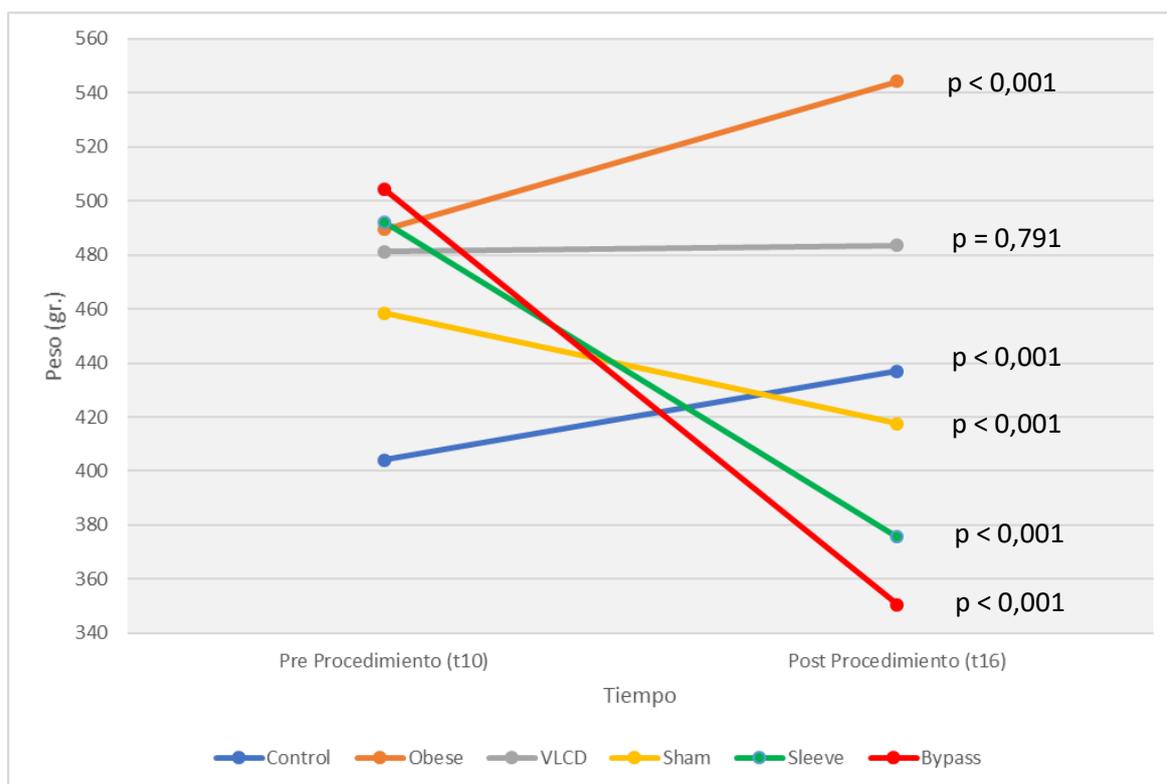


Figura 31: Comparación del peso por grupos entre t10 y t16

Estos datos se correlacionan con la información descrita en la literatura y en la introducción de este trabajo sobre la efectividad de los diferentes tratamientos.

Podemos objetivar que la cirugía bariátrica como opción terapéutica es eficaz para conseguir una pérdida ponderal significativa y, sin embargo, confirma la menor eficacia que tiene, también en pacientes humanos, los tratamientos dietéticos.

Siguiendo el análisis por grupos, los grupos Control y Obesas siguen la evolución prevista.

Destaca por otro lado el grupo Sham, donde llama la atención la marcada pérdida ponderal que presentan las ratas tras sufrir una agresión física, sea cual sea su índole, sin haber realizado ningún procedimiento bariátrico.

Comparación del peso medio entre los grupos antes y después de las intervenciones

Una vez descritas las características de los diferentes grupos, y habiéndose objetivado las diferencias que presentaban tras las intervenciones, se realizaron estudios comparativos entre los grupos en un mismo tiempo.

Para ello se utilizó una ANOVA de 2 factores y se eliminó el grupo control ya que no es útil en este nivel del estudio.

Grupos	Tejidos	Genes
1 Control	1 Grasa Subcutánea	1 FAS
2 Obesas	2 Grasa Visceral	2 FASN
2 VLCD	3 Músculo	3 FTO
4 Sham	4 Hígado	4 IRS1
5 Sleeve	5 Sangre	5 Leptina
6 Bypass		6 MCP1
		7 PPAR γ
		8 TNF α

Figura 24: Esquema Grupos - Tejidos - Genes

Previamente hemos descrito que antes de realizar las intervenciones (t10), de forma conjunta, no se evidencian diferencias significativas entre los grupos.

Si realizamos este análisis de forma comparativa grupos a grupo vemos que se mantienen los mismos resultados tal como se evidencia en la Tabla 8. Sin embargo, tras las intervenciones y antes del sacrificio (t16), sí que se objetivan diferencias significativas entre algunos grupos. Los resultados se describen en la Tabla 9.

Tabla 8: Comparación de variación ponderal entre grupos antes de las intervenciones

Pre (t10) Post (t16)	Grupo	Grupo	Diferencia Media	Error Std.	Sig.	Intervalo de confianza del 95%	
						Límite Inferior	Límite Superior
Pre	Obesas	VLCD	8.143	28.830	.780	-51.358	67.644
		Sham	30.929	30.007	.313	-31.002	92.859
		Sleeve	-2.714	28.830	.926	-62.216	56.787
		Bypass	-15.071	43.244	.730	-104.323	74.180
	VLCD	Obesas	-8.143	28.830	.780	-67.644	51.358
		Sham	22.786	30.007	.455	-39.145	84.717
		Sleeve	-10.857	28.830	.710	-70.358	48.644
		Bypass	-23.214	43.244	.596	-112.466	66.038
	Sham	Obesas	-30.929	30.007	.313	-92.859	31.002
		VLCD	-22.786	30.007	.455	-84.717	39.145
		Sleeve	-33.643	30.007	.273	-95.574	28.288
		Bypass	-46.000	44.038	.307	-136.890	44.890
	Sleeve	Obesas	2.714	28.830	.926	-56.787	62.216
		VLCD	10.857	28.830	.710	-48.644	70.358
		Sham	33.643	30.007	.273	-28.288	95.574
		Bypass	-12.357	43.244	.778	-101.609	76.895
Bypass	Obesas	15.071	43.244	.730	-74.180	104.323	
	VLCD	23.214	43.244	.596	-66.038	112.466	
	Sham	46.000	44.038	.307	-44.890	136.890	
	Sleeve	12.357	43.244	.778	-76.895	101.609	

Tabla 9: Comparación de variación ponderal entre grupos después de las intervenciones

Pre (t10) Post (t16)	Grupo	Grupo	Diferencia Media	Error Std.	Sig.	Intervalo de confianza del 95%	
						Límite Inferior	Límite Superior
Post	Obesas	VLCD	60.714	30.690	.059	-2.626	124.055
		Sham	126.786	31.943	.001	60.859	192.713
		Sleeve	168.571	30.690	.000	105.231	231.912
		Bypass	193.786	46.035	.000	98.775	288.797
	VLCD	Obesas	-60.714	30.690	.059	-124.055	2.626
		Sham	66.071	31.943	.050	.144	131.998
		Sleeve	107.857	30.690	.002	44.517	171.198
		Bypass	133.071	46.035	.008	38.060	228.082
	Sham	Obesas	-126.786	31.943	.001	-192.713	-60.859
		VLCD	-66.071	31.943	.050	-131.998	-.144
		Sleeve	41.786	31.943	.203	-24.141	107.713
		Bypass	67.000	46.879	.166	-29.754	163.754
	Sleeve	Obesas	-168.571	30.690	.000	-231.912	-105.231
		VLCD	-107.857	30.690	.002	-171.198	-44.517
		Sham	-41.786	31.943	.203	-107.713	24.141
		Bypass	25.214	46.035	.589	-69.797	120.225
Bypass	Obesas	-193.786	46.035	.000	-288.797	-98.775	
	VLCD	-133.071	46.035	.008	-228.082	-38.060	
	Sham	-67.000	46.879	.166	-163.754	29.754	
	Sleeve	-25.214	46.035	.589	-120.225	69.797	

Podemos observar que el grupo de ratas Obesas, que puede ser considerado el “nuevo” grupo control, ya que todos los grupos que se comparan tras las intervenciones parten inicialmente de ratas obesas, presenta diferencias significativas post intervención en comparación con los grupos Sham, Sleeve y Bypass, por tanto, con todos los grupos quirúrgicos, no siendo así con el Grupo VLCD.

Este dato resulta significativo dado que, a pesar de que se evidencia una evolución diferente y que, probablemente, realizando el análisis pasado más tiempo sí que se hubieran encontrado diferencias, demuestra que la efectividad del tratamiento fue claramente inferior a la de los otros grupos.

De hecho, el grupo VLCD sí que presentó diferencias significativas con el resto de los grupos sometidos a intervenciones quirúrgicas, confirmando que la disminución ponderal de los grupos quirúrgicos fue marcadamente superior al grupo de dieta hipocalórica.

En relación a los grupos quirúrgicos, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellos y, obviamente, respecto al grupo de ratas Obesas.

Por otro lado, también se procedió a analizar si había influencia en los resultados según el momento de la intervención. A pesar de que todas las intervenciones se iniciaron en la semana 10 (t10), no todas las cirugías se podían realizar por falta de tiempo y personal el mismo día.

Por ello, previamente se tomaron medidas en el protocolo para minimizar ese posible factor de confusión, realizando una intervención de cada grupo al día y no todas las cirugías de un mismo grupo conjuntamente.

Tal como se puede observar en la Tabla 10 el momento en el que se llevó a cabo la intervención no tuvo un impacto significativo en los resultados del estudio.

	Suma de cuadrados Tipo III	df	Media al cuadrado	F	Sig.
Pre (t10) – Post (16)	15834.107	1	15834.107	60.471	.000
Pre_Post * Grupo	54001.947	5	10800.389	41.247	.000
Pre_Post * DIA	104.931	1	104.931	.401	.532

Tabla 10: Significación estadística según intervención, grupo y día de la intervención

Finalmente, se realizó el análisis de los resultados añadiendo un tiempo intermedio a las tres semanas de la intervención, es decir, en t13.

El objetivo de este análisis fue valorar si la evolución en el tiempo de las respuestas de las diferentes intervenciones era parecida y sostenida con el paso de las semanas o si seguían evoluciones diferentes.

Los resultados se encuentran presentados en la Figura 32.

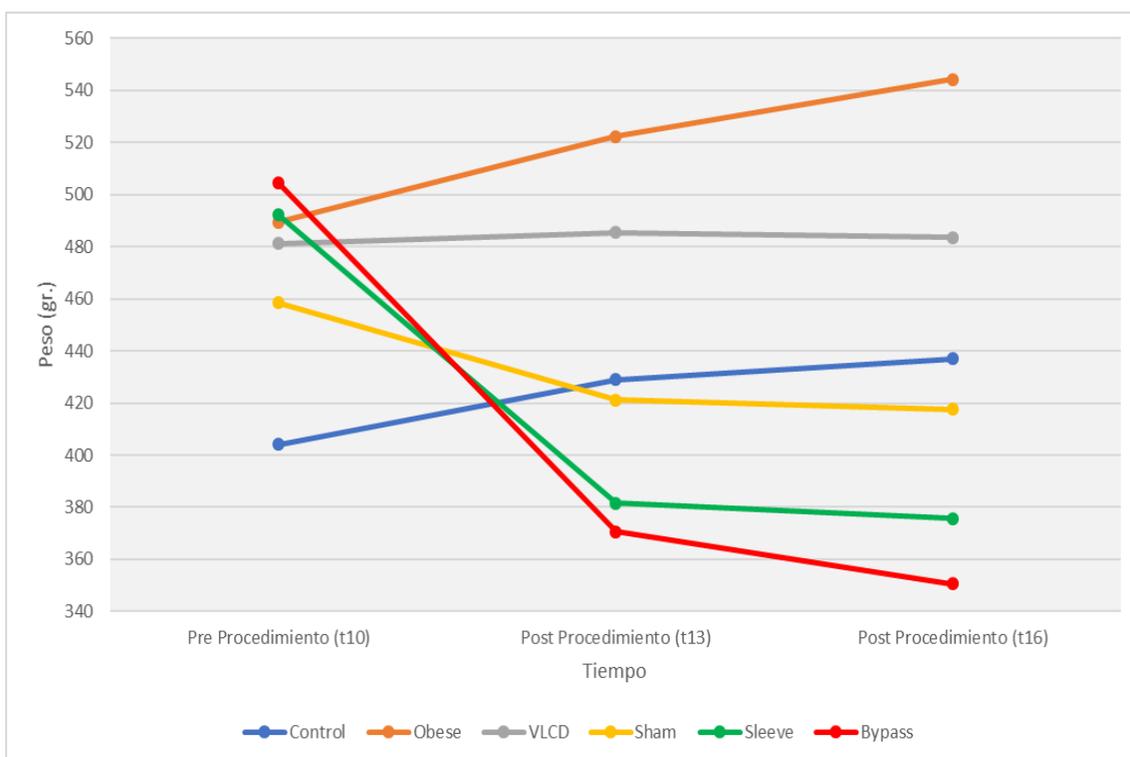


Figura 32: Comparación evolutiva de los pesos post intervención (3 tiempos)

Resulta llamativo que no hubo diferencias significativas entre los pesos entre la semana 14 y la 16 en ninguno de los grupos.

Por tanto, evolutivamente, la eficacia de todas las intervenciones fue muy importante durante las primeras semanas, donde hay una variación ponderal destacable, produciéndose una estabilización posterior.

Únicamente en el grupo del Bypass la tendencia de pérdida de peso se mantenía con la suficiente intensidad como para estar cerca de la significación estadística ($p=0,06$), pero

dada la reducida “n” sobre la que se pudo realizar el análisis hace que este resultado no sea valorable.

Estudio de la expresión y metilación de genes

Se obtuvo material de estudio de 34 de las 36 ratas mencionadas en la Tabla 6, correspondientes a todos los grupos experimentales menos las 2 pertenecientes al grupo Bypass.

Sin embargo, tras el sacrificio, se objetivaron las complicaciones postoperatorias descritas en dos de los animales del grupo Sleeve.

Dada la posibilidad de que estas complicaciones pudieran generar cambios no controlados a nivel de la expresión genética y el estado epigenético, sobre todo en relación al estado inflamatorio, finalmente se incluyeron en el estudio los resultados de únicamente 32 ratas: 7 Controles, 7 Obesas, 7 VLCD, 6 Sham y 5 Sleeves.

Grupos	Tejidos	Genes
1 Control	1 Grasa Subcutánea	1 FAS
2 Obesas	2 Grasa Visceral	2 FASN
3 VLCD	3 Músculo	3 FTO
4 Sham	4 Hígado	4 IRS1
5 Sleeve	5 Sangre	5 Leptina
6 Bypass		6 MCP1
		7 PPAR γ
		8 TNF α

Figura 33: Grupos, tejidos y genes incluidos en el análisis de expresión y metilación genética

De estas 32 ratas se tomaron las muestras de los 5 tejidos y se estudió la expresión y la metilación de los 8 genes previamente mencionados (Figura 33).

Seguidamente, para comparar los resultados y poder proceder al estudio estadístico, se calculó la media de los valores obtenidos en cada uno de los grupos para cada gen y cada tejido.

El análisis estadístico se realizó con el programa STATA versión 13.0 y el programa IBM SPSS Statistics versión 21.0.

Inicialmente se valoró la normalidad de las muestras mediante la prueba de Shapiro-Wilks. En caso de seguir una distribución normal se estudió la homogeneidad mediante el método de Levene. Si la muestra resultaba homogénea se procedía al análisis estadístico mediante métodos paramétricos y, en caso contrario, mediante test no paramétricos.

A pesar de ello, no todas las comparativas tienen la misma relevancia clínica, por lo que se priorizó estudiar los cambios objetivados entre grupos de interés. Es decir, a pesar de que puedan existir diferencias significativas entre cualquiera de los grupos, tejidos y genes, las diferencias que realmente podrían estar relacionadas con nuestra hipótesis son las que existen entre las siguientes comparativas (Tabla 11):

1. Grupo control vs grupo Obesas

- Con esta comparativa se pretende averiguar si la ingesta excesiva y el aumento de peso producen cambios a nivel genético y epigenético

2. Grupo Obesas vs grupo VLCD

- En esta comparativa se pretende averiguar si el inicio de una dieta hipocalórica puede revertir los posibles cambios evidenciados en la comparativa anterior o, incluso, generar alteraciones de novo.

3. Grupo Obesas vs grupo Sham

- En este caso se pretende averiguar si el estrés quirúrgico por si solo es capaz de inducir cambios en dichos niveles. Nos sirve como grupo control respecto a los grupos sometidos a cirugías bariátricas.

4. Grupo Obesas vs grupo Sleeve

- Al igual que en el caso de Obesas vs VLCD, se pretende averiguar si la realización de una cirugía bariátrica puede revertir los cambios existentes tras la aparición de la obesidad o si se pueden generar de novo.

5. Grupo VLCD vs grupo Sleeve

- Comparando el grupo VLCD con el grupo Sleeve buscamos si existen diferencias relacionadas con la cirugía bariátrica respecto a someterse a una dieta, ya que resultan dos de los tratamientos principales de la obesidad.

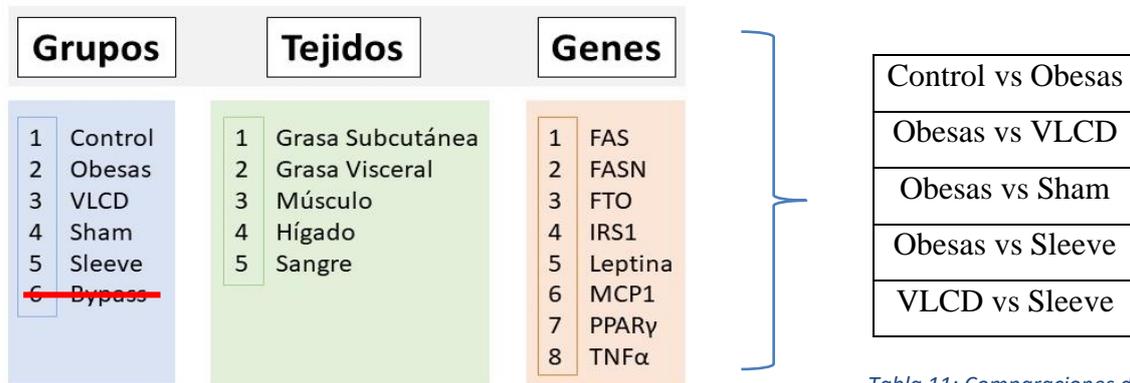


Tabla 11: Comparaciones de interés

Figura 33: Grupos, tejidos y genes incluidos en el análisis de expresión y metilación genética

Por tanto, presentaremos los resultados de expresión genética de los diferentes grupos, tejidos y genes y, posteriormente, los resultados de las comparativas de interés. En caso de existir cambios estadísticamente significativos de expresión, añadiremos los resultados de metilación. Del mismo modo, en caso de existir diferencias significativas en el estado de la metilación de algún gen, expondremos los resultados obtenidos en la expresión.

A modo esquemático, los resultados se van a mostrar siguiendo la siguiente estructura:

Grupo en estudio

- Control
- Obesas
- VLCS
- Sham
- Sleeve
- Bypass

Grasa subcutánea	Grasa visceral	Músculo	Hígado	Sangre
FAS	FAS	FAS	FAS	FAS
FASN	FASN	FASN	FASN	FASN
FTO	FTO	FTO	FTO	FTO
IRS1	IRS1	IRS1	IRS1	IRS1
Leptina	Leptina	Leptina	Leptina	Leptina
MCP1	MCP1	MCP1	MCP1	MCP1
PPAR γ	PPAR γ	PPAR γ	PPAR γ	PPAR γ
TNF α	TNF α	TNF α	TNF α	TNF α

Figura 34: Esquema de resultados de expresión genética

Resultados de expresión genética

Grupo Control

En la tabla 12 podemos observar los resultados de la expresión genética en los diferentes tejidos del grupo control.

Grasa subcutánea	Grasa Visceral	Músculo
<i>FAS</i> : 0,033	<i>FAS</i> : 0,019	<i>FAS</i> : No expresado
<i>FASN</i> : 7,379	<i>FASN</i> : 1,346	<i>FASN</i> : 0,002
<i>FTO</i> : 1,105	<i>FTO</i> : 0,226	<i>FTO</i> : 0,018
<i>IRS1</i> : 0,172	<i>IRS1</i> : 0,039	<i>IRS1</i> : 0,029
<i>Leptina</i> : 1,309	<i>Leptina</i> : 0,237	<i>Leptina</i> : 0,02
<i>MCPI</i> : 0,066	<i>MCPI</i> : No expresado	<i>MCPI</i> : 0,002
<i>PPARγ</i> : 0,412	<i>PPARγ</i> : 0,17	<i>PPARγ</i> : 0,001
<i>TNFα</i> : No expresado	<i>TNFα</i> : No expresado	<i>TNFα</i> : 0,001
Hígado	Sangre	
<i>FAS</i> : 0,051	<i>FAS</i> : 0,013	
<i>FASN</i> : 11,478	<i>FASN</i> : 0,011	
<i>FTO</i> : 1,89	<i>FTO</i> : No expresado	
<i>IRS1</i> : 1,216	<i>IRS1</i> : 0,399	
<i>Leptina</i> : No expresado	<i>Leptina</i> : No expresado	
<i>MCPI</i> : 0,02	<i>MCPI</i> : 0,007	
<i>PPARγ</i> : 0,078	<i>PPARγ</i> : 0,206	
<i>TNFα</i> : 0,003	<i>TNFα</i> : 0,013	

Tabla 12: Resultado de la expresión genética relativa en el grupo control

Obesas

En la tabla 13 podemos observar los resultados de la expresión genética en los diferentes tejidos del grupo de ratas obesas.

Grasa subcutánea	Grasa Visceral	Músculo
<i>FAS</i> : 0,042	<i>FAS</i> :0,049	<i>FAS</i> : No expresado
<i>FASN</i> : 11,034	<i>FASN</i> : 2,353	<i>FASN</i> : 0,003
<i>FTO</i> : 0,944	<i>FTO</i> : 0,525	<i>FTO</i> : 0,020
<i>IRSI</i> : 0,083	<i>IRSI</i> : 0,008	<i>IRSI</i> : 0,018
<i>Leptina</i> : 1,227	<i>Leptina</i> : 1,397	<i>Leptina</i> : 0,062
<i>MCPI</i> : 0,024	<i>MCPI</i> : No expresado	<i>MCPI</i> : 0,003
<i>PPARγ</i> : 0,329	<i>PPARγ</i> : 0,295	<i>PPARγ</i> : 0,001
<i>TNFα</i> : No expresado	<i>TNFα</i> : No expresado	<i>TNFα</i> : 0,001
Hígado	Sangre	
<i>FAS</i> : 0,070	<i>FAS</i> : 0,006	
<i>FASN</i> : 5,637	<i>FASN</i> : 0,014	
<i>FTO</i> : 1,756	<i>FTO</i> : No expresado	
<i>IRSI</i> : 1,002	<i>IRSI</i> : 0,453	
<i>Leptina</i> : No expresado	<i>Leptina</i> : No expresado	
<i>MCPI</i> : 0,003	<i>MCPI</i> : 0,026	
<i>PPARγ</i> : 0,054	<i>PPARγ</i> : 0,145	
<i>TNFα</i> : 0,003	<i>TNFα</i> : 0,011	

Tabla 13: Resultado de la expresión genética relativa en el grupo Obesas

VLCD

En la tabla 14 podemos observar los resultados de la expresión genética en los diferentes tejidos del grupo VLCD.

Grasa subcutánea	Grasa Visceral	Músculo
<i>FAS</i> : 0,030	<i>FAS</i> : 0,038	<i>FAS</i> : No expresado
<i>FASN</i> : 7,308	<i>FASN</i> : 1,516	<i>FASN</i> : 0,005
<i>FTO</i> : 1,289	<i>FTO</i> : 0,424	<i>FTO</i> : 0,030
<i>IRS1</i> : 0,159	<i>IRS1</i> : 0,095	<i>IRS1</i> : 0,029
<i>Leptina</i> : 1,291	<i>Leptina</i> : 0,747	<i>Leptina</i> : No válido
<i>MCPI</i> : 0,054	<i>MCPI</i> : No expresado	<i>MCPI</i> : 0,018
<i>PPARγ</i> : 0,474	<i>PPARγ</i> : 0,304	<i>PPARγ</i> : 0,003
<i>TNFα</i> : No expresado	<i>TNFα</i> : No expresado	<i>TNFα</i> : 0,003
Hígado	Sangre	
<i>FAS</i> : 0,044	<i>FAS</i> : 0,010	
<i>FASN</i> : 10,401	<i>FASN</i> : 0,012	
<i>FTO</i> : 1,620	<i>FTO</i> : No expresado	
<i>IRS1</i> : 0,862	<i>IRS1</i> : 0,303	
<i>Leptina</i> : No expresado	<i>Leptina</i> : No expresado	
<i>MCPI</i> : 0,003	<i>MCPI</i> : 0,008	
<i>PPARγ</i> : 0,076	<i>PPARγ</i> : 0,190	
<i>TNFα</i> : 0,003	<i>TNFα</i> : 0,011	

Tabla 14: Resultado de la expresión genética relativa en el grupo VLCD

Sham

En la tabla 15 podemos observar los resultados de la expresión genética en los diferentes tejidos del grupo de cirugía Sham.

Grasa subcutánea	Grasa Visceral	Músculo
<i>FAS</i> : 0,029	<i>FAS</i> : 0,049	<i>FAS</i> : No expresado
<i>FASN</i> : 0,390	<i>FASN</i> : 1,041	<i>FASN</i> : 0,001
<i>FTO</i> : 0,831	<i>FTO</i> : 0,318	<i>FTO</i> : 0,017
<i>IRS1</i> : 0,099	<i>IRS1</i> : 0,061	<i>IRS1</i> : 0,018
<i>Leptina</i> : 1,058	<i>Leptina</i> : 0,456	<i>Leptina</i> : 0,010
<i>MCPI</i> : 0,025	<i>MCPI</i> : No expresado	<i>MCPI</i> : 0,001
<i>PPARγ</i> : 0,404	<i>PPARγ</i> : 0,155	<i>PPARγ</i> : < 0,001
<i>TNFα</i> : No expresado	<i>TNFα</i> : No expresado	<i>TNFα</i> : < 0,001
Hígado	Sangre	
<i>FAS</i> : 0,085	<i>FAS</i> : 0,009	
<i>FASN</i> : 18,022	<i>FASN</i> : 0,011	
<i>FTO</i> : 1,785	<i>FTO</i> : No expresado	
<i>IRS1</i> : 1,325	<i>IRS1</i> : 0,283	
<i>Leptina</i> : No expresado	<i>Leptina</i> : No expresado	
<i>MCPI</i> : 0,028	<i>MCPI</i> : 0,009	
<i>PPARγ</i> : 0,051	<i>PPARγ</i> : 0,160	
<i>TNFα</i> : 0,006	<i>TNFα</i> : 0,014	

Tabla 15: Resultado de la expresión genética relativa en el grupo Sham

Sleeve:

Finalmente, en la Tabla 16 podemos observar los resultados de la expresión genética en los diferentes tejidos del grupo Sleeve, sometido a cirugía bariátrica.

Grasa subcutánea	Grasa Visceral	Músculo
<i>FAS</i> : 0,041	<i>FAS</i> : 0,028	<i>FAS</i> : No expresado
<i>FASN</i> : 14,506	<i>FASN</i> : 1,119	<i>FASN</i> : 0,005
<i>FTO</i> : 1,433	<i>FTO</i> : 0,323	<i>FTO</i> : 0,019
<i>IRS1</i> : 0,133	<i>IRS1</i> : 0,072	<i>IRS1</i> : 0,021
<i>Leptina</i> : 0,496	<i>Leptina</i> : 0,395	<i>Leptina</i> : 0,011
<i>MCPI</i> : 0,040	<i>MCPI</i> : No expresado	<i>MCPI</i> : 0,022
<i>PPARγ</i> : 0,469	<i>PPARγ</i> : 0,157	<i>PPARγ</i> : 0,002
<i>TNFα</i> : No expresado	<i>TNFα</i> : No expresado	<i>TNFα</i> : 0,001
Hígado	Sangre	
<i>FAS</i> : 0,073	<i>FAS</i> : 0,021	
<i>FASN</i> : 13,757	<i>FASN</i> : No válido	
<i>FTO</i> : 1,500	<i>FTO</i> : No expresado	
<i>IRS1</i> : 0,744	<i>IRS1</i> : 0,301	
<i>Leptina</i> : No expresado	<i>Leptina</i> : No expresado	
<i>MCPI</i> : 0,035	<i>MCPI</i> : 0,007	
<i>PPARγ</i> : 0,056	<i>PPARγ</i> : 0,356	
<i>TNFα</i> : 0,005	<i>TNFα</i> : 0,014	

Tabla 16: Resultado de la expresión genética relativa en el grupo Sleeve

Comparativa entre grupos de interés

- Control vs Obesas:

Comparando el grupo Control con el grupo de ratas Obesas, con el objetivo de determinar si se generan cambios en la expresión y la metilación del epigenoma en relación con la aparición de la obesidad, hemos obtenido diferencias significativas en la expresión de Leptina en Grasa Visceral. (Figura 35)

Sin embargo, estos cambios de expresión no se han acompañado de cambios a nivel de metilación en las zonas de los promotores estudiados. (Tabla 17)

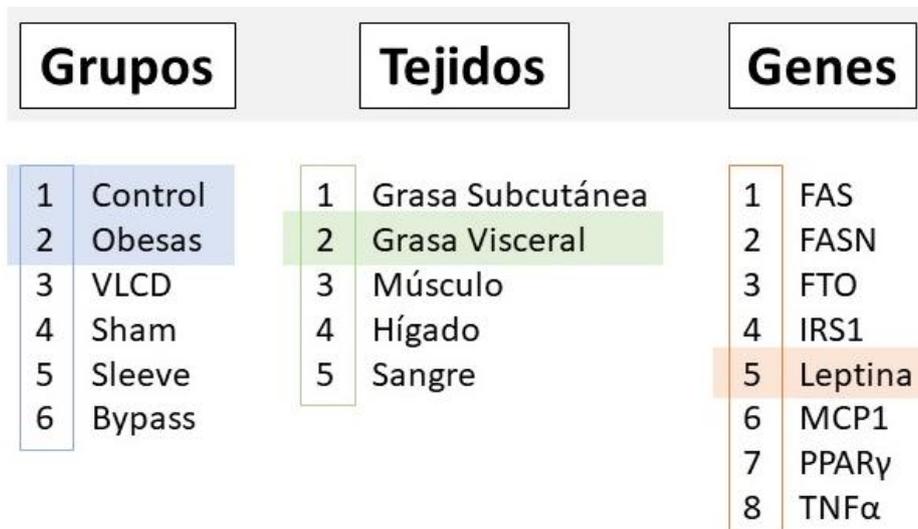


Figura 35: Esquema de cambios de expresión y metilación entre los grupos Control - Obesas

Grasa Visceral - Leptina	Control	Obesas	
Expresión	0,237	1,397	$p = 0,0095$

Tabla 17: Cambios de expresión y metilación entre los grupos Control - Obesas

- Obesas vs VLCD:

Si comparamos el grupo de ratas Obesas con el grupo VLCD (Figura 36), con el objetivo de determinar si la reducción de la ingesta calórica conlleva cambios significativos, encontramos que existen cambios en la expresión de $TNF\alpha$ en el Músculo y de la metilación de FASN en el Hígado. (Tabla 18)

Como en el caso anterior, estos cambios no se correlacionan con modificaciones significativas de sus respectivas expresiones genéticas o metilaciones epigenéticas.

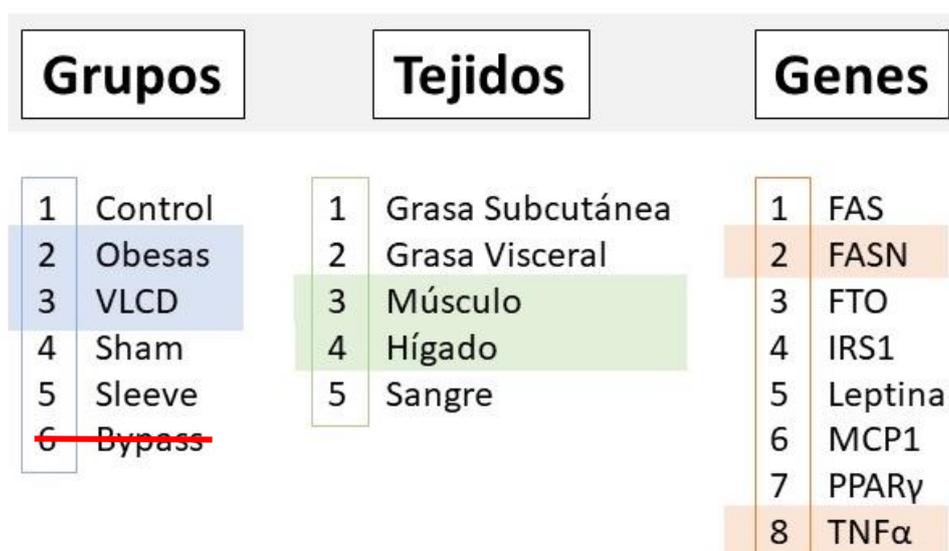


Figura 36: Esquema de cambios de expresión y metilación entre los grupos Obesas - VLCD

MUSCULO / $TNF\alpha$	Obesas	VLCD	
Expresión	0,001	1,393	$p = 0,0403$
HIGADO / FASN			
Expresión	5,637	10,401	$p = 0,504$
Metilación P5	6,330	3,318	$p = 0,0117$

Tabla 18: Cambios de expresión y metilación entre los grupos Obesas - VLCD

- Obesas vs Sham:

Comparando el grupo de ratas Obesas con el grupo Sham, con el objetivo de encontrar cambios que puedan estar relacionados con la agresión quirúrgica, encontramos que existen variaciones en la expresión y metilación de FASN en el Hígado. (Figura 37)

También se objetivan cambios en la metilación de FAS y IRS1 en Hígado que no se correlacionan con cambios en la expresión. (Tabla 19)



Figura 37: Esquema de cambios de expresión y metilación entre los grupos Obesas - Sham

HIGADO / FASN	Obesas	Sham	
Expresión	5,637	18,022	p = 0,004
Metilación P1	4,434	1,783	p = 0,0103
Metilación P3	3,171	1,585	p = 0,0096
HIGADO / FAS			
Expresión	0,070	0,085	p = 0,622
Metilación P1	3,470	6,045	p = 0,022
HIGADO / IRS1			
Expresión	1,002	1,325	p = 1,00
Metilación P2	6,840	14,335	P = 0,0028

Tabla 19: Cambios de expresión y metilación entre los grupos Obesas – Sham

- Obesas vs Sleeve:

Se comparan el grupo de ratas Obesas con el grupo Sleeve para determinar si la cirugía bariátrica produce cambios en la expresión y metilación genética. (Figura 38)

En este caso, encontramos variaciones de expresión y metilación de MCP1 en Hígado. También se objetivan cambios epigenéticos en FAS y FASN en Hígado y únicamente FASN en Músculo sin variaciones en la expresión. (Tabla 20)



Figura 38: Esquema de cambios de expresión y metilación entre los grupos Obesas - Sleeve

HIGADO / MCP1	Obesas	Sleeve	
Expresión	0,003	0,035	p = 0,0321
Metilación P1	70,66	56,34	p = 0,021
HIGADO / FAS			
Expresión	0,070	0,073	p = 0,998
Metilación P1	3,470	7,953	p = 0,0062
HIGADO / FASN			
Expresión	5,637	13,757	p = 0,119
Metilación P3	3,171	1,222	p = 0,0028
MUSCULO / FASN			
Expresión	0,003	0,005	p = 1,000
MetilaciónP1	3,667	7,530	p = 0,0064

Tabla 20: Cambios de expresión y metilación entre los grupos Obesas - Sleeve

- VLCD vs Sleeve:

Se compara también el grupo de ratas sometidas a una dieta hipocalórica (VLCD) con el grupo Sleeve, sometido a cirugía bariátrica, con el objetivo de averiguar si se modifica la expresión genética y el estado de la metilación de forma diferencial según el tratamiento dietético / quirúrgico. (Figura 39)

En este caso se han identificado cambios de expresión en MCP1 en Hígado no relacionados con variaciones en la metilación.

Sin embargo, se han objetivado cambios en el estado de la metilación en Músculo de FASN que no se acompañan de cambios en su expresión genética. (Tabla 21)



Figura 39: Esquema de cambios de expresión y metilación entre los grupos VLCD - Sleeve

HIGADO / MCP1	VLCD	Sleeve	
Expresión	0,003	0,035	p = 0,0059
MUSCULO / FASN			
Expresión	0,003	0,005	p = 1,000
MetilaciónP1	3,459	7,530	p = 0,0053

Tabla 21: Cambios de expresión y metilación entre los grupos VLCD – Sleeve

Finalmente, los resultados donde se han evidenciado diferencias significativas se muestran simplificados en dos tablas, una con los cambios de expresión y otra con los cambios en la metilación. (Tablas 22 y 23 respectivamente)

	Control vs Obesas	Obesas vs VLCD	Obesas vs Sham	Obesas vs Sleeve	VLCD vs Sleeve
Grasa Subcutánea					
Grasa Visceral	Leptina				
Músculo		TNF α			
Higado			FASN	MCP1	MCP1
Sangre					

Tabla 22: Resultados comparativos entre grupos de interés de los cambios de expresión genética

	Control vs Obesas	Obesas vs VLCD	Obesas vs Sham	Obesas vs Sleeve	VLCD vs Sleeve
Grasa Subcutánea					
Grasa Visceral					
Músculo				FASN	FASN
Higado		FASN	FAS FASN IRS1	FAS FASN MCP1	
Sangre					

Tabla 23: Resultados comparativos entre grupos de interés de los cambios epigenéticos

Discusión

Discusión

La obesidad, tal como se ha descrito en la introducción de este trabajo, tanto como patología individual como por la relación que tiene en el desarrollo de otras patologías (cardiovascular, diabetes, artropatías...) representa uno de los principales problemas a nivel social y sanitario del mundo.

El impacto clínico es muy importante para los pacientes mientras que el coste es muy elevado para los servicios sanitarios, atribuyéndose hasta un 10% del coste de gasto médico por persona.¹⁷⁰

Su tratamiento, en la actualidad, incluye el uso de varias opciones terapéuticas diferentes, lo que requiere de la actuación de equipos multidisciplinares.^{171,172}

Desde soporte psicológico, pasando por estrictos tratamientos dietéticos, controles endocrinológicos y una multitud de diferentes opciones quirúrgicas, son diferentes las estrategias que posibilitan que pacientes con severos problemas de obesidad recuperen tanto a nivel social como a nivel de salud una calidad de vida adecuada.¹⁷³

Por todo ello el estudio de nuevos fármacos y técnicas quirúrgicas ha sido una constante a lo largo de las últimas décadas

A este problema se le asocia el desconocimiento de la eficacia que los tratamientos actuales van a tener sobre un paciente en concreto. Nuestro paciente. ¿Es útil implementar una dieta? ¿Qué dieta? ¿Y esta eficacia se va a mantener a largo plazo? ¿Deberíamos ser más agresivos con cierto tipo de pacientes, mediante tratamiento farmacológico o quirúrgico? ¿Ganará de nuevo peso tras una intervención quirúrgica que es costosa para el sistema sanitario y que implica riesgos para el paciente?

En definitiva, a pesar de que existen múltiples guías para el tratamiento de la obesidad y éstas están basadas en la evidencia científica, habitualmente con conocimiento sobre grupos de personas que comparten cierto tipo de características comunes, hoy en día no somos capaces de predecir la eficacia de los resultados de forma individualizada.

Por ello, siguiendo las tendencias actuales como en el caso de los pacientes neoplásicos, existe un interés añadido en que los tratamientos sean lo más personalizados posibles, de

forma que se puedan maximizar sus beneficios, minimizando los efectos secundarios y los costes.¹⁷⁴

Aquí radica el interés del estudio de la genética y de la epigenética. Aquellos tratamientos basados en este tipo de estudios nos pueden permitir asociar pacientes y tratamientos con los mejores resultados posibles.

Por otro lado, gracias a la posibilidad de aplicar de forma experimental las diferentes terapéuticas existentes, controlando posibles factores de confusión y limitaciones éticas que existirían en un estudio realizado en humanos, podemos estudiar los resultados de cada uno de los diferentes tratamientos disponibles.

Resultados en el cambio ponderal

Los resultados obtenidos demuestran la tendencia natural que tienen los animales de experimentación y, análogamente, los seres humanos a ganar peso. Ciertamente es que, para que esto suceda, deben darse unas circunstancias concretas como facilidad de acceso al alimento y tendencia al sedentarismo, entre otros.¹⁷⁵

Por un lado, la importancia del acceso a la dieta es cabal. Así, con los resultados obtenidos del grupo control vemos que animales con acceso a la dieta de forma fácil y continuada, a pesar de ser una dieta equilibrada, si no presentan sucesos estresantes, tienen una predisposición natural a tener un incremento ponderal continuado.

Si añadimos los resultados del grupo de las ratas obesas no hacemos más que confirmar algo que ya es conocido en la literatura médica. No solamente la cantidad de dieta es importante, sino que el tipo de alimento ingerido tendrá una repercusión directa con la evolución ponderal del sujeto.

Tal como hemos podido ver, el grupo de ratas Obesas presenta un incremento de peso sostenido y de mayor intensidad que el grupo control a lo largo de todo el estudio, siendo la única variable diferencial la dieta hipercalórica.

Con el grupo VLCD podemos, por un lado, incidir de nuevo en este mismo concepto ya que, una vez iniciada esta dieta, los animales presentaron una evidente rectificación de su tendencia ascendente previa.

Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que tratar de conseguir una reducción de peso a base únicamente de una dieta hipocalórica no es una opción óptima. De hecho, el peso de las ratas del grupo VLCD no presenta una variación estadísticamente significativa entre el momento antes de iniciar la dieta y la medición final.

Tampoco se evidencia esta diferencia significativa entre los grupos Obesas y VLCD post dietas, aunque la tendencia es claramente diferente.

Es posible que, alargando el tiempo de medición, aumentando la “n” de los grupos y por tanto la potencia estadística o añadiendo otros factores, como el ejercicio físico o una restricción más severa en cuanto a la cantidad de ingesta diaria, sí que se consiguieran cambios significativos dentro del grupo VLCD antes y después de la intervención o entre los grupos Obesas y VLCD tras las dietas.

En todo caso, al no ser el objetivo primario de nuestro proyecto no se han añadido estas variables.

Por tanto, podemos concluir que la dieta hipocalórica resulta una medida interesante en la prevención de la obesidad, ya que con ella conseguimos una leve disminución o estabilidad ponderal mantenida a lo largo del tiempo, pero no podemos confiar en ella como tratamiento único en un individuo ya obeso.

Además, esta medida depende de un estricto compromiso con el cumplimiento de ésta de forma continuada, hecho que, en la práctica clínica en humanos, disminuye de forma evidente su eficacia.

Los resultados existentes en la literatura médica ya apuntan que este tratamiento tiene resultados limitados y difíciles de mantener a largo plazo.¹⁷⁶ De hecho, en algunos estudios, se expone que la ganancia ponderal tras realizar una restricción calórica puede ser más pronunciada y más intensa a nivel del tejido adiposo visceral, con lo que podría incluso tener efectos deletéreos a largo plazo.¹⁷⁷

En cuanto a los grupos sometidos a cirugía, resulta significativo el gran impacto que tiene la agresión quirúrgica en la evolución ponderal de los animales.

Tal es este impacto que no se han obtenido diferencias significativas entre este grupo y los grupos sometidos a cirugía bariátrica, aunque de nuevo, la tendencia es diferente.

Esta pérdida ponderal del grupo Sham probablemente esté en relación con el estrés que sufre el individuo al ser sometido a una cirugía.

Es ya conocido que cualquier tipo de estrés (físico, psicológico...) puede hacer variar el metabolismo basal. Lio W et al. describe como el estrés producido por aislamiento en ratas produce una disminución en la leptina circulante con una consecuente disminución de peso.¹⁷⁸ Este factor ya se tuvo en cuenta y fue controlado en nuestro estudio.

Por tanto, se puede deducir que, una vez el factor estresante (la cirugía) desapareciera, las ratas recuperarían su tendencia natural a ganar peso y que, si el estudio hubiese sido más largo, se hubieran acabado encontrado diferencias significativas entre el grupo Sham y los grupos de sometidos a cirugía bariátrica.

Finalmente, los grupos sometidos a cirugía bariátrica presentan evoluciones congruentes con lo ya conocido en la experiencia en humanos.^{150,179}

Ambos grupos tienen buenas respuestas a la cirugía con importantes pérdidas ponderales que resultan estadísticamente significativas.

Si relacionamos estos resultados con los obtenidos en el grupo VLCD entenderemos que, un tratamiento que incluya inicialmente una dieta estricta, seguida de una intervención de cirugía bariátrica, nos aportará los mejores resultados posibles en cuanto a pérdida ponderal.

A pesar de ello, si nos fijamos en la evolución a lo largo del tiempo del estudio, tras una buena respuesta inicial el peso en todos los casos tiende a estabilizarse.

Este hecho, que también sucede en el ser humano (Figura 40), es satisfactorio si para entonces ya hemos conseguido nuestro objetivo de pérdida de peso.

Sin embargo, no siempre es así por lo que no es extraño que se requieran otros tratamientos complementarios o incluso segundas intervenciones quirúrgicas.

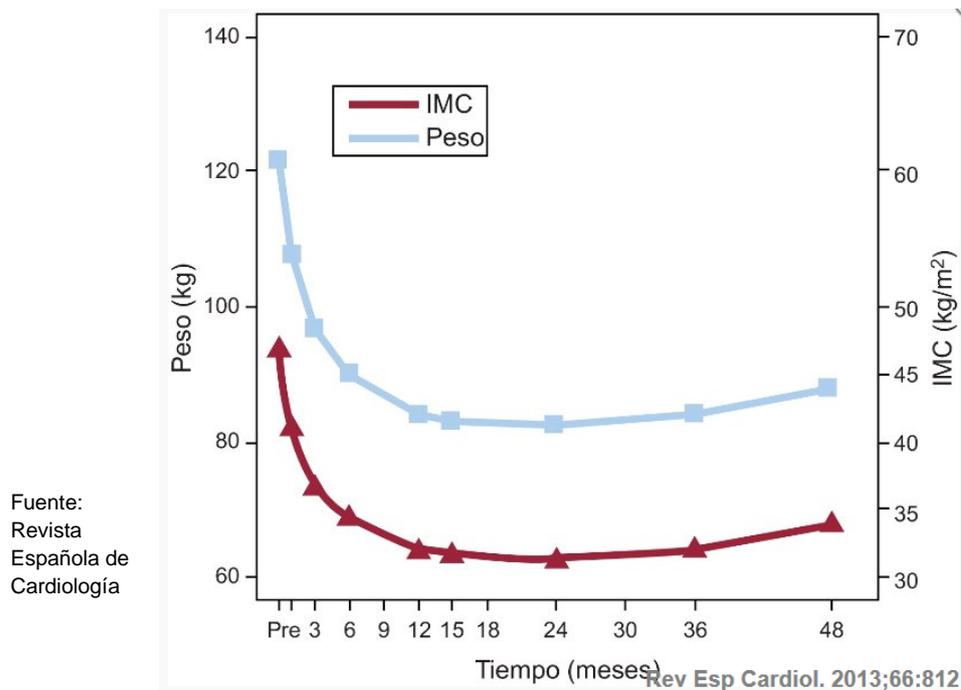


Figura 40: Evolución ponderal post bypass gástrico

En relación con el tipo de intervención quirúrgica cabe destacar la baja “n” del grupo bypass que limita su representación del grupo y la posibilidad de encontrar diferencias significativas.

En nuestro caso, no hemos hallado tales diferencias en cuanto a pérdida ponderal, tendencia comparable con los resultados en humanos.¹⁸⁰

Por tanto, si éste fuera nuestro único objetivo, cualquiera de las dos intervenciones sería válida.

Sin embargo, si tenemos en cuenta otros factores, como la morbimortalidad que tienen¹⁸¹ o el efecto sobre otras comorbilidades presentes en el paciente, deberíamos hacer una selección más individualizada.

Por ejemplo, a pesar de la facilidad técnica del Sleeve gástrico, es conocido que el Bypass ofrece mejores resultados en la resolución de enfermedades asociadas a la obesidad como la Diabetes Mellitus.¹⁸²

Cambios genéticos y epigenéticos:

Tal como se ha descrito, es conocido que las técnicas de cirugía bariátrica obtienen mejores resultados que los tratamientos médicos y dietéticos en relación con el exceso de peso perdido. Además, esta reducción a nivel ponderal se asocia, en la mayoría de pacientes, con una mejoría de múltiples comorbilidades relacionadas con la obesidad como la DM2,^{183,184} DLP,¹⁸⁵ HTA¹⁸⁵...

Hasta el momento los beneficios relacionados con estas intervenciones se han relacionado mayoritariamente con su capacidad restrictiva, disminuyendo la ingesta de forma drástica, y en el caso del BYPG, con su componente malabsortivo, disminuyendo la fracción del alimento que es absorbida a nivel intestinal.

Sin embargo, existen dudas razonables de si estos dos factores son los únicos mecanismos que justifican todos los beneficios observados. De ser así, y cogiendo la técnica del Sleeve gástrico como ejemplo donde se le podría suponer un componente únicamente restrictivo, aplicando una dieta estricta con una ingesta diaria análoga a la que hace un paciente tras esta cirugía, los resultados deberían ser similares.

La realidad es que, como ya se ha descrito en la introducción, la evolución ponderal de estos dos grupos no es parecida, obteniendo mejores resultados en los pacientes sometidos a cirugía.

Por ello se concluye, y se ha evidenciado en múltiples estudios clínicos previos, que éstos tratamientos se relacionan con cambios a nivel hormonal y enzimático que potencien sus efectos.^{186,187} Y en última instancia, que existan variaciones en los niveles de hormonas/enzimas, dependerá de que aumente o disminuya su producción controlada por la expresión de los genes que las sintetizan.

Dado que los cambios a nivel epigenético regulan, precisamente, la expresión genética y que estos cambios se ven influenciados por múltiples factores internos y externos, se postula que otro efecto de la cirugía bariátrica sería la modificación de la estructura epigenética, afectando a genes relacionados con la ingesta, el control del metabolismo energético y el control del estado proinflamatorio.

En el apartado anterior se han destacado los resultados obtenidos a nivel de expresión genética y del estado epigenético de los promotores de los genes en los tejidos estudiados, focalizando la comparación de grupos que tienen un sentido clínico.

Seguidamente, vamos a analizar estos resultados y veremos qué relación tiene con los cambios ponderales que han sufrido los diferentes grupos de interés.

Sin embargo, antes de entrar en los detalles de cada grupo/tejido/gen debemos tener en cuenta ciertos aspectos genéricos sobre el estudio epigenético que nos pueden ayudar a interpretar los resultados obtenidos.

Revisando la literatura podemos objetivar que, en la mayoría de los estudios realizados sobre patología benigna, no neoplásica, los hallazgos encontrados en cuanto a variaciones epigenéticas son de baja magnitud.

Por ejemplo, en la revisión sistemática de Dijk et al. sobre epigenética y obesidad se identificó que los cambios en porcentaje de metilación de los promotores de genes de interés raramente eran superiores al 10%. De hecho, gran parte de los resultados oscilan por debajo del 5%.¹²⁰ Por tanto, es de esperar que las variaciones que se pueden encontrar en estudios como el que hemos realizado sean también de baja magnitud.

Por otro lado, en la actualidad no se conocen con exactitud todos los mecanismos de regulación de la expresión genética. Y tampoco conocemos todas las zonas de los promotores genéticos susceptibles de ser metiladas y con capacidad de cambiar la expresión. De hecho, la mayoría de las zonas conocidas se han identificado en estudios sobre pacientes neoplásicos que son, evidentemente, diferentes al paciente obeso.

Todo ello nos lleva a inferir que, el hecho de no encontrar cambios epigenéticos en algunos de nuestros resultados, puede realmente ser debido a que no existen, pero sin poder descartar que no se haya estudiado la zona más estrictamente relacionada con la expresión genética.

Control vs Obesas

En esta comparativa únicamente hemos podido identificar cambios significativos en los niveles de expresión de *Leptina* en grasa visceral, siendo éstos más elevados en el grupo de ratas obesas.

Este resultado es congruente con lo conocido en la literatura actual sobre pacientes humanos y con la evolución ponderal que ha sufrido el grupo de ratas obesas en nuestro estudio. Ya hemos descrito en la introducción que la leptina, producida principalmente por el tejido adiposo, se encuentra incrementada en los individuos obesos y disminuida en aquellos que sufren ayuno o desnutrición.^{17,18,19}

Cabe destacar que se atribuye una relativa resistencia a la leptina a los pacientes obesos, dado que la función de ésta es suprimir el apetito y disminuir la ingesta, hechos que claramente no se producen en este tipo de pacientes. Sin embargo, se desconoce la causa y los mecanismos que producen esta resistencia.

Un estudio en ratas de Git et al¹⁸⁸ trata de, al menos, discernir si esta resistencia es consecuencia de la obesidad y de una dieta hipercalórica o bien si existe una resistencia previa y, por tanto, es un factor que predispone al individuo a desarrollar obesidad. Según los resultados obtenidos, la resistencia a la leptina parece ser un factor preexistente que facilitaría el desarrollo de la obesidad, siendo este un factor de riesgo independiente de la ingesta o del tipo de dieta. Sin embargo, esta resistencia parece aumentar a partir de las 4 semanas en aquellos individuos expuestos a la dieta hipercalórica y no en los que siguen una dieta normal, resultando en un aumento de la ingesta de este grupo y, secundariamente, del peso. Por tanto, estaríamos ante una alteración que resulta tanto causa como consecuencia de la obesidad y de una dieta hipercalórica.

Ante este hecho, resulta interesante conocer los mecanismos que controlan la producción de leptina, entrando en juego el campo de la epigenética, así como los motivos que generan esta resistencia previa o los que facilitan su aparición.

Precisamente con este objetivo, Lecourte et al, en otro estudio en ratas, ya trató de encontrar una relación entre la expresión de leptina y cambios epigenéticos.¹⁸⁹ En su estudio, y de acuerdo con nuestros resultados, demostró que las crías de ratas sometidas a dietas hipercalórica presentaban una expresión elevada del gen de la leptina en grasa

visceral, concretamente grasa perirrenal, no siendo así en grasa subcutánea en mediciones posteriores a 21 días del nacimiento. Sin embargo, a diferencia de nuestro caso, estos cambios en los niveles de expresión sí que estaban relacionados con cambios epigenéticos en regiones reguladoras de dicho gen.

En nuestro estudio, lamentablemente, no hemos podido corroborar esta relación.

Este hecho puede ser debido a varios motivos. Por un lado, hay que recordar que el estado epigenético se ve influenciado por estímulos internos y externos todavía no bien conocidos. Por tanto, cualquier diferencia en el procedimiento del estudio puede actuar como factor de confusión.

Por ello, el tipo de tejido analizado, por ejemplo, puede jugar un papel muy importante al no encontrarse en las mismas condiciones unos que otros. En nuestro caso, mayoritariamente se ha obtenido grasa intraabdominal y no perirrenal, como en el caso de Lecourte et al.

Otra posibilidad puede estar relacionada con las zonas del genoma/promotor que se han estudiado.

Esta última posibilidad es aún mayor si tenemos en cuenta que, en el estudio de Lecourte et al, la mayoría de los cambios epigenéticos observados no fueron directamente en el promotor del gen de la leptina. En su caso, las diferencias significativas se encontraron mayoritariamente en secuencias reguladoras localizadas en regiones intergenéticas que nosotros no hemos estudiado.

Todo ello nos permite confirmar la relación que existe entre la obesidad y elevados niveles de leptina. Y aunque no se han encontrado cambios a nivel epigenético, sigue pareciendo un target interesante para futuros estudios, con el fin de identificar nuevos marcadores que nos permitan predecir qué individuos están predispuestos a sufrir obesidad y cuáles no.

Obesas vs VLCD

En este caso se han identificado cambios significativos en la expresión de TNF α en el

músculo, siendo más elevada su expresión en el grupo de ratas que fueron sometidos a una dieta hipocalórica.

Este resultado, sin embargo, no lo podemos relacionar directamente con un cambio ponderal dado que no se encontraron cambios significativos, aunque la tendencia de ambos grupos era claramente diferente.

De hecho, tal como se ha comentado previamente, se puede inferir que estas diferencias de peso hubiesen acabado siendo significativas si el análisis se hubiese realizado pasado más tiempo. Esto se deduce al observar que, en t10 antes de las intervenciones, la diferencia media de peso entre ambos grupos era de 8gr. mientras que en el momento del sacrificio había aumentado a 60gr.

Si nos centramos en el análisis de expresión, lo sucedido en nuestro estudio no sería lo esperable dado lo conocido hasta la actualidad.

Cabe recordar que el TNF α , una citoquina producida y secretada por los macrófagos principalmente en el tejido adiposo, es conocido y relacionado con la obesidad desde los años 90.¹⁹⁰

Se relaciona en la literatura con el grado de adiposidad de los tejidos, interviene en procesos de inflamación y de apoptosis además de promover un aumento de la resistencia insulínica. Por ello, se ha objetivado que se encuentra elevado en individuos con obesidad, individuos que ya se ha descrito sufren un cierto estado proinflamatorio.¹⁹¹

Sin embargo, en nuestro estudio hemos obtenido un resultado paradójico por varios motivos.

Por un lado, el músculo no sería el tejido donde se hubiera esperado un mayor cambio en la expresión de TNF α . A pesar de que también se conoce su expresión en este tejido y en el hígado,¹⁹² lo previsible hubiera sido objetivar diferencias en el tejido adiposo, subcutáneo o visceral, que es donde principalmente se produce.

Por otro lado, en caso de producirse cambios significativos, lo razonable hubiera sido objetivar un aumento del TNF α en el grupo de las ratas obesas, dada su relación con el tejido adiposo,¹⁹³ y no en el grupo VCLD que, a pesar de no haber perdido peso al menos no ha seguido aumentando a lo largo del tiempo.

Por ello, dado que el resultado no es congruente, asumimos que los cambios evidenciados no deben estar relacionados con la evolución ponderal de los diferentes grupos. Probablemente, no ha existido un cambio en la cantidad de tejido adiposo suficiente como para afectar a la expresión de TNF α .

Esta asunción también se sustenta en el hecho de que, en las otras comparaciones de interés, a pesar de existir cambios ponderales más llamativos que entre las ratas Obesas y las ratas VLCD, no se reproduce el resultado obtenido en este grupo.

Descartada la influencia del cambio ponderal, otra posibilidad que podría haber explicado este resultado sería la dieta. A diferencia de la dieta estándar, rica en carbohidratos, y de la hipercalórica, rica en grasas, la dieta hipocalórica presentaba una distribución más equilibrada de los nutrientes, distribuidos aproximadamente en partes iguales. Sería plausible que la composición de la dieta afectara de forma indirecta al estado inflamatorio del músculo.

Sin embargo, tampoco se ha encontrado en la literatura ninguna evidencia que pueda sostener esta teoría. Mas bien al contrario. Aunque hay pocos estudios específicos relacionando únicamente el TNF α en músculo y la pérdida de peso secundaria a dieta solamente, Oliveira et al. describe en un estudio en ratones como una dieta restrictiva produce varios cambios a nivel bioquímico e inmunológico entre los que destaca una disminución del TNF α circulante.¹⁹⁴

Del mismo modo, Derous et al. desarrollan un estudio parecido en el que exponen a ratas a diferentes grados de reducción de la ingesta y estudian sus efectos sobre el hambre y los ciclos circadianos. Los resultados, al igual que en el caso anterior, demuestran una relación directa entre el grado de restricción y la disminución de los niveles circulantes de insulina, leptina y TNF α .¹⁹⁵

Específicamente en músculo, Roberts et al. valora si una composición diferente de la dieta, por ejemplo, a nivel proteico, disminuye los niveles de TNF α tras realizar ejercicio sin evidenciar de cambios significativos.¹⁹⁶ Mientras que Ferrier et al. sí que encuentran una relación entre una dieta baja en grasas saturada y una disminución del TNF α a nivel muscular, que además resulta independiente de la evolución ponderal.¹⁹⁷

Por tanto, tampoco parece probable que la dieta sea el factor desencadenante de este aumento de TNF α ya que, aunque sí que se evidencia una relación en la literatura entre

ambos, la tendencia habitual es a la disminución y no al aumento. Sin embargo, cabe mencionar que las dietas de los artículos referenciados son diferentes entre ellas y en comparación con nuestro estudio. Por ello, no podemos descartar completamente que nuestro resultado sí que se vea influenciado.

Dado que estas son las dos únicas variables conocidas que sean diferentes entre los dos grupos, es posible que exista algún factor de confusión externo no controlado que justifique este mayor estado proinflamatorio.

Por otro lado, estos cambios de expresión tampoco se han visto relacionados con cambios significativos a nivel epigenético lo que, como en el caso anterior, puede ser debido a que éstos no existan o bien a que no estén relacionados con las zonas del promotor que han sido estudiadas en nuestro estudio.

Finalmente, entre estos dos grupos sí que se han identificado cambios significativos en el estado de la metilación de una de las nueve regiones estudiadas del promotor de FASN en el hígado.

Esta variación no se ha acompañado de cambios a nivel de expresión, seguramente debido a que las otras 8 regiones estudiadas del promotor no han variado, no siendo el estímulo suficientemente fuerte como para que se inicie la transcripción.

Por ello, no podemos asumir que la dieta produzca cambios significativos en la metilación del promotor de FASN.

Obesas vs Sham

En la comparación de ratas Obesas con las sometidas a la cirugía Sham encontramos algunas diferencias tanto en expresión como en metilación.

A nivel de expresión únicamente se objetiva un cambio en FASN en el hígado, encontrándose aumentada en el grupo quirúrgico.

Cabe recordar que la expresión de FASN, el gen del que se sintetiza la proteína Ácido Graso Sintasa, se relaciona con la acumulación de tejido graso, principalmente a nivel visceral, así como con la existencia de resistencia a la insulina.¹⁹⁸

Este resultado no parece congruente con la relación conocida y ya descrita previamente entre la obesidad y la resistencia insulínica.

Si tenemos en cuenta los cambios ponderales objetivados en nuestros grupos, en los que hemos evidenciado una clara reducción de peso en el grupo Sham respecto al grupo de Obesas (-126g), lo esperable hubiera sido una disminución y no un aumento de FASN en el grupo quirúrgico.

Por ello, difícilmente podemos atribuir este cambio en la expresión a los cambios ponderales.

Otra posibilidad sería que el aumento en la expresión de FASN fuera secundario al estrés quirúrgico que sufre este grupo.

Este hecho implicaría que, al someter a un individuo a una intervención quirúrgica cualquiera, por el simple hecho de ser operado, se promueve la síntesis de ácidos grasos a nivel del hígado, al menos a medio plazo.

Sin embargo, actualmente, no se ha encontrado en la literatura otra evidencia que sustente esta aseveración y no se ha objetivado el mismo efecto en el otro grupo quirúrgico de nuestro proyecto. Por tanto, se requerirían de nuevos estudios enfocados a confirmar este hecho.

Alternativamente, la explicación de por qué hemos obtenido este resultado podría ser la combinación temporal de los dos factores previos, desapareciendo posteriormente el estrés quirúrgico.

Es conocido que una dieta restrictiva en calorías como la que se utiliza, precisamente, antes de intervenciones de cirugía bariátrica, produce una disminución de peso y del tamaño del hígado, que oscila entre el 5 y el 20% del volumen según las series, y que se acompaña de una reducción de hasta el 20% del grado de esteatosis.¹⁹⁹

En el caso del grupo Sham, como en cualquier grupo quirúrgico, existe una situación de estrés quirúrgico asociado a una alteración de la dieta, con un empeoramiento del estado nutricional, y un aumento del catabolismo que explica la disminución de peso que han sufrido estos animales. Probablemente, similar a lo que sucede con las dietas restrictivas en humanos, también haya supuesto una disminución del volumen hepático y del grado de esteatosis. De hecho, un trabajo sobre ratas obesas, identificó que la cirugía Sham

produce una notable disminución de la esteatosis hepática y por, tanto, respalda esta teoría.²⁰⁰

Sin embargo, una vez eliminado este estímulo externo (la agresión quirúrgica) y de nuevo siguiendo una dieta normal, es previsible que exista una tendencia a recuperar el estado nutricional previo y, por tanto, a la lipogénesis.

Este hecho, podría justificar el aumento de la expresión de FASN en el hígado²⁰¹ y, a la vez, sería congruente con que no se objetive en el grupo Sleeve, dado que estas ratas presentan el componente restrictivo de la cirugía y probablemente, en caso de recuperar peso, no lo harían a la velocidad del grupo Sham.

En este caso, además, se ha objetivado una menor metilación en dos de las zonas promotoras de FASN, hecho que se puede relacionar con una mayor expresión del mismo.

Por otro lado, también en el hígado se han evidenciados cambios en la metilación de otros dos genes, FAS y IRS1.

A diferencia de FASN, lo que se ha objetivado es un mayor grado de metilación en una de las zonas promotoras de ambos genes, que podría haberse asociado a una disminución de la expresión, pero en estos casos no se han evidenciado diferencias significativas.

Obesas vs Sleeve

En este caso, se ha identificado una variación en la expresión de MCP1 en Hígado, encontrándose un aumento significativo en el grupo Sleeve.

Este cambio de expresión, además, ha ido acompañado de una disminución significativa del peso de este grupo, con una reducción respecto a las Obesas de -170g.

Sin embargo, a pesar de ser la comparación más relevante del estudio para poder identificar la relación entre cirugía bariátrica y cambios en la expresión genética, no se han podido evidenciar otros cambios significativos en ningún otro gen ni tejido.

Para interpretar este resultado, hay que recordar que MCP1 es una citoquina, sintetizada y secretada por células del músculo liso vascular, endotelio, monocitos y macrófagos, entre otros, con actividad quimioatrayente.

Su función está relacionada fundamentalmente con el tránsito de células del sistema inmune. Por tanto, está implicada en el reclutamiento o migración de leucocitos y más concretamente de monocitos, a los focos donde está teniendo lugar la respuesta inflamatoria.

Así, MCP1 ya ha sido previamente estudiada en pacientes con obesidad, siendo identificada como una de las posibles citoquinas que participan en el estado proinflamatorio.²⁰² Habitualmente se encuentra elevada respecto a sujetos no obesos, tanto en humanos como en ratas,²⁰³ principalmente en tejido adiposo.^{204,205} En nuestro estudio, en cambio, no se han objetivado estas diferencias entre ratas control y obesas.

Otro aspecto a tener en cuenta es la evolución posterior a la cirugía, donde encontramos resultados dispares en la literatura.

Existen proyectos, como el realizado por Shimizu et al., en el que se estudia la variación de MCP1 en pacientes obesos sometidos a un Sleeve gástrico, donde no se identifican variaciones significativas tras 1 o 6 meses de la cirugía.²⁰⁶

En cambio, en modelo experimental en ratas, encontramos experiencias con una disminución de su expresión en grasa mesentérica a los 4 meses tras ser sometidas a un Bypass Gástrico.²⁰⁷ Y en el mismo sentido, Beisani et al, de nuevo en humanos, identificaron una disminución de la expresión de MCP1 en leucocitos circulantes 6 meses después de ser sometido a un Sleeve gástrico.²⁰⁸

En ningún caso hemos encontrado estudios donde se identifiquen cambios de expresión a nivel hepático.

En nuestro caso, no hemos obtenido diferencias en la expresión en tejido adiposo y el resultado en hígado ha sido inverso a lo que cabría esperar, pareciendo que existe un mayor estado proinflamatorio en el grupo sometido a Sleeve Gástrico.

Hay varias posibles explicaciones para este hecho.

Por un lado, se trata de un tejido diferente que, aunque esperaríamos que se comportara de forma similar al tejido adiposo, puede no ser el caso en la práctica clínica.

Otra posibilidad, que justificaría el resultado obtenido en el hígado y la falta de cambios en tejido adiposo, sería el tiempo de medición. En comparación con el estudio sobre ratas

con Bypass, en nuestro caso el análisis ha sido realizado al mes y medio de la intervención quirúrgica (6 semanas). Por tanto, podríamos estar todavía bajo ciertos efectos proinflamatorios de la cirugía, aunque resulta poco probable, dado que no se han encontrado mediadores proinflamatorios elevados en el resto de los tejidos.

Finalmente, podría existir un factor externo que promoviera este aumento de la inflamación hepática, tratándose de nuevo de un factor de confusión.

Si valoramos el estado epigenético de MCP1 en Hígado, objetivamos que en este caso si hay una correcta relación entre el estado de metilación y la expresión.

Comparativamente, el grupo Sleeve Gástrico ha presentado un estado de metilación significativamente menor en la región del promotor estudiada, lo que explicaría su mayor expresión.

Dado que estos cambios no se han identificado en el grupo Sham ni el grupo VLCD, en principio podemos descartar que se deban a la agresión quirúrgica o a la dieta y serían propios de la intervención de cirugía bariátrica realizada.

Finalmente, cabe destacar que, aunque no hemos realizado una comparación específica entre los dos grupos quirúrgicos (Sham vs Sleeve), sí que encontramos una relación interesante con los cambios epigenéticos en el hígado.

Por un lado, en ambos casos objetivamos un aumento de la metilación significativo de la región del promotor de FAS respecto al grupo de Obesas, aunque en ninguno de ellos este cambio tiene implicación en cuanto al nivel de expresión.

Por otro lado, también se identifica en ambos casos una disminución de la metilación del promotor de FASN respecto al grupo de Obesas. Sin embargo, en este caso, mientras en el grupo Sham estas diferencias son significativas en dos zonas del promotor y se acompañan de un aumento de la expresión del gen, en el grupo Sleeve solamente encontramos estas diferencias en una de las zonas del promotor, sin que se asocien cambios significativos en la expresión. La posible explicación para resultados se ha comentado en la comparativa entre Obesas y Sham.

Ante estos cambios objetivados en ambos grupos quirúrgicos, donde ambos presentan una pérdida ponderal significativa, pero sin diferencias entre ellos, podemos inferir, que

o bien la agresión quirúrgica o bien la pérdida ponderal estimulan cambios epigenéticos en FAS y FASN en el hígado.

También existe en el grupo Sleeve un aumento de la metilación en una de las regiones estudiadas del promotor de FASN en Músculo pero que no tiene repercusión en cuanto a niveles de expresión.

VLCD vs Sleeve

Finalmente, comparando el grupo sometido a cirugía bariátrica con el que ha seguido una dieta hipocalórica, de nuevo objetivamos que el grupo de cirugía bariátrica presenta una mayor expresión de MCP1 en Hígado.

Ya hemos comentado en el apartado anterior las posibles causas por las que es posible que se encuentre aumentada la expresión de MCP1 en el grupo quirúrgico, siendo una posibilidad que sea debida a la agresión quirúrgica junto con la pérdida ponderal y los cambios anatómicos y metabólicos que genera la cirugía bariátrica.

Al evidenciar que esta variación también se objetiva al comparar el grupo Sleeve con el grupo VLCD esta conjetura gana valor.

A diferencia del grupo de las ratas Obesas, donde la evolución ponderal había seguía tendencias opuestas con el grupo Sleeve, la comparación con el grupo VLCD también presenta diferencias significativas, pero de menor magnitud. Cabe recordar que el grupo de dieta hipocalórica consigue mantener un peso más o menos estable a lo largo del tiempo a diferencia de las Obesas que siguen aumentando. Y el grupo Sham presenta una evolución ponderal análoga al grupo Sleeve, sin que se haya evidenciado una variación similar de MCP1.

Por tanto, parece que se puede descartar que esta mayor expresión de MCP1 esté relacionada con cambios a nivel ponderal de los individuos.

Sin embargo, en este caso, a diferencia de la comparación con las ratas Obesas, no se ha acompañado de cambios significativos en el estado de la metilación del promotor.

De nuevo, resulta difícil establecer una relación directa entre los factores externos, como una intervención quirúrgica, y cambios de metilación y expresión.

Del mismo modo, hemos identificado una mayor metilación del promotor de FASN en Músculo que no se ha acompañado de cambios en la expresión.

Fortalezas del estudio

Gracias a trabajar con cirugía experimental sobre animales hemos tenido la posibilidad de analizar la expresión genética y el estado de la metilación epigenética de diferentes genes en gran cantidad de tejidos y bajo diferentes estímulos externos.

Además, posteriormente, hemos podido comparar estos resultados con la evolución ponderal de cada grupo, pudiendo relacionar una variable más.

Con esto, no solamente hemos podido hacer un amplio análisis del efecto de nuestras diferentes intervenciones, sino que, con este diseño, se eliminan gran parte de los posibles sesgos de confusión que supondría comparar los resultados de mediciones indirectas o teniendo que prescindir de los resultados de algunos tejidos.

Por otra parte, es evidente que realizar este estudio sobre paciente humanos sería mucho más complejo y éticamente discutido dada la necesidad de realizar biopsias en múltiples órganos que podrían comportar una comorbilidad asociada.

Limitaciones del estudio

Nuestro estudio presenta principalmente dos limitaciones relevantes.

La primera es la falta de financiación, que nos ha obligado a hacer una selección de los tejidos y genes a analizar.

Evidentemente, esta selección se ha realizado basándonos en criterios científicos y pensando en obtener el máximo rendimiento posible. Es decir, los órganos y genes analizados son ya conocidos en la literatura como partes relevantes en el control metabólico y estado inflamatorio.

Sin embargo, también es evidente que muchos otros genes y tejidos interesantes han quedado excluidos

Del mismo modo, a nivel epigenético solamente hemos podido estudiar determinadas zonas relacionadas con los genes seleccionados, pudiendo existir falsos negativos al no ser las zonas más relacionadas con el control transcripcional.

La segunda limitación relevante es que, de los dos grupos sometidos inicialmente a cirugía bariátrica, solamente uno, el del Sleeve Gástrico, ha llegado hasta el final del proyecto con número de individuos suficiente como para ser analizado.

El grupo del Bypass, debido a la mala evolución de varias de las ratas, no ha podido ser incluido en la comparativa final a pesar de ser uno de los grupos con mayor interés clínico.

Relevancia clínica

Los hallazgos descritos en este estudio a nivel de variación ponderal son congruentes y refuerzan la evidencia existente en la literatura, reforzando la necesidad de plantear tratamientos para la obesidad multimodales, siendo el más efectivo la cirugía bariátrica. Se constata, por tanto, la mayor efectividad de estas técnicas en relación con la pérdida ponderal en comparación con las dietas.

Esto es importante a la hora de definir nuestra estrategia terapéutica ya que, parece evidente, que una actitud más agresiva de forma precoz nos va a proporcionar unas ventajas que las otras alternativas de las que disponemos no.

En cambio, los resultados obtenidos a nivel de expresión y metilación no nos permiten establecer nuevas conclusiones relevantes a nivel terapéutico.

A pesar de que hemos encontrado algunas diferencias significativas en la expresión de genes en varios tejidos y que, en ocasiones se han acompañado de cambios significativos de metilación, no en todos los casos son congruentes con lo que cabría esperar ni disponemos de una explicación clara de cuál ha sido la causa.

Por ello, no nos sirven como posibles marcadores de efectividad de los diferentes tratamientos ni aportan información del porqué de los buenos resultados de la cirugía bariátrica.

En conclusión, nuestro estudio nos permite ampliar el conocimiento que disponemos del metabolismo energético, la genética y la epigenética relacionada con la obesidad y sus tratamientos.

Sin embargo, es evidente que esta línea de investigación, tanto por nuestros resultados como por los encontrados en otros proyectos descritos en la literatura, todavía se encuentra en una fase temprana.

Por tanto, será conveniente continuar con estudios que profundicen en otras posibles relaciones a nivel genético/epigenético, así como un análisis más pormenorizado del control de la expresión genética y la relevancia de los promotores y zonas reguladoras de cada uno de los posibles genes implicados.

Conclusiones

Conclusiones

Tras el análisis de la evolución ponderal y su relación con cambios de expresión y cambios epigenéticos podemos concluir que:

- 1.- Ninguna de las intervenciones realizadas, independientemente de la evolución ponderal, ha generado cambios significativos en la metilación ni en la expresión de genes relacionados con el metabolismo o el estado inflamatorio en grasa subcutánea.
- 2.- El aumento de peso secundario a una dieta hipercalórica provoca un aumento de la expresión de leptina en grasa visceral que no se relaciona con cambios epigenéticos.
- 3.- El inicio de una dieta hipocalórica en ratas obesas produce un aumento de TNF α en músculo independiente del estado epigenético y de la variación ponderal.
- 4.- La agresión quirúrgica promueve, tras una pérdida ponderal inicial significativa, un aumento de la expresión de FASN en hígado asociado a una disminución de la metilación de este gen.
- 5.- La cirugía bariátrica resulta el tratamiento más efectivo para la obesidad, asociándose a un aumento de expresión de MCP1 en hígado también secundario a una disminución en el grado de metilación de este gen.
- 6.- Ninguna de las intervenciones realizadas, independientemente de la evolución ponderal, ha generado cambios significativos en la metilación ni en la expresión de genes relacionados con el metabolismo o el estado inflamatorio en sangre.

Bibliografía

Bibliografía

1. Yusuf S, Hawken S, Ôunpoo S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004;364(9438):937-952. doi:10.1016/S0140-6736(04)17018-9
2. Kamran SM, Iftikhar R, Khan A, Altaf M. Comparison of CAD risk factors in abdominal obesity versus general obesity with normal WC in adult males. *J Pak Med Assoc*. 2014;64(4):394-398. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24864631>. Accessed July 13, 2019.
3. Chandra A, Neeland IJ, Berry JD, et al. The Relationship of Body Mass and Fat Distribution With Incident Hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(10):997-1002. doi:10.1016/j.jacc.2014.05.057
4. Centre NC, Care P, Excellence PH. Obesity : the prevention , identification , assessment and management of overweight and obesity in adults and children. *Heal San Fr*. 2006;5(December):1-84. <http://www.nice.org.uk/nicemedia/pdf/CG43NICEGuideline.pdf>.
5. Sanidad M De. Nota Técnica. Encuesta Nacional de Salud . España 2017. 2018:1-12.
6. *Obesidad y Sobrepeso.*; 2018.
7. Huxley RR, Misialek JR, Agarwal SK, et al. Physical activity, obesity, weight change, and risk of atrial fibrillation: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2014;7(4):620-625. doi:10.1161/CIRCEP.113.001244
8. Laiyemo AO. The risk of colonic adenomas and colonic cancer in obesity. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28(4):655-663. doi:10.1016/j.bpg.2014.07.007
9. Ignatieva E V., Afonnikov DA, Saik O V., Rogaev EI, Kolchanov NA. A compendium of human genes regulating feeding behavior and body weight, its functional characterization and identification of GWAS genes involved in brain-specific PPI network. *BMC Genet*. 2016;17(S3):158. doi:10.1186/s12863-016-0466-2
10. Dhurandhar EJ, Keith SW. The aetiology of obesity beyond eating more and exercising less. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28(4):533-544. doi:10.1016/j.bpg.2014.07.001
11. Levine JA, Lanningham-Foster LM, McCrady SK, et al. Interindividual variation in posture allocation: possible role in human obesity. *Science*. 2005;307(5709):584-586. doi:10.1126/science.1106561
12. Arija V, Rodrigo CP, de Vitoria EM, et al. Valores de referencia de ingesta dietética y de antropometría en estudios poblacionales. *Nutr Hosp*. 2015;31:157-

167. doi:10.3305/nh.2015.31.sup3.8763
13. Serra-Majem L, Aranceta J. Nutritional objectives for the Spanish population. Consensus from the Spanish Society of Community Nutrition. *Public Health Nutr.* 2003;4(6a). doi:10.1079/phn2001229
 14. Aranceta J, Serra-Majem L. Dietary guidelines for the Spanish population. *Public Health Nutr.* 2003;4(6a). doi:10.1079/phn2001228
 15. WHO J, Consultation FAOE. World Health Organization, Food and Agriculture Organization UN. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation. Geneva, Switzerland: 2002. 2003. doi:ISBN 92 4 120916 X ISSN 0512-3054 (NLM classification: QU 145)
 16. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA). Informe del consumo de alimentación en España. *Gob España.* 2018:1-225. doi:http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeconsumoalimentacion2014_tcm7-382148.pdf
 17. Jeffery ND, Levine JM, Olby NJ, Stein VM. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. 2013:1318-1333.
 18. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol.* 2000;68(4):437-446. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11037963. Accessed February 22, 2019.
 19. Grinspoon S, Gulick T, Askari H, et al. Serum leptin levels in women with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(11):3861-3863. doi:10.1210/jcem.81.11.8923829
 20. Emile L. Boulpaep WFB. *Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach.* Philadelphia: Saunders; 2003.
 21. Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell.* 2004;116(2):337-350. doi:10.1016/s0092-8674(03)01081-x
 22. In N, Juxtaparaventricular THE, Of R, et al. Neurons in the Juxtaparaventricular Region of the Lateral Hypothalamus Are Activated By Leptin and. *Brain Res.* 2013;(602):19-26. doi:10.1016/j.brainres.2012.08.020.PREPRO-THYROTROPIN
 23. Mosimann F, Pralong FP, Roduit R, et al. Leptin Inhibits Directly Glucocorticoid Secretion by Normal Human and Rat Adrenal Gland 1 . *Endocrinology.* 2014;139(10):4264-4268. doi:10.1210/endo.139.10.6254
 24. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol.* 2000.
 25. Procaccini C, Jirillo E, Matarese G. Leptin as an immunomodulator. *Mol Aspects Med.* 2012;33(1):35-45. doi:10.1016/j.mam.2011.10.012
 26. Wallaschofski H, Kobsar A, Sokolova O, Eigenthaler M, Lohmann T. Co-activation of Platelets by Prolactin or Leptin - Pathophysiological Findings and

- Clinical Implications. *Horm Metab Res.* 2004;36(1):1-6. doi:10.1055/s-2004-814200
27. Shiver J, Reimann K, Lord C, et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature.* 2002;415(January):339-343.
 28. Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab.* 2008;34(1):2-11. doi:10.1016/j.diabet.2007.09.004
 29. Bristol-Myers Squibb Company. Endocrinologic and Metabolic Drugs Advisory Committee Briefing Document 2013. 2013.
 30. José C, Bautista M, Díez A, Giráldez T, Porrás A, Viguera E. Grelina, mucho más que la hormona del hambre. *SEBBM Divulg.* 2015. doi:http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_RPC.2018.10.1
 31. Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S. The hormonal control of food intake. *Cell.* 2007;129(2):251-262. doi:10.1016/j.cell.2007.04.001
 32. Cowley MA, Smith RG, Diano S, et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron.* 2003;37(4):649-661. doi:10.1016/S0896-6273(03)00063-1
 33. TRUJILLO ME, SCHERER PE. Adiponectin - journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med.* 2005;257(2):167-175. doi:10.1111/j.1365-2796.2004.01426.x
 34. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care.* 2003;26(8):2442-2450. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12882876>. Accessed April 2, 2019.
 35. Palomer X, Pérez A, Blanco-Vaca F. Adiponectina: Un nuevo nexo entre obesidad, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. *Med Clin (Barc).* 2005;124(10):388-395. doi:10.1157/13072576
 36. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab.* 2006;3(3):153-165. doi:10.1016/j.cmet.2006.01.004
 37. Chaudhri O, Small C, Bloom S. Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2006;361(1471):1187-1209. doi:10.1098/rstb.2006.1856
 38. Moreno-Aliaga MJ, Lorente-Cebrián S, Pérez-Echarri N, Hernández JAM. Visfatin, apelina y nuevas moléculas del síndrome metabólico. *Rev Esp Obes.* 2008;6(4):205-214.
 39. Araki S, Dobashi K, Kubo K, et al. Plasma visfatin concentration as a surrogate marker for visceral fat accumulation in obese children. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16(2):384-388. doi:10.1038/oby.2007.54
 40. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science.* 2005;307(5708):426-430. doi:10.1126/science.1097243

41. Berndt J, Klötting N, Kralisch S, et al. Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes*. 2005;54(10):2911-2916. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16186392>. Accessed March 9, 2019.
42. Sun G, Bishop J, Khalili S, et al. Serum visfatin concentrations are positively correlated with serum triacylglycerols and down-regulated by overfeeding in healthy young men. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(2):399-404. doi:10.1093/ajcn/85.2.399
43. Revollo JR, Körner A, Mills KF, et al. Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab*. 2007;6(5):363-375. doi:10.1016/j.cmet.2007.09.003
44. Church C, Moir L, McMurray F, et al. Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nat Genet*. 2010;42(12):1086-1092. doi:10.1038/ng.713
45. Ahmad T, Chasman DI, Mora S, et al. The fat-mass and obesity-associated (FTO) gene, physical activity, and risk of incident cardiovascular events in white women. *Am Heart J*. 2010;160(6):1163-1169. doi:10.1016/j.ahj.2010.08.002
46. Hakanen M, Raitakari OT, Lehtimäki T, et al. FTO genotype is associated with body mass index after the age of seven years but not with energy intake or leisure-time physical activity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(4):1281-1287. doi:10.1210/jc.2008-1199
47. Jia G, Fu Y, Zhao X, et al. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*. 2011;7(12):885-887. doi:10.1038/nchembio.687
48. Gerken T, Girard CA, Tung Y-CL, et al. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science*. 2007;318(5855):1469-1472. doi:10.1126/science.1151710
49. Speakman JR, Rance KA, Johnstone AM. Polymorphisms of the FTO gene are associated with variation in energy intake, but not energy expenditure. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16(8):1961-1965. doi:10.1038/oby.2008.318
50. Dina C, Meyre D, Gallina S, et al. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet*. 2007;39(6):724-726. doi:10.1038/ng2048
51. Timpson NJ, Emmett PM, Frayling TM, et al. The fat mass- and obesity-associated locus and dietary intake in children. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(4):971-978. doi:10.1093/ajcn/88.4.971
52. Do R, Bailey SD, Desbiens K, et al. Genetic variants of FTO influence adiposity, insulin sensitivity, leptin levels, and resting metabolic rate in the Quebec Family Study. *Diabetes*. 2008;57(4):1147-1150. doi:10.2337/db07-1267
53. Lima-Martínez MM, Betancourt L, Bermúdez A. Glucagón: ¿un simple espectador o un jugador clave en la fisiopatología de la diabetes? *Av en Diabetol*. 2011;27(5):160-167. doi:10.1016/j.avdiab.2011.09.002

54. Silverthorn DU, Johnson BR. *Fisiología Humana: Un Enfoque Integrado*. Editorial Médica Panamericana; 2014. <https://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/5159/Fisiologia-Humana.html>. Accessed April 1, 2019.
55. Figueroa LÁC. *Fisiología Endocrina*. Vol 39.; 2017. <https://revistamedicina.net/ojsanm/index.php/Medicina/article/view/117-8>. Accessed April 1, 2019.
56. Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte D. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev*. 1992;13(3):387-414. doi:10.1210/edrv-13-3-387
57. Obici S, Feng Z, Karkanas G, Baskin DG, Rossetti L. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci*. 2002;5(6):566-572. doi:10.1038/nn861
58. Choudhury AI, Heffron H, Smith MA, et al. The role of insulin receptor substrate 2 in hypothalamic and beta cell function. *J Clin Invest*. 2005;115(4):940-950. doi:10.1172/JCI24445
59. Brüning JC1, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D KC. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. - PubMed - NCBI. *Science (80-)*. 2000. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bruning+J.C.+Gautam+D.+Burks+D.J.+Gillette+J.+Schubert+M.+Orban+P.C.+Klein+R.+Krone+W.+Muller-Wieland+D.+Kahn+C.R.+Role+of+brain+insulin+receptor+in+control+of+body+weight+and+reproduction>. Accessed April 1, 2019.
60. Ullrich A, Bell JR, Chen EY, et al. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature*. 313(6005):756-761. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2983222>. Accessed April 1, 2019.
61. Giovannone B, Scaldaferrri ML, Federici M, et al. Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential. *Diabetes Metab Res Rev*. 16(6):434-441. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11114102>. Accessed April 1, 2019.
62. Myers MG, White MF. The new elements of insulin signaling. Insulin receptor substrate-1 and proteins with SH2 domains. *Diabetes*. 1993;42(5):643-650. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8387037>. Accessed April 1, 2019.
63. Le Roith D, Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care*. 2001;24(3):588-597. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11289486>. Accessed April 1, 2019.
64. Araki E, Lipes MA, Patti ME, et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*. 1994;372(6502):186-190. doi:10.1038/372186a0
65. Kadowaki T, Tamemoto H, Tobe K, et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1 and identification of insulin receptor substrate-2. *Diabet Med*. 1996;13(9 Suppl 6):S103-8.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8894493>. Accessed April 1, 2019.
66. Kubota N1, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, Tsubamoto Y, Komeda K, Nakano R, Miki H, Satoh S, Sekihara H, Sciacchitano S, Lesniak M, Aizawa S, Nagai R, Kimura S, Akanuma Y, Taylor SI KT. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. - PubMed - NCBI. *Diabetes*. 2000. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11078455>. Accessed April 1, 2019.
 67. Habegger KM, Heppner KM, Geary N, Bartness TJ, DiMarchi R, Tschöp MH. The metabolic actions of glucagon revisited. *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6(12):689-697. doi:10.1038/nrendo.2010.187
 68. Quesada I, Tudurí E, Ripoll C, Nadal Á. Physiology of the pancreatic α -cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol*. 2008;199(1):5-19. doi:10.1677/JOE-08-0290
 69. Franklin I, Gromada J, Gjinovci A, Theander S, Wollheim CB. Beta-cell secretory products activate alpha-cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. *Diabetes*. 2005;54(6):1808-1815. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15919803>. Accessed April 2, 2019.
 70. Dunning BE, Foley JE, Ahrén B. Alpha cell function in health and disease: influence of glucagon-like peptide-1. *Diabetologia*. 2005;48(9):1700-1713. doi:10.1007/s00125-005-1878-0
 71. Ahrén B. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia*. 2000;43(4):393-410. doi:10.1007/s001250051322
 72. Li XC, Zhuo JL. Targeting glucagon receptor signalling in treating metabolic syndrome and renal injury in Type 2 diabetes: theory versus promise. *Clin Sci (Lond)*. 2007;113(4):183-193. doi:10.1042/CS20070040
 73. Kieffer TJ, Heller RS, Unson CG, Weir GC, Habener JF. Distribution of glucagon receptors on hormone-specific endocrine cells of rat pancreatic islets. *Endocrinology*. 1996;137(11):5119-5125. doi:10.1210/endo.137.11.8895386
 74. Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;284(4):E671-8. doi:10.1152/ajpendo.00492.2002
 75. FASN fatty acid synthase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=2194. Accessed April 3, 2019.
 76. Chakravarty B, Gu Z, Chirala SS, Wakil SJ, Quioco FA. Human fatty acid synthase: structure and substrate selectivity of the thioesterase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(44):15567-15572. doi:10.1073/pnas.0406901101
 77. Griffin M, Sul HS. Insulin Regulation of Fatty Acid Synthase Gene Transcription: Roles of USF and SREBP-1c. *IUBMB Life (International Union Biochem Mol Biol Life)*. 2004;56(10):595-600. doi:10.1080/15216540400022474
 78. Sul HS, Latasa M-J, Moon Y, Kim K-H. Regulation of the Fatty Acid Synthase Promoter by Insulin. *J Nutr*. 2000;130(2):315S-320S. doi:10.1093/jn/130.2.315S

79. Ahmed W, Ziouzenkova O, Brown J, et al. PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation? *J Intern Med.* 2007;262(2):184-198. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01825.x
80. Alemán G, Torres N TA. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in obesity and insulin resistance development. *Rev Investig Clínica.* 2004. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Los+receptores+activados+por+proliferadores+de+peroxisomas+\(PPARs\)+en+el+desarrollo+de+obesidad+y+resistencia+a+la+insulina](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Los+receptores+activados+por+proliferadores+de+peroxisomas+(PPARs)+en+el+desarrollo+de+obesidad+y+resistencia+a+la+insulina). Accessed April 3, 2019.
81. Su JL, Simmons CJ, Wisely B, Ellis B, Winegar DA. Monitoring of PPAR alpha protein expression in human tissue by the use of PPAR alpha-specific MAbs. *Hybridoma.* 1998;17(1):47-53. doi:10.1089/hyb.1998.17.47
82. Braissant O, Fougère F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology.* 1996;137(1):354-366. doi:10.1210/endo.137.1.8536636
83. Bordés Gonzalez, R; Martínez Beltrán, M; García Olivares, E; Guisado Barrilao R. El proceso inflamatorio. 2010:1-18.
84. Roit, IM; Brostoff, J; Male D. *Inmunología.* 2nd ed. Salvat; 1992.
85. Ishizaka K. Mast cell activation and mediator release. *Prog Allergy.* 1984;34.
86. Male, DK; Champion, B; Cooke, A; Owen M. Cell traffic and inflammation. *Adv Immunol.* 1991.
87. Gallin J. Fundamental Immunology. *Inflammation.* 1989:721-733.
88. Valdés JMB, Alonso M del CV, Martínez MP, Sarracent GLS, Álvarez DD, Martín IM. Mecanismos implicados en la aparición y regulación del proceso de remodelación del tejido adiposo y estado de lipoinflamación en la obesidad. *Rev Cubana Pediatr.* 2016;88(3):348-359.
89. Baudrand BR, Arteaga UE MG. El tejido graso como modulador endocrino: Cambios hormonales asociados a la obesidad. *Rev Med Chile.* 2010;138(10):1294-301.
90. Izaola O, de Luis D, Sajoux I, Domingo JC, Vidal M. [Inflammation and obesity (lipoinflammation)]. *Nutr Hosp.* 2015;31(6):2352-2358. doi:10.3305/nh.2015.31.6.8829
91. Godínez-gutiérrez SA, Valerdi-contreras L. Obesidad: Resistencia endocrina múltiple. 2013;20(4):152-168.
92. Reyes HJN, Cortés PZ, Cruz AG, et al. Papel del adipocito en la expresión del factor inducible por hipoxia (HIF) asociado a la obesidad. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir.* 2011;70(4):261-266.
93. López Morales CM, Palomares Uribe GH, Serrano Osuna R, et al. Perfil metabólico y estado nutricional en adolescentes de una comunidad del norte de México TT - Metabolic profile and nutritional status in adolescents in a community

- in northern Mexico. *Acta Pediatr Esp.* 2013;71(1):13-17. <http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/es/ibc-109398>.
94. Regazzetti C, Peraldi P, Gremeaux T, et al. Hypoxia Decreases Insulin Signaling Pathways in Adipocytes. *Diabetes.* 2009;58(1):95-103. doi:10.2337/db08-0457
 95. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest.* 2011;121(6):2094-2101. doi:10.1172/JCI45887
 96. Prieur X, Mok CYL, Velagapudi VR, et al. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes.* 2011;60(3):797-809. doi:10.2337/db10-0705
 97. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(10):772-783. doi:10.1038/nri1937
 98. Falchi M, El-Sayed Moustafa JS, Takousis P, et al. Low copy number of the salivary amylase gene predisposes to obesity. *Nat Genet.* 2014;46(5):492-497. doi:10.1038/ng.2939
 99. Lyon HN, Hirschhorn JN. Genetics of common forms of obesity: a brief overview. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(1 Suppl):215S-217S. doi:10.1093/ajcn/82.1.215S
 100. Dubois L, Ohm Kyvik K, Girard M, et al. Genetic and environmental contributions to weight, height, and BMI from birth to 19 years of age: an international study of over 12,000 twin pairs. Wang G, ed. *PLoS One.* 2012;7(2):e30153. doi:10.1371/journal.pone.0030153
 101. Oelsner KT, Guo Y, To SB-C, Non AL, Barkin SL. Maternal BMI as a predictor of methylation of obesity-related genes in saliva samples from preschool-age Hispanic children at-risk for obesity. *BMC Genomics.* 2017;18(1):57. doi:10.1186/s12864-016-3473-9
 102. Pérez-Pérez A, Vilariño-García T, Fernández-Riejos P, Martín-González J, Segura-Egea JJ, Sánchez-Margalet V. Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017;35:71-84. doi:10.1016/j.cytogfr.2017.03.001
 103. Quiroga de Michelena MI. Obesidad y genética. *An la Fac Med.* 2017;78(2):87. doi:10.15381/anales.v78i2.13216
 104. Angulo MA, Butler MG, Cataletto ME. Prader-Willi syndrome: a review of clinical, genetic, and endocrine findings. *J Endocrinol Invest.* 2015;38(12):1249-1263. doi:10.1007/s40618-015-0312-9
 105. Bueno M, Esteba-Castillo S, Novell R, et al. Lack of Postprandial Peak in Brain-Derived Neurotrophic Factor in Adults with Prader-Willi Syndrome. Jana NR, ed. *PLoS One.* 2016;11(9):e0163468. doi:10.1371/journal.pone.0163468
 106. Kaminsky ZA, Tang T, Wang S-C, et al. DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat Genet.* 2009;41(2):240-245. doi:10.1038/ng.286

107. Aguilera CM, Anguita-ruiz A. [r e v i s i ó n] Epigenética de la obesidad. 2018;XII:47-60. doi:10.7400/NCM.2018.12.2.5062
108. Salto R, Vílchez JD GM. Bases moleculares de la expresión génica. In: Panamericana E, ed. *Bases Moleculares de La Nutrición*. 3a edición. ; 2017:157-176.
109. Handel AE, Ebers GC, Ramagopalan S V. Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease. *Trends Mol Med*. 2010;16(1):7-16. doi:10.1016/j.molmed.2009.11.003
110. Bell CG. The Epigenomic Analysis of Human Obesity. *Obesity*. 2017;25(9):1471-1481. doi:10.1002/oby.21909
111. Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, et al. DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. *Lancet*. 2014;383(9933):1990-1998. doi:10.1016/S0140-6736(13)62674-4
112. Agha G, Houseman EA, Kelsey KT, Eaton CB, Buka SL, Loucks EB. Adiposity is associated with DNA methylation profile in adipose tissue. *Int J Epidemiol*. 2015;44(4):1277-1287. doi:10.1093/ije/dyu236
113. Huang T, Zheng Y, Qi Q, et al. DNA Methylation Variants at HIF3A Locus, B-Vitamin Intake, and Long-term Weight Change: Gene-Diet Interactions in Two U.S. Cohorts. *Diabetes*. 2015;64(9):3146-3154. doi:10.2337/db15-0264
114. Ronn T, Volkov P, Gillberg L, et al. Impact of age, BMI and HbA1c levels on the genome-wide DNA methylation and mRNA expression patterns in human adipose tissue and identification of epigenetic biomarkers in blood. *Hum Mol Genet*. April 2015. doi:10.1093/hmg/ddv124
115. Richmond RC, Sharp GC, Ward ME, et al. DNA Methylation and BMI: Investigating Identified Methylation Sites at *HIF3A* in a Causal Framework. *Diabetes*. 2016;65(5):1231-1244. doi:10.2337/db15-0996
116. Aslibekyan S, Demerath EW, Mendelson M, et al. Epigenome-wide study identifies novel methylation loci associated with body mass index and waist circumference. *Obesity*. 2015;23(7):1493-1501. doi:10.1002/oby.21111
117. Marchi M, Lisi S, Curcio M, et al. Human leptin tissue distribution, but not weight loss-dependent change in expression, is associated with methylation of its promoter. *Epigenetics*. 2011;6(10):1198-1206. doi:10.4161/epi.6.10.16600
118. Mendelson MM, Marioni RE, Joehanes R, et al. Association of Body Mass Index with DNA Methylation and Gene Expression in Blood Cells and Relations to Cardiometabolic Disease: A Mendelian Randomization Approach. Lewis C, ed. *PLOS Med*. 2017;14(1):e1002215. doi:10.1371/journal.pmed.1002215
119. Arner P, Sinha I, Thorell A, Rydén M, Dahlman-Wright K, Dahlman I. The epigenetic signature of subcutaneous fat cells is linked to altered expression of genes implicated in lipid metabolism in obese women. *Clin Epigenetics*. 2015;7(1):93. doi:10.1186/s13148-015-0126-9
120. van Dijk SJ, Molloy PL, Varinli H, Morrison JL, Muhlhausler BS, Members of

- EpiSCOPE. Epigenetics and human obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(1):85-97. doi:10.1038/ijo.2014.34
121. Janesick A, Blumberg B. Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev*. 2011;93(1):34-50. doi:10.1002/bdrc.20197
 122. Karmaus W, Osuch JR, Eneli I, et al. Maternal levels of dichlorodiphenyl-dichloroethylene (DDE) may increase weight and body mass index in adult female offspring. *Occup Environ Med*. 2009;66(3):143-149. doi:10.1136/oem.2008.041921
 123. Callaway E. Epigenomics starts to make its mark. *Nature*. 2014;508(7494):22. doi:10.1038/508022a
 124. Gil, A. *Tratado de Nutrición. Tomo I (Bases Fisiológicas y Bioquímicas de La Nutrición) y Tomo IV (Nutrición Clínica)*. Editorial Panamericana; 2010.
 125. Cascales, Angosto, M, et al. *Bioquímica y Fisiopatología de La Nutrición*. Instituto de España.; 2005.
 126. Garrow, JS. *Human Nutrition and Dietetics*. 10^a. Churchill Livingstone; 2000.
 127. Morales-Falo EM, Sánchez-Moreno C, Esteban A, Alburquerque JJ, Garaulet M. [Quality of the diet "before and during" a weight loss treatment based on Mediterranean Diet; behavioural therapy and nutritional education]. *Nutr Hosp*. 28(4):980-987. doi:10.3305/nh.2013.28.4.6665
 128. *Treatment of Obesity in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus - Guideline Synopsis and Supplementary Search for and Assessment of Systematic Reviews Executive Summary of Final Report V09-02, Version 1.0*. Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2005. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24783275>. Accessed July 13, 2019.
 129. Lecube A, Monereo S, Rubio MÁ, et al. Prevención, diagnóstico y tratamiento de la obesidad. Posicionamiento de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad de 2016. *Endocrinol Diabetes y Nutr*. 2017;64(xx):15-22. doi:10.1016/j.endonu.2016.07.002
 130. Bray GA. Medical treatment of obesity: the past, the present and the future. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28(4):665-684. doi:10.1016/j.bpg.2014.07.015
 131. Di Dalmazi G, Vicennati V, Pasquali R, Pagotto U. The unrelenting fall of the pharmacological treatment of obesity. *Endocrine*. 2013;44(3):598-609. doi:10.1007/s12020-013-9983-1
 132. Hainer V. Overview of new antiobesity drugs. *Expert Opin Pharmacother*. 2014;15(14):1975-1978. doi:10.1517/14656566.2014.946904
 133. Dolgin E. A history of drugs on the weight list. *Nat Med*. 2012;18(6):843. doi:10.1038/nm0612-843
 134. Solas M, Milagro FI, Martínez-Urbistondo D, Ramirez MJ, Martínez JA. Precision

- Obesity Treatments Including Pharmacogenetic and Nutrigenetic Approaches. *Trends Pharmacol Sci.* 2016;37(7):575-593. doi:10.1016/j.tips.2016.04.008
135. Fujioka K. Safety and tolerability of medications approved for chronic weight management. *Obesity (Silver Spring)*. 2015;23 Suppl 1:S7-11. doi:10.1002/oby.21094
 136. Pucci A, Finer N. New medications for treatment of obesity: metabolic and cardiovascular effects. *Can J Cardiol.* 2015;31(2):142-152. doi:10.1016/j.cjca.2014.11.010
 137. Jackson VM, Breen DM, Fortin J-P, et al. Latest approaches for the treatment of obesity. *Expert Opin Drug Discov.* 2015;10(8):825-839. doi:10.1517/17460441.2015.1044966
 138. Christou GA, Katsiki N, Kiortsis DN. The Current Role of Liraglutide in the Pharmacotherapy of Obesity. *Curr Vasc Pharmacol.* 2016;14(2):201-207. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26074046>. Accessed July 7, 2019.
 139. Pucci A, Finer N. New medications for treatment of obesity: metabolic and cardiovascular effects. *Can J Cardiol.* 2015;31(2):142-152. doi:10.1016/j.cjca.2014.11.010
 140. Kakkar AK, Dahiya N. Drug treatment of obesity: current status and future prospects. *Eur J Intern Med.* 2015;26(2):89-94. doi:10.1016/j.ejim.2015.01.005
 141. Smith SM, Meyer M, Trinkley KE. Phentermine/topiramate for the treatment of obesity. *Ann Pharmacother.* 2013;47(3):340-349. doi:10.1345/aph.1R501
 142. Kiortsis DN. A review of the metabolic effects of controlled-release Phentermine/Topiramate. *Hormones (Athens)*. 2013;12(4):507-516. doi:10.14310/horm.2002.1438
 143. Ali KF, Shukla AP, Aronne LJ. Bupropion-SR plus naltrexone-SR for the treatment of mild-to-moderate obesity. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2016;9(1):27-34. doi:10.1586/17512433.2016.1100072
 144. Kumar RB, Aronne LJ. Efficacy comparison of medications approved for chronic weight management. *Obesity.* 2015;23(S1):S4-S7. doi:10.1002/oby.21093
 145. Gerstein H, Jaeschke R. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes mellitus. Dr. Hertzl Gerstein in an interview with Dr. Roman Jaeschke. *Polish Arch Intern Med.* 2016;126(10):803-805. doi:10.20452/pamw.3612
 146. Yu J, Zhou X, Li L, et al. The long-term effects of bariatric surgery for type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of randomized and non-randomized evidence. *Obes Surg.* 2015;25(1):143-158. doi:10.1007/s11695-014-1460-2
 147. Gloy VL, Briel M, Bhatt DL, et al. Bariatric surgery versus non-surgical treatment for obesity: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ.* 2013;347(oct22 1):f5934-f5934. doi:10.1136/bmj.f5934
 148. Cheng J, Gao J, Shuai X, Wang G, Tao K. The comprehensive summary of surgical

- versus non-surgical treatment for obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncotarget*. 2016;7(26):39216-39230. doi:10.18632/oncotarget.9581
149. Rossell J, González M, Mestres N, et al. Diet Change After Sleeve Gastrectomy Is More Effective for Weight Loss Than Surgery Only. *Obes Surg*. 2017;27(10):2566-2574. doi:10.1007/s11695-017-2650-5
 150. *Vía Clínica de Cirugía Bariátrica 2017*; 2017.
 151. Marceau P, Hould FS, Simard S, et al. Biliopancreatic diversion with duodenal switch. *World J Surg*. 1998;22(9):947-954. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9717420>. Accessed July 13, 2019.
 152. Mason EE. Vertical Banded Gastroplasty for Obesity. *Arch Surg*. 1982;117(5):701. doi:10.1001/archsurg.1982.01380290147026
 153. Grace DM. Gastric restriction procedures for treating severe obesity. *Am J Clin Nutr*. 1992;55(2):556S-559S. doi:10.1093/ajcn/55.2.556s
 154. Larrad-Jiménez A, Díaz-Guerra CS-C, de Cuadros Borrajo P, Lesmes IB, Esteban BM. Short-, mid- and long-term results of Larrad biliopancreatic diversion. *Obes Surg*. 2007;17(2):202-210. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17476873>. Accessed July 13, 2019.
 155. Capella, Capella, Mandec, Nath. Vertical Banded Gastroplasty-Gastric Bypass: preliminary report. *Obes Surg*. 1991;1(4):389-395. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10775940>. Accessed July 13, 2019.
 156. Fobi MA, Lee H, Holness R, Cabinda D. Gastric bypass operation for obesity. *World J Surg*. 1998;22(9):925-935. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9717418>. Accessed July 13, 2019.
 157. Wittgrove AC, Clark GW, Tremblay LJ. Laparoscopic Gastric Bypass, Roux-en-Y: Preliminary Report of Five Cases. *Obes Surg*. 1994;4(4):353-357. doi:10.1381/096089294765558331
 158. Regan JP, Inabnet WB, Gagner M, Pomp A. Early experience with two-stage laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass as an alternative in the super-super obese patient. *Obes Surg*. 2003;13(6):861-864. doi:10.1381/096089203322618669
 159. Lecube A, de Hollanda A, Calañas A, et al. Trends in Bariatric Surgery in Spain in the Twenty-First Century: Baseline Results and 1-Month Follow Up of the RICIBA, a National Registry. *Obes Surg*. 2016;26(8):1836-1842. doi:10.1007/s11695-015-2001-3
 160. Fornovi A, Martí P, Ferrer M, et al. Variación del perfil cardiometabólico en pacientes diabéticos obesos intervenidos de cirugía bariátrica. Cambios en el riesgo cardiovascular. 2014;66(10):812-818.
 161. Cazzo E, Gestic MA, Utrini MP, Machado RR, Pareja JC, Chaim EA. Control of hypertension after roux-en-y gastric bypass among obese diabetic patients. *Arg Gastroenterol*. 51(1):21-24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24760059>. Accessed July 13, 2019.

162. Puzziferri N, Roshek TB, Mayo HG, Gallagher R, Belle SH, Livingston EH. Long-term Follow-up After Bariatric Surgery. *JAMA*. 2014;312(9):934. doi:10.1001/jama.2014.10706
163. Adana JCR de, Santos RS, eds. *CIRUGÍA DE LA OBESIDAD MÓRBIDA*. 2ª Edición.; 2012.
164. Yazdi FT, Clee SM, Meyre D. Obesity genetics in mouse and human: back and forth, and back again. *PeerJ*. 2015;3:e856. doi:10.7717/peerj.856
165. Lopez PP, Nicholson SE, Burkhardt GE, Johnson RA, Johnson FK. Development of a Sleeve Gastrectomy Weight Loss Model in Obese Zucker Rats. *J Surg Res*. 2009;157(2):243-250. doi:10.1016/j.jss.2008.10.025
166. Bueter M, Abegg K, Seyfried F, Lutz TA, le Roux CW. Roux-en-Y Gastric Bypass Operation in Rats. *J Vis Exp*. 2012;(64):e3940. doi:10.3791/3940
167. Hrdlickova R, Toloue M, Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2017;8(1). doi:10.1002/wrna.1364
168. Ignacio San Segundo; Catalina S. Sanz-Lozano. Introduction to the Gene Expression Analysis. *Mol Genet Asthma*. 2016;1434:121-137. doi:10.1007/978-1-4939-3652-6
169. Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of pyrosequencing. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(9):1296-1303. doi:10.5858/arpa.2012-0463-RA
170. Fujita M, Sato Y, Nagashima K, Takahashi S, Hata A. Medical costs attributable to overweight and obesity in Japanese individuals. *Obes Res Clin Pract*. 2018;12(5):479-484. doi:10.1016/j.orcp.2018.06.002
171. Skolnik NS, Ryan DH. Pathophysiology, epidemiology, and assessment of obesity in adults. *J Fam Pract*. 2014;63(7 Suppl):S3-S10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25198218>. Accessed October 15, 2019.
172. Ryan DH. The pharmacological and surgical management of adults with obesity. *J Fam Pract*. 2014;63(7 Suppl):S21-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25198216>. Accessed October 15, 2019.
173. Nadalini L, Zenti MG, Masotto L, et al. Improved quality of life after bariatric surgery in morbidly obese patients. Interdisciplinary group of bariatric surgery of Verona (G.I.C.O.V.). *G Chir*. 35(7-8):161-164. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25174289>. Accessed October 15, 2019.
174. Crisci S, Amitrano F, Saggese M, et al. Overview of Current Targeted Anti-Cancer Drugs for Therapy in Onco-Hematology. *Medicina (B Aires)*. 2019;55(8):414. doi:10.3390/medicina55080414
175. Lifshitz F, Lifshitz JZ. Globesity: the root causes of the obesity epidemic in the USA and now worldwide. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2014;12(1):17-34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25345082>. Accessed October 15, 2019.
176. Foster GD, Wyatt HR, Hill JO, et al. Weight and metabolic outcomes after 2 years

- on a low-carbohydrate versus low-fat diet: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2010;153(3):147-157. doi:10.7326/0003-4819-153-3-201008030-00005
177. Banasik JL, Walker MK, Randall JM, Netjes RB, Foutz MS. Low-calorie diet induced weight loss may alter regulatory hormones and contribute to rebound visceral adiposity in obese persons with a family history of type-2 diabetes. *J Am Assoc Nurse Pract.* 2013;25(8):440-448. doi:10.1111/j.1745-7599.2012.00808.x
 178. Iio W, Takagi H, Ogawa Y, Tsukahara T, Chohnan S, Toyoda A. Effects of chronic social defeat stress on peripheral leptin and its hypothalamic actions. *BMC Neurosci.* 2014;15(1):72. doi:10.1186/1471-2202-15-72
 179. Gloy VL, Briel M, Bhatt DL, et al. Bariatric surgery versus non-surgical treatment for obesity: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ.* 2013;347(oct22 1):f5934. doi:10.1136/bmj.f5934
 180. Dogan K, Gadiot RPM, Aarts EO, et al. Effectiveness and Safety of Sleeve Gastrectomy, Gastric Bypass, and Adjustable Gastric Banding in Morbidly Obese Patients: a Multicenter, Retrospective, Matched Cohort Study. *Obes Surg.* 2015;25(7):1110-1118. doi:10.1007/s11695-014-1503-8
 181. Zellmer JD, Mathiason MA, Kallies KJ, Kothari SN. Is laparoscopic sleeve gastrectomy a lower risk bariatric procedure compared with laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass? A meta-analysis. *Am J Surg.* 2014;208(6):903-910. doi:10.1016/j.amjsurg.2014.08.002
 182. Torgersen Z, Osmolak A, Forse RA. Sleeve gastrectomy and Roux En Y gastric bypass. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2014;21(5):352-357. doi:10.1097/MED.0000000000000099
 183. Osland E, Yunus RM, Khan S, Memon B, Memon MA. Diabetes improvement and resolution following laparoscopic vertical sleeve gastrectomy (LVSG) versus laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass (LRYGB) procedures: a systematic review of randomized controlled trials. *Surg Endosc.* 2017;31(4):1952-1963. doi:10.1007/s00464-016-5202-5
 184. Wu G, Cai B, Yu F, et al. Meta-analysis of bariatric surgery versus non-surgical treatment for type 2 diabetes mellitus. *Oncotarget.* 2016;7(52):87511-87522. doi:10.18632/oncotarget.11961
 185. Bhandari M, Reddy M, Kosta S, Mathur W, Fobi M. Laparoscopic sleeve gastrectomy versus laparoscopic gastric bypass: A retrospective cohort study. *Int J Surg.* 2019;67:47-53. doi:10.1016/j.ijssu.2019.05.004
 186. Abu-Gazala S, Horwitz E, Ben-Haroush Schyr R, et al. Sleeve Gastrectomy Improves Glycemia Independent of Weight Loss by Restoring Hepatic Insulin Sensitivity. *Diabetes.* 2018;67(6):1079-1085. doi:10.2337/db17-1028
 187. Pham NH, Bena J, Bhatt DL, Kennedy L, Schauer PR, Kashyap SR. Increased Free Testosterone Levels in Men with Uncontrolled Type 2 Diabetes Five Years After Randomization to Bariatric Surgery. *Obes Surg.* 2018;28(1):277-280. doi:10.1007/s11695-017-2881-5
 188. de Git KCG, Peterse C, Beerens S, et al. Is leptin resistance the cause or the

- consequence of diet-induced obesity? *Int J Obes.* 2018;42(8):1445-1457. doi:10.1038/s41366-018-0111-4
189. Lecoutre S, Oger F, Pourpe C, et al. Maternal obesity programs increased leptin gene expression in rat male offspring via epigenetic modifications in a depot-specific manner. *Mol Metab.* 2017;6(8):922-930. doi:10.1016/j.molmet.2017.05.010
190. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (80-).* 1993;259(5091):87-91. doi:10.1126/science.7678183
191. Tzanavari T, Giannogonas P, Karalis KP. TNF- α and obesity. *Curr Dir Autoimmun.* 2010;11(February):145-156. doi:10.1159/000289203
192. Lee YS, Wollam J, Olefsky JM. An Integrated View of Immunometabolism. *Cell.* 2018;172(1-2):22-40. doi:10.1016/j.cell.2017.12.025
193. Pietiläinen KH, Kannisto K, Korshennikova E, et al. Acquired obesity increases CD68 and tumor necrosis factor- α and decreases adiponectin gene expression in adipose tissue: A study in monozygotic twins. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(7):2776-2781. doi:10.1210/jc.2005-2848
194. C. de Oliveira D, Santos EW, Nogueira-Pedro A, Xavier JG, Borelli P, Fock RA. Effects of short-term dietary restriction and glutamine supplementation in vitro on the modulation of inflammatory properties. *Nutrition.* 2018;48:96-104. doi:10.1016/j.nut.2017.11.015
195. Derous D, Mitchell SE, Green CL, et al. The effects of graded levels of calorie restriction: VI. Impact of shortterm graded calorie restriction on transcriptomic responses of the hypothalamic hunger and circadian signaling pathways. *Aging (Albany NY).* 2016;8(4):642-661. doi:10.18632/aging.100895
196. Roberts J, Zinchenko A, Suckling C, Smith L, Johnstone J, Henselmans M. The short-term effect of high versus moderate protein intake on recovery after strength training in resistance-trained individuals. *J Int Soc Sports Nutr.* 2017;14(1):1-11. doi:10.1186/s12970-017-0201-z
197. Ferrier KE, Nestel P, Taylor A, Drew BG, Kingwell BA. Diet but not aerobic exercise training reduces skeletal muscle TNF- α in overweight humans. *Diabetologia.* 2004;47(4):630-637. doi:10.1007/s00125-004-1373-z
198. Berndt J, Kovacs P, Ruschke K, et al. Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: Association with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2007;50(7):1472-1480. doi:10.1007/s00125-007-0689-x
199. Holderbaum M, Casagrande DS, Sussenbach S, Buss C. Effects of very low calorie diets on liver size and weight loss in the preoperative period of bariatric surgery: a systematic review. *Surg Obes Relat Dis.* 2018;14(2):237-244. doi:10.1016/j.soard.2017.09.531
200. Talavera-Urquijo E, Rodríguez-Navarro S, Beisani M, et al. Morphofunctional Changes After Sleeve Gastrectomy and Very Low Calorie Diet in an Animal Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Obes Surg.* 2018;28(1):142-151.

doi:10.1007/s11695-017-2805-4

201. Yang F, Dai Y, Min C, Li X. Neonatal overfeeding induced glucocorticoid overexposure accelerates hepatic lipogenesis in male rats. *Nutr Metab.* 2018;15(1):1-10. doi:10.1186/s12986-018-0272-0
202. Harman-Boehm I, Blüher M, Redel H, et al. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: Effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(6):2240-2247. doi:10.1210/jc.2006-1811
203. Higa JK, Liu W, Berry MJ, Panee J. Supplement of bamboo extract lowers serum monocyte chemoattractant protein-1 concentration in mice fed a diet containing a high level of saturated fat. *Br J Nutr.* 2011;106(12):1810-1813. doi:10.1017/S0007114511002157
204. Ray I, Mahata SK, De RK. Obesity: An Immunometabolic Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7(DEC):1-9. doi:10.3389/fendo.2016.00157
205. Montecucco F, Lenglet S, Quercioli A, et al. Gastric bypass in morbid obese patients is associated with reduction in adipose tissue inflammation via N-oleoylethanolamide (OEA)-mediated pathways. *Thromb Haemost.* 2015;113(4):838-850. doi:10.1160/TH14-06-0506
206. Shimizu H, Hatao F, Imamura K, Takanishi K, Tsujino M. Early Effects of Sleeve Gastrectomy on Obesity-Related Cytokines and Bile Acid Metabolism in Morbidly Obese Japanese Patients. *Obes Surg.* 2017;27(12):3223-3229. doi:10.1007/s11695-017-2756-9
207. Mocanu AO, Mulya A, Huang H, et al. Effect of roux-en-y gastric bypass on the NLRP3 Inflammasome in adipose tissue from obese rats. *PLoS One.* 2015;10(10):1-16. doi:10.1371/journal.pone.0139764
208. Beisani M, Pappa S, Moreno P, et al. Laparoscopic sleeve gastrectomy induces molecular changes in peripheral white blood cells. *Clin Nutr.* 2019;(xxxx):10-16. doi:10.1016/j.clnu.2019.03.012

Anexos

1.- Dietas

Teklad Custom Research Diet Data Sheet

TD.06414 Adjusted Calories Diet (60/Fat)

Formula	g/Kg
Casein	265.0
L-Cystine	4.0
Maltodextrin	160.0
Sucrose	90.0
Lard	310.0
Soybean Oil	30.0
Cellulose	65.5
Mineral Mix, AIN-93G-MX (94046)	48.0
Calcium Phosphate, dibasic	3.4
Vitamin Mix, AIN-93-VX (94047)	21.0
Choline Bitartrate	3.0
Blue Food Color	0.1

Footnote

Approx. 60% of total calories come from fat. Designed with similarities to Research Diets, Inc. formula D12492. For the series TD 06414-TD 06416. Approximate fatty acid profile (% of total fat): 37% saturated, 47% monounsaturated, 16% polyunsaturated.

Selected Nutrient Information¹

	% by weight	% kcal from
Protein	23.5	18.4
Carbohydrate	27.3	21.3
Fat	34.3	60.3
Kcal/g	5.1	

¹ Values are calculated from ingredient analysis or manufacturer data

Teklad Diets are designed & manufactured for research purposes only.

Speak With A Nutritionist

- (800) 483-5523
- askanutritionist@harlan.com

Harlan Laboratories · PO Box 44220 · Madison, WI 53744-4220
www.harlan.com

**Key Features**

- Purified Diet
- Diet Induced Obesity
- High Fat

Key Planning Information

- Products are made fresh to order
- Store product at 4°C or lower
- Use within 6 months (applicable to most diets)
- Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number
- Replace diet at minimum once per week
More frequent replacement may be advised
- Lead time:
 - 2 weeks non-irradiated
 - 4 weeks irradiated

**Product Specific Information**

- 1/2" Pellet or Powder (free flowing)
- Minimum order 3 Kg
- Irradiation available upon request

Options (Fees Will Apply)

- Rush order (pending availability)
- Irradiation (see Product Specific Information)
- Vacuum packaging (1 and 2 Kg)

International Inquiry

- Outside U.S.A. or Canada -
- askanutritionist@harlan.com

Place Your Order (U.S.A. & Canada)

- Place Order - Obtain Pricing -
- Check Order Status -
- (800) 483-5523
- (608) 277-2066 facsimile
- tekladinfo@harlan.com



Helping you do research better

Teklad Custom Research Diet Data Sheet

TD.120686 Restricted Diet**Formula**

	g/Kg
Casein	362.0
DL-Methionine	7.0
Dextrose, monohydrate	172.03
Corn Starch	78.1
Maltodextrin	75.0
Cellulose	83.6152
Corn Oil	122.5
Brewers Yeast	14.0
Vitamin Mix, Teklad (40060)	17.5
Mineral Mix, AIN-76 (170915)	61.25
Calcium Carbonate	5.25
Magnesium Oxide	1.75
Sodium Fluoride	0.0039
Sodium Molybdate, dihydrate	0.0009

Footnote

TD.120685 & TD.120686 are a pair of diets very similar to the pair of diets (TD.94145 & TD.94146) described in PNAS, 2001, 98(19):10630-10635. In that paper, control diet was fed at 95 kcal/week per mouse and the restricted diet 53 kcal/week per mouse.

Selected Nutrient Information¹

	% by weight	% kcal from
Protein	32.9	35.2
Carbohydrate	31.9	34.2
Fat	12.7	30.6

Kcal/g 3.7

¹ Values are calculated from Ingredient analysis or manufacturer data

Teklad Diets are designed & manufactured for research purposes only.

Speak With A Nutritionist

- (800) 483-5523
- askanutritionist@harlan.com

Harlan Laboratories · PO Box 44220 · Madison, WI 53744-4220

www.harlan.com

harlan[®]

Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better, and the Harlan logo are trademarks and trade names of Harlan Laboratories, Inc.
© 2008 Harlan Laboratories, Inc.

Key Features

- Purified Diet
- Diet for Caloric Restriction

Key Planning Information

- Products are made fresh to order
- Store product at 4°C or lower
- Use within 6 months (applicable to most diets)
- Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number
- Replace diet at minimum once per week
More frequent replacement may be advised
- Lead time:
 - 2 weeks non-irradiated
 - 4 weeks Irradiated

**Product Specific Information**

- 1/2" Pellet or Powder (free flowing)
- Minimum order 3 Kg
- Irradiation available upon request

Options (Fees Will Apply)

- Rush order (pending availability)
- Irradiation (see Product Specific Information)
- Vacuum packaging (1 and 2 Kg)

International Inquiry

- Outside U.S.A. or Canada -
- askanutritionist@harlan.com

**Place Your Order (U.S.A. & Canada)**

- Place Order - Obtain Pricing -
- Check Order Status -
- (800) 483-5523
- (608) 277-2066 facsimile
- tekladinfo@harlan.com

Helping you do research better

2014



Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet

Product Description- 2014 is a fixed formula, non-autoclavable diet manufactured with high quality ingredients and designed to promote longevity and normal body weight in rodents. 2014 does not contain alfalfa or soybean meal, thus minimizing the occurrence of natural phytoestrogens. Typical isoflavone concentrations (daidzein + genistein aglycone equivalents) range from non-detectable to 20 mg/kg. Exclusion of alfalfa reduces chlorophyll, improving optical imaging clarity. Absence of animal protein and fish meal minimizes the presence of nitrosamines. **Also available certified (2014C) and irradiated (2914). For autoclavable diet, refer to 2014S (Sterilizable).**

Macronutrients		
Crude Protein	%	14.3
Fat (ether extract) ^a	%	4.0
Carbohydrate (available) ^b	%	48.0
Crude Fiber	%	4.1
Neutral Detergent Fiber ^c	%	18.0
Ash	%	4.7
Energy Density ^d	kcal/g (kJ/g)	2.9 (12.1)
Calories from Protein	%	20
Calories from Fat	%	13
Calories from Carbohydrate	%	67
Minerals		
Calcium	%	0.7
Phosphorus	%	0.6
Non-Phytate Phosphorus	%	0.3
Sodium	%	0.1
Potassium	%	0.6
Chloride	%	0.3
Magnesium	%	0.2
Zinc	mg/kg	70
Manganese	mg/kg	100
Copper	mg/kg	15
Iodine	mg/kg	6
Iron	mg/kg	175
Selenium	mg/kg	0.23
Amino Acids		
Aspartic Acid	%	0.9
Glutamic Acid	%	2.9
Alanine	%	0.9
Glycine	%	0.7
Threonine	%	0.5
Proline	%	1.2
Serine	%	0.7
Leucine	%	1.4
Isoleucine	%	0.6
Valine	%	0.7
Phenylalanine	%	0.7
Tyrosine	%	0.4
Methionine	%	0.3
Cystine	%	0.3
Lysine	%	0.7
Histidine	%	0.4
Arginine	%	0.8
Tryptophan	%	0.2

Teklad Diets are designed and manufactured for research purposes only.



© 2015 Envigo

Ingredients (in descending order of inclusion)- Wheat middlings, ground wheat, ground corn, corn gluten meal, calcium carbonate, soybean oil, dicalcium phosphate, iodized salt, L-lysine, vitamin E acetate, DL-methionine, magnesium oxide, choline chloride, manganous oxide, ferrous sulfate, menadione sodium bisulfite complex (source of vitamin K activity), zinc oxide, copper sulfate, niacin, calcium pantothenate, calcium iodate, pyridoxine hydrochloride, riboflavin, thiamin mononitrate, vitamin A acetate, vitamin B₁₂ supplement, folic acid, cobalt carbonate, biotin, vitamin D₃ supplement.

Standard Product Form: **Pellet**

Vitamins		
Vitamin A ^{e,f}	IU/g	6.0
Vitamin D ₃ ^{e,g}	IU/g	0.6
Vitamin E	IU/kg	120
Vitamin K ₃ (menadione)	mg/kg	20
Vitamin B ₁ (thiamin)	mg/kg	12
Vitamin B ₂ (riboflavin)	mg/kg	6
Niacin (nicotinic acid)	mg/kg	54
Vitamin B ₆ (pyridoxine)	mg/kg	10
Pantothenic Acid	mg/kg	17
Vitamin B ₁₂ (cyanocobalamin)	mg/kg	0.03
Biotin	mg/kg	0.26
Folate	mg/kg	2
Choline	mg/kg	1030
Fatty Acids		
C16:0 Palmitic	%	0.5
C18:0 Stearic	%	0.1
C18:1ω9 Oleic	%	0.7
C18:2ω6 Linoleic	%	2.0
C18:3ω3 Linolenic	%	0.1
Total Saturated	%	0.6
Total Monounsaturated	%	0.7
Total Polyunsaturated	%	2.1
Other		
Cholesterol	mg/kg	--

^a Ether extract is used to measure fat in pelleted diets, while an acid hydrolysis method is required to recover fat in extruded diets. Compared to ether extract, the fat value for acid hydrolysis will be approximately 1% point higher.

^b Carbohydrate (available) is calculated by subtracting neutral detergent fiber from total carbohydrates.

^c Neutral detergent fiber is an estimate of insoluble fiber, including cellulose, hemicellulose, and lignin. Crude fiber methodology underestimates total fiber.

^d Energy density is a calculated estimate of *metabolizable energy* based on the Atwater factors assigning 4 kcal/g to protein, 9 kcal/g to fat, and 4 kcal/g to available carbohydrate.

^e Indicates added amount but does not account for contribution from other ingredients.

^f 1 IU vitamin A = 0.3 µg retinol

^g 1 IU vitamin D = 25 ng cholecalciferol

For nutrients not listed, insufficient data is available to quantify.

Nutrient data represent the best information available, calculated from published values and direct analytical testing of raw materials and finished product. Nutrient values may vary due to the natural variations in the ingredients, analysis, and effects of processing.

2.- Tablas de pesos

Rata	Grupo	Peso 0	Peso 1	Peso 2	Peso 3	Peso 4	Peso 5	Peso 6
1	1	250	290	318	340	366	384	395
2	1	245	282	307	323	345	359	371
3	1	258	270	298	320	342	350	365
4	1	230	248	267	283	296	310	323
5	1	261	266	280	292	303	309	321
6	1	223	280	313	340	360	375	387
7	1	215	298	329	348	370	385	399
8	2	230	267	297	322	351	368	385
9	2	245	288	321	346	375	397	416
10	2	255	313	351	384	416	445	470
11	2	260	282	324	341	376	402	420
12	2	233	292	333	362	388	409	425
13	2	225	274	303	336	363	384	403
14	2	240	296	338	376	407	439	461
15	3	254	307	344	369	390	404	423
16	3	240	276	315	343	366	386	403
17	3	237	261	295	323	354	376	398
18	3	240	303	351	390	418	436	454
19	3	222	306	348	385	416	442	470
20	3	245	304	342	375	404	427	446
21	3	233	261	291	317	340	352	373
22	4	228	298	335	368	412	448	493
23	4	254	318	359	393	420	443	468
24	4	240	287	308	327	350	365	378
25	4	263	295	317	334	349	358	377
26	4	294	340	372	398	419	438	448
27	4	277	306	315	323	337	343	344
28	4	282	320	347	381	398	417	437
29	5	240	302	332	358	383	401	421
30	5	235	304	335	363	395	417	440
31	5	253	294	319	342	368	390	404
32	5	288	345	390	429	459	482	512
33	5	285	320	333	355	371	383	392
34	5	280	317	340	353	370	389	405
35	5	292	340	372	402	429	448	468
36	6	264	324	358	380	404	419	445
37	6	240	305	347	383	414	445	476
38	6	255	304	338	372	397	423	443
39	6	260	348	324	348	366	374	399
40	6	240	270	294	320	339	362	376
41	6	303	355	391	416	437	457	470
42	6	294	348	378	406	427	449	475

Rata	Grupo	Peso 7	Peso 8	Peso 9	Peso 10	Peso 11	Peso 12	Peso 13
1	1	408	419	430	442	444	455	461
2	1	386	395	403	413	415	422	431
3	1	377	390	404	410	415	425	433
4	1	326	336	343	350	353	355	360
5	1	328	334	341	345	354	362	367
6	1	400	408	418	430	432	441	454
7	1	406	416	423	439	445	460	469
8	2	398	411	422	431	440	443	453
9	2	434	454	465	474	486	498	507
10	2	493	318	532	550	555	566	579
11	2	438	450	467	480	490	501	513
12	2	442	459	474	485	494	503	514
13	2	424	439	430	456	460	468	477
14	2	485	508	531	550	559	573	590
15	3	433	450	461	470	477	475	479
16	3	424	441	453	462	474	475	478
17	3	425	445	469	485	506	489	481
18	3	466	476	492	503	508	503	500
19	3	482	500	515	528	534	537	534
20	3	462	480	491	503	507	500	501
21	3	386	398	407	418	420	410	417
22	4	532	563	575	9	9	9	9
23	4	489	512	531	547	540	515	513
24	4	385	390	398	405	407	385	387
25	4	391	404	419	426	430	9	460
26	4	461	479	483	494	503	486	463
27	4	352	362	366	372	374	363	332
28	4	450	465	471	480	492	500	453
29	5	435	447	452	460	453	406	397
30	5	452	473	491	503	495	419	404
31	5	412	430	445	453	448	374	341
32	5	526	542	559	566	582		460
33	5	397	409	416	419	422	408	330
34	5	422	440	454	463	473	471	388
35	5	487	505	519	533	552	566	471
36	6	464	477	491	501	491	9	9
37	6	502	528	547	570	566	496	440
38	6	460	471	481	493	500	9	9
39	6	413	418	430	440	439	380	342
40	6	392	401	411	420	424	420	9
41	6	487	499	506	515	522	517	9
42	6	490	504	517	532	545	562	9

Rata	Grupo	Peso 14	Peso 15	Peso 16	Peso 17
1	1	468	474	470	9
2	1	436	445	444	9
3	1	434	442	450	9
4	1	369	375	375	9
5	1	376	382	380	9
6	1	450	457	457	9
7	1	470	472	483	9
8	2	456	466	475	9
9	2	511	520	527	9
10	2	584	599	612	9
11	2	524	539	553	9
12	2	508	522	533	9
13	2	476	483	487	9
14	2	598	612	623	9
15	3	484	484	492	9
16	3	477	480	480	9
17	3	483	474	469	9
18	3	496	493	500	9
19	3	532	525	515	9
20	3	504	508	503	9
21	3	422	428	426	9
22	4	9	9	9	9
23	4	520	520	517	9
24	4	390	396	398	9
25	4	387	385	383	380
26	4	462	465	467	472
27	4	326	294	293	270
28	4	442	449	447	459
29	5	402	415	415	9
30	5	404	404	362	9
31	5	339	324	308	9
32	5	424	354	351	351
33	5	318	323	302	318
34	5	350	344	350	366
35	5	434	433	442	453
36	6	9	9	9	9
37	6	415	385	380	9
38	6	9	9	9	9
39	6	326	325	321	310
40	6	9	9	9	9
41	6	9	9	9	9
42	6	9	9	9	9

LEYENDA

Grupo 1	Control
Grupo 2	Obesas
Grupo 3	Dieta VLCD
Grupo 4	Sham
Grupo 5	Sleeve
Grupo 6	Bypass

9 = Éxitus

3.- Cebadores

Cebadores utilizados para el estudio de la expresión genética

Genes de referencia

GEN	Secuencia del cebador	Tamaño amplicon (RNA)	T° de Hibridación
rat PSMC4 FW	AACTACCACTGACGCACTTC	146	62
rat PSMC4 RV	CACACGGATAAATGCAGCTG		
Gapdh qForward rat	AACCCATCACCATCTTCCAG	203	62
Gapdh qReverse rat	CCAGTAGACTCCACGACATAC		

Genes a estudio

Leptin FW	AGGATGACACCAAACCCTC	141	62
Leptin RV	TCTTGACAAACTCAGAATGGG		
FTO FW	TCTGAGGAAAGAATGGCACG	115	62
FTO RV	CAGAGGCATAGAAGGGTCATC		
MCP-1/CCL2 FW	TTAATGCCCACTCACCTG	133	62
MCP-1/CCL2 RV	CTCTTGAGCTTGGTGACAAATAC		
IRS1 FW	ACGCTCCAGTGAGGATTTAAG	123	62
IRS1 RV	AGGATTGCTGAGGTCATTTAGG		
TNF alpha FW	CTTCTGTCTACTGAACTTCGGG	137	62
TNF alpha RV	CTACGGGCTTGTCACCTCG		
PPARG FW	GGAGCCTAAGTTTGAGTTTGC	150	62
PPARG RV	AGCAGGTTGTCTTGGATGTC		
FAS FW	CCGGTTGGCAATTCTATTTGTG	150	62
FAS RV	TTTCGGCAGTTCTCCAGATG		
GHRL FW	ATGCTCCCTTCGATGTTGG	140	
GHRL RV	CAGTCCTGTCAGTGGTTACTTG		
FASN (fatty acid synthase) FW	TTGATGGCTCACACACCTAC	170	62
FASN (fatty acid synthase) RV	CAGGCTCTTCAGTGGTAGCA		

Tabla 24: Primers utilizados en la PCR de la expresión genética

Cebadores utilizados para el estudio de la metilación

	GEN	Cebadores	T° Hibr.	Amplificación
IRS1_A	IRS1_A ext F	GTTGGTGGGGTGTGGTTTA	59	352
	IRS1_A ext R	CAACATCAATAAATAACAATCC		
	IRS1_A Int F	GGGAATTTGGGGTGATATTG	59	305
	IRS1_A int R	CCCTAACACCAACAAAACCC		
IRS1_B	IRS1_B ext F	ATTATGTAGTTGTAGAAGAGT	54	370
	IRS1_B ext R	ACACCTCCCTCTACTC		
	IRS1_B int F	GGTATTAGTTGTTTTGTTTAG	54	263
	IRS1_B int R	CAAACCCAAAAATATACATAAA		
FASN	rat FASN bis F	GTTTTGGAGATTAGGATG	50	301
	rat FASN bis R	AACTCTAAACAATCTATATC		
	rat FASN bis F Seq	TAGGTAGGATAGGGAATATT		
MCP1	rat MCP1 bis F	ATATTTGTGGTTATAGTTTAG	53	303
	rat MCP1 bis R	ACCTCTATCTATATCTCTAC		
	rat MCP1 bis F Seq	TTGGAAATATTTAAGGGTT		
FAS	rat FAS bis F	AGTGATATATAGGTATTTAA	48	299
	rat FAS bis R	ATAAAATAACTATCATCCAA		
Leptin_A	rat LEP_A bis F	TATTAAGGATAGTTTTTGTTT	54	306
	rat LEP_A bis R	CCTCAAAAAAAAAACTTCAAC		
	rat LEP_A bis F Seq	TTAAAGTAGGTTTTTTATAG		
Leptin_B	rat LEP_B bis F	GTAATGAAGATTTTAATAGA	48	266
	rat LEP_B bis R	AAATCTTATTACATATTTCAA		
PPARg_A	rat PPARg_A bis F	GTGATAGTTAGGGTATTAGT	56	396
	rat PPARg_A bis R	CCCAAATCTCTTCTTCAAC		
	rat PPARg_A bis F Seq	GATTGTGAGGAGTAAGG		
PPARg_B	rat PPARg_B bis F	GTGGAGTTATTTTAGGTTTTT	54	301
	rat PPARg_B bis R	TAACCCCATTTTCCTCACA		

Tabla 25: Primers utilizados en la PCR del estudio de la metilación del epigenoma

