
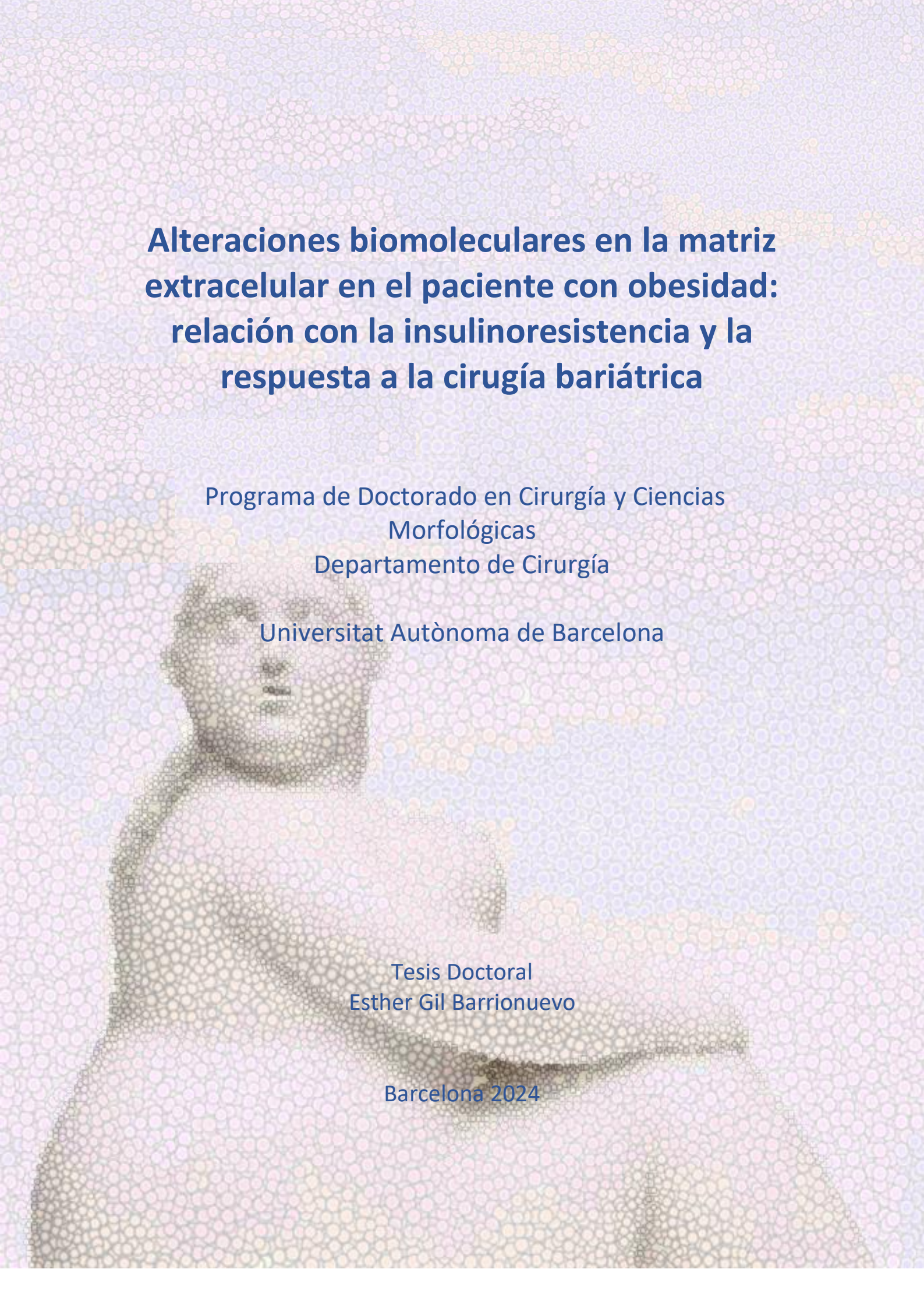


**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

**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:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

**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>

The background of the cover is a microscopic image of cells, showing a grid-like pattern of small, rounded cells with visible nuclei and cytoplasm. The cells are arranged in a regular, repeating pattern, creating a textured, cellular appearance. The colors are muted, with shades of pink, purple, and blue.

# **Alteraciones biomoleculares en la matriz extracelular en el paciente con obesidad: relación con la insulinoresistencia y la respuesta a la cirugía bariátrica**

Programa de Doctorado en Cirugía y Ciencias Morfológicas  
Departamento de Cirugía

Universitat Autònoma de Barcelona

Tesis Doctoral  
Esther Gil Barrionuevo

Barcelona 2024





# Tesis Doctoral

## Alteraciones biomoleculares en la matriz extracelular en el paciente con obesidad: relación con la insulinoresistencia y la respuesta a la cirugía bariátrica

Programa de Doctorado en Cirugía y Ciencias  
Morfológicas  
Departamento de Cirugía

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona 2024

Doctorando:

Esther Gil Barrionuevo

Directores:

José María Balibrea del Castillo

Maria Antònia Arbós Via

Maria Teresa Quiles Pérez

Tutor:

Manel Armengol Carrasco



*“Solo existen dos cosas: ciencia y opinión.  
La primera engendra el conocimiento;  
la segunda, la ignorancia”.*

*Hipócrates (460 a.c. – 370 a.c)*



*A mi familia*





## AGRADECIMIENTOS

He tenido la suerte de haber llegado hasta aquí siguiendo los pasos de grandes maestros, tanto los que me precedieron como los que me han acompañado en el camino.

En primer lugar, este proyecto sigue la estela del Dr. José M. Balibrea, compañero, amigo, uno de los impulsores de este proyecto y sin duda médico ejemplar, cuyo apoyo y enseñanzas a lo largo de los años no puedo más que agradecer. Del mismo modo, este trabajo no hubiese sido posible sin las Dras. María Antonia Arbós y María Teresa Quiles, cuya profesionalidad y compromiso con el proyecto desde su nacimiento merecen tanto reconocimiento y gratitud como su paciencia infinita y su capacidad para sujetar el timón aún cuando azota el temporal. A todos ellos les debo gran parte de lo aprendido en el camino. También quisiera agradecer la ayuda del Dr. Manel Armengol, por su confianza en este trabajo y por poner los medios necesarios para su realización.

Quisiera agradecer la colaboración de todas las personas que de alguna forma han participado en este proyecto: la Unidad de Cirugía Endocrina, Bariátrica y Metabólica del Hospital Universitari Vall d'Hebrón, el Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital San Rafael y en especial a la Dra. Janice Velasco, el Grupo de Investigación en Cirugía General, la Unidad de Alta Tecnología y otros equipos del Vall d'Hebrón Institut de Recerca (VHIR), así como todos los estudiantes y médicos residentes que en algún momento de su formación colaboraron con este proyecto.

Por otro lado, quisiera agradecer el apoyo recibido durante estos últimos dos años por los miembros del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, y en especial al Dr. Joan Francesc Julián, por ofrecerme su confianza y la oportunidad de trabajar en un proyecto asistencial apasionante con el que hace unos años sólo podía soñar. Quisiera dedicar un especial agradecimiento a los integrantes de la Unidad de Trauma y Cirugía de Urgencias: Protti, Enrico, y la recién llegada Ana. Gracias por vuestro apoyo, por vuestra paciencia y por ofrecer siempre lo mejor de vosotros, en la calma y en la tempestad, ya sea una decisión firme, una duda compartida, un consejo, una sonrisa, un abrazo o a veces hasta un hombro sobre el que llorar. Sois el mejor equipo médico y humano con el que una puede tener el placer de trabajar, y compartir aventuras con vosotros es realmente un regalo.

No quisiera olvidarme de la gente que, hace ya unos años, me vio nacer y crecer como cirujana: adjuntos, residentes y personal administrativo de los servicios de Cirugía General y del Aparato Digestivo y de la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática del Hospital Universitari Vall d'Hebrón. Todos ellos forman parte de ese capítulo especial, quizás por ser el primero, de esta andadura profesional. De todos ellos he aprendido, entre otras muchas cosas, que un médico es también un científico, y que las batallas nunca se ganan (ni se pierden) solo. Algunos de esos compañeros de batalla, como Silvia y Laura, me han regalado, además de su talento, su apoyo, su amistad e incontables ratos de risas y llantos que seguimos compartiendo más allá de las fronteras del quirófano. Por ello, me siento enormemente afortunada.

Y, sin embargo, a pesar de todo lo recibido de las personas que me han acompañado en esta aventura y con las que he tenido el placer de trabajar, este camino no hubiese sido posible sin el apoyo y el afecto de las personas que forman parte de mi vida, mucho más allá de los límites de mi carrera. A Marc, seguramente una de las personas que más de cerca me ha acompañado en este viaje tanto profesional como personal, nunca podré agradecerle lo suficiente su ayuda, su paciencia, su apoyo, su cariño y su empeño en que no dejase de remar aún cuando la corriente parecía más fuerte. De él y con él he aprendido muchísimo, y me siento agradecida por todo lo compartido en el camino. Sin él difícilmente hubiese llegado hasta aquí.

También estoy inmensamente agradecida a esos amigos que se convirtieron en mis compañeros de vida hace ya bastantes años. Gracias por ser también mi familia, por acompañarme siempre, por ponerme los pies en la tierra y por seguir aquí. Gracias Enrique, por ser uno de los mayores tesoros que he encontrado, por darme paz y hacerlo todo mejor y más fácil solo por estar ahí. Gracias Marc por regalarme tu amor, tu confianza y algunas lecciones valiosas que intentaré no olvidar. Gracias Ayor por estar siempre, y ayudarme a recordar que hay momentos y lugares en que todo, simplemente, está bien.

Finalmente, a pesar de la enorme fortuna de haberme encontrado con todas estas personas a lo largo del camino, mi mayor agradecimiento es sin duda para mi familia. Para mis abuelos, las personas más especiales que jamás haya conocido, por enseñarme lo que significa querer sin condiciones. Para mis padres, por compartir esa enseñanza y por ser siempre mi hogar y mi refugio; por haber puesto una red bajo mis pies para que saltar diera menos miedo y por ayudarme a curar las heridas después de cada caída. Todo lo que hago y todo lo soy, es y será gracias a ellos. Para Marta y Núria, por hacerme sentir en casa, por cuidarme y apoyarme, por darme amor y fuerza y caminar conmigo siempre.

Barcelona, septiembre de 2023.

## ABREVIATURAS

- *%TWL: Porcentaje de peso total perdido*
- *ACTB:  $\beta$ -actina*
- *ADAM: Desintegrina y metaloproteinasa*
- *ADAMTS: Desintegrina y metaloproteinasa con dominios trombospondina*
- *ADAMTS1: Desintegrina y metaloproteinasa con dominios trombospondina 1*
- *ADAMTS4: Desintegrina y metaloproteinasa con dominios trombospondina 4*
- *ADAMTS9: Desintegrina y metaloproteinasa con dominios trombospondina 9*
- *ADN: Ácido desoxirribonucleico*
- *ADNc: ADN complementario*
- *AGL: Ácidos grasos libres*
- *AMPK: Proteína quinasa activada por AMP*
- *ARN: Ácido ribonucleico*
- *ARNc: ARN complementario*
- *ARNm: ARN mensajero*
- *ASA: índice de la Sociedad Americana de Anestesiología*
- *BGA: Banda gástrica ajustable*
- *CB: Cirugía bariátrica*
- *CD: Cruce duodenal*
- *CGH (array de): hibridación genómica comparada*
- *CRISPL2: Proteína secretada rica en cisteína con dos dominios LCCL de unión a lipopolisacáridos*
- *Ct: umbral de ciclo (cycle threshold)*
- *DBP: Derivación bilio-pancreática*
- *DLP: Dislipemia*
- *DM2: Diabetes mellitus tipo 2*
- *FAK: quinasa de adhesión focal*
- *FTL: cadena ligera de ferritina*
- *GDE: Gen diferencialmente expresado*
- *GSEA: Análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (Gen Set Enrichment Analysis)*
- *GV: Gastrectomía vertical*
- *GVL: Gastrectomía vertical laparoscópica*
- *HA: Ácido hialurónico*
- *HAS1: Hialuronano sintasa 1*
- *HbA1c: Hemoglobina glicosilada*
- *HIF1 $\alpha$ : Factor 1 inducible por hipoxia  $\alpha$*
- *HOMA-IR: Índice de resistencia a la insulina (homeostatic model assessment of insulin resistance)*
- *HTA: Hipertensión arterial*
- *IL6: Interleuquina 6*
- *ILK: quinasa ligada a integrina*
- *IMC: Índice de masa corporal*

- *IPO8: importina 8*
- *Log2FC: Ratio de expresión entre dos condiciones, expresada en escala logarítmica (Log Fold Change)*
- *LRYGB: By-pass gástrico en Y-de-Roux laparoscópico*
- *MEC: Matriz extracelular*
- *MMP's: Metaloproteinasas de matriz*
- *MMP19: Metaloproteinasa de matriz 19*
- *NAFLD: Esteato-hepatopatía no alcohólica*
- *OPN: Osteopontina*
- *ORA: Análisis de sobre-representación (Over-representation analysis)*
- *PCA: Análisis de componentes principales*
- *PRG4: Proteoglicano 4*
- *RIN: Número de integridad del ARN*
- *RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real*
- *RYGB: By-pass gástrico en Y-de-Roux*
- *S100A8: Calgranulina A*
- *SADI-S: By-pass duodeno-ileal de anastomosis única con gastrectomía vertical*
- *SAHS: Síndrome de apneas-hipopneas del sueño*
- *SNP: polimorfismo de un solo nucleótido*
- *SRGN: Serglicina*
- *TAE: Tejido adiposo epiploico*
- *TAM: Tejido adiposo mesentérico*
- *TAS: Tejido adiposo subcutáneo*
- *TAV: Tejido adiposo visceral*
- *THBS1: Trombospondina 1*
- *TIMPs: Inhibidores tisulares de metaloproteinasas*
- *TNF: Factor de necrosis tumoral*
- *TP: Tejido peritoneal*
- *VCAN: Versicano*
- *VEGF $\alpha$ : Factor de crecimiento endotelial vascular  $\alpha$*

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Datos demográficos y clínicos de los sujetos estudiados .....	98
<b>Tabla 2.</b> Evolución clínica al año de la CB en el grupo de pacientes con obesidad .....	99
<b>Tabla 3.</b> Datos clínicos de los pacientes incluidos en la validación mediante RT-qPCR.....	122
<b>Tabla 4.</b> Evolución clínica a los 12 meses de la CB de los pacientes incluidos en la validación mediante RT-qPCR .....	122
<b>Tabla 5.</b> Genes utilizados en la validación de la expresión diferencial mediante qPCR.....	125
<b>Tabla 6.</b> Asociación entre variables clínicas basales y expresión génica .....	126
<b>Tabla 7.</b> Correlación entre variables clínicas basales y expresión génica .....	128
<b>Tabla 8.</b> Correlación entre variables clínicas a los 12 meses de la CB y expresión génica ....	132

### ANEXOS

<b>Tabla A1.</b> Conjunto de genes de matrisoma (n=380) .....	193
<b>Tabla A2.</b> Genes del matrisoma con expresión diferencial entre grupos en TAE .....	194
<b>Tabla A3.</b> Genes del matrisoma con expresión diferencial entre grupos en TAM.....	195
<b>Tabla A4.</b> Genes del matrisoma con expresión diferencial entre grupos en TP .....	196
<b>Tabla A5.</b> Genes del matrisoma con expresión diferencial entre grupos en TAS .....	197
<b>Tabla A6.</b> Genes del matrisoma con mayor expresión diferencial entre grupos .....	198
<b>Tabla A7.</b> Valores de expresión en TAE en los pacientes con obesidad respecto a los individuos sin obesidad .....	213
<b>Tabla A8.</b> Valores de expresión en TAM en los pacientes con obesidad respecto a los individuos sin obesidad.....	213
<b>Tabla A9.</b> Valores de expresión en TP en los pacientes con obesidad respecto a los individuos sin obesidad.....	213
<b>Tabla A10.</b> Valores de expresión en TAS en los pacientes con obesidad respecto a los individuos sin obesidad .....	213
<b>Tabla A11.</b> Análisis de asociación: situación clínica basal y expresión génica en TAE .....	214
<b>Tabla A12.</b> Análisis de asociación: situación clínica basal y expresión génica en TAM.....	214
<b>Tabla A13.</b> Análisis de asociación: situación clínica basal y expresión génica en TP .....	214
<b>Tabla A14.</b> Análisis de asociación: situación clínica basal y expresión génica en TAS .....	214
<b>Tabla A15.</b> Análisis de correlación: situación clínica basal y expresión génica en TAE .....	215
<b>Tabla A16.</b> Análisis de correlación: situación clínica basal y expresión génica en TAM .....	215
<b>Tabla A17.</b> Análisis de correlación: situación clínica basal y expresión génica en TP .....	215
<b>Tabla A18.</b> Análisis de correlación: situación clínica basal y expresión génica en TAS .....	215
<b>Tabla A19.</b> Análisis de correlación: evolución postoperatoria y expresión génica en TAE ...	216
<b>Tabla A20.</b> Análisis de correlación: evolución postoperatoria y expresión génica en TAM .	216
<b>Tabla A21.</b> Análisis de correlación: evolución postoperatoria y expresión génica en TP .....	216
<b>Tabla A22.</b> Análisis de correlación: evolución postoperatoria y expresión génica en TAS ...	216





## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Bases fisiopatológicas de la adiposopatía.....	29
<b>Figura 2.</b> El tejido adiposo en el paciente con obesidad .....	29
<b>Figura 3.</b> Procedimientos de cirugía bariátrica realizados en el mundo .....	33
<b>Figura 4.</b> Principales técnicas quirúrgicas en cirugía bariátrica.....	34
<b>Figura 5.</b> Tendencias en cirugía bariátrica .....	35
<b>Figura 6.</b> Single anastomosis duodeno-ileal bypass with sleeve gastrectomy (SADI-S).....	36
<b>Figura 7.</b> MEC y disfunción inmunometabólica .....	48
<b>Figura 8.</b> Esquema general del estudio.....	65
<b>Figura 9.</b> Tejidos incluidos en el estudio.....	68
<b>Figura 10.</b> Extracción de ARN.....	77
<b>Figura 11.</b> GeneChip.....	79
<b>Figura 12.</b> <i>Pooling</i> de muestras en el grupo de pacientes con obesidad .....	80
<b>Figura 13.</b> <i>Pooling</i> de muestras en el grupo de sujetos control .....	81
<b>Figura 14.</b> Metodología general del análisis de expresión génica.....	82
<b>Figura 15.</b> Análisis del perfil de expresión génica mediante microarrays .....	84
<b>Figura 16.</b> Sujetos incluidos en el análisis transcripcional.....	97
<b>Figura 17.</b> Desviación estándar de todos los genes en el array.....	101
<b>Figura 18.</b> Genes analizados .....	102
<b>Figura 19.</b> Distribución por categorías de los genes de matrisoma .....	103
<b>Figura 20.</b> PCA (análisis no supervisado) .....	103
<b>Figura 21.</b> Heatmap (análisis supervisado) .....	104
<b>Figura 22.</b> Volcano plots de la expresión génica .....	106
<b>Figura 23.</b> Genes con expresión diferencial entre grupos.....	107
<b>Figura 24.</b> Análisis de Componentes Principales entre grupos .....	108
<b>Figura 25.</b> Análisis de Componentes Principales por grupos y tejidos .....	109
<b>Figura 26.</b> Heatmap (análisis no supervisado).....	110
<b>Figura 27.</b> Composición global del matrisoma .....	112
<b>Figura 28.</b> Genes relacionados con la MEC.....	113
<b>Figura 29.</b> Genes relacionados con la MEC, sobre- e infra-expresados .....	113
<b>Figura 30.</b> Categorías de genes relacionados con la MEC en pacientes.....	114
<b>Figura 31.</b> Gráfico de barras de enriquecimiento en TAE.....	117
<b>Figura 32.</b> Mapa de enriquecimiento en TAE .....	117
<b>Figura 33.</b> Gráfico de barras de enriquecimiento en TAM .....	118
<b>Figura 34.</b> Mapa de enriquecimiento en TAM.....	118
<b>Figura 35.</b> Gráfico de barras de enriquecimiento en TP .....	119
<b>Figura 36.</b> Mapa de enriquecimiento en TP .....	119
<b>Figura 37.</b> Gráfico de barras de enriquecimiento en TAS.....	120
<b>Figura 38.</b> Mapa de enriquecimiento en TAS .....	120
<b>Figura 39.</b> Niveles de expresión ( $\Delta$ Ct) mediante RT-qPCR .....	124
<b>Figura 40.</b> Correlación entre HOMA-IR y expresión génica en TAE .....	129
<b>Figura 41.</b> Correlación entre HOMA-IR y expresión génica en TP .....	129
<b>Figura 42.</b> Correlación entre IMC y expresión génica.....	130

<b>Figura 43.</b> Correlación entre perfil lipídico y expresión génica en TAE .....	130
<b>Figura 44.</b> Correlación entre perfil lipídico y expresión génica en TP .....	131
<b>Figura 45.</b> Correlación entre HOMA-IR tras cirugía bariátrica y expresión génica.....	132
<b>Figura 46.</b> Correlación entre dislipemia postoperatoria y expresión génica en TP.....	133
<b>Figura 47.</b> Correlación entre dislipemia postoperatoria y expresión génica en TAM .....	133
<b>Figura 48.</b> Correlación entre dislipemia postoperatoria y expresión génica en TP.....	134

## ANEXOS

<b>Figura A1.</b> Tipos de microarrays de expresión .....	188
<b>Figura A2.</b> GeneChip de Affymetrix .....	189
<b>Figura A3.</b> Curva de amplificación y fases durante los sucesivos ciclos de PCR.....	191
<b>Figura A4.</b> PCA y <i>heatmap</i> para comparaciones múltiples por grupos y tejidos .....	206

# ÍNDICE

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>19</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>21</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>1.1. LA OBESIDAD: ASPECTOS GENERALES .....</b>	<b>25</b>
1.1.1. Epidemiología de la obesidad .....	25
1.1.2. Sd. metabólico y comorbilidades asociadas .....	26
1.1.3. Metabolismo energético, obesidad e inflamación .....	28
<b>1.2. TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD .....</b>	<b>30</b>
1.2.1. Tratamiento médico .....	31
1.2.2. Tratamiento quirúrgico .....	32
<b>1.3. EL TEJIDO ADIPOSO Y LA MATRIZ EXTRACELULAR .....</b>	<b>39</b>
1.3.1. Estructura de la MEC en el tejido adiposo .....	39
1.3.2. Adiposopatía y remodelación de la MEC .....	45
<b>1.4. EL PAPEL DE LAS CÉLULAS MESOTELIALES .....</b>	<b>49</b>
1.4.1. Propiedades de las células mesoteliales .....	49
1.4.2. Células mesoteliales y fibrosis .....	50
1.4.3. Precursores adipocíticos .....	51
<b>1.5. LA MEC COMO POTENCIAL DIANA TERAPÉUTICA EN LA OBESIDAD .....</b>	<b>52</b>
<b>2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>57</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>61</b>
<b>3.1. OBJETIVO PRINCIPAL .....</b>	<b>61</b>
<b>3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS .....</b>	<b>61</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>65</b>
<b>4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO .....</b>	<b>65</b>
4.1.1. Cálculo del tamaño muestral .....	66
4.1.2. Participantes .....	66
4.1.3. Intervenciones quirúrgicas .....	67
4.1.4. Obtención de muestras biológicas .....	68
4.1.5. Consideraciones éticas .....	69
<b>4.2. VARIABLES CLÍNICAS Y BIOQUÍMICAS .....</b>	<b>70</b>
4.2.1. Variables epidemiológicas y antropométricas .....	70
4.2.2. Comorbilidades .....	71
4.2.3. Variables bioquímicas .....	74
<b>4.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA .....</b>	<b>76</b>
4.3.1. Obtención del ARN .....	76
4.3.2. Análisis de microarrays .....	78
4.3.3. Análisis de los perfiles de expresión génica .....	85
4.3.4. Análisis de los genes diferencialmente expresados .....	86

4.3.5. Validación de resultados mediante RT-qPCR .....	91
<b>4.4. RELACIÓN ENTRE EXPRESIÓN GÉNICA Y VARIABLES CLÍNICAS .....</b>	<b>94</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>97</b>
<b>5.1. RESULTADOS CLÍNICOS .....</b>	<b>97</b>
5.1.1. Pacientes incluidos en el análisis transcripcional .....	97
5.1.2. Análisis de variables clínicas y demográficas .....	98
<b>5.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA .....</b>	<b>99</b>
5.2.1. Control de calidad de las muestras analizadas .....	100
5.2.2. Pre-procesamiento: normalización y filtrado .....	100
5.2.3. Resultados del análisis de expresión general .....	102
5.2.4. Resultados del análisis de expresión diferencial .....	105
5.2.5. Análisis funcional o de significación biológica .....	111
5.2.6. Resultados de la validación mediante RT-qPCR .....	121
5.2.7. Niveles de expresión génica y situación clínica basal .....	126
5.2.8. Niveles de expresión génica y evolución postoperatoria .....	131
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>137</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>159</b>
<b>8. LÍNEAS DE FUTURO.....</b>	<b>163</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>167</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>187</b>
<b>10.1. ANEXO I: Bases del análisis de expresión génica mediante microarrays.....</b>	<b>187</b>
<b>10.2. ANEXO II: Bases del análisis de expresión génica mediante RT-qPCR.....</b>	<b>190</b>
<b>10.3. ANEXO III: Conjunto de genes del matrisoma.....</b>	<b>193</b>
<b>10.4. ANEXO IV: Genes del matrisoma con expresión diferencial entre grupos por tejidos..</b>	<b>194</b>
<b>10.5. ANEXO V: Genes con mayor expresión diferencial entre grupos por tejidos.....</b>	<b>198</b>
<b>10.6. ANEXO VI: Análisis no supervisado (PCAs y <i>Clustering</i>).....</b>	<b>206</b>
<b>10.7. ANEXO VII: Selección de genes más representativos de los procesos enriquecidos.....</b>	<b>208</b>
<b>10.8. ANEXO VIII: Diferencias de expresión entre grupos mediante microarrays y RT-qPCR.....</b>	<b>213</b>
<b>10.9. ANEXO IX: Análisis de asociación: expresión génica y situación clínica basal.....</b>	<b>214</b>
<b>10.10. ANEXO X: Análisis de correlación: expresión génica y situación clínica basal.....</b>	<b>215</b>
<b>10.11. ANEXO XI: Análisis de correlación: expresión génica y evolución postoperatoria .....</b>	<b>216</b>

## ABSTRACT

The role of alterations in the remodeling of extracellular matrix (ECM) in the different adipose tissues in obesity and its associated comorbidities, as well as in the response to bariatric surgery (BS), is currently unknown. Likewise, the potential contribution to this phenomenon by mesothelial cells present in the peritoneum is unknown. The objective of this study was to analyze the transcriptional profile of ECM-related genes in mesenteric adipose tissue (TAM), omental adipose tissue (TAE), subcutaneous adipose tissue (TAS) and peritoneal tissue (TP) and their relationship with different clinical variables.

A prospective observational case-control study was designed with a group of patients with obesity undergoing BS and a group of controls without obesity undergoing elective cholecystectomy, obtaining intraoperative samples of the four tissues (TAM, TAE, TAS and TP). Subsequently, differential expression analysis was performed using microarrays and ECM-related genes differentially expressed between groups in each tissue were selected. After a functional enrichment analysis, the most representative genes were selected and, in a subgroup of patients and controls, expression differences were validated by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Finally, the relationship between the expression levels of the selected genes and different baseline clinical variables of this subgroup of patients and controls was analyzed, as well as the weight and metabolic evolution 12 months after BS in the patient subgroup.

Between January 2017 and May 2019, tissue samples were obtained in the patient group (n=30) and the control group (n=13). Differential expression analysis using microarrays revealed an overexpression of genes related to the ECM in the group of patients with obesity compared to the control group in the four tissues studied. However, the differences in TAS were considerably less notable. The functional enrichment analysis also showed a lower number of enriched functional categories related to the ECM in the TAS compared to the rest of the tissues. Subsequently, 11 representative genes of the enriched processes were selected (*VCAN*, *PRG4*, *SRGN*, *S100A8*, *CRISPLD2*, *THBS1*, *ADAMTS1*, *ADAMTS4*, *ADAMTS9*, *MMP19* and *HAS1*) and the differential expression results were validated by RT-qPCR.

Overexpression in TAM and TAE of four of the genes selected in the functional enrichment analysis (*HAS1*, *ADAMTS4*, *THBS1* and *S100A8*) was associated with obesity and insulin resistance at the time of intervention. HOMA-IR was also correlated with the expression of *HAS1*, *THBS1*, *VCAN*, and *S100A8* in TAE and *ADAMTS1*, *ADAMTS4*, and *THBS1* in TP. No consistent relationships were identified between the expression of the genes analyzed and the presence of arterial hypertension and dyslipidemia at the time of the intervention. The expression in TAS did not show any notable relationships either.

Regarding the relationship between gene expression and evolution 12 months after BS, a correlation was found between the decrease in HOMA-IR and the overexpression of *ADAMTS9* in TAM and *THBS1* in TAE. The changes in the lipid profile 12 months after BS were also correlated with the expression of some of the selected genes (*ADAMTS4* and *PRG4* in TAS, *VCAN* in TAM and *CRISPLD2*, *ADAMTS4* and *VCAN* in TP). No correlations were identified between the expression of the analyzed genes and weight change after BS.

The observed results point to a relationship between obesity, insulin resistance and the overexpression of genes related to the ECM in the visceral tissues analyzed (TAM, TAE and TP),

highlighting the possible contribution of the TAM and mesothelial cells to metabolic deregulation in the obese patient.

## RESUMEN

Actualmente se desconoce el papel que juegan las alteraciones en la remodelación de la matriz extracelular (MEC) de los distintos tejidos adiposos en la obesidad y sus comorbilidades asociadas, así como en la respuesta a la cirugía bariátrica (CB). Asimismo, se desconoce la potencial contribución a este fenómeno de las células mesoteliales presentes en el peritoneo. El objetivo de este estudio fue analizar el perfil transcripcional de los genes relacionados con la MEC en el tejido adiposo mesentérico (TAM), el tejido adiposo epiploico (TAE), el tejido adiposo subcutáneo (TAS) y el tejido peritoneal (TP) y su relación con distintas variables clínicas.

Se diseñó un estudio observacional prospectivo de tipo caso-control con un grupo de pacientes con obesidad intervenidos de CB y un grupo de controles sin obesidad intervenidos de colecistectomía electiva, obteniéndose intraoperatoriamente muestras de los cuatro tejidos (TAM, TAE, TAS y TP). Posteriormente, se realizó un análisis de expresión diferencial mediante microarrays y se seleccionaron los genes relacionados con la MEC diferencialmente expresados entre grupos en cada tejido. Tras un análisis de enriquecimiento funcional, se seleccionaron los genes más representativos y, en un subgrupo de pacientes y controles, se validaron las diferencias de expresión mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Finalmente, se analizó la relación entre los niveles de expresión de los genes seleccionados y distintas variables clínicas basales de este subgrupo de pacientes y controles, así como la evolución ponderal y metabólica a los 12 meses de la CB del subgrupo pacientes.

Entre enero de 2017 y mayo de 2019, se obtuvieron las muestras tisulares en el grupo de pacientes (n=30) y el grupo de controles (n=13). El análisis de expresión diferencial mediante microarrays objetivó una sobreexpresión de genes relacionados con la MEC en el grupo de pacientes con obesidad respecto al grupo control en los cuatro tejidos estudiados. Sin embargo, las diferencias en el TAS fueron considerablemente menos notables. El análisis de enriquecimiento funcional mostró también un menor número de categorías funcionales enriquecidas relacionadas con la MEC en el TAS en comparación con el resto de tejidos. Posteriormente, se seleccionaron 11 genes representativos de los procesos enriquecidos (*VCAN*, *PRG4*, *SRGN*, *S100A8*, *CRISPLD2*, *THBS1*, *ADAMTS1*, *ADAMTS4*, *ADAMTS9*, *MMP19* y *HAS1*) y se validaron los resultados de expresión diferencial mediante RT-qPCR.

La sobreexpresión en TAM y TAE de cuatro de los genes seleccionados en el análisis de enriquecimiento funcional (*HAS1*, *ADAMTS4*, *THBS1* y *S100A8*) se asoció con la obesidad y la insulinoresistencia en el momento de la intervención. HOMA-IR también se correlacionó con la expresión de *HAS1*, *THBS1*, *VCAN* y *S100A8* en TAE y *ADAMTS1*, *ADAMTS4* y *THBS1* en TP. No se identificaron relaciones consistentes entre la expresión de los genes analizados y la presencia de HTA y DLP en el momento de la intervención. La expresión en TAS tampoco mostró relaciones destacables.

Respecto la relación de la expresión génica y la evolución a los 12 meses de la CB, se encontró una correlación entre la disminución del HOMA-IR y la sobreexpresión de *ADAMTS9* en TAM y *THBS1* en TAE. Los cambios en el perfil lipídico a los 12 meses de la CB también se



correlacionaron con la expresión de algunos de los genes seleccionados (*ADAMTS4* y *PRG4* en TAS, *VCAN* en TAM y *CRISPL2*, *ADAMTS4* y *VCAN* en TP). No se identificaron correlaciones entre la expresión de los genes analizados y la evolución ponderal.

Los resultados observados apuntan a una relación entre la obesidad, la resistencia insulínica y la sobreexpresión de genes relacionados con la MEC en los tejidos viscerales analizados (TAM, TAE y TP), destacando la posible contribución del TAM y las células mesoteliales a la desregulación metabólica en el paciente con obesidad.

# 1. INTRODUCCIÓN



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. LA OBESIDAD: ASPECTOS GENERALES

### 1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA OBESIDAD

En las últimas décadas, la obesidad se ha convertido en uno de los mayores problemas de salud pública en todo el mundo. La prevalencia de la obesidad se ha más que duplicado desde 1980, y casi triplica los datos de la década anterior. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, actualmente más del 39% de la población adulta tiene sobrepeso (definido como índice de masa corporal o IMC > 25 kg/m<sup>2</sup>) y un 13% (11% de los hombres y 15% de las mujeres) sufre de obesidad (IMC > 30 kg/m<sup>2</sup>). De hecho, en las últimas décadas hemos asistido a un cambio de paradigma respecto al estado nutricional de la población en términos globales, de forma que actualmente la obesidad y el sobrepeso no solamente son más prevalentes, sino que aproximadamente el 65% de la población mundial vive en áreas donde estos trastornos causan más muertes que la desnutrición<sup>(1)</sup>.

En los países occidentales, el problema es aún más grave y actualmente la obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas. En España, a día de hoy alrededor del 22% de la población tiene obesidad, y más del 61% tiene sobrepeso<sup>(2)</sup>. En los Estados Unidos, quizás uno de los máximos exponentes del problema, actualmente 2 de cada 3 adultos tienen sobrepeso<sup>(3)</sup> y, según datos de 2016, la proporción de norteamericanos con IMC > 30 kg/m<sup>2</sup> es del 39.6%. La prevalencia es incluso más elevada entre las mujeres y la población de entre 40 y 59 años, donde las cifras de obesidad alcanzan el 42.8%<sup>(4)</sup>. La proporción de adultos con IMC incluso mayor también ha aumentado en los últimos años<sup>(4)</sup>, y actualmente el 7.7% de adultos en los Estados Unidos tienen un IMC por encima de 40 kg/m<sup>2</sup>. Entre las mujeres y la población de mediana edad, la proporción de individuos con obesidad severa se acerca peligrosamente al 10%<sup>(4)</sup>.

Si bien la obesidad fue considerada hasta hace pocos años un problema casi exclusivo de los países desarrollados, la tendencia creciente de este trastorno está afectando también a los países y sectores sociales más desfavorecidos, entre los cuales se está registrando un rápido aumento de casos<sup>(1)</sup>. Mientras los países en vías de desarrollo siguen afrontando el problema de la desnutrición, en la actualidad deben enfrentarse de forma concomitante a un rápido aumento de la población con obesidad, especialmente en las áreas urbanas. En estas áreas, los patrones dietéticos, laborales y de transporte se están acercando progresivamente al modelo occidental de vida sedentaria y sobreconsumo de grasas y azúcares a una velocidad equiparable a la del imparable crecimiento urbanístico. En consecuencia, hoy en día las zonas menos desarrolladas se enfrentan a un doble problema, ya que es cada vez más habitual la coexistencia de la desnutrición y la obesidad en una misma comunidad.

Entre los jóvenes por debajo de 20 años, la tendencia en las últimas décadas ha sido también creciente. Se calcula que hoy en día 340 millones de niños y adolescentes tienen sobrepeso (40 millones por debajo de los 5 años). Esto supone un incremento dramático desde la década de 1970, donde el sobrepeso infantil y juvenil se situaba alrededor del 4%, hasta cifras actuales cercanas al 18%. Hasta un 6% de la población juvenil a nivel global está hoy en día en rango de obesidad. De forma similar a la población adulta, los datos son especialmente alarmantes en los países occidentales. En EUA la obesidad en los menores de 20 años supera el 18%, mientras que el 6% de esta población tiene un grado severo de obesidad con un IMC > 40 kg/m<sup>2</sup>, especialmente entre la población adolescente. En los países en vías de desarrollo, la población infantil es aún más vulnerable y más susceptible de sufrir los efectos de un inadecuado cuidado nutricional pre-natal y en edades tempranas. En África, la proporción de niños menores de 5 años con sobrepeso ha aumentado un 50% en los últimos 20 años, y aproximadamente la mitad de menores de 5 años con sobrepeso en el mundo viven en países asiáticos. Al mismo tiempo, esta población está expuesta a una alimentación rica en grasas y azúcares y pobre en micronutrientes, que habitualmente tiene un menor coste y también una menor calidad en términos nutricionales. Estos patrones dietéticos asociados a un bajo nivel de actividad física, propiciados por los cambios socio-ambientales en zonas con una falta de planificación sanitaria, educativa, económica y urbanística, han resultado en un aumento preocupante de la obesidad infantil y juvenil en estas áreas, mientras el problema de la desnutrición sigue sin resolverse.

La obesidad es actualmente no solo un problema para la salud individual, con importantes consecuencias en términos de enfermedades asociadas, disminución de la calidad y de la esperanza de vida<sup>(5,6)</sup>. Se trata de una enfermedad crónica cuyo alarmante ritmo de crecimiento, que se espera que continúe en las próximas décadas, supone un verdadero reto también para el Sistema Sanitario, para las economías y para el conjunto de la sociedad. Según un informe de la OECDE (*Organization for Economic Cooperation and Development*) de 2019<sup>(7)</sup>, en los próximos años la obesidad reducirá la esperanza de vida entre 1 y 4 años en los países miembros, y en los próximos 30 años se esperan más de 92 millones de muertes prematuras relacionadas con la obesidad. Según este informe, actualmente, los costes de esta enfermedad para el sistema sanitario en los países occidentales se sitúan alrededor del 8% del gasto sanitario total. Los costes indirectos y el impacto económico global, incluyendo la disminución de la productividad laboral y el producto interior bruto, se estiman mucho mayores.

En conclusión, la obesidad es un problema crónico de tendencia claramente creciente y actualmente de proporciones epidémicas, que supondrá sin duda uno de los principales retos para la Salud Pública en el siglo XXI. Ya que se trata de una enfermedad prevenible, en los próximos años serán cruciales las políticas de prevención a nivel global para disminuir el enorme impacto para el Sistema Sanitario y para el conjunto de la sociedad tanto de la obesidad como de sus enfermedades asociadas.

### 1.1.2. SÍNDROME METABÓLICO Y COMORBILIDADES ASOCIADAS

La obesidad tiene implicaciones a muchos niveles, empezando por la nada despreciable repercusión sobre la imagen corporal, las relaciones sociales y la autoestima, además de la

evidente limitación para la actividad física e incluso las actividades de la vida diaria. Esta afectación de la calidad de vida en ocasiones requiere de atención psicológica o psiquiátrica específica<sup>(8)</sup>. Por otro lado, el exceso de peso favorece la aparición de artropatías graves, dolor crónico, alteraciones del sueño, síndrome de apneas-hipopneas del sueño (SAHS) y otros problemas respiratorios. El aumento de volumen de grasa intra-abdominal también se asocia con la aparición de enfermedad por reflujo gastro-esofágico e incontinencia urinaria severa, entre otros trastornos<sup>(1,2)</sup>.

No obstante, los principales efectos del exceso de grasa corporal se dan a nivel molecular, manifestándose en un gran espectro de alteraciones metabólicas que conllevan una reducción de la esperanza de vida de estos pacientes<sup>(9)</sup>. La hipertensión arterial (HTA) es hasta un 40% más prevalente en la población con obesidad<sup>(2)</sup> y el riesgo relativo de padecer diabetes tipo 2 (DM2) es 7 veces mayor en estos pacientes<sup>(10)</sup>. El 60% de los pacientes con obesidad sufren de dislipemia (DLP)<sup>(11)</sup>, y más del 90% tienen algún grado de esteato-hepatopatía no alcohólica (NAFLD)<sup>(12)</sup>. En este contexto, la NAFLD se ha convertido a día de hoy en la principal causa de hepatopatía en el mundo occidental, y se espera que en la próxima década la esteato-hepatitis no alcohólica (NASH), su forma más severa, se convierta en la primera causa de trasplante hepático<sup>(13,14)</sup>.

La asociación entre el exceso de tejido adiposo, la DM2, la HTA y la DLP es tan estrecha, que en los años 90 apareció el término “síndrome metabólico” para hacer referencia a la coexistencia de estas patologías<sup>(15)</sup>. Aunque los criterios diagnósticos del síndrome metabólico han ido variando con el tiempo, aproximadamente el 40% de la población europea padecería este síndrome, según la definición propuesta en 2005 por la *International Diabetes Federation*<sup>(16)</sup>, muy similar al actual consenso de 2009<sup>(17)</sup>. La elevada prevalencia de síndrome metabólico en los pacientes con obesidad responde conceptualmente al hecho de que el tejido adiposo actuaría como un órgano endocrino en sí mismo, que en ciertos estados patológicos como la obesidad sufre una desregulación a la que se ha dado el nombre de “adiposopatía”, “enfermedad del tejido adiposo” o *sick fat*<sup>(18,19)</sup>. Esta desregulación, que afecta también al sistema inmunitario propiciando un estado de inflamación crónica<sup>(20)</sup>, tiene entre sus principales implicaciones metabólicas el aumento de la resistencia a la insulina<sup>(21)</sup>. Todas estas alteraciones se traducen en un elevado riesgo cardiovascular en los pacientes que presentan síndrome metabólico<sup>(22)</sup>, pero también en una mayor incidencia y mortalidad asociada a determinados tipos de cáncer en pacientes con obesidad, como lo son el cáncer colorrectal, el cáncer de mama en mujeres post-menopáusicas, o los tumores de endometrio, riñón, esófago y páncreas<sup>(23)</sup>.

Cabe mencionar que no todos los pacientes con obesidad sufren complicaciones a nivel sistémico<sup>(11)</sup>. Existe un subgrupo de pacientes con obesidad conocidos como “obesos sanos”. Aunque no existe un consenso respecto a la definición de este subgrupo, este término suele utilizarse para definir a personas con un IMC > 30 kg/m<sup>2</sup> que no presenta ninguna otra de las patologías características del síndrome metabólico<sup>(24)</sup>. La prevalencia de “obesos sanos” se estima de entre el 2-28%<sup>(25)</sup>. Sin embargo, estos individuos no deben considerarse completamente sanos, ya que, en algunos estudios, aunque en menor medida que los “obesos enfermos”, estos sujetos presentan un riesgo cardiovascular mayor que el de los sujetos con normopeso<sup>(26)</sup>.

### 1.1.3. METABOLISMO ENERGÉTICO, OBESIDAD E INFLAMACIÓN. EL CONCEPTO DE “ADIPOSOPATÍA”

Como se ha comentado anteriormente, a día de hoy sabemos que el tejido adiposo es un tejido dinámico y metabólicamente activo, que actúa a nivel sistémico como un órgano endocrino mediante la secreción de las llamadas “adipoquinas”. Además, a medida que profundizamos en el estudio de la adiposopatía se pone de manifiesto una estrecha relación entre el metabolismo energético y el sistema inmune, lo cual ha dado lugar a la aparición del término “inmunometabolismo”<sup>(21,27)</sup>.

Para explicar las bases de la adiposopatía (**Figura 1**), podríamos decir que, mientras que en el individuo sano existe un estado de equilibrio entre el tejido adiposo y el resto del organismo, en el paciente con obesidad estas relaciones o interacciones a nivel inmunometabólico se ven altamente alteradas y desreguladas<sup>(18,19)</sup>. Según esta teoría, un balance energético positivo en el organismo generaría la hipertrofia selectiva del tejido adiposo visceral (TAV), que incluye al tejido adiposo mesentérico (TAM) y al tejido adiposo epiploico (TAE), en lugar de una respuesta hiperplásica homogénea del TAV y el tejido adiposo subcutáneo (TAS). La expansión patológica del TAV mediante la hipertrofia adipocitaria daría lugar a una hipoxia relativa del tejido adiposo. Esta isquemia relativa estaría también relacionada con un depósito excesivo de componentes de la MEC alrededor de los adipocitos, que limitaría la respuesta angiogénica en un tejido adiposo en expansión. La hipoxia en el tejido adiposo, mediante la activación de proteínas como el factor 1 inducible por hipoxia  $\alpha$  (*HIF1  $\alpha$* ), no provoca en este caso una respuesta pro-angiogénica sino la activación de un programa transcripcional alternativo, con síntesis incrementada de MEC y aumento de la fibrosis tisular<sup>(28)</sup>. La respuesta angiogénica limitada junto con la remodelación alterada de la MEC, que no solo supone una restricción física para el adipocito y los neo-vasos sanguíneos sino que se relaciona con la activación de vías de señalización pro-inflamatorias dependientes de integrinas y otros receptores de membrana, serían las responsables de disparar la respuesta inflamatoria local, induciendo una alteración en el perfil de secreción de citoquinas por parte del tejido adiposo con repercusiones a nivel sistémico<sup>(29,30)</sup>.

En el tejido adiposo del paciente con obesidad se ha descrito también un aumento de la migración de células inflamatorias. Este aumento de células inflamatorias está probablemente relacionado con la necrosis y apoptosis adipocitaria, producto de la limitada respuesta angiogénica, la remodelación alterada de la MEC con depósitos excesivos de sus componentes y la activación de vías de señalización relacionadas con la muerte celular (**Figura 2**). La apoptosis de los adipocitos induciría la infiltración del tejido adiposo por macrófagos, ya que el adipocito necrótico constituiría un estímulo fagocítico para este subtipo celular<sup>(30)</sup>. De hecho, en el tejido adiposo de los pacientes con obesidad se ha observado un aumento de la población de macrófagos y de citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF) o la interleuquina 6 (IL6) entre otras<sup>(20,21,27,31,32)</sup>. Estas citoquinas favorecen la infiltración por leucocitos mononucleares pro-inflamatorios como los linfocitos T CD8+, T CD4+ h1 y B2, que a su vez inducen la migración de nuevos macrófagos y su diferenciación a estados pro-inflamatorios<sup>(31)</sup>. La producción y liberación de citoquinas pro-inflamatorias por parte del tejido



adiposo provoca a su vez un aumento de la síntesis hepática de proteína C reactiva (PCR) <sup>(20)</sup>, dando lugar a un estado basal de inflamación sistémica crónica en los pacientes con obesidad.

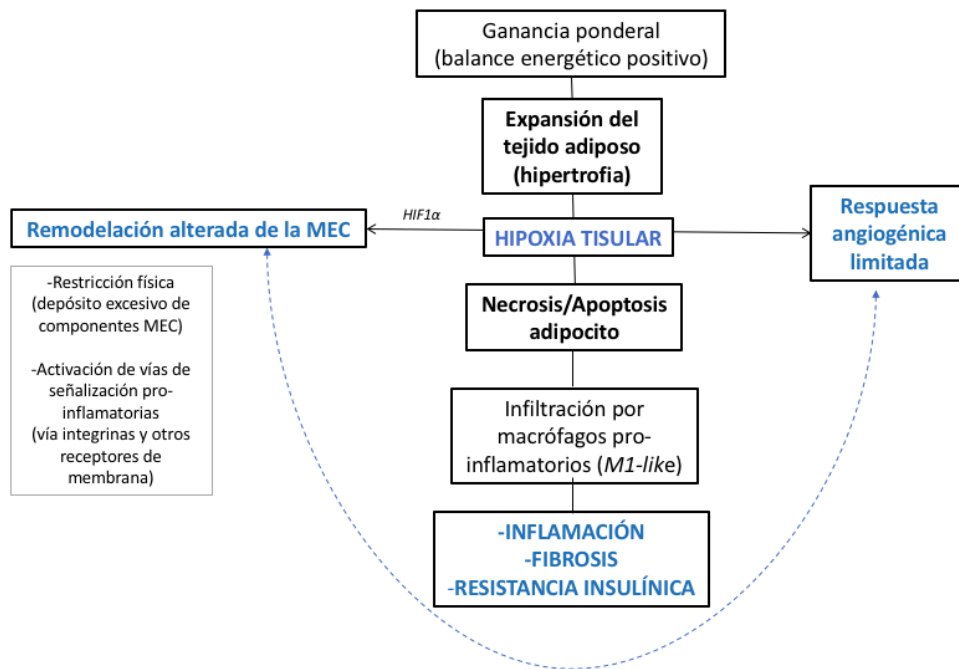


Figura 1. Bases fisiopatológicas de la adiposopatía.

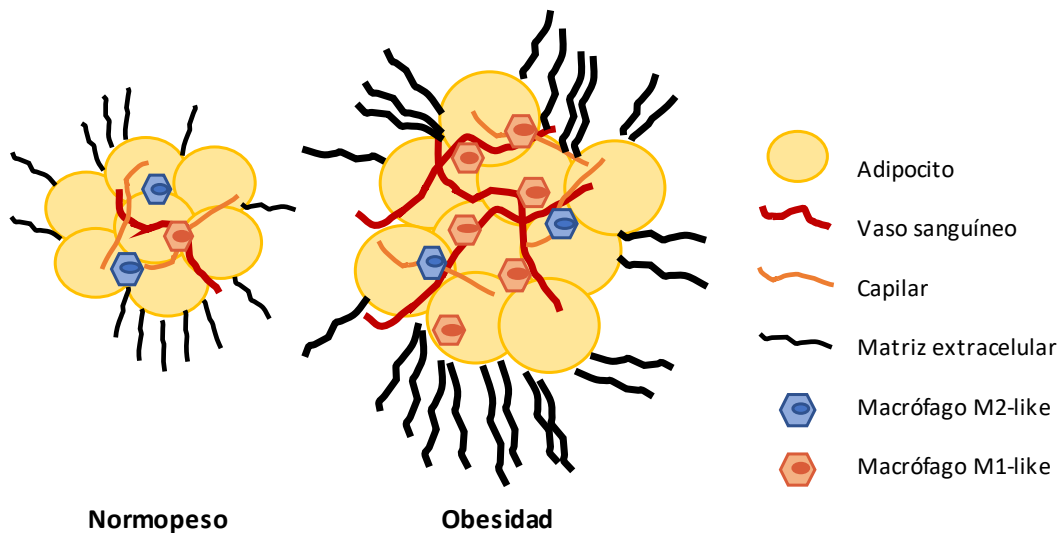


Figura 2. El tejido adiposo en el paciente con obesidad. Adaptada de De Lin, *Biochem Pharmacol*, 2016 <sup>(30)</sup>.

Una de las principales consecuencias de la alteración inmunometabólica que observamos en la obesidad es la aparición de resistencia a la insulina. Los mecanismos concretos que relacionan

la hipoxia del tejido adiposo y la fibrosis con la resistencia insulínica no están bien establecidos<sup>(30)</sup>. No obstante, sabemos que uno de los mecanismos probablemente implicados en la resistencia a la insulina está relacionado con TNF, el cual interfiere en la fosforilación de IRS1 (Insuline Receptor Substrate 1)<sup>(20,21,32,33)</sup> limitando su función como transductor de la señal de la insulina en los adipocitos y probablemente también a nivel sistémico<sup>(21,31)</sup>. Otra de los factores relacionados con la resistencia insulínica tiene que ver con el aumento de la lipólisis en el tejido adiposo de los sujetos con obesidad, lo cual genera un aumento de los ácidos grasos libres (AGL) circulantes<sup>(34-36)</sup>. Estos AGL interfieren con las vías de comunicación de la insulina<sup>(21,34)</sup> y actúan como agentes pro-inflamatorios a nivel sistémico, contribuyendo a la cascada de eventos que culminan en la alteración del metabolismo energético<sup>(27,31,36)</sup>. Además, el exceso de AGL favorece el acúmulo ectópico de lípidos en tejidos como el hígado, el músculo o los vasos sanguíneos, dando lugar a alteraciones específicas en estos tejidos<sup>(19,35,37)</sup>.

Las alteraciones inmunometabólicas asociadas a la obesidad han sido un campo de interés creciente en los últimos 20 años. No obstante, aunque tenemos evidencia que apoya el concepto general de la adiposopatía, a nivel molecular existen mecanismos de regulación locales y sistémicos altamente complejos cuyas bases fisiopatológicas e implicaciones clínicas aún no han podido ser del todo aclaradas, y que sin duda serán objeto de nuevas investigaciones en los próximos años.

## 1.2. TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD

En términos generales, el tratamiento de la obesidad tiene como objetivo la reducción del peso del individuo. Sin embargo, la pérdida ponderal no persigue simplemente la corrección de factores o medidas antropométricas, sino que está dirigida a conseguir una mejoría del estado inmunometabólico del paciente. Es decir, el objetivo de la pérdida ponderal sería mejorar el complejo conjunto de alteraciones metabólicas que conocemos como “adiposopatía” y sus consecuencias deletéreas para la salud del paciente con obesidad. De hecho, sabemos que la pérdida de peso se asocia a una disminución del riesgo cardiovascular y a la mejoría o incluso resolución de enfermedades tales como la DM2, la DLP, la HTA y el SAHS<sup>(2)</sup>. Una disminución ponderal del 5-10% se ha asociado a un descenso de 1.0% en los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c) y a una disminución de la necesidad de fármacos hipoglucemiantes, así como a la disminución de las cifras de tensión arterial y el uso de medicación antihipertensiva<sup>(38)</sup>. Una disminución mantenida de peso mucho menos significativa, de tan solo entre 2.5 y 5 kgs, tendría también beneficios metabólicos notables, y se ha asociado a la mejoría del perfil lipídico y a una disminución significativa del riesgo de sufrir DM2 de hasta el 60%. Además, la reducción en el peso se asocia también a una disminución de la incidencia de patología neoplásica en los pacientes con obesidad, a una mejoría del dolor articular, de la capacidad funcional y en definitiva a un incremento notable de la calidad de vida<sup>(2,38)</sup>.

En relación con las estrategias de pérdida ponderal, debemos distinguir dos grandes grupos o tipos de tratamiento de la obesidad: los tratamientos médicos, basados en la intervención

nutricional o dietética y las modificaciones en el estilo de vida, y los tratamientos quirúrgicos, basados en estrategias intervencionistas para conseguir la disminución ponderal y la corrección de la adiposopatía.

### 1.2.1. TRATAMIENTO MÉDICO

El tratamiento médico ha demostrado efectividad en el tratamiento de la obesidad, consiguiendo tanto una reducción ponderal como una mejoría de las comorbilidades en estos pacientes<sup>(38,39)</sup>.

El manejo médico se basa en una estrategia terapéutica formada por tres pilares fundamentales de intervención<sup>(38)</sup>:

1. Reducción del aporte calórico: Típicamente se recomienda un déficit del aporte energético requerido en un 30% o una reducción de  $\geq 500-750$  kcal/d, que en términos genéricos correspondería a un aporte aproximado de 1200 a 1500 kcal/d para las mujeres y de 1500 a 1800 kcal/d para los hombres. No obstante, el cálculo concreto del aporte calórico debe realizarse de forma individualizada de acuerdo al peso de cada individuo y al nivel de actividad física).
2. Aumento de la actividad física: la recomendación general consiste en realizar ejercicios aeróbicos durante un tiempo  $\geq 150$  min/sem (lo que equivaldría a  $\geq 30$  min/d al menos 5 días/sem). Niveles superiores de actividad (200-300 min/sem) se recomiendan para mantener la pérdida ponderal o minimizar la reganancia de peso a largo plazo (más allá de los 12 meses).
3. Terapia conductual y estrategias para facilitar la adherencia a las recomendaciones dietéticas y del estilo de vida: En general se recomiendan programas estructurados de auto-monitorización de la ingesta, la actividad física y el peso combinado con controles preferentemente presenciales, que deben ser frecuentes ( $> 14$  sesiones/6 m) y mantenerse a largo plazo a intervalos mayores para prevenir la reganancia ponderal.

Con una estrategia médica óptima, intensiva, desarrollada por especialistas y con controles frecuentes, se puede conseguir una pérdida ponderal de alrededor de unos 8 kgs o un 5-10% del peso inicial en un periodo de 6-12 meses. Sin embargo, una cierta reganancia ponderal es frecuente e incluso esperable en estos programas. Aunque no se ha establecido la duración mínima de la intervención para el mantenimiento de la pérdida ponderal, un programa de seguimiento y recomendaciones periódicas hasta al menos 2.5 años tras la intervención inicial ha demostrado reducir la reganancia ponderal en estos pacientes. Aún así, los resultados ponderales tras una intervención médica óptima a largo plazo demuestran que únicamente un 35%-60% de los pacientes mantiene una pérdida  $\geq 5\%$  del peso inicial a los 2 años de la intervención.

## 1.2.2. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

La cirugía bariátrica (etimológicamente “relativa al tratamiento de lo pesado”) nació en los años 50 de la mano de Kremen <sup>(40)</sup>, quién observó que los pacientes que, por diferentes motivos, habían requerido una resección intestinal amplia, tenían problemas malabsortivos y perdían peso a pesar de que aumentaran su aporte calórico. Estas observaciones dieron lugar en las décadas siguientes al desarrollo de una serie de técnicas quirúrgicas que se basaron bien en limitar la absorción de nutrientes mediante secciones y derivaciones del tracto intestinal (técnicas a las que se denominó *malabsortivas*), o bien en limitar capacidad del tracto digestivo y especialmente del estómago (técnicas *restrictivas*). Sin embargo, en los últimos 20 años, los avances en la comprensión de la fisiopatología de la obesidad y de los cambios fisiopatológicos derivados de la intervención sobre el tracto gastrointestinal han hecho que se abandone esta clasificación, que no refleja los mecanismos (aún no del todo conocidos) ni los objetivos actuales del tratamiento quirúrgico de la obesidad. Las intervenciones ya no se consideran *malabsortivas*, *restrictivas* o *mixtas*, sino que la *cirugía bariátrica* ha pasado a entenderse como una *cirugía metabólica*. De esta forma, el objetivo inicial de pérdida ponderal ha sido substituido por unos objetivos metabólicos de corrección de la adiposopatía y de resolución de las comorbilidades derivadas de un estado metabólico alterado en el paciente con obesidad.

### 1.2.2.1. Principales técnicas quirúrgicas

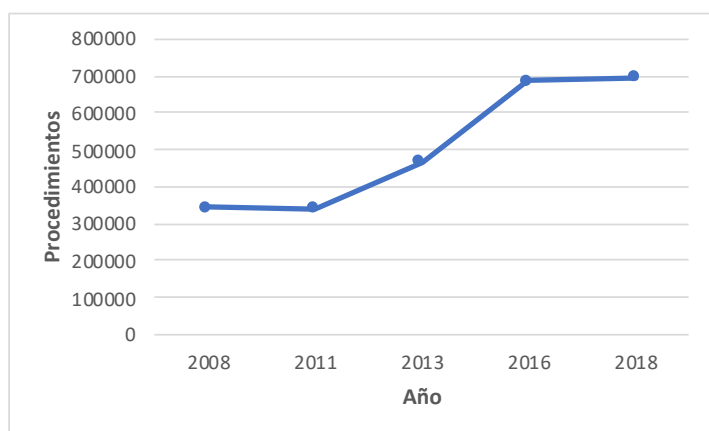
De acuerdo con lo establecido en las Guías Europeas sobre Cirugía Bariátrica y Metabólica avaladas por la International *Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders* (IFSO) y la *European Association for the Study of Obesity* (EASO), los procedimientos actualmente disponibles y aceptados para la pérdida de peso y el control metabólico de los pacientes con obesidad son los siguientes:

- Banda gástrica ajustable (BGA)
- Gastrectomía vertical (GV)
- By-pass gástrico en Y-de-Roux (RYGB)
- Derivación bilio-pancreática (DBP)
- By-pass duodenal/cruce duodenal (BPD/CD)

Existen otras muchas técnicas de las cuales no se dispone de resultados a largo plazo y cuya recomendación e indicaciones aún deben ser evaluadas, como la plicatura gástrica laparoscópica o el by-pass gástrico en omega. El by-pass duodeno-ileal de anastomosis única con gastrectomía vertical (SADI-S) es un tipo de CD modificado que también se considera una de las técnicas sobre las que se requiere una mayor evidencia a largo plazo antes de establecer su indicación. Otros procedimientos, como las intervenciones de interposiciones intestinal o los dispositivos endoluminales, se consideran aún exclusivamente experimentales <sup>(41)</sup>.

Según datos de la International *Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders* (IFSO), en los últimos 15 años se han duplicado los procedimientos de CB realizados en el mundo (**Figura 3**). De entre todos los procedimientos descritos, sin duda los dos más utilizados son el

RYGB laparoscópico (LRYGB) y la GV laparoscópica (GVL) (**Figura 4**), que hoy en día suponen aproximadamente el 90% de los procedimientos realizados en el mundo (**Figura 5**)<sup>(42)</sup>.



**Figura 3. Procedimientos de cirugía bariátrica realizados en el mundo,** según datos de la encuesta realizada por la *International Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders* (IFSO) en 2018<sup>(42)</sup>.

### Bypass gástrico en Y-de-Roux

El RYGB fue introducido por primera vez en la práctica clínica en 1967 de la mano de Mason, quién lo describió como una variante de la reconstrucción tipo Billroth II utilizada tras la antrectomía como tratamiento de la úlcera gástrica<sup>(43)</sup>. En 1977, Griffin adoptó la configuración “en Y de Roux”<sup>(44)</sup>, una de las principales modificaciones del procedimiento que tras medio siglo de variaciones nos llevarían a la técnica actual. La última gran modificación del procedimiento llegó con la introducción de las técnicas mínimamente invasivas, cuando en 1993 Wittgrove y Clark describieron el RYGB laparoscópico<sup>(45)</sup>. Aunque desde su descripción se han producido múltiples variaciones, la técnica, que rápidamente se convirtió en el procedimiento de referencia para la mayoría de grupos<sup>(46,47)</sup>, consiste en la creación de una bolsa o “pouch” gástrico de unos 25-30 ml de volumen seguido de la sección de la primera asa yeyunal (a unos 30 cms del ángulo de Treitz) y la posterior reconstrucción del tránsito intestinal. Esta reconstrucción del tránsito se realiza mediante la disposición de las asas “en Y de Roux”, confeccionando una anastomosis gastro-yeyunal (entre el cabo distal del asa yeyunal y el pouch gástrico) y una anastomosis yeyuno-yeyunal o “pie de asa” (entre el cabo proximal del asa yeyunal, portadora de las secreciones bilio-pancreáticas, y el yeyuno distal, a unos 150 cms de la anastomosis gastro-yeyunal). De este modo, la técnica, combina el efecto restrictivo de la reducción del tamaño del estómago con el efecto malabsortivo derivado de disminuir la longitud del tramo de intestino delgado donde se producirá la absorción de nutrientes, que queda reducida al tramo distal a la anastomosis yeyuno-yeyunal o “asa común”, donde convergen el contenido alimentario y las secreciones bilio-pancreáticas<sup>(48)</sup>.

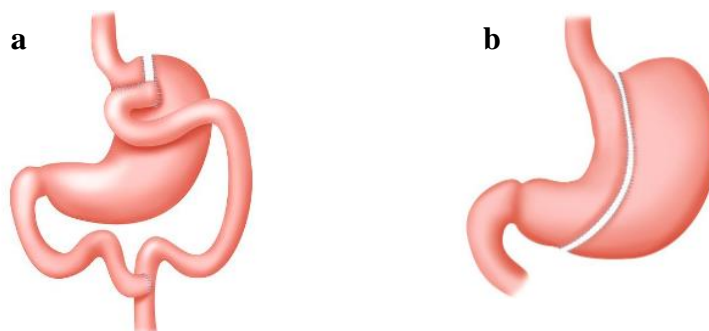
### Gastrecomía vertical

La GVL es un procedimiento técnicamente más sencillo, creado como una adaptación resectiva por vía laparoscópica del procedimiento de Magenstrasse y Mill. La técnica fue inicialmente

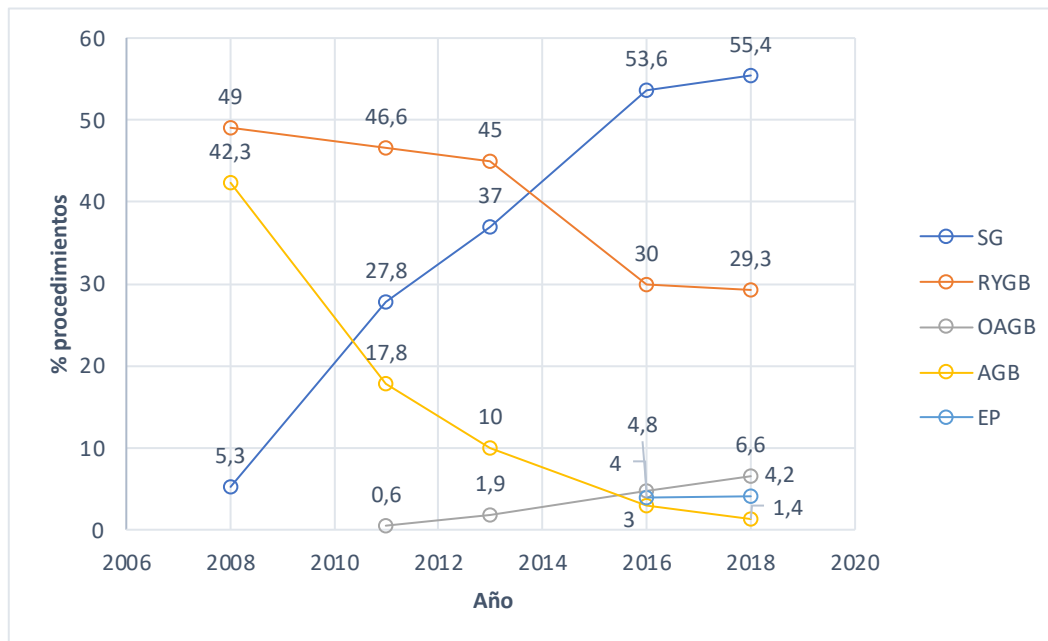
descrita en los años 80 como una modificación de la gastrectomía realizada en el contexto de una DBP con CD. Posteriormente, ya en el siglo XXI, se utilizó como el primer tiempo de un procedimiento en dos fases en pacientes con super-obesidad ( $\text{IMC} \geq 60 \text{ kg/m}^2$ ) o que por su elevado riesgo quirúrgico se consideraba que no podían ser sometidos a un LRYGB<sup>(49)</sup>. El objetivo fue inicialmente producir una pérdida ponderal inicial que permitiera reducir el riesgo quirúrgico y posibilitara una cirugía más compleja en un segundo tiempo. La técnica consiste en una gastrectomía restrictiva en forma tubular mediante la cual se reseca el 80% del volumen del estómago a expensas de la curvatura mayor. Tras la pérdida ponderal inicial, se podía plantear una conversión a LRYGB o CD. Sin embargo, los resultados ponderales y metabólicos de los pacientes sometidos a GVL eran a menudo satisfactorios, hasta el punto que el segundo tiempo quirúrgico que pretendía añadir un componente malabsortivo a la intervención no se llegaba a realizar por estimarse innecesario en muchos de los casos.

La evolución favorable de los pacientes sometidos a GVL se recibió con gran sorpresa en el mundo de la CB, donde tradicionalmente se había relacionado el éxito de los procedimientos con el componente malabsortivo<sup>(46)</sup>. De hecho, la GVL ha demostrado conseguir resultados significativamente mejores que otros procedimientos restrictivos, siendo incluso comparables a los obtenidos por el *gold standard* de la CB, el LRYGB<sup>(50,51)</sup>. El éxito de la técnica se ha relacionado con diferentes mecanismos fisiopatológicos relacionados con el aumento de péptidos similares al glucagón tipo 1 (GLP1), el descenso de la ghrelina y otros mecanismos hormonales aún desconocidos, que sitúan a la GVL en la esfera de la regulación inmunometabólica más allá de los efectos puramente restrictivos<sup>(50)</sup>.

Los buenos resultados como técnica única han hecho que en los últimos años la GVL haya ganado popularidad tanto entre los pacientes como entre los cirujanos, por lo que en los últimos 15 años se ha producido un enorme aumento en el uso y la indicación de esta técnica<sup>(42,52)</sup> (**Figura 5**). De hecho, en la actualidad la GVL ha superado al LRYGB en número de intervenciones y supone ya más del 50% de los procedimientos de CB realizados en todo el mundo<sup>(50)</sup>.



**Figura 4. Principales técnicas quirúrgicas en cirugía bariátrica. a.** Bypass gástrico en Y-de-Roux; **b.** Gastrectomía vertical (de <https://www.nhs.uk/conditions/weight-loss-surgery/types/>).



**Figura 5. Tendencias en cirugía bariátrica.** Evolución del número de procedimientos realizados en el mundo respecto a las principales técnicas en CB, según la encuesta realizada por la *International Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders (IFSO)* en 2018<sup>(42)</sup>. SG: Sleeve gastrectomy, RYGB: Roux-en-Y Gastric Bypass, OAGB: One Anastomosis Gastric Bypass, AGB: Adjustable Gastric Band, EP: Experimental Procedures. Adaptada de Angrisani et al, *Obesity Surgery* 2021.

### SADI-S (Single anastomosis duodeno-ileal bypass with sleeve gastrectomy)

Se trata de una técnica descrita en 2010 por el Dr. Sánchez-Pernaute<sup>(53)</sup>, considerada una modificación simplificada del cruce duodenal con el objetivo de disminuir el tiempo quirúrgico y el riesgo de complicaciones post-operatorias.

Se trata de un procedimiento en el que inicialmente se realiza una gastrectomía vertical, seguida de una anastomosis duodeno-ileal con preservación del píloro, exclusión yeyunal y creación de un asa común alimentaria (originalmente de 200cms, posteriormente estandarizada a unos 300 cms para disminuir el riesgo de déficits nutricionales) (**Figura 6**).

El SADI-S puede realizarse como cirugía primaria directa, planificada en dos tiempos o como procedimiento revisional en caso de fracaso terapéutico tras la gastrectomía vertical<sup>(54)</sup>.

Cabe decir que, a pesar de las potenciales ventajas del SADI-S, hoy en día representa un pequeño porcentaje de los procedimientos de CB realizados y existe todavía poca literatura que describa sus resultados en grandes series homogéneas. A pesar de que existe cierta evidencia sobre la seguridad del procedimiento y sobre su efectividad tanto a nivel de la pérdida ponderal como de la mejoría metabólica<sup>(54-56)</sup>, el SADI-S se considera aún una de las técnicas sobre las que se requiere una mayor evidencia a largo plazo para poder establecer su indicación específica<sup>(41)</sup>.

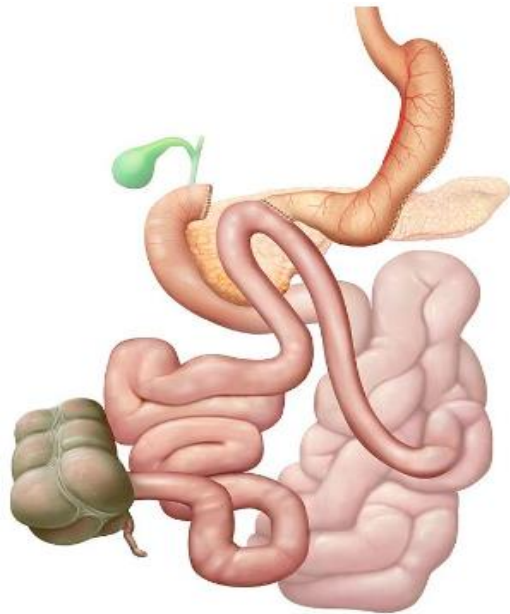


Figura 6. Single anastomosis duodeno-ileal bypass with sleeve gastrectomy (SADI-S) (de <https://www.iqlacy.com/que-operamos/obesidad-morbida/tecnicas-avanzadas-la-cirugia-la-obesidad-morbida/>).

#### 1.2.2.2. Indicaciones de cirugía bariátrica

Desde los años 90 y hasta 2022, se consideró indicada la cirugía bariátrica o metabólica en pacientes entre 18 y 60 años con las siguientes características<sup>(41)</sup>:

- IMC  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup>
- IMC 35–40 kg/m<sup>2</sup> con comorbilidades en las que la pérdida de peso inducida quirúrgicamente pueda suponer una mejoría significativa (enfermedades metabólicas, cardio-respiratorias, artropatías severas, trastornos psicológicos severos relacionados con la obesidad, etc.).

El IMC utilizado como criterio para la cirugía puede ser el IMC actual o el IMC máximo alcanzado previamente. Se debe tener en cuenta que la pérdida ponderal preoperatoria como resultado de un tratamiento médico intensificado (llegando a un IMC por debajo del establecido como criterio para la indicación de CB) no constituye una contraindicación para la CB previamente indicada. La CB tiene indicación en aquellos pacientes que muestran una pérdida de peso significativa con un programa de tratamiento conservador, pero que muestran una reganancia ponderal a medio-largo plazo. En individuos de origen asiático, el límite de IMC debe reducirse en 2.5 puntos para compensar factores genéticos, ambientales y dietéticos en esta población.

No obstante, durante la redacción del presente trabajo fueron publicadas las nuevas recomendaciones respecto a las indicaciones de procedimientos en cirugía bariátrica y metabólica por parte de la *American Society for Metabolic and Bariatric Surgery* (ASMBS) y de la *International Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders* (IFSO)<sup>(57)</sup>, las cuales en 2022 establecieron un límite menor respecto al IMC para considerar la indicación de CB:



- IMC > 35 kg/m<sup>2</sup>
- IMC 30 - 35 kg/m<sup>2</sup> con comorbilidades asociadas en las que la pérdida de peso inducida quirúrgicamente pueda suponer una mejoría significativa (DM2, HTA, DLP, SAHS, enfermedades cardiovasculares, asma, NAFLD, enfermedades renales, síndrome del ovario poliquístico, infertilidad, enfermedad por reflujo gastro-esofágico, *pseudotumor cerebri* o artropatía severa).

En individuos de origen asiático, el límite de IMC debe reducirse en 2.5 puntos para compensar factores genéticos, ambientales y dietéticos en esta población. Dado que no existe evidencia a favor de establecer un límite de edad para la indicación de CB, se recomienda una selección de los pacientes teniendo en cuenta la evaluación de la fragilidad.

### 1.2.2.3. Elección de la técnica quirúrgica

Respecto a la elección de la técnica quirúrgica, de acuerdo con la evidencia actual se considera que no existen datos concluyentes sobre cómo asignar un procedimiento bariátrico o metabólico determinado a cada paciente <sup>(41)</sup>.

En la selección de la técnica quirúrgica deben considerarse factores como las comorbilidades y el control metabólico del paciente, la presencia de hernia hiatal o enfermedad por reflujo gastroesofágico, la necesidad de tratamiento farmacológico por otras enfermedades, la experiencia del cirujano y los deseos y expectativas del paciente.

En general, a pesar de la falta de evidencia concluyente en este sentido, se considera que la mejoría de las comorbilidades, la pérdida ponderal y el mantenimiento del peso a largo plazo serían mayores tras la DBP, seguidas por el CD, LRYGB, GVL y finalmente BGA. Paralelamente, la complejidad quirúrgica y las potenciales complicaciones postquirúrgicas o metabólicas a largo plazo seguirían este mismo orden decreciente entre las técnicas mencionadas. Así pues, a pesar de que los resultados postquirúrgicos de la GVL se han demostrado comparables a los del LRYGB <sup>(58)</sup>, la tendencia actual en la práctica clínica suele ser la de proponer la GVL en lugar del LRYGB a los pacientes con menor exceso de peso o menos comorbilidades asociadas a la obesidad <sup>(59)</sup>. Cabe destacar que, al ser la GVL una técnica más sencilla y más rápida frente al LRYGB, ésta suele considerarse una opción más adecuada en los pacientes de mayor riesgo quirúrgico <sup>(60)</sup>. Contrariamente, al ser una técnica que preserva el píloro y que por tanto puede favorecer una elevada presión intra-gástrica, la presencia de enfermedad por reflujo gastroesofágico se considera una contraindicación relativa de la GVL, y el esófago de Barret se considera actualmente una contraindicación absoluta de la técnica <sup>(61,62)</sup>.

### 1.2.2.4. Resultados de la cirugía bariátrica

La efectividad de las técnicas quirúrgicas en el tratamiento de la obesidad ha sido ampliamente reportada en la literatura <sup>(58,63-67)</sup>. En 2004, un metaanálisis con más de 20.000 pacientes evaluando el efecto de diferentes técnicas quirúrgicas reportó una pérdida ponderal media del 61% del exceso de peso, con una resolución de comorbilidades tales como la HTA, DM2, DLP y

SAHS superior al 70% con una mortalidad del 0.5%<sup>(65)</sup>. De la misma forma, otro metaanálisis más reciente incluyendo más de 160.000 pacientes intervenidos entre 2003 y 2012 reportó resultados similares<sup>(67)</sup>.

En los últimos años, el tratamiento quirúrgico ha demostrado ser el tratamiento más efectivo de la obesidad mórbida tanto en términos metabólicos como ponderales<sup>(41,68-71)</sup>. En 2014, un metaanálisis de 16 estudios (5 ECR) incluyendo más de 6000 pacientes con un seguimiento de 18 meses concluyó que los pacientes sometidos a CB tenían una pérdida ponderal significativamente mayor, una mejoría en el metabolismo glicídico y entre 10-15 veces más probabilidades de conseguir una remisión de la DM2 en comparación con el tratamiento médico<sup>(70)</sup>. En el mismo sentido, los resultados del estudio prospectivo randomizado “*Surgical Treatment and Medications Potentially Eradicate Diabetes Efficiently*” (STAMPEDE) al año<sup>(71)</sup>, a los 3 años<sup>(68)</sup> y 5 años después de la CB<sup>(69)</sup> demostraron una superioridad de las dos técnicas quirúrgicas más utilizadas (RYGBP y GV) respecto al tratamiento médico en cuanto a la pérdida ponderal, el control glicémico, la mejoría del perfil lipídico, la reducción del tratamiento farmacológico y el aumento de la calidad de vida de los pacientes. De hecho, a los 5 años el 88% de los pacientes sometidos a CB en este estudio presentaban un control glicémico considerado entre aceptable y muy bueno sin requerimiento de insulina, y la mayoría de pacientes con una HbA1c  $\leq 6.0\%$  no requerían tratamiento hipoglucemiante alguno, objetivo que no se alcanzó en ninguno de los pacientes sometidos a tratamiento médico. Otros estudios recientes con seguimiento a largo plazo han demostrado una reducción de la mortalidad en los pacientes sometidos a CB, además de una menor aparición de comorbilidades asociadas, con la consecuente disminución en la utilización de recursos sanitarios<sup>(72,73)</sup>.

Cabe destacar que existe evidencia de los efectos tempranos de la cirugía metabólica, que preceden a la pérdida ponderal. Se ha demostrado una rápida mejoría postquirúrgica en los valores de HbA1c, HOMA-IR (*homeostatic model assessment of insulin resistance*), colesterol LDL, tensión arterial y una reducción general del riesgo cardiovascular independientes de la pérdida ponderal<sup>(74-78)</sup>. Sin embargo, los mecanismos exactos que producen este cambio metabólico en relación con cada una de las técnicas quirúrgicas es un amplio campo de estudio que comprende mecanismos múltiples y complejos, los cuales no están a día de hoy completamente definidos<sup>(41)</sup>.

Respecto a las diferencias entre las técnicas quirúrgicas, el mayor cuerpo de evidencia disponible acerca de los resultados metabólicos y ponderales se refiere al LRYGB, debido a que se trata de la técnica más antigua. No obstante, existen al menos dos metaanálisis basados en estudios aleatorizados que han descrito resultados clínicos similares con otras técnicas<sup>(58,64)</sup>. Otros metaanálisis han evidenciado una mayor pérdida ponderal a largo plazo en los pacientes sometidos a LRYGBP en comparación con la GV. Sin embargo, en este mismo estudio no se evidenciaron diferencias entre las técnicas respecto a la resolución de comorbilidades<sup>(79)</sup>. Respecto al SADI-S, a pesar de que existe una evidencia limitada a largo plazo, en un metaanálisis reciente se ha descrito una pérdida ponderal y una resolución de la diabetes comparable a otras técnicas malabsortivas, evidenciándose una mayor resolución de la diabetes en comparación con el LRYGBP<sup>(56)</sup>. Otro metaanálisis publicado en 2023 señaló una mayor pérdida ponderal y una mayor tasa de remisión de la diabetes en los pacientes sometidos a SADI-S en comparación

con el LRYGBP <sup>(80)</sup>. Otros estudios que comparan los resultados tras el LRYGBP con la GVL han señalado la importancia de la severidad y la duración pre-operatoria de la diabetes como uno de los factores asociados a los resultados metabólicos tras la CB, más allá de la realización de una técnica quirúrgica concreta <sup>(81)</sup>.

## 1.3. EL TEJIDO ADIPOSO Y LA MATRIZ EXTRACELULAR

### 1.3.1. ESTRUCTURA DE LA MEC EN EL TEJIDO ADIPOSO

La MEC es una estructura compleja compuesta por diferentes proteínas, proteoglicanos y polisacáridos, que proporciona un soporte para las células y modula los procesos biológicos en los tejidos mediante la regulación de los procesos de adhesión celular, migración, regeneración y apoptosis entre otros. El papel de la MEC en la regulación de la adhesión celular y la activación de vías de señalización dependen en gran medida de las integrinas, que actúan como transductores de señal a través de la membrana plasmática para activar diferentes vías de señalización intracelular <sup>(30,82)</sup>.

Dado que el tejido adiposo de los pacientes con obesidad se caracteriza por una gran expansión adipocítica, la remodelación y reorganización de la MEC resulta crucial para permitir el aumento de tamaño de los adipocitos (hipertrofia) y la formación de nuevos adipocitos a partir de células precursoras (hiperplasia). Además, la MEC interviene en la formación de nuevos vasos sanguíneos, punto fundamental en un tejido adiposo sano. Como se ha comentado previamente, la limitada respuesta angiogénica en el tejido adiposo enfermo y las condiciones de hipoxia relativa dan lugar a la necrosis del adipocito y la consecuente inflamación, fibrosis y finalmente a las alteraciones inmunometabólicas que conducen a la resistencia a la insulina.

En el tejido adiposo, la MEC está formada básicamente por colágenos, fibronectina y una pequeña proporción de laminina <sup>(83)</sup>. No obstante, existen gran cantidad de componentes y moléculas reguladoras que tienen un importante papel en la remodelación de la MEC y por tanto en la función y regulación del tejido adiposo. A continuación, se describen brevemente estos componentes, receptores y reguladores principales de la MEC.

#### 1.3.1.1. Componentes de la MEC

##### Colágenos

El colágeno (tipos I, II, III, IV) es el principal componente estructural de la MEC. Es producido principalmente por los adipocitos, pero también por los pre-adipocitos, células endoteliales y *stem cells* presentes en el tejido adiposo.

Dado que los adipocitos maduros almacenan energía en forma de triglicéridos, la matriz de colágeno proporciona un fuerte esqueleto externo que soporta el estrés mecánico del adipocito. Además, los colágenos intervienen en los procesos de adhesión, diferenciación y cicatrización en el tejido adiposo <sup>(82)</sup>.

El colágeno tipo IV se encuentra en la membrana basal de los adipocitos <sup>(30)</sup>, mientras que el colágeno tipo I es el componente más abundante de la MEC <sup>(84)</sup>.

En la obesidad, el acúmulo de colágeno en el tejido adiposo da lugar a fibrosis y aumento de la rigidez, limitando la capacidad de expansión del adipocito. Estos cambios se han relacionado con la presencia de insulinoresistencia <sup>(85)</sup>.

### Osteopontina (OPN)

Proteína estructural de la MEC, principalmente expresada en los macrófagos del tejido adiposo <sup>(86)</sup>. La osteopontina se encuentra elevada en el tejido adiposo de las personas con obesidad <sup>(87)</sup>, y la delección de este gen en ratones ha demostrado prevenir la inflamación e infiltración por macrófagos del tejido adiposo, mejorando la sensibilidad a insulina <sup>(88)</sup>. Recientemente, ciertos estudios han señalado una elevación de la osteopontina plasmática en pacientes con DM2 <sup>(89)</sup>.

### Ácido hialurónico (HA)

Glucosaminoglicano lineal que promueve la quimiotaxis y adhesión de monocitos mediante la unión al receptor CD44 <sup>(90,91)</sup>. El ácido hialurónico se encuentra aumentado en ratones obesos, y la inhibición de esta molécula mejora la inflamación y resistencia insulínica en ratones <sup>(58,92)</sup>.

### Trombospondina 1 (THBS1):

Proteína de la familia de las trombospondinas, con funciones antiangiogénicas y antitumorales.

La trombospondina-1 es una glicoproteína de adhesión con múltiples dominios que actúa como mediadora en las interacciones célula-célula y célula-MEC. Se une a fibronectina, laminina y a los colágenos tipo V y VII entre otros. Se expresa predominantemente en el TAV.

La trombospondina-1 se ha relacionado con la modulación tanto positiva como negativa de los procesos de adhesión migración y crecimiento de las células endoteliales. De hecho, esta proteína interacciona con al menos 12 receptores relacionados con la adhesión celular, incluyendo CD36 (actúa como ligando de CD36 activando una respuesta antiangiogénica), integrinas- $\alpha$ V y  $\beta$ 1, sindecano y proteína asociada a integrinas (IAP o CD47). También interacciona con múltiples proteasas relacionadas con la angiogénesis como el plasminógeno, la urokinasa, las metaloproteinasas de matriz (MMP's), la trombina, la catepsina y la elastasa.

Tiene un papel en la agregación plaquetar y también en la respuesta adaptativa al estrés del retículo endoplasmático por medio de la interacción con ATF6 (*activating transcription factor 6 alpha*).

Se ha descrito la sobreexpresión de *THBS1* asociada a la obesidad, y su expresión se encuentra elevada en pacientes afectados de obesidad con resistencia a la insulina<sup>(30)</sup>. En ratones, la dieta rica en grasas induce la expresión de *THBS1* en el tejido adiposo y aumenta los niveles de THBS1 circulante<sup>(93)</sup>. La delección del gen *THBS1* en ratones ha demostrado ser un factor protector contra la inflamación del tejido adiposo y la resistencia insulínica inducida por dieta<sup>(93)</sup>.

### 1.3.1.2. Integrinas y otros receptores de la MEC

#### Integrinas

Las integrinas son receptores heterodiméricos transmembrana compuestos por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . En los mamíferos, existen 18 tipos de subunidades  $\alpha$  y 8 tipos de subunidades  $\beta$ , que se combinan para dar lugar a 24 integrinas distintas<sup>(94)</sup>.

Las integrinas son los principales receptores implicados en la adhesión celular a las proteínas de la MEC y también en ciertas uniones célula-célula. Desde su descubrimiento por parte de Hynes et al. en 1987<sup>(95)</sup>, estos receptores de membrana han despertado interés por su papel en la adhesión celular y en la activación de vías de señalización intracelular.

Las integrinas están formadas por un gran dominio extracelular de unión al ligando, un dominio trans-membrana y un pequeño dominio intracelular indirectamente asociado con el esqueleto acto-miosínico. Existen diferentes sub-familias de integrinas en función de su dominio extracelular, incluyendo receptores de colágeno, receptores de laminina, receptores Arg-Gly-Asp (RGD) y receptores específicos de leucocitos<sup>(94)</sup>.

Para la activación de las integrinas, es necesario un cambio del receptor adoptando una conformación “abierta”, lo cual requiere de la acción de proteínas adaptadoras intracelulares tales como las talinas y kindilinas<sup>(96,97)</sup>. Sin embargo, las integrinas no tienen actividad quinasa propia, por lo que la señalización intracelular depende de la actividad de moléculas como FAK (*quinasa de adhesión focal*) e ILK (integrina ligada a quinasa).

Aunque el papel de las integrinas en el tejido adiposo en la obesidad aún no está bien establecido, algunos estudios apuntan a un rol fundamental de las interacciones entre la MEC y los receptores de membrana en relación a las alteraciones inmunometabólicas objetivadas en la obesidad. En modelos animales transgénicos con DM2, la integrina  $\beta 1$  parece modular la actividad de GLUT 4, el principal transportador de glucosa dependiente de insulina del tejido adiposo<sup>(98)</sup>. La disminución de los niveles de ILK en ratones, se ha objetivado hiperglicemia e hiperinsulinemia asociadas a la infra-expresión de GLUT4<sup>(99)</sup>. Por otro lado las integrinas  $\beta 2$ , relacionadas con la función leucocitaria, se relacionan con la infiltración del tejido muscular por

parte de neutrófilos, lo cual se ha relacionado con un empeoramiento de la resistencia insulínica<sup>(100)</sup>. Por último, se cree que las integrinas podrían participar en la regulación del metabolismo glucídico a través de vías de señalización relacionadas con el estrés mecánico en determinados tejidos<sup>(101)</sup>.

## CD44

CD44 es una glicoproteína que actúa como receptor transmembrana. Se expresa en gran cantidad de tejidos y se une a componentes de la MEC, especialmente a ácido hialurónico y a osteopontina.

CD44 regula diferentes funciones celulares relacionadas con la interacción célula-MEC y la interacción célula-célula. Se han descrito una isoforma estándar (CD44s) y múltiples variantes (CD44v), las cuales se encuentran en algunos tejidos epiteliales y en situaciones patológicas<sup>(102)</sup>. Se han descrito tres tipos de acciones relacionadas con la actividad de este receptor: en primer lugar, la interacción con ligandos como HA, que puede activar diferentes vías de señalización a través de la interacción con receptores con actividad tirosin-quinasa o con el citoesqueleto celular actínico; en segundo lugar, CD44 presenta funciones como co-receptor que intervienen en la señalización mediada por receptores con actividad tirosin-quinasa. Por último, CD44 conecta la membrana plasmática y el citoesqueleto actínico<sup>(103)</sup>.

Los estudios disponibles sobre el papel de CD44 en el tejido adiposo en la obesidad se han centrado en la isoforma estándar (CD44s), mientras que las variantes en el tejido adiposo no han sido estudiadas<sup>(30)</sup>.

CD44 tiene un papel destacado en la inflamación a nivel del tejido adiposo y la aparición de la resistencia insulínica. La deficiencia de este receptor se ha relacionado con la mejoría del metabolismo glucídico y de la inflamación a nivel del tejido adiposo en ratones diabéticos, y el tratamiento con anticuerpos anti-CD44 disminuye el nivel de glucosa plasmática y también la infiltración por macrófagos en el tejido adiposo de ratones sometidos a dieta hipercalórica<sup>(104)</sup>.

En humanos, CD44 está fuertemente expresado en las células inflamatorias del tejido adiposo obeso y los niveles de CD44 en plasma se relacionan con la resistencia a la insulina. De hecho, tanto CD44 como OPN están altamente expresados en el tejido adiposo en condiciones de obesidad<sup>(105)</sup>. Por otro lado, un análisis de metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN) en humanos relacionó los fenómenos epigenéticos con la desregulación del TAV, siendo CD44 una de las moléculas identificadas relacionadas con la insulinoresistencia en los pacientes con obesidad<sup>(106)</sup>.

## CD36

También conocida como “translocasa de ácidos grasos”, CD36 es una proteína integral de membrana que se une a gran cantidad de ligandos incluyendo colágenos, THBS1, lipoproteínas

y ácidos grasos<sup>(107)</sup>. Este receptor facilita el transporte de AGL hacia el tejido adiposo en humanos<sup>(108)</sup>.

Los ratones sometidos a dieta hipercalórica con delección de CD36 muestran mejoría en el perfil insulínico y una reducción del infiltrado de macrófagos en el tejido adiposo comparado con los ratones con CD36<sup>(109,110)</sup>. Estudios de expresión génica han demostrado una sobreexpresión de CD36 en el TAM de pacientes diabéticos<sup>(111)</sup>.

El papel de CD36 en relación con la obesidad y el metabolismo glucídico ha sido mayoritariamente atribuido a su función como transportador de AGL. No obstante, se ha propuesto que la unión de CD36 a componentes de la MEC como THBS1 podría tener un importante papel en la transducción de señales y la activación de vías de señalización intracelular<sup>(112)</sup>.

### 1.3.1.3. Reguladores de la MEC

#### Metaloproteinasas de matriz (Matrix Metalloproteinases o MMP's)

Las MMP's pertenecen a la superfamilia de las metzincinas, metaloproteinasas dependientes de zinc que comprende las subfamilias MMP, ADAM (Desintegrina y metaloproteinasas) y ADAMTS (Desintegrina y metaloproteinasas con dominios trombospondina)<sup>(113)</sup>.

La subfamilia MMP está formada por endopeptidasas dependientes de calcio que contienen zinc, las cuales son responsables de la degradación de proteínas estructurales de la MEC<sup>(114)</sup>. Las MMP's juegan un papel fundamental en la regeneración de la MEC tanto en condiciones normales como patológicas, y participan en los procesos de cicatrización, regeneración tisular, angiogénesis y metástasis de células neoplásicas<sup>(114)</sup>. Algunos subtipos de MMP se han relacionado con procesos de apoptosis de algunos tipos celulares<sup>(115)</sup> y con la regulación de la transcripción de diferentes proteínas y factores de crecimiento<sup>(116)</sup>.

Los miembros de la familia MMP pueden dividirse en colagenasas (MMP1, -8 y -13), gelatinasas A y B (MMP2 y -9), estromalinas 1, 2 y 3 (MMP3, -10 y 11), matrilisina 1 y 2 (MMP7 y -26), MMP's de membrana (MT-MMP's: MMP14, -15, -16, -17, -24 y -25) y elastasa (MMP12)<sup>(117)</sup>.

Las MMPs son inhibidas por sus inhibidores endógenos, los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*), de forma que el equilibrio entre estas dos familias determina la actividad tisular "neta" de las MMPs. El desequilibrio o desregulación en las MMPs, sobrerreguladas en la obesidad, se ha relacionado con la fisiopatología de la obesidad y la DM2 en humanos<sup>(30,118)</sup>. La concentración plasmática de MMP2 y -9 se encuentra aumentada en pacientes con obesidad<sup>(118)</sup> y en los pacientes diabéticos<sup>(119)</sup>. Además, la expresión de *MMP9* en el tejido adiposo se correlaciona positivamente con el HOMA-IR en personas con obesidad<sup>(118)</sup>. Debido a la sobre-regulación de MMP's en la obesidad, se ha descrito una disminución en los niveles de elastina en el tejido adiposo de los pacientes con

obesidad. El análisis del tejido adiposo tanto visceral como subcutáneo en humanos y ratones sugiere la relación entre la sobrerregulación de *MMP12* y la obesidad así como la resistencia insulínica<sup>(120)</sup>. También se ha descrito un aumento de *MMP11* en el tejido adiposo de ratones obesos, que podría ser uno de los mecanismos tempranos relacionados con la disfunción del tejido adiposo<sup>(121)</sup>.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que las MMPs probablemente juegan un importante papel en la homeostasis del tejido adiposo en la obesidad. No obstante, la relación de cada MMP con sus sustratos específicos y sus implicaciones en relación a la obesidad y la resistencia insulínica no han sido claramente definidos<sup>(30)</sup>.

### Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases o TIMP's)

Familia de inhibidores tisulares endógenos y específicos de las MMP's. Existen cuatro tipos de TIMP's (TIMP-1 a -4)<sup>(122)</sup>.

Se han descrito niveles plasmáticos aumentados de TIMP1 y 2 en pacientes con DM2 y síndrome metabólico<sup>(119)</sup>. Por otro lado, la delección de *TIMP2* en ratones exacerba la inducción de obesidad mediante dieta rica en grasas en modelo murino<sup>(123)</sup>, mientras que la expresión de *TIMP3* se encuentra reducida en el tejido adiposo de ratones obesos<sup>(124)</sup>. Otros estudios han relacionado la delección de *TIMP3* con esteatosis hepática e inflamación a nivel del tejido adiposo en ratones<sup>(125)</sup>; por contra, la sobreexpresión de *TIMP3* en macrófagos los protege contra estas condiciones y mejora la resistencia insulínica<sup>(126)</sup>.

Estos datos sugieren que la actividad de las TIMP's tendría un efecto metabólico protector por contraposición a la actividad tisular de las MMP's, probablemente regulada por factores tisulares locales no del todo conocidos<sup>(30)</sup>. Los efectos beneficiosos asociados a la actividad de las TIMP's podrían deberse a la supresión de la actividad de MMP's y a la consecuente mayor estabilización de la MEC, o a su potencial efecto sobre la actividad de otras familias de proteasas como ADAM y ADAMTS<sup>(127)</sup>.

### ADAMTS (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1)

Pertenecientes también a la superfamilia de las metzincinas como las MMP's, se trata de una familia de metalopeptidasas que participan en la degradación de la MEC en diferentes tejidos. Utilizan el zinc como cofactor.

Las 19 proteínas ADAMTS descritas en el ser humano se clasifican en ocho categorías biológicas en base a la organización de sus dominios y a sus funciones conocidas. Las agreganasas (ADAMTS 1, 4, 5, 8, 15), además de sus funciones proteolíticas, tienen entre sus miembros proteínas con actividad anti-angiogénica como ADAMTS1 y 8 (aunque en otros subgrupos de ADAMTS se han descrito también efectos sobre la angiogénesis)<sup>(128)</sup>. ADAMTS2, 3 y 14 forman un grupo



relacionado con la maduración de las fibras de colágeno<sup>(129)</sup>. Otros subgrupos están formados por proteoglicanas (ADAMTS 9 y 20), e incluso existen algunas de las ADAMTS que conforman subgrupos llamados “huérfanos”, ya que el sustrato específico y función de cada una de estas proteasas no ha sido aún identificado (ADAMTS6, 10, 16, 18, 17 y 19)<sup>(128)</sup>.

Existe muy poca información sobre la relación entre la familia ADAMTS y la homeostasis glucídica. Se ha descrito una sobreexpresión de *ADAMTS5* durante el desarrollo de obesidad en ratones<sup>(130)</sup>, y también en ratas con obesidad inducida por dieta<sup>(131)</sup>. *Kozá* describió una correlación entre la expresión de *ADAMTS5* en el tejido adiposo y las diferencias en la masa adipocítica de ratones genéticamente idénticos C57BL/6J<sup>(132)</sup>, mientras que otros autores han relacionado la actividad de ADAMTS 5 con la adipogénesis y la expansión del tejido adiposo en el modelo murino<sup>(132,133)</sup>.

Actualmente los mecanismos mediante los cuales MMP's, TIMP's y ADAMTS intervienen en los desórdenes metabólicos asociados a la obesidad son en gran parte desconocidos.

### 1.3.2. ADIPOSOPATÍA Y REMODELACIÓN DE LA MEC

A pesar de que en la literatura existen numerosos estudios que relacionan tanto el depósito excesivo de componentes de la MEC como la activación de vías de señalización relacionadas con los receptores de MEC con la alteración inmunometabólica del paciente con obesidad, los mecanismos específicos que dan lugar a estos cambios a nivel del tejido adiposo no son completamente conocidos.

A continuación se exponen los principales factores que actualmente se consideran implicados en la relación entre MEC y adiposopatía (**Figura 7**).

#### 1.3.2.1. Inhibición de la angiogénesis en el tejido adiposo. El papel de HIF1 $\alpha$ .

Como se ha comentado previamente, el tejido adiposo en expansión requiere de una respuesta angiogénica adecuada. En la obesidad, en cambio, el potencial angiogénico se encuentra limitado por mecanismos que se creen relacionados con la MEC<sup>(30)</sup>.

En condiciones de obesidad, el factor inducible por hipoxia HIF1 $\alpha$  no da lugar a un aumento de la angiogénesis mediado por el factor de crecimiento endotelial vascular  $\alpha$  (VEGF $\alpha$ ), como sí sucede en el crecimiento tumoral<sup>(134)</sup>, sino que HIF1 $\alpha$  induce la activación de un programa transcripcional alternativo que da lugar a la síntesis de componentes estructurales de la MEC y a un aumento de la fibrosis tisular.

La respuesta antiangiogénica “paradójica” mediada por HIF1 $\alpha$  ha sido apoyada por hallazgos experimentales, como la prevención de la respuesta fibrótica en el tejido adiposo de ratones obesos tratados con PX-478, un inhibidor de HIF1 $\alpha$ , o bien mediante sobreexpresión de una variante dominante negativa de *HIF1 $\alpha$* <sup>(28)</sup>. De hecho, se ha observado que la respuesta a la

hipoxia en el tejido adiposo de ratones *ob/ob* se asocia paradójicamente con una disminución de la expresión del gen *VEGF $\alpha$*  y de la densidad vascular en ese tejido <sup>(135)</sup>.

La capacidad angiogénica del tejido adiposo se relaciona con la homeostasis glucídica. En ratones obesos sometidos a dieta hipercalórica, la inducción de la expresión de *VEG  $\alpha$*  en el tejido adiposo es capaz de revertir la intolerancia a la glucosa <sup>(136)</sup>, y la inhibición de *HIF1 $\alpha$*  en este modelo animal se ha asociado también con una mejoría metabólica.

Se ha propuesto la hipótesis de que la escasa angiogénesis en el tejido adiposo de las personas con obesidad podría condicionar un menor intercambio de insulina y otras hormonas, así como de citoquinas y adipoquinas entre la sangre y el tejido adiposo, lo que podría dar lugar a la resistencia insulínica por mecanismos similares a los descritos en otros tejidos como el músculo esquelético <sup>(137,138)</sup>.

En conjunto, estos hallazgos sugieren la presencia de mecanismos específicos en la obesidad que relacionan la hipoxia, la angiogénesis y la fibrosis. Dado que la fibrosis parece inhibir la capacidad angiogénica del tejido adiposo mediante la inhibición de la expresión de factores angiogénicos como *VEGF $\alpha$* , la hipótesis sobre la existencia vías de señalización inhibitorias de la angiogénesis mediada por la interacción entre ECM y receptor parecería razonable <sup>(30)</sup>. No obstante, no disponemos actualmente de datos sobre la regulación de la angiogénesis mediada por integrinas u otros receptores, por lo que son necesarios más estudios en este campo.

#### 1.3.2.2. Inducción de la muerte celular en el adipocito

Los componentes de la MEC no sólo proporcionan soporte estructural a los adipocitos, sino que regulan la proliferación y los procesos de muerte celular en el tejido adiposo.

La primera hipótesis sobre la relación de la fibrosis con la muerte celular en el tejido adiposo tiene que ver con la restricción física que los depósitos excesivos de componentes de MEC imponen a la expansión del adipocito, lo que causaría la muerte celular <sup>(139)</sup>. En segundo lugar, se ha propuesto que la interacción MEC – receptor (ya sean integrinas u otros) podría desencadenar la activación de vías de señalización relacionadas con la necrosis o apoptosis del adipocito <sup>(30)</sup>. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que, en ratones *ob/ob* sin colágeno VI (*Col6a1*), se ha observado una menor necrosis de los adipocitos, acompañada de la aparición de adipocitos de mayor tamaño y de una mejoría de la resistencia insulínica <sup>(139)</sup>. En el mismo estudio, la reducción de la muerte adipocitaria se asoció con una disminución significativa de una de las formas de Xbp1, un marcador de estrés del retículo endoplasmático que actúa como inductor de la apoptosis mediante la activación del factor de transcripción CHOP y la proteína-quinasa JNK <sup>(139)</sup>.

Los mecanismos propuestos sobre la señalización mediada por receptores relacionados con la MEC y su relación con la inducción de la muerte en el adipocito guardan cierto paralelismo con la fisiopatología tumoral. De hecho, muchos de los cambios observados durante la expansión

del tejido adiposo que tienen que ver con los componentes de la MEC, sus reguladores o sus receptores, se dan también durante el crecimiento tumoral. Estos cambios incluyen un depósito excesivo de algunos colágenos (I, II, III, V y IX) <sup>(140)</sup>, niveles aumentados de MMP's (MMP1, 2, 3, 7, 9, 12, 14, 21, 24, 25) y TIMP's (TIMP 1, 2 y 3) <sup>(141)</sup>, y el aumento de la señalización mediada por receptores de MEC como el descrito entre HA y el receptor CD44 <sup>(142)</sup>. No obstante, mientras que los cambios a nivel de la MEC en el caso de la expansión tumoral dan lugar al crecimiento celular, invasión y metástasis, en el caso de la expansión del tejido adiposo la consecuencia final sería la apoptosis. Si bien no se conocen las vías y mecanismos de regulación que podrían estar implicadas en este proceso, los avances en el conocimiento de la biología tumoral podrán sin duda contribuir a esclarecer la relación entre obesidad, fibrosis, apoptosis y homeostasis glucídica.

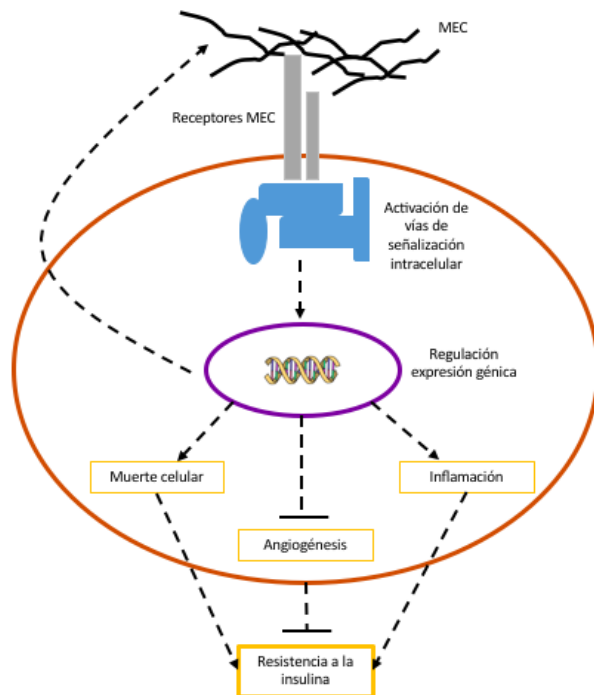
### 1.3.2.3. Inducción de la infiltración del tejido adiposo por macrófagos e inflamación

Independientemente de los mecanismos inductores de la muerte celular en la obesidad, la muerte del adipocito se ha relacionado con la inflamación y la infiltración del tejido adiposo por parte de macrófagos, que serían atraídos por el estímulo fagocítico del adipocito necrótico <sup>(143)</sup>. Por otro lado, algunos autores han propuesto que la interacción MEC – receptor podría activar vías de señalización intracelular que darían lugar a la regulación de genes relacionados con la inflamación y la quimiotaxis de células del sistema inmune <sup>(30)</sup>.

Estudios en modelo de obesidad murino han demostrado un aumento de la infiltración por macrófagos y de apoptosis adipocítica en ratones con una delección selectiva de la proteín-quinasa FAK en los adipocitos <sup>(144)</sup>. Dado que FAK es una tirosin-quinasa esencial en la proliferación celular cuya transmisión de señales depende de las integrinas, estos hallazgos sugieren un probable papel de FAK en la regulación de la expresión génica relacionada con la inflamación en el tejido adiposo.

Otros trabajos en ratones con obesidad inducida por dieta han mostrado que el tratamiento con hialuronidasa recombinante pegilada de origen humano disminuye no sólo el HA a nivel del tejido adiposo, sino también la expresión de marcadores pro-inflamatorios como TNF $\alpha$  <sup>(138)</sup>. La delección de *CD44*, el principal receptor de HA, también ha mostrado una disminución de la expresión de genes relacionados con la inflamación a nivel del tejido adiposo <sup>(145)</sup>. Estos datos sugieren que la activación de vías de señalización mediadas por HA – CD44 podrían regular la infiltración por macrófagos y la inflamación del tejido adiposo en ratones.

Por último, también se ha señalado que la delección del gen de la integrina  $\beta$ 2 protegería a los ratones con obesidad inducida por dieta de la resistencia insulínica, ya que evitaría la activación y proliferación de macrófagos en el tejido adiposo <sup>(146)</sup>.



**Figura 7. MEC y disfunción inmunometabólica.** Esquema representativo de los factores implicados en la relación entre matriz extracelular y disfunción inmunometabólica del tejido adiposo. *Adaptada de De Lin, Biochem Pharmacol, 2016* <sup>(30)</sup>.

#### 1.3.2.4. El origen celular del depósito excesivo de ECM: ¿adipocitos, preadipocitos o macrófagos?

La contribución cuantitativa de los distintos tipos celulares a los depósitos fibróticos del tejido adiposo en el paciente con obesidad es difícil de establecer. Sin embargo, parece claro que no existe un único tipo celular responsable de la síntesis de componentes de la MEC <sup>(147)</sup>.

Los preadipocitos y los macrófagos, aunque son superados por la gran masa adipocitaria en el tejido adiposo hipóxico, pueden incluso superar en número a los adipocitos y su papel en relación a los cambios fibróticos tisulares ha sido demostrado en numerosos trabajos <sup>(147)</sup>. Estudios *in vitro* sugieren que los preadipocitos, en contacto con células inflamatorias como los macrófagos, producen una gran cantidad de moléculas de la MEC como colágeno tipo I, fibronectina o su receptor la integrina  $\alpha 5$  entre otros <sup>(148)</sup>. Los macrófagos, por su parte, parecen actuar como reguladores de la producción de depósitos fibróticos. Los macrófagos producen mediadores solubles como TGF- $\beta 1$  y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés) que activan a los fibroblastos además de regular el balance entre las MMP's i sus inhibidores <sup>(149)</sup>. Estas células son también responsables de la secreción de citoquinas que regulan la fibrogénesis mediante la atracción de fibroblastos y células inflamatorias hacia el tejido adiposo. De hecho, dada su capacidad para estimular una respuesta tanto pro- como anti-fibrótica y su actividad reguladora en la activación de los fibroblastos, los macrófagos aparecen como uno de los actores principales en el proceso de fibrosis. Otros tipos celulares como los

mastocitos han sido también relacionados con el acúmulo de colágeno en el tejido adiposo, aunque se desconoce su función en relación a este proceso <sup>(150)</sup>.

Por último, la estrecha relación entre los adipocitos y los depósitos extracelulares de colágeno y otros componentes de la MEC no permiten excluir a los propios adipocitos como productores de los cambios fibróticos en el tejido adiposo de los pacientes con obesidad <sup>(151)</sup>. De hecho, existe una cierta semejanza entre los adipocitos y las células estrelladas responsables de los cambios fibróticos en el hígado. Estas células, en su estado quiescente o inactivo, expresan un perfil transcripcional similar al del adipocito <sup>(152)</sup>. En respuesta a diferentes estímulos, estas células estrelladas se diferencian en miofibroblastos y expresan un programa transcripcional profibrótico, lo cuál permite hipotetizar sobre la posible existencia de mecanismos similares en el adipocito (que sin embargo a día de hoy no han sido descritos).

## 1.4. EL PAPEL DE LAS CÉLULAS MESOTELIALES

En las últimas décadas ha sido ampliamente reportada la relación entre la localización de los diferentes depósitos adipocíticos y su efecto diferencial sobre el metabolismo energético <sup>(153,154)</sup>. Así pues, los individuos en que el exceso de adiposidad se presenta sobretodo a nivel del TAS presentan un menor riesgo cardiovascular que los individuos con una mayor proporción de grasa visceral <sup>(155)</sup>. Asimismo, la celularidad y los diferentes patrones de expansión del tejido adiposo en la obesidad son otro claro predictor de disfunción metabólica: mientras que la hipertrofia del TAV se relaciona con el síndrome metabólico, los mal llamados “obesos sanos” exhiben un fenotipo caracterizado por la presencia de adipocitos más numerosos y de menor tamaño a nivel del TAV, resultado del predominio de la expansión hiperplásica <sup>(156)</sup>.

Hasta la fecha, tanto el origen de los nuevos adipocitos durante la expansión del tejido adiposo como los factores celulares y moleculares que regulan el equilibrio entre los procesos de hipertrofia e hiperplasia en la población adipocitaria en los diferentes depósitos son en gran medida desconocidos. No obstante, en los últimos años han surgido numerosos estudios que apuntan a un origen diferencial de las distintas poblaciones en los distintos depósitos adipocíticos que podría contribuir a explicar sus diferencias funcionales en condiciones de obesidad <sup>(157,158)</sup>. En este contexto, las células mesoteliales aparecen como potenciales precursores adipocitarios y como uno de los actores principales en los procesos de remodelación e inflamación en el TAV <sup>(156)</sup>.

### 1.4.1. PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS MESOTELIALES

Las células mesoteliales son células planas y poligonales que forman una monocapa sobre la superficie visceral y parietal de las cavidades peritoneal, pleural y pericárdica <sup>(159)</sup>. Esta monocapa continua permite el transporte de fluidos entre cavidades, manteniendo la homeostasis de las cavidades que reviste. A pesar de que estas células poseen propiedades

comunes a las células epiteliales, como la presencia de microvellosidades o la polaridad basal/apical, su origen es mesodérmico y comparten características típicas de células mesenquimales (como por ejemplo la expresión de desmina y vimentina).

La presencia de células mesoteliales recubriendo los depósitos adipocíticos viscerales (omental y mesentérico) ha sido reportada desde los años 80 <sup>(160)</sup>. En cambio, estas células no están presentes en el TAS <sup>(161)</sup>.

Tradicionalmente se consideró que la función de las células mesoteliales era básicamente de barrera, proporcionando una superficie no adherente que permite el contacto y movimiento de estructuras vecinas y constituyendo la primera línea de defensa contra agentes lesivos <sup>(162)</sup>. Sin embargo, múltiples investigadores en los últimos años han descrito un fenotipo inflamatorio en las células mesoteliales en el TAV de los pacientes con obesidad, y se las ha relacionado con fenómenos inflamatorios *in vitro* <sup>(163)</sup>.

Cultivos de células mesoteliales han demostrado la secreción de IL8 *in vitro* en respuesta al estímulo pro-inflamatorio de IL1b y TNF <sup>(164)</sup>. Se cree que IL8 tiene un papel fundamental en el reclutamiento de leucocitos a través del tejido peritoneal (TP) en caso de peritonitis <sup>(165)</sup>. *In vitro*, la grasa visceral libera mayor cantidad de IL8 que la grasa subcutánea, siendo esta liberación más significativa en la fracción vascular estromal que en la población adipocitaria aislada. Estos hallazgos sugieren que las células no adipocíticas podrían contribuir al incremento de los niveles circulantes de IL8 observados en la obesidad <sup>(166)</sup>. En humanos, los niveles circulantes de IL8 se correlacionan con el IMC, la resistencia a insulina y el riesgo cardiovascular <sup>(167)</sup>.

Por su parte, el tejido adiposo es uno de los principales lugares de producción de IL6, citoquina fuertemente relacionada con la resistencia insulínica y la alteración del metabolismo energético en la obesidad <sup>(168)</sup>. Los niveles de IL6, cuya liberación se ha demostrado en células peritoneales en respuesta al estímulo pro-inflamatorio de TNF y IL1b <sup>(164)</sup>, se encuentran elevados en los pacientes que realizan diálisis peritoneal <sup>(167)</sup>. Por tanto, como se ha demostrado con otras citoquinas <sup>(163,166)</sup>, se cree que las células mesoteliales podrían participar en la producción de IL6 en el TAV contribuyendo a la disfunción inmunometabólica del paciente con obesidad.

Las células mesoteliales peritoneales también expresan el receptor tipo toll (TLR), que en las células inmunes se relaciona con la producción y secreción de citoquinas. En ratones, la inhibición de la señalización mediada por TLR4 ha demostrado tener un efecto protector contra la inflamación y la resistencia insulínica inducida por la dieta alta en grasas, sugiriendo un papel de este receptor en la desregulación metabólica asociada a la obesidad <sup>(169)</sup>.

#### 1.4.2. CÉLULAS MESOTELIALES Y FIBROSIS

La fibrosis es uno de los principales factores contribuyentes a la disfunción tisular en la obesidad. Los fibroblastos, uno de los principales tipos celulares productores de colágeno, son células mesenquimales que se encuentran en el estroma de numerosos tejidos, entre ellos el tejido

adiposo. Se trata de células indiferenciadas que no expresan marcadores de otros tipos celulares, por lo que existen aún a día de hoy ciertas dudas sobre su origen y sobre si constituyen una población homogénea de células o bien se trata de distintas subpoblaciones procedentes de distintos progenitores <sup>(170)</sup>. Sea como fuere, este tipo celular está fuertemente implicado en los procesos de regeneración tisular, cicatrización, reparación, remodelación y fibrosis.

En los últimos años, se ha sugerido que las células mesoteliales podrían tener un rol en la fibrosis tisular en diferentes tejidos, especialmente cuando los mecanismos normales de regeneración se encuentran alterados. En este contexto, las células mesoteliales serían capaces de diferenciarse y migrar hacia la zona lesionada, expresando un perfil pro-inflamatorio, secretando citoquinas y contribuyendo a la fibrogénesis. De hecho, el desarrollo de nuevas técnicas de marcaje y rastreo molecular ha permitido en los últimos años demostrar que las células mesoteliales son capaces de experimentar una “transición mesotelial a mesenquimal”, también llamada “transición epitelial a mesenquimal” o EMT por sus siglas en inglés <sup>(124)</sup>. Mediante este proceso, descrito en distintas situaciones patológicas en diferentes tejidos como el hígado, el pulmón, el riñón o el peritoneo de pacientes en diálisis peritoneal <sup>(171)</sup>, las células mesenquimales se convertirían en células fibrogénicas mediante un mecanismo dependiente de TGFβ. Este mecanismo también se ha descrito durante el desarrollo tisular normal, en que las células mesoteliales que expresan la glicoproteína de membrana “mesotelina” dan lugar a células de muculatura lisa, fibroblastos y células endoteliales en distintos órganos intra-abdominales y torácicos <sup>(172)</sup>.

En conjunto, estos hallazgos sugieren la contribución de las células mesoteliales a la fibrosis del TAV en los sujetos con obesidad.

#### 1.4.3. PRECURSORES ADIPOCÍTICOS

El origen de las células del tejido adiposo, incluyendo los adipocitos y los tipos celulares del estroma circundante, han sido un área de interés en los últimos años. Las diferencias en la expresión génica, así como su aparición durante las diferentes etapas del desarrollo han dado lugar a la hipótesis de un origen diferencial entre los diferentes depósitos anatómicos de tejido adiposo. Si bien se había apuntado a un origen del tejido adiposo pardo a partir de la cresta neural <sup>(173)</sup>, estudios recientes apuntan también a un distinto origen embrionario de los TAVs y TAS en ratones. *Chau* observó recientemente que los depósitos mesentéricos, omental, gonadales, y otros depósitos adiposos viscerales que aparecen después del nacimiento en ratones derivan de células precursoras que expresaron el gen del tumor de Wilms *Wt1* durante el desarrollo. En cambio, las células adiposas de los depósitos inguinales derivarían de un subtipo celular distinto, que no expresa *Wt1*. Se ha objetivado la expresión de *Wt1* en las células mesoteliales presentes en el depósito adiposo gonadal durante el desarrollo embrionario, sugiriendo que estas células mesoteliales podrían ser precursores de los adipocitos en este tejido <sup>(157)</sup>. De hecho, las células mesoteliales *Wt1* + expresaron marcadores de precursores adipocitarios (CD29, CD34, Sca1). En línea con estos hallazgos, estudios anteriores habían demostrado que las células mesoteliales en cultivo se podían diferenciar en adipocitos y otros tipos celulares mesenquimales <sup>(174)</sup>. Otros estudios recientes han apoyado el concepto de un

origen mesotelial de los adipocitos en el TAV<sup>(175)</sup>, en contraposición a la hipótesis previa sobre el origen perivascular de los precursores adipocíticos<sup>(176)</sup>. Cabe decir, no obstante, que ambas hipótesis no son mutuamente excluyentes, sino que existen datos en la literatura que apoyan la heterogenicidad de precursores en el TAV, cuyos depósitos tendrían origen en diferentes linajes celulares<sup>(177)</sup>.

Dadas las características funcionales de las células mesoteliales, el mesotelio asociado a los depósitos adiposos viscerales podría ser uno de los contribuyentes a la disfunción tisular en el paciente con obesidad. Un conocimiento más profundo de las características de este subtipo celular en la obesidad será crucial para esclarecer su papel en la desregulación inmunometabólica de estos pacientes.

## 1.5. LA MEC COMO POTENCIAL DIANA TERAPÉUTICA EN LA OBESIDAD

Dado que la fibrosis a nivel del tejido adiposo en los pacientes con obesidad se ha relacionado con alteraciones patológicas tanto a nivel local como sistémico relacionadas con la hipoxia tisular, la inflamación del tejido adiposo, y finalmente la disminución de la sensibilidad a la insulina<sup>(178)</sup> e incluso un peor pronóstico tras la CB<sup>(179,180)</sup>, la MEC se ha convertido en los últimos años en una diana terapéutica prometedora para combatir la obesidad y las comorbilidades relacionadas. Desgraciadamente, hasta la fecha no existen tratamientos capaces de bloquear de forma directa o revertir los cambios fibróticos a nivel del tejido adiposo<sup>(178)</sup>.

Como se ha comentado anteriormente, HIF1 $\alpha$  es uno de los factores principales en el desarrollo de los cambios fibróticos tisulares en respuesta a la hipoxia. Se testó el efecto de la inhibición de HIF1 $\alpha$  mediante su inhibidor específico PX-478 en ratones obesos, y evidenció la supresión de los cambios fibróticos y la inflamación a nivel del tejido adiposo con una mejoría metabólica asociada<sup>(28)</sup>. El aumento de la expresión de HIF1 $\alpha$  mediante la inhibición del dominio hidroxilasa (PHD) por parte de GSK1278863 y FG-4592 se ha asociado también a una disminución de los niveles de colesterol plasmático, proporcionando nuevas perspectivas respecto al posible tratamiento de la dislipemia asociada a la obesidad<sup>(181,182)</sup>.

Por su parte, la señalización mediada por TGF- $\beta$  también ha despertado interés terapéutico para combatir la fibrosis tisular. Actualmente existen fármacos hipoglucemiantes de primera línea como la metformina que parecen inhibir la respuesta profibrótica mediada por TGF- $\beta$ 1/Smad3 a través de su acción activadora de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). Este efecto antifibrótico mediado por AMPK se ha relacionado con un aumento de la sensibilidad a la insulina<sup>(183)</sup>. A pesar de que el diseño de fármacos específicos capaces de bloquear la respuesta fibrótica mediada por TGF- $\beta$  constituye actualmente un reto, se ha visto que la berberina, compuesto presente en diversas plantas, ejerce un efecto antidiabético mediante la activación de AMPK<sup>(184)</sup> y disminuye la fosforilación de Smad3 mediada por TGF- $\beta$ . Estos cambios han



demostrado disminuir el acúmulo de colágeno y revertir la sobreexpresión de genes relacionados con la fibrosis en ratones obesos<sup>(185)</sup>.

La familia de metaloproteinasas MMP es otro de los factores clave en la remodelación de la MEC en la obesidad. En este sentido, la inhibición de proteinasas como MMP14 se ha asociado a la posible reversibilidad de los cambios fibróticos a nivel del tejido adiposo<sup>(178)</sup>.

La constatación en los últimos años de la relación entre la fibrosis del tejido adiposo y la desregulación metabólica en la obesidad ha abierto las puertas a la exploración de nuevas estrategias de tratamiento. Si bien los hallazgos terapéuticos en este campo son a día de hoy limitados, el estudio de la MEC en los tejidos adiposos y su relación con las alteraciones fisiopatológicas en el paciente con obesidad sin duda podrá dar lugar en los próximos años al desarrollo de nuevas dianas terapéuticas tanto para la obesidad como para las comorbilidades asociadas.



## 2. HIPÓTESIS



## 2. HIPÓTESIS

La alteración de la regeneración de la MEC se considera uno de los componentes de la llamada “adiposopatía” asociada a la obesidad. Por tanto, la disfunción inmunometabólica sistémica que padecen los pacientes con obesidad podría relacionarse con esta regeneración alterada de la MEC en el tejido adiposo. No obstante, no se conocen las diferencias en las alteraciones de la MEC de los distintos tipos de tejido adiposo ni la contribución específica de cada uno de ellos en la disfunción inmunometabólica sistémica. Asimismo, tampoco está establecido el papel en la regeneración de la MEC de las células mesoteliales (presentes en el peritoneo que recubre el tejido adiposo mesentérico y epiploico, pero no el tejido adiposo subcutáneo).

Así pues, la **hipótesis** de este trabajo es que, entre un grupo de pacientes con obesidad y un grupo de controles sin obesidad, existen diferencias en la expresión de genes relacionados con la MEC en los distintos tejidos estudiados (tejido adiposo mesentérico, tejido adiposo epiploico, tejido adiposo subcutáneo y tejido peritoneal), las cuáles podrían relacionarse con diferentes variables clínicas pre-operatorias y con la evolución metabólica y ponderal tras la cirugía bariátrica.



## 3. OBJETIVOS





## 3. OBJETIVOS

En relación con la hipótesis de este trabajo, se han definido los siguientes objetivos:

### 3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Comparar las diferencias en el perfil transcripcional de los genes relacionados con la MEC en los cuatro tejidos estudiados (tejido adiposo mesentérico, tejido adiposo epiloico, tejido adiposo subcutáneo y tejido peritoneal) en un grupo de pacientes con obesidad y un grupo de controles sin obesidad, y analizar la relación entre la expresión de los genes más representativos y distintas variables clínicas basales, así como la evolución tras la CB en el grupo de pacientes con obesidad.

### 3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- 1.** Realizar un análisis de expresión diferencial mediante microarrays a partir de muestras de ácido ribonucleico (ARN) tisular en los cuatro tejidos estudiados e identificar los genes relacionados con la MEC diferencialmente expresados (GDEs) entre el grupo de pacientes y el grupo control.
- 2.** Realizar un análisis de enriquecimiento funcional de los genes relacionados con la MEC diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes y el grupo control en los cuatro tejidos estudiados, y seleccionar los genes más representativos de este análisis para la validación de su expresión diferencial mediante RT-qPCR en un subgrupo representativo de pacientes y controles.
- 3.** Analizar la relación entre diferentes variables clínicas (IMC, insulinoresistencia, HTA y DLP) en el momento de la intervención y los niveles de expresión de los genes seleccionados en el análisis de enriquecimiento funcional de los cuatro tejidos estudiados en un subgrupo representativo de pacientes y controles.
- 4.** Analizar la relación entre la evolución ponderal y metabólica a los 12 meses de la CB y los niveles de expresión de los genes seleccionados en el análisis de enriquecimiento funcional de los cuatro tejidos estudiados en un subgrupo representativo de pacientes.



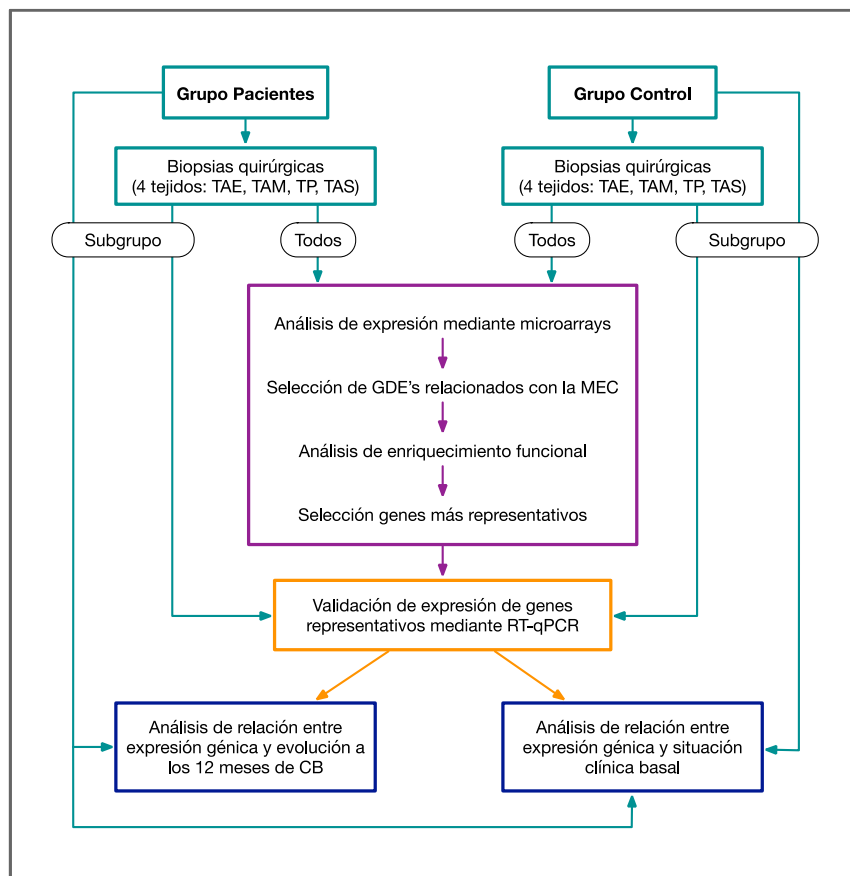
## 4. MATERIAL Y MÉTODOS



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se diseñó un estudio prospectivo observacional de tipo caso-control <sup>(186)</sup> entre un grupo de pacientes con IMC  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup> intervenidos de CB laparoscópica electiva y un grupo de controles con IMC  $\leq 30$  kg/m<sup>2</sup> intervenidos de colecistectomía laparoscópica electiva. De cada sujeto, se obtuvieron biopsias quirúrgicas de cuatro tejidos (TAM, TAE, TAS y TP). A continuación, se realizó un análisis de expresión diferencial mediante microarrays y se seleccionaron los genes relacionados con la MEC diferencialmente expresados entre grupos en cada tejido. Tras un análisis de enriquecimiento funcional, se seleccionaron los genes más representativos y, en un subgrupo de pacientes y controles, se validaron las diferencias de expresión mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Finalmente, se analizó la relación entre los niveles de expresión mediante RT-qPCR de los genes seleccionados en este subgrupo de pacientes y controles y distintas variables clínicas basales, así como la evolución ponderal y metabólica de los pacientes a los 12 meses de la CB (**Figura 8**).



**Figura 8. Esquema general del estudio.** TAM: Tejido adiposo mesentérico; TAE: Tejido adiposo epiploico; TAS: Tejido adiposo subcutáneo; TP: Tejido peritoneal; GDEs: Genes diferencialmente expresados; MEC: Matriz extracelular; RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real; CB: Cirugía bariátrica.

#### 4.1.1. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

Para el cálculo del tamaño muestral, se utilizó el aplicativo web de Fisterra (<https://www.fisterra.com/mbe/investiga/9muestras/9muestras2.asp>).

Para detectar cambios de expresión de al menos un 25% con una potencia estadística del 80% y un nivel de confianza del 95% (error tipo 1 < 0.05 bilateral), se calculó una n requerida de 26 sujetos en cada grupo. Asumiendo unas pérdidas esperadas de hasta el 30% (15% por problemas técnicos durante el procesamiento de las muestras y otro 15% por pérdida durante el seguimiento), la n final requerida fue de 38 sujetos por grupo.

#### 4.1.2. PARTICIPANTES

##### 4.1.2.1. Criterios de inclusión

Los participantes del estudio fueron reclutados de forma consecutiva en dos centros, el Hospital Universitario Vall d'Hebrón (grupo pacientes) y el Hospital San Rafael (grupo control). Los criterios de inclusión fueron:

##### Grupo Pacientes

- IMC > 35 kg/m<sup>2</sup>.
- Edad entre 18 y 60 años.
- Indicación de CB según criterios clásicos recogidos en las guías internacionales<sup>(1,41,187)</sup> (IMC > 40 kg/m<sup>2</sup> o IMC > 35 kg/m<sup>2</sup> con al menos una de las siguientes comorbilidades: DM2, HTA, DLP, SAHS, NAFLD, cardiopatía isquémica, enfermedad por reflujo gastro-esofágico, insuficiencia venosa severa, artropatía severa, incontinencia urinaria severa o alteración significativa de la calidad de vida por alteración de la movilidad).
- Fracaso en un intento previo de perder peso o incapacidad para mantener la pérdida ponderal a largo plazo mediante intervenciones dietéticas y conductuales.
- Adecuada adherencia y cumplimiento preoperatorio de los controles médicos y el seguimiento establecido dentro del programa de CB.
- Capacidad para comprender y dar su consentimiento informado para una CB.
- Consideración de "apto" para CB tras la evaluación por parte del Comité Multidisciplinar de la Unidad de Obesidad Mórbida del Hospital Universitario Vall d'Hebrón.
- Pacientes operables, sin contraindicación quirúrgica por otro motivo (riesgo quirúrgico no aceptable por comorbilidades médicas, pronóstico vital comprometido por otra patología, abuso de tóxicos).

##### Grupo Control

- IMC < 30 kg/m<sup>2</sup>.
- Edad entre 18 y 60 años.

- Indicación de colecistectomía laparoscópica programada por colelitiasis.
- Capacidad para comprender y dar su consentimiento informado para una cirugía abdominal electiva.
- Sujetos operables, sin contraindicación quirúrgica por otro motivo (riesgo quirúrgico no aceptable por comorbilidades médicas, pronóstico vital comprometido por otra patología, abuso de tóxicos).

#### 4.1.2.2. Criterios de exclusión

Se excluyeron todos los sujetos con alguno de los siguientes criterios:

- Edades extremas (<18 o >60 años).
- Contraindicación para la cirugía (sujetos no operables).
- Sujetos sometidos a cirugía urgente.
- Sujetos con evidencia de proceso inflamatorio agudo intra-abdominal.
- Sujetos en tratamiento con metformina o fármacos hipoglucemiantes que pudiesen interferir con los procesos de regeneración y remodelación tisular a nivel de la MEC.
- Sujetos en tratamiento con otros fármacos que pudiesen interferir con los procesos de regeneración y remodelación tisular a nivel de la MEC (quimioterápicos, inmunomoduladores, corticoides sistémicos y tratamientos anti-inflamatorios crónicos).
- Sujetos con patología neoplásica.
- Sujetos con patología inflamatoria crónica.
- Consumo de alcohol > 20 gr/día

#### 4.1.3. INTERVENCIONES QUIRÚRGICAS

Todos los participantes del estudio que conformaron el grupo de pacientes con obesidad fueron sometidos a CB en la Unidad de Cirugía Bariátrica, Endocrina y Metabólica del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitario Vall d'Hebrón. Se incluyeron pacientes sometidos a diferentes técnicas de CB: GVL, LRYGB y SADI-S. La elección de la técnica quirúrgica en cada paciente se realizó de acuerdo a los criterios clínicos e indicaciones establecidas por la Unidad Multidisciplinar de Obesidad Mórbida del Hospital Universitario Vall d'Hebrón. Estas técnicas quirúrgicas se encuentran detalladas en el apartado **2.2.2.1. Principales técnicas quirúrgicas**.

Todos los participantes del estudio que conforman el grupo de controles sin obesidad fueron sometidos a colecistectomía laparoscópica por colelitiasis sintomática y fueron intervenidos en la Unidad de Cirugía General del Hospital San Rafael.

Para este estudio, se registró específicamente el tipo de intervención quirúrgica, el cumplimiento del protocolo antes y después de la intervención, las incidencias durante la misma

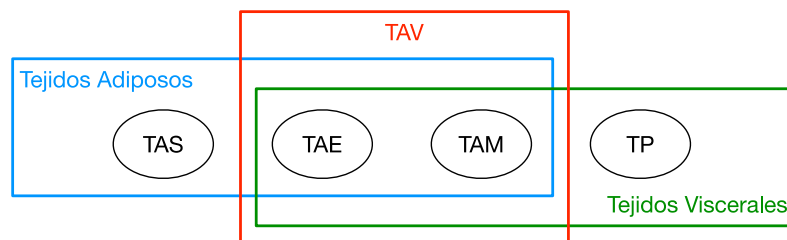
y la evolución postoperatoria.

#### 4.1.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

##### Biopsias de tejidos

Tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con obesidad, se obtuvieron biopsias quirúrgicas de los cuatro tejidos a estudio durante la cirugía programada. Estos tejidos son:

- Tejido adiposo subcutáneo (TAS)
- Tejido adiposo epiploico (TAE)
- Tejido adiposo mesentérico (TAM)
- Tejido peritoneal (TP)



**Figura 9. Tejidos incluidos en el estudio.** TAS: Tejido adiposo subcutáneo; TAE: Tejido adiposo epiploico; TAM: Tejido adiposo mesentérico; TP: Tejido peritoneal; TAV: Tejido adiposo visceral.

El TAS, el TAE y el TAM son tejidos adiposos, a diferencia del TP que es un tejido mesotelial. El TAE, el TAM y el TP se consideran tejidos viscerales por encontrarse a nivel intrabdominal, a diferencia del TAS. Al tratarse de tejidos adiposos de localización intraabdominal, el TAE y el TAM se engloban en el concepto de TAV, para contraponerlos al TAS (**Figura 9**).

Para facilitar el posterior procesamiento de los tejidos se estableció un tamaño mínimo de 1 cm x 1 cm x 0.5 cms de grosor (excepto para muestras de TP, cuyo grosor es inferior a 0.1 cms). El TAS fue obtenido a nivel abdominal y el TP fue obtenidos a nivel parietal anterior. Tras la escisión, las muestras fueron conservadas en medio de estabilización de RNA (*RNAlater™ Stabilization Solution; Thermo Fisher Scientific*). Todas las muestras fueron conservadas a 4°C hasta ser congeladas en nitrógeno líquido a -80°C en las primeras 48h tras su extracción para posterior procesamiento.

Las muestras de tejidos biológicos fueron registradas en el Registro Nacional de Biobancos (<https://biobancos.isciii.es/>), sección "Colecciones" (Colección de Muestras registrada con Referencia C.0004671) y almacenadas adecuadamente en un repositorio tutelado por el Grupo de Investigación en Cirugía General del Vall d'Hebrón Institut de Recerca (GRCG-VHIR), con la correspondiente codificación e información clínica y epidemiológica asociada.



Durante el proceso de obtención y almacenamiento de muestras biológicas se aplicaron los estándares internacionales de buenas prácticas de acuerdo a las recomendaciones facilitadas por el servicio de asesoramiento del Biobanco-VHIR ([http://en.vhir.org/portal1/article\\_menu\\_serveis.asp?s=serveis&contenttypeid=293&contentid=1220&t=biobanc](http://en.vhir.org/portal1/article_menu_serveis.asp?s=serveis&contenttypeid=293&contentid=1220&t=biobanc)).

## Muestras de sangre

A todos los participantes del estudio se les extrajo una muestra de sangre obtenida mediante punción venosa periférica entre las 7:00 y las 8:00 de la mañana, tras 8h de ayuno, justo antes de la de la intervención quirúrgica ( $t_0$ ).

En el caso del grupo de pacientes, se realizaron además controles analíticos postoperatorios de forma regular de acuerdo con el protocolo de seguimiento establecido por la Unidad Multidisciplinar de Obesidad Mórbida del Hospital Universitario Vall d'Hebrón, incluyendo un control analítico a los 12 meses de la CB ( $t_{12}$ ).

A parte de las biopsias quirúrgicas y de las determinaciones analíticas aquí descritas, no se realizaron otros análisis ni exploraciones complementarias adicionales a los participantes del estudio.

### 4.1.5. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los sujetos que voluntariamente participaron en el estudio recibieron un documento de información al paciente y firmaron un consentimiento informado específico para la obtención intra-operatoria de muestras biológicas de acuerdo con las directrices de la Ley 41/2002 Básica Reguladora de la autonomía del paciente y de los derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica. Ambos documentos están registrados en la historia clínica de los participantes.

Los datos de los participantes se mantuvieron en todo momento codificados a fin de garantizar la confidencialidad en su utilización según la normativa vigente (Ley 15/99 de Protección de Datos de Carácter Personal), no siendo la identidad de los participantes en ningún caso revelada a terceras personas.

La presente Tesis Doctoral, enmarcada en el proyecto titulado "*Alteraciones biomoleculares en la matriz extracelular como herramienta para establecer nuevos perfiles de pacientes y predicción de respuesta a cirugía bariátrica. Estudio en humanos y ratas*", parcialmente financiado por una subvención para Proyectos de Investigación en Salud (modalidad Proyectos de Investigación en Salud) de la Acción Estratégica en Salud 2013-2016 (Instituto de Salud Carlos III), otorgada en la convocatoria 2017 (FIS PI17-01879), ha sido autorizada por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Vall d'Hebrón (<http://www.vhir.org/serveis/CEIC/presentacioplataforma.asp>) tras su evaluación en la sesión ordinaria nº 323 el pasado 12/01/2018 (Proyecto PR(AG)122/2017), con dictamen favorable.

## 4.2. VARIABLES CLÍNICAS Y BIOQUÍMICAS

### 4.2.1. VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS Y ANTROPOMÉTRICAS

El día de la intervención quirúrgica ( $t_0$ ), se registró el sexo, edad, peso y talla de todos los participantes del estudio. En el grupo de pacientes con obesidad, el peso se registró también a los 12 meses de la intervención ( $t_{12}$ ).

#### Índice de masa corporal (IMC)

Mediante la talla y el peso en cada momento, se calculó el IMC. El IMC es una de las principales variables antropométricas utilizadas para definir la constitución física o el “tamaño relativo” de un individuo. Popularizado por el matemático belga Adolphe Quetelet en 1832 <sup>(188)</sup> e inicialmente conocido como “índice de Quetelet”, se define como la relación entre el peso del individuo en kilogramos y el cuadrado de la altura en metros:

$$\text{IMC} = \text{Peso (kg)} / \text{Altura(m)}^2$$

Este índice, denominado IMC a partir de 1972 por Ancel Keys <sup>(189)</sup>, es a día de hoy uno de los principales índices antropométricos utilizados tanto en la práctica clínica como en estudios poblacionales, ya que es un índice fácil de calcular, económico y que presenta buena correlación con el porcentaje de grasa corporal <sup>(1)</sup>.

#### Porcentaje de peso total perdido (%TWL)

En la literatura reciente se han descrito diferentes métricas o formas de cuantificar la evolución ponderal de los pacientes con obesidad tras las CB. En general, las variaciones absolutas en el peso o el IMC no se consideran adecuadas para comparar sujetos con parámetros antropométricos preoperatorios distintos <sup>(190,191)</sup>. En cambio, las medidas que expresan un valor relativo, como el % de peso total perdido (*Percentage of Total Weight Loss*, %TWL), el % de exceso de peso perdido (*Percentage of Excess Weight Loss*, %EWL) o el porcentaje de exceso de IMC perdido (*Percentage of Excess BMI Loss*, %EBMIL) resultan más útiles en este sentido. A pesar de sus limitaciones <sup>(192)</sup>, las medidas ponderales relativas son actualmente las recomendadas tanto por la *American Society for Metabolic and Bariatric Surgery* <sup>(193)</sup> como por las principales publicaciones científicas en el campo de la CB para evaluar la evolución ponderal postoperatoria del paciente con obesidad.

En este estudio, siguiendo la recomendación más generalizada <sup>(193)</sup>, hemos utilizado el %TWL como medida para analizar la pérdida ponderal de los pacientes tras la CB. Esta métrica se calcula como el *incremento partido por el total*:

$$\%TWL = (\text{Peso inicial} - \text{Peso final}) / \text{Peso inicial}$$

Dado que, de acuerdo con la evidencia actual, la máxima pérdida ponderal tras la CB se alcanza entre el primer y el segundo año tras la intervención <sup>(194–197)</sup>, en este estudio decidimos evaluar la evolución ponderal de los pacientes con obesidad utilizando el %TWL a los 12 meses de la CB.

#### 4.2.2. COMORBILIDADES

En este estudio se definieron y analizaron específicamente las comorbilidades incluidas dentro del denominado síndrome metabólico <sup>(17)</sup>: diabetes o pre-diabetes, HTA y DLP. También se registró el consumo de tabaco y enólico.

Se registró el índice de la Sociedad Americana de Anestesiología (ASA) de los participantes en el momento de la intervención como medida global de las comorbilidades de los sujetos estudiados.

Las variables clínico-epidemiológicas y las comorbilidades definidas fueron evaluadas en el momento de la intervención ( $t_0$ ) y a los 12 meses de la cirugía en el caso del grupo de pacientes ( $t_{12}$ ).

Otras comorbilidades, como el SAHS o la NAFLD fueron registradas de acuerdo con la evaluación clínica inicial en el momento del reclutamiento. Sin embargo, la evolución de estas variables a los 12 meses de la intervención en el grupo de pacientes con obesidad no se analiza específicamente en la práctica clínica habitual y por tanto no fue evaluada en este estudio.

#### Diabetes

El diagnóstico clínico de diabetes se definió, de acuerdo a la *American Diabetes Association* <sup>(198)</sup>, como la positividad de uno de los criterios:

- Glucosa plasmática en ayunas (tras 8h sin aporte calórico)  $\geq 126$  mg/dL (7.0 mmol/L).
- Glucosa plasmática  $\geq 200$  mg/dL (11.1 mmol/L) a las 2 horas durante el test de sobrecarga oral de glucosa
- HbA1c  $\geq 6.5\%$  (48 mmol/mol)
- Cualquier determinación de glucosa plasmática  $\geq 200$  mg/dL (11.1 mmol/L) en un paciente con síntomas clásicos de hiperglicemia o crisis hiperglicémica

#### Prediabetes

El diagnóstico clínico de prediabetes se definió, de acuerdo a la *American Diabetes Association* <sup>(198)</sup>, como la positividad de uno de los criterios:

- Glucosa plasmática en ayunas (tras 8h sin aporte calórico) entre 100 mg/dL (5.6 mmol/L) y 125 mg/dL (6.9 mmol/L)
- Glucosa plasmática entre 140 mg/dL (7.8 mmol/L) y 199 mg/dL (11.0 mmol/L) a las 2 horas durante el test de sobrecarga oral de glucosa

- HbA1c 5.7-6.4% (39-47 mmol/mol)

## Hipertensión arterial (HTA)

La presión arterial normal se define por la presencia de una presión sistólica < 120 mmHg y una presión diastólica < 80 mmHg. Por encima de estas cifras, se definen la “presión arterial elevada” cuando la presión sistólica está entre 120-129 mmHg y la “hipertensión arterial” cuando se detectan cifras de tensión sistólica por encima de 130 mmHg o de tensión diastólica superiores a 80 mmHg<sup>(199)</sup>. Sin embargo, la tendencia actual y las recomendaciones del *American College of Cardiology* y la *American Heart Association* recogidas en las guías clínicas internacionales<sup>(199)</sup> consideran la tensión arterial como una variable continua en la que no se puede establecer un punto de corte categórico entre valores normales y alterados para toda la población, sino que los objetivos tensionales deben definirse en cada individuo en función de sus comorbilidades y del riesgo cardiovascular concreto que presente teniendo en cuenta otras variables como la edad, el sexo o la presencia de eventos cardiovasculares previos. Así pues, los objetivos tensionales y la indicación del tratamiento farmacológico antihipertensivo no se definen en base a una cifra tensional concreta sino en relación al riesgo cardiovascular concreto del paciente. De esta forma, en pacientes adultos sanos sin historia cardiovascular previa y con un riesgo de enfermedad cardiovascular arterioesclerótica estimado < 10% a 10 años, se recomendará el uso de medicación antihipertensiva por encima de cifras tensionales sistólicas de 140 mmHg o diastólicas de 90 mmHg (objetivada en dos determinaciones diferentes tomadas en reposo por personal sanitario), mientras que en pacientes con antecedente de eventos cardiovasculares previos o un ASCVD a 10 años > 10 % el objetivo tensional debe ser más conservador y se recomienda el inicio de tratamiento antihipertensivo a partir de cifras tensionales de 130/80 mmHg<sup>(199)</sup>. En consecuencia, la estrategia clínica actual consiste en realizar una estratificación precisa e individualizada del riesgo cardiovascular del paciente (que puede realizarse fácilmente con la herramienta disponible en la web de la *American Heart Association* (<http://static.heart.org/riskcalc/app/index.html#!/baseline-risk>), y a partir de éste establecer objetivos tensionales concretos y valorar la necesidad de iniciar tratamiento con uno o varios fármacos.

De acuerdo con las recomendaciones actuales, para este estudio la presencia de HTA no se ha definido únicamente en base a unas cifras tensionales concretas por encima de la definición de normalidad, sino que se ha considerado la necesidad de utilizar algún tratamiento farmacológico para mantener las cifras de presión arterial por debajo del umbral tensional definido para cada paciente de acuerdo a la estratificación individualizada del riesgo cardiovascular establecida en las guías internacionales.

Del mismo modo, la resolución de la HTA a los 12 meses en el grupo de pacientes sometidos a CB se ha definido como el mantenimiento de cifras tensionales por debajo del umbral establecido para cada paciente sin necesidad de tratamiento farmacológico.

## Dislipemia (DLP)

La alteración del metabolismo lipídico es una de las comorbilidades frecuentemente asociadas a la obesidad. En general, para los individuos con bajo riesgo cardiovascular se recomiendan valores de colesterol-LDL < 130 mg/dL, colesterol-HDL > 40 mg/dL, colesterol-No HDL < 160 mg/dL, y triglicéridos < 150 mg/dL. Sin embargo, del mismo modo que se establece para la presión arterial, de acuerdo con las guías para el manejo de la dislipemia y la prevención del riesgo cardiovascular publicadas en 2017 por la *American Association of Clinical Endocrinologists (AACE)* y el *American College of Endocrinology (ACE)* <sup>(200)</sup>, se definen unas categorías de riesgo en función de las cuales se establecen las cifras objetivo de colesterol-LDL, colesterol-HDL, colesterol-no HDL, triglicéridos y Apo B. Así pues, del mismo modo que sucede con las cifras de presión arterial, la valoración individualizada del riesgo cardiovascular a 10 años mediante distintas herramientas o scores (*Framingham Risk Assessment Tool*, *Reynolds Risk Score* o *MESA 10-year ACVD Risk with Coronary Artery Calcification (CAC) Calculator*, entre otros) constituye la base sobre la que se construye la actuación terapéutica individualizada con respecto al perfil lipídico <sup>(200)</sup>. En base a esta estratificación del riesgo, las recomendaciones respecto a las cifras objetivo y la indicación de tratamiento farmacológico pueden ser muy variables entre individuos. A modo de ejemplo, para los individuos considerados de mayor riesgo cardiovascular (“riesgo extremo”) se recomiendan cifras de colesterol-LDL por debajo de los 55 mg/dL, muy por debajo de los 130 mg/dL recomendados para individuos de bajo riesgo.

En este estudio y de acuerdo con las recomendaciones actuales, la presencia de DLP no se definido únicamente en base a unos valores analíticos concretos respecto al perfil lipídico, sino que se ha considerado la necesidad de utilizar algún tratamiento farmacológico para mantener los valores de lípidos en sangre por debajo del valor definido para cada paciente de acuerdo a la estratificación individualizada del riesgo cardiovascular establecida en las guías internacionales.

Del mismo modo, la resolución de la DLP en el grupo de pacientes con obesidad a los 12 meses de la CB se ha definido como el mantenimiento de valores lipídicos en sangre por debajo del umbral establecido para cada paciente sin necesidad de tratamiento farmacológico.

## Síndrome de apneas-hipopneas del sueño (SAHS)

El SAHS es un trastorno respiratorio caracterizado por la interrupción de la respiración durante el sueño, ya sea en forma de apneas (cese del flujo de aire de al menos 10 segundos) o hipopneas (reducción en el flujo de aire con desaturación resultante de al menos un 4 %) <sup>(201)</sup>. Esta alteración aparece como consecuencia de la obstrucción de la vía respiratoria alta como consecuencia del inadecuado tono motor de la lengua y de los músculos responsables de la apertura de la vía aérea superior, y es un factor de riesgo independiente para complicaciones cardiovasculares (des de la hipertensión a la cardiopatía isquémica), neurológicas y perioperatorias <sup>(201,202)</sup>. Si bien la prevalencia del SAHS se estima de entre el 2% y el 7% <sup>(203)</sup> en la población general, su incidencia entre la población obesa con criterios de CB se sitúa alrededor del 80% <sup>(204)</sup>.

En este estudio, la presencia de SAHS se ha definido de acuerdo con los criterios diagnósticos clásicos (*Apnea-Hipopnea Index* –AHI– de 5 o superior con síntomas asociados tales como somnolencia diurna, fatiga o alteraciones cognitivas, o AHI de 15 o superior independientemente de la presencia de síntomas asociados) <sup>(205)</sup>. El diagnóstico de SAHS se realizó tras la evaluación mediante polisomnografía realizada y evaluada por especialistas de la Unidad del Sueño del Servicio de Neumología del Hospital Universitario Vall d’Hebrón, de acuerdo con el protocolo de la Unidad Multidisciplinar de Obesidad Mórbida del hospital.

La resolución del SAHS en el grupo de pacientes después de la CB no se evaluó específicamente.

### Esteato-hepatopatía no alcohólica (NAFLD, Non-alcoholic fatty liver disease)

Aunque los criterios diagnósticos de NAFLD difieren según las diferentes asociaciones y sociedades científicas, la definición de dicha entidad incluye de forma constante la evidencia de una acumulación excesiva de lípidos en el parénquima hepático (detectado por imagen o histología) y la ausencia de otras causas de esteatosis en ausencia de consumo enólico <sup>(206)</sup>. La NAFLD incluye un espectro de trastornos de diferente gravedad, que van desde la esteatosis o NAFL (*non-alcoholic fatty liver*), forma mayoritaria y más benigna sin evidencia de daño celular, hasta la esteatohepatitis o NASH (*non-alcoholic steatohepatitis*) con evidencia de cambios inflamatorios hepatocitarios con o sin fibrosis <sup>(207)</sup>.

Existe una relación bidireccional entre la NAFLD y el síndrome metabólico, de forma que la NAFLD ha llegado a considerarse como la manifestación de este síndrome a nivel hepático siendo a resistencia a la insulina el principal factor implicado en esta asociación <sup>(208)</sup>. Además, existe evidencia de que la prevalencia de NAFLD aumenta con el IMC <sup>(209)</sup>, y los datos de diferentes estudios histológicos muestran prevalencias de hasta un 85% de esteatosis i un 40% de esteatohepatitis en pacientes con IMC > 40 kg/m<sup>2</sup> <sup>(210)</sup>.

En este estudio, se definió la presencia de NAFLD de acuerdo a criterios ecográficos.

La resolución de la NAFLD en el grupo de pacientes después de la CB no se evaluó de forma específica.

### 4.2.3. VARIABLES BIOQUÍMICAS

Utilizando la muestra obtenida el día de la intervención ( $t_0$ ), se determinaron los valores en plasma de glucosa, insulina y HbA1c% en todos los sujetos incluidos en el estudio. En los sujetos del grupo de pacientes sometidos a CB se determinaron también los valores de triglicéridos y colesterol (LDL y HDL). En este grupo, se realizó además un control analítico con las mismas determinaciones a los 12 meses tras la CB ( $t_{12}$ ). Estas determinaciones fueron realizadas por parte del laboratorio del Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Vall d’Hebrón en todos los pacientes.

De la muestra de sangre preoperatoria ( $t_0$ ) también se obtuvieron otras determinaciones (bioquímica básica, ionograma y pruebas de coagulación) de acuerdo con los protocolos preoperatorios habituales del Hospital Universitario Vall d'Hebrón y del Hospital San Rafael. Estas determinaciones se realizaron en el laboratorio de los Servicios de Bioquímica Clínica de ambos hospitales, en función del centro en el que se intervino quirúrgicamente a cada paciente (grupo control en el Hospital San Rafael, grupo pacientes en el Hospital Universitario Vall d'Hebrón).

Según las técnicas estandarizadas de los laboratorios de los Servicios de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Vall d'Hebrón y del Hospital San Rafael, los parámetros bioquímicos básicos se determinaron mediante el analizador automático Cobas c-711 Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

La glucosa se determinó mediante el método enzimático de la glucosa-hexoquinasa.

La determinación de triglicéridos se realizó mediante el método enzimático de lipasa / GPO / PAP (Glicerol fosfato / peroxidasa aminofenazona).

El colesterol total se determinó mediante el método enzimático de la colesterol-esterasa / colesterol- oxidasa; el colesterol HDL mediante método directo inmuno-enzimático, y el colesterol LDL mediante la fórmula de Friedewald (Colesterol LDL (mg/ dL) = Colesterol Total - [Colesterol HDL + Triglicéridos/5]).

Los niveles de insulina inmunorreactiva fueron determinados mediante un inmunoensayo de electroluminiscencia automatizado (Modular E-170, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), con una sensibilidad de 0,2 mUI/L y un coeficiente de variación interensayo de <2,8%.

La HbA1c se determinó mediante la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento con un analizador completamente automatizado (Adams Menarini Hi-AUTO A1c 8160, Arkray, Kyoto, Japón), con un coeficiente de variación interensayo de 1,8% y 1,5% a niveles de HbA1c de 4,8% y 9%, respectivamente (rango de referencia: 4-5,8%).

## HOMA-IR

Para la evaluación del grado de resistencia insulínica se utilizó el HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment for Insuline Resistance*). Se trata de un método descrito en 1985 para estimar la función de las células beta-pancreáticas y la resistencia insulínica en base a los valores de glucosa e insulina plasmática en ayunas. Se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = (\text{glucosa en ayunas (mg/dL)} \cdot \text{insulina en ayunas (mUI/L)}) / 405$$

Se han descrito variaciones en el punto de corte del HOMA-IR a partir del cual se considera que un paciente presenta o no resistencia a la insulina en función de la edad, la raza, el sexo e incluso ciertas comorbilidades<sup>(211)</sup>. En nuestro medio, Ascaso<sup>(212)</sup> estudió la distribución del índice en una cohorte de población española sin parámetros clínicos ni analíticos de diabetes o síndrome

de resistencia insulínica, estableciendo un valor de HOMA-IR  $\geq 3.8$  (correspondiente al percentil 90 de la distribución del índice en dicha población) como el punto de corte para definir la insulinoresistencia. De acuerdo con esta evidencia, se definió la resistencia a la insulina como un valor de HOMA-IR  $\geq 3.8$ . No obstante, respecto a la evaluación de la evolución metabólica tras la CB, se consideró que el análisis de una medida relativa resulta más adecuado que la valoración respecto a un punto de corte concreto dada la variabilidad en el perfil metabólico inicial de los sujetos incluidos. Por este motivo, en este estudio, la evolución del perfil de insulinoresistencia tras la CB se analizó en términos de variación relativa (%) del HOMA-IR a los 12 meses de la intervención.

### 4.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

#### 4.3.1. OBTENCIÓN DEL ARN

El análisis transcriptómico mediante microarrays de expresión se basa en la detección y cuantificación de los ARN mensajeros (ARNm) presentes en una determinada muestra.

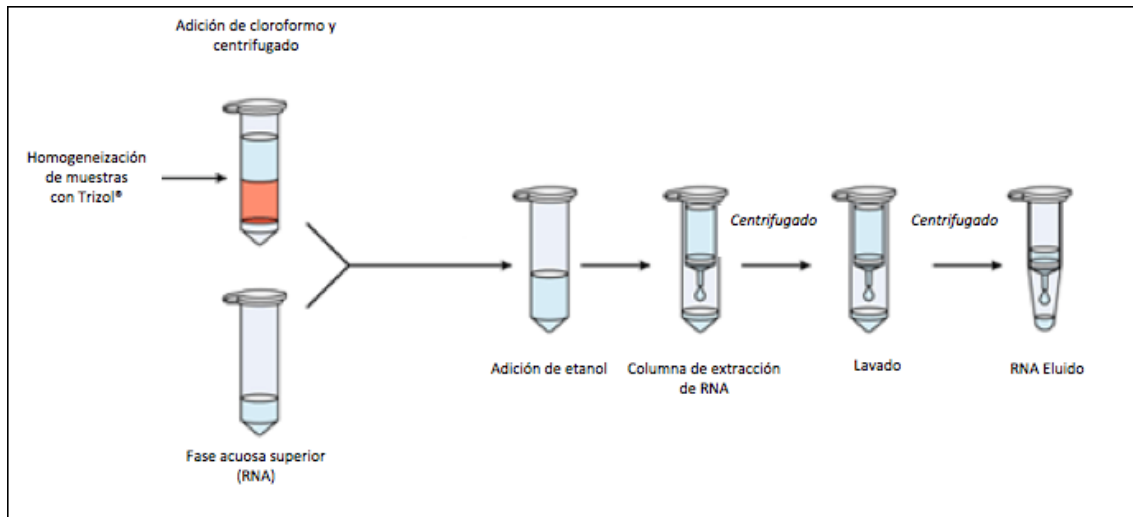
Como se ha especificado previamente (ver apartado **4.1.4. Obtención de muestras biológicas**), las muestras tisulares obtenidas mediante biopsia quirúrgica fueron conservadas en medio de estabilización de ARN (RNAlater™ Stabilization Solution; *Thermo Fisher Scientific*) y se mantuvieron a una temperatura de 4°C durante un máximo de 48h. Posteriormente, fueron congeladas en nitrógeno líquido a -80°C para su posterior procesamiento y extracción de RNA.

La extracción del ARN se realizó mediante la combinación de dos técnicas: la homogeneización del tejido con reactivo Trizol®, y la posterior purificación del ARN total del tejido en columnas de sílice utilizando el kit *PureLink® RNA Mini kit* (*Thermo Fisher Scientific*).

En primer lugar, se procedió a la homogeneización de las muestras tisulares con un volumen de Trizol® (*Ambion*) proporcional al peso del tejido según especificaciones de la casa comercial. Se homogeneizaron muestras de entre 100 y 200 mg de tejido para asegurar una concentración de ARN final suficiente para el análisis. Después de la homogeneización y lisis celular de la muestra con el reactivo Trizol®, se añadió un volumen proporcional de cloroformo para separar el homogeneizado en una fase acuosa superior (que contiene ARN) claramente diferenciada de las capas inferiores (que contienen ADN y proteínas).

La purificación y aislamiento final del ARN de la fase acuosa se llevó a cabo utilizando las columnas de centrifugación con membrana de sílice del *PureLink® RNA Mini Kit* (*Thermo Fisher Scientific*) siguiendo las indicaciones de la casa comercial (**Figura 10**). Se añadió un tratamiento adicional en las columnas de sílice, incorporando una DNasa (*PureLink® DNase Set*; *Thermo Fisher Scientific*) para eliminar posibles restos de ADN genómico en el eluido final.





**Figura 10. Extracción de ARN.** Proceso de extracción de ARN de muestras tisulares utilizando el PureLink® RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific). Modificado de <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/rna-extraction/rna-types/total-rna-extraction/purelink-rna-mini-kit.html>.

#### 4.3.1.1. Análisis cuantitativo y cualitativo del ARN

Para asegurar la validez de los resultados, tras la extracción del ARN tisular se realizó un análisis cuantitativo y cualitativo del ARN obtenido. Mediante este análisis se determinó la concentración, pureza e integridad de las muestras de ARN, ya que alteraciones en alguno de estos parámetros podrían provocar enormes variaciones en los resultados del análisis que podrían generar conclusiones erróneas.

De acuerdo a las directrices MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*)<sup>(213)</sup>, se analizó el ARN purificado mediante espectrofotómetro (ND-2000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies Inc.) y electroforesis capilar utilizando el Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

La concentración de ARN fue determinada mediante Nanodrop y la integridad del ARN fue evaluada mediante el cálculo del número de integridad del ARN (RIN, *RNA Integrity Number*) proporcionado tras el análisis mediante Bioanalyzer, siendo el RIN un valor que puede oscilar entre 1 (ARN totalmente degradado) y 10 (ARN totalmente íntegro). Sólo se aceptaron para el análisis transcripcional los participantes cuyas 4 muestras tisulares tuvieran una concentración superior a 100 ng/μl y un RIN > 7. Para las muestras de TP, de procesamiento más complejo debido a las características del tejido, se aceptó un RIN >5).

Los procesos de extracción de ARN y análisis inicial con espectrofotómetro se realizaron en las instalaciones del VHIR (*Vall d'Hebrón Institut de Recerca*) por parte del personal del Grupo de Investigación en Cirugía General (*Grup de Recerca en Cirurgia General, GRGC-VHIR*).

Los procesos de análisis de integridad del ARN mediante Bioanalyzer y el posterior análisis transcriptómico con microarrays se realizó en la sección de Genómica de la Unidad de Alta

Tecnología (UAT) del VHIR  
([http://en.vhir.org/portal1/article\\_menu\\_serveis.asp?s=serveis&contenttypeid=279&contentid=1219&t=uat](http://en.vhir.org/portal1/article_menu_serveis.asp?s=serveis&contenttypeid=279&contentid=1219&t=uat)).

## 4.3.2. ANALISIS DE MICROARRAYS

### 4.3.2.1. Análisis transcriptómico mediante microarrays

Las bases del análisis de expresión génica mediante microarrays se encuentran explicadas en el **Anexo I**.

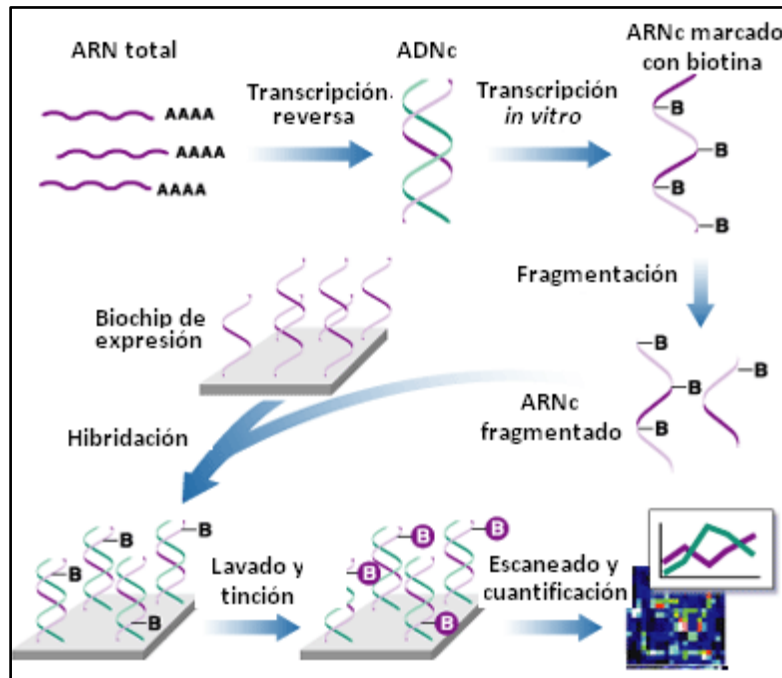
Todo el procesamiento se llevó a cabo con el ensayo comercial de Affymetrix *Clariom™ S Pico Assay HT, human (Thermo Fisher Scientific)*, que integró en este caso placas de 24 chips *Clariom S 24-Array Plate* y todos los reactivos necesarios para llevar cabo el análisis transcripcional (**Figura 11**). Estos chips permiten medir el nivel de expresión de > 20,000 genes correctamente anotados. El procesamiento se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### Amplificación y marcaje con biotina

Se partió de muestras de ARN (grupos de muestras o *pools*) a una concentración de 500 pg/uL. Se inició el proceso con una transcripción inversa que integra la longitud completa del ARN, capturando tanto ARN codificante como las múltiples formas de ARN no codificante. Seguidamente, se amplificó el ADN complementario (ADNc) resultante mediante qPCR, y se realizó una transcripción in vitro T7 (con T7 RNA polimerasa) de la cual se obtuvo ARN complementario (ARNc). Este a su vez se purificó y se utilizó para sintetizar, mediante transcripción inversa, un ADNc que finalmente se marcó con biotina tras un proceso de fragmentación.

#### Hibridación, adquisición de las imágenes y generación de datos

Se llevó a cabo a partir de la hibridación del ADNc biotilado en las dos placas de 24 chips, utilizando durante todo el proceso el sistema *GeneTitan™ HT Microarray System*, de alto rendimiento y automatizado. Los chips se incubaron a 45°C en agitación y, tras una serie de lavados, se escanearon con el dispositivo *GeneTitan Instrument Imaging Device*. Los primeros datos en crudo de la cuantificación se obtuvieron gracias al software del sistema *Transcriptome Analysis Console version 4.0. (Thermo Fisher Scientific)*, a partir de la matriz de intensidades de señal de cada chip.



**Figura 11. GeneChip.** Procesamiento y análisis de muestras de ARN con GeneChip de Affymetrix. Modificado de <http://www.affymetrix.com> y de Lipshutz, R. J., Fodor, S. P., Gingeras, T. R. & Lockhart, D. J. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat. Genet.* 21, 20-4 (1999) <sup>(214)</sup>.

#### 4.3.2.2. Pooling o agrupación de muestras para el análisis con microarrays

En los análisis mediante microarrays, el término *pooling* se refiere a la agrupación o combinación de diferentes ARNm (procedentes de diferentes casos) en una sola muestra o *pool* que será hibridada en el microarray. Las muestras de ARNm pueden ser agrupadas en pools por diferentes motivos <sup>(215)</sup>:

- En primer lugar, debido a la posible necesidad de obtener una mayor concentración de ARNm para poder ser analizada en los microarrays (en casos en los que no se disponga de suficiente ARNm procedente de cada muestra de forma individual) <sup>(216)</sup>.
- En segundo lugar, con el objetivo de reducir el efecto de las variaciones biológicas en el análisis (es decir, minimizar el efecto de la variación entre individuos) <sup>(217,218)</sup>. Esta reducción de la variabilidad entre individuos puede ser deseable cuando se desean analizar las diferencias de expresión entre grupos (por ejemplo, de casos y controles) y no entre individuos. Con esta estrategia se facilita la detección de hallazgos significativos y patrones de expresión característicos en las poblaciones de estudio <sup>(219,220)</sup>.
- En tercer lugar, con el objetivo de reducir los costes del análisis, ya que los estudios que incluyen la agrupación de muestras en pools permiten analizar un gran número de individuos agrupados, disminuyendo el número de microarrays necesarios y potencialmente disminuyendo el coste total del análisis.

En el presente estudio, dado que el objetivo principal es la comparación del mapa transcriptómico entre grupos, decidimos trabajar con pools de muestras dadas las potenciales ventajas de este diseño respecto a la reducción de la variabilidad individual, así como considerando la reducción de costes y por tanto la mayor eficiencia asociada a este diseño. Para validar los hallazgos iniciales del análisis con microarrays en los individuos estudiados, posteriormente se seleccionaron los genes más representativos con expresión diferencial en los tejidos de interés y se analizó su expresión individual mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

En el grupo de pacientes con obesidad se obtuvieron 6 pools por tejido, estando cada pool compuesto por muestra de 5 sujetos distintos. En el grupo control se obtuvieron también 6 pools por tejido, pero en estos se combinó el material de menos sujetos, concretamente de 3 sujetos en uno y de dos sujetos por pool en el resto. Así pues, en este estudio, el análisis con microarrays se basó en la hibridación de 48 muestras, cada una de ellas formada por un pool de muestras de ARN procedente de varios individuos (**Figuras 12 y 13**):

- Grupo Pacientes (n = 30): **6 pools** (n=5 sujetos/pool) x **4 tejidos** = **24 pools de muestras para el análisis.**
- Grupo Control (n = 13): **6 pools** (5 pools con n=2 sujetos; 1 pool con n=3 sujetos) x **4 tejidos** = **24 pools de muestras para el análisis.**
- En TOTAL: **24 muestras** (pacientes) + **24 muestras** (controles) = **48 muestras para el análisis**

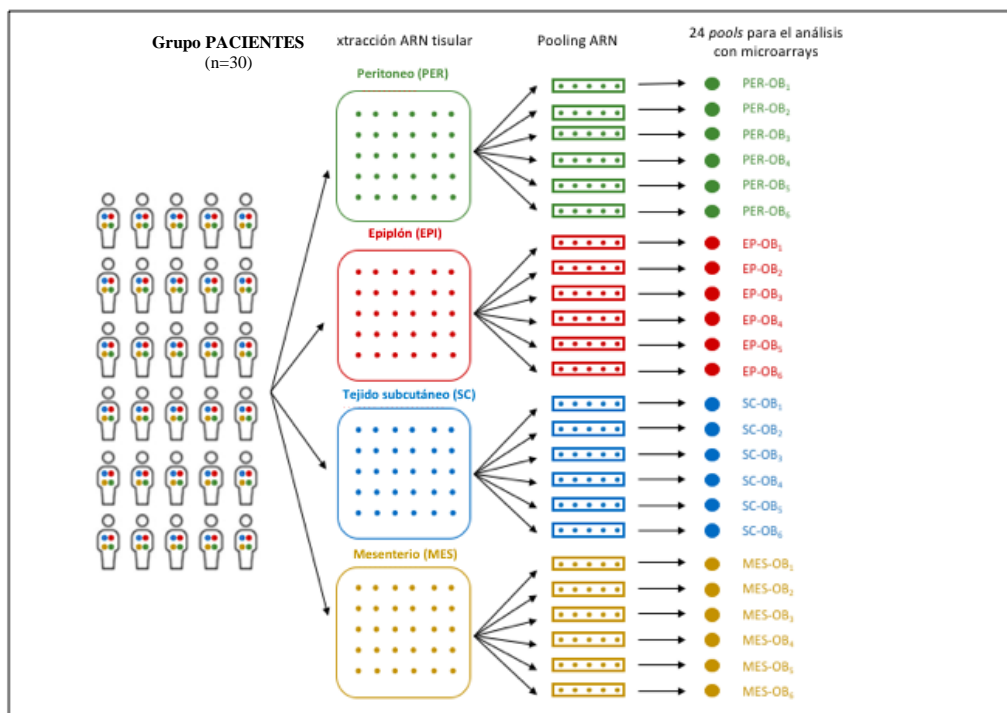


Figura 12. Pooling de muestras en el grupo de pacientes con obesidad.

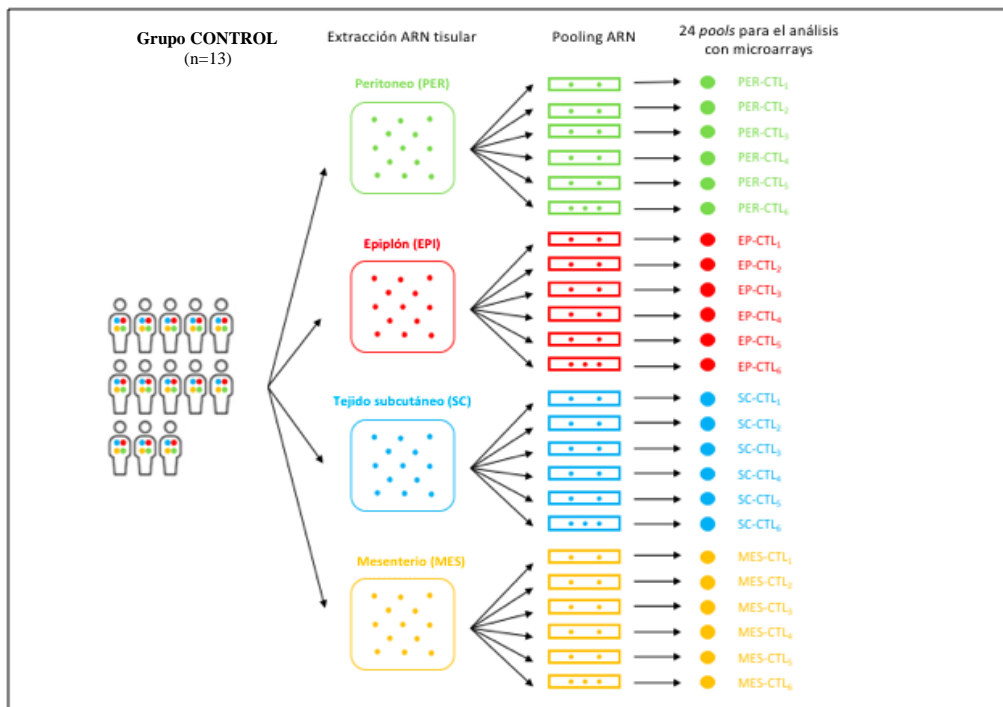
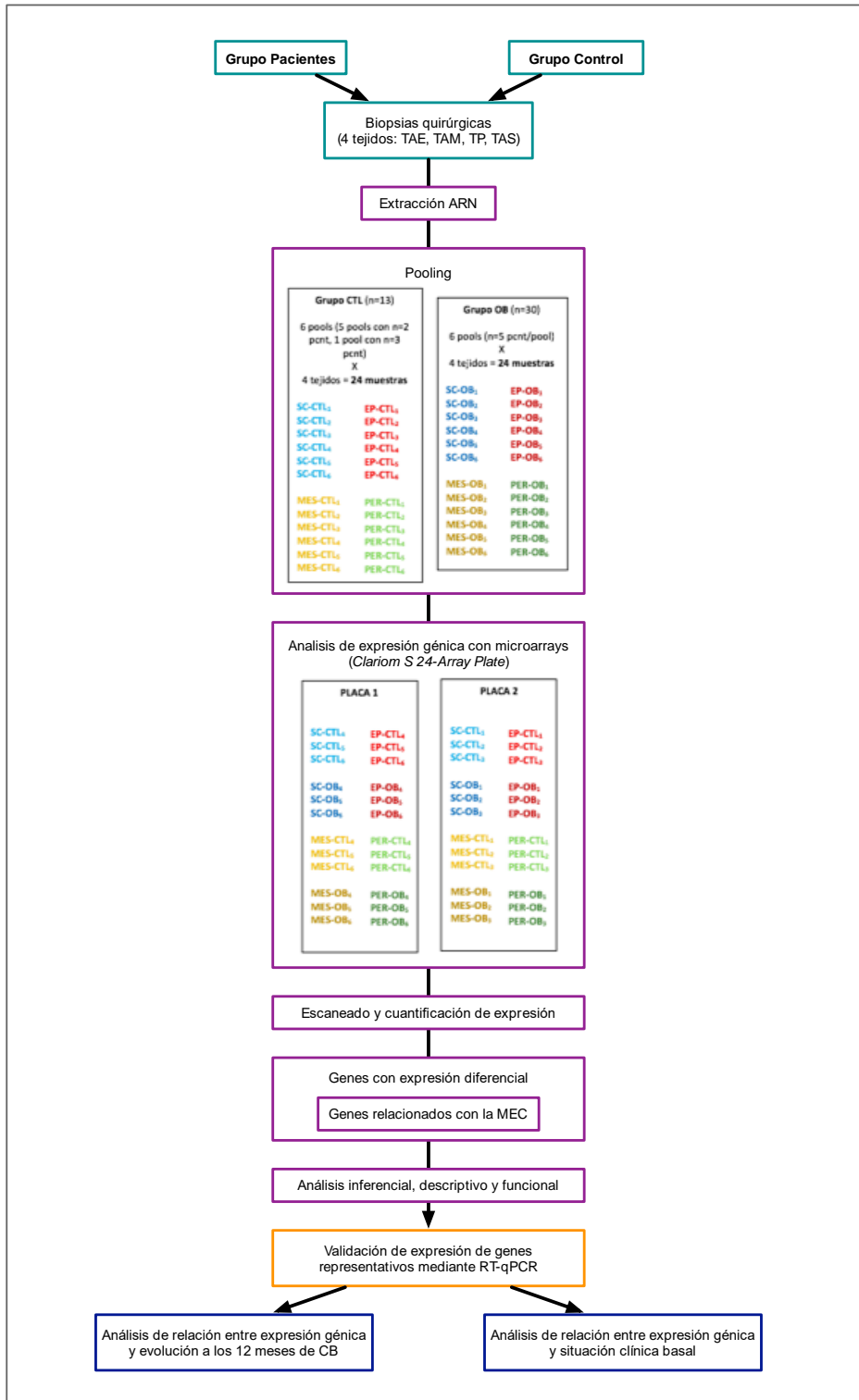


Figura 13. Pooling de muestras en el grupo de sujetos control.

Para el análisis con microarrays, los pools de muestras se distribuyeron en dos placas de 24 chips *Clariom S 24-Array Plate*. Dado que en cada grupo se dispone de 6 pools de muestras para cada uno de los tejidos, estos se distribuyeron 3 a 3 en cada una de las placas para minimizar las posibles variaciones sistemáticas en la medida que pudieran estar relacionadas con factores técnicos y no con una verdadera variación biológica, efecto conocido como efecto lote o *batch effect* <sup>(221)</sup>. De esta forma, en cada placa de 24 chips se analizaron tantos pools de muestras del grupo control como del grupo de pacientes, con las muestras de cada tejido igualmente distribuidas entre las dos placas.

En la **Figura 14** se representa de forma esquematizada la metodología general del análisis de expresión génica mediante microarrays, así como la distribución específica de los pools de muestras en las placas de 24 chips para el análisis de expresión génica.



**Figura 14. Metodología general del análisis de expresión génica.** ARN: ácido ribonucleico; TAE: Tejido adiposo epiloico, TAM: Tejido adiposo mesentérico; TP: Tejido peritoneal; TAS: Tejido adiposo subcutáneo; MEC: Matriz extracelular; CB: Cirugía bariátrica.

#### 4.3.2.3. Análisis bioinformático de los resultados de los microarrays

El análisis bioinformático se realizó con el soporte de la Unidad de Estadística y Bioinformática (UEB) del Vall d'Hebrón Institut de Recerca (VHIR), siguiendo el esquema habitual para el análisis de datos de microarrays ([http://en.vhir.org/portal1/article\\_menu\\_serveis.asp?s=serveis&contenttypeid=43&contentid=1250&t=presentation](http://en.vhir.org/portal1/article_menu_serveis.asp?s=serveis&contenttypeid=43&contentid=1250&t=presentation)).

Para el análisis estadístico se utilizó el lenguaje estadístico "R" (*versión R 3.6.0 (2019-04-26)*, Copyright (C) 2019 The R Foundation for Statistical Computing) y las bibliotecas desarrolladas para el análisis de microarrays en el *Proyecto Bioconductor* ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)).

#### Preprocesamiento: normalización y filtrado

Antes de analizar los resultados obtenidos en los microarrays, es imprescindible realizar un preprocesamiento de los datos con el objetivo de detectar y eliminar variaciones sistemáticas y artefactuales asociadas a factores técnicos e inherentes al propio proceso de hibridación de los arrays, preservando la variación biológica real. Para ello se realizó una primera exploración cualitativa de los resultados analizando la distribución de los valores de intensidad de los distintos arrays, con el objetivo de validar la inclusión o no de los chips en el proceso de normalización posterior.

#### Normalización

La normalización es el proceso mediante el cual se eliminan o minimizan las variaciones no biológicas en los niveles de intensidad de la señal, de forma que se puedan detectar de forma adecuada las diferencias en la expresión génica eliminando los sesgos asociados a factores técnicos, de manera que se puedan comparar los datos obtenidos en el análisis de los arrays.

En este estudio, el proceso de normalización se realizó mediante el método RMA (*Robust Multi-array Average*)<sup>(222)</sup>, que incluye la corrección del fondo o *background* de hibridaciones no específicas, la normalización de los datos por cuantiles y la conversión de las sondas a transcritos, con promedio de los valores de los exones, para obtener un valor único de expresión correspondiente a cada gen analizado (sumarización).

#### Filtrado

Para aumentar el poder estadístico y reducir el "ruido de fondo" en el análisis, el preprocesamiento de los datos incluyó un proceso de filtrado mediante el cual algunos genes que no pueden considerarse expresados o diferencialmente expresados fueron eliminados. Para asegurarnos de que ningún gen diferencialmente expresado se eliminara del análisis, la desviación estándar de todos los genes en el array fue calculada de forma que se pudiera ordenar y expresar gráficamente. Si la expresión de un gen determinado cambia en función de las condiciones experimentales (es decir, entre los diferentes grupos), sería de esperar que la

desviación estándar entre muestras fuese elevada; por el contrario, las desviaciones estándar de los genes cuya expresión no varía entre los grupos deberían ser más baja.

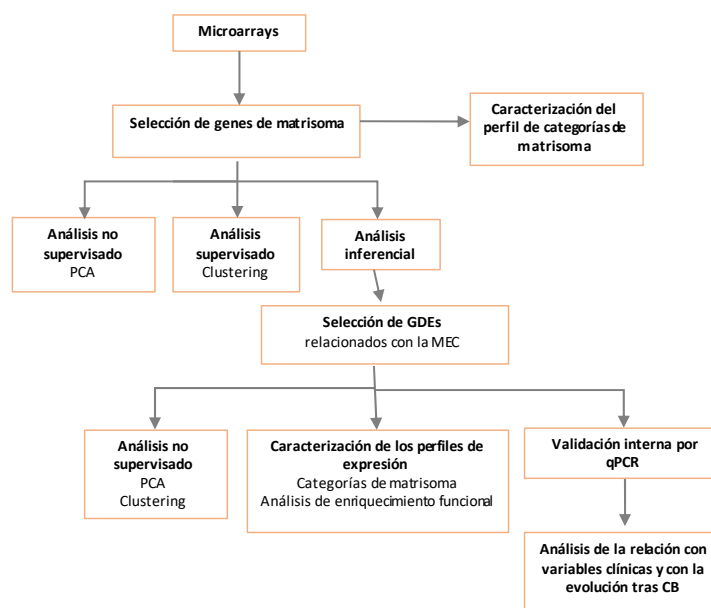
En el presente estudio se eliminaron del análisis todos aquellos genes cuya desviación estándar estuviese por debajo del percentil 65 de todas las desviaciones estándar calculadas. En este caso, se estableció un punto de corte que puede considerarse conservador con el objetivo de evitar que se eliminara del análisis algún gen con expresión diferencial. Este proceso dio como resultado la selección de un listado de genes para su posterior análisis de expresión diferencial.

### Identificación y clasificación de los genes del matrisoma

Tomando como referencia la base de datos de la plataforma *The Matrisome Project* (<http://matrisomeproject.mit.edu/>)<sup>(223)</sup>, de entre los genes seleccionados se identificaron los específicamente relacionados con la matriz extracelular. Estos genes fueron clasificados de acuerdo con la división *Core-matrisome / Matrisome-associated* y también en base a las categorías funcionales (*ECM glycoproteins, collagens, proteoglycans, ECM-affiliated proteins, ECM-regulators y secreted factors*) definidas en la plataforma.

Los genes identificados fueron incluidos en el análisis de expresión, que se basó en (Figura 15):

- Caracterización y análisis comparativo de los perfiles de expresión génica de grupos y tejidos;
- Análisis estadístico inferencial para la detección y selección de los subconjuntos de genes del matrisoma con expresión génica diferencial en obesidad; y
- Caracterización y análisis de significación biológica de los conjuntos de genes seleccionados para la caracterización funcional de la expresión génica del matrisoma en obesidad.



**Figura 15. Análisis del perfil de expresión génica de proteínas del matrisoma en los grupos estudiados a partir de los datos obtenidos mediante microarrays.** PCA: análisis de componentes principales, MEC: Matriz extracelular, GDE: genes diferencialmente expresados, CB: Cirugía bariátrica



### 4.3.3. ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA

El análisis de microarrays necesita métodos matemáticos que exploren unos datos que se encuentran en un espacio altamente dimensional, es decir, que se encuentran influenciados por un gran número de factores o variables. Mediante este tipo de métodos matemáticos se consigue reducir la dimensionalidad de determinados grupos de genes que presentan patrones transcripcionales similares. Estos métodos se basan en la agrupación de diversas variables en factores o componentes, compuestos cada uno de ellos por la agrupación de múltiples variables, que serían factores explicativos de una determinada proporción de la variación observada en un conjunto de datos. Este tipo de análisis exploratorios permiten discriminar condiciones experimentales distintas, en este caso grupos de sujetos, en base a los perfiles globales de expresión.

Los perfiles de expresión génica de matrisoma se caracterizaron a dos niveles: en primer lugar, a partir del total de genes de matrisoma detectados en el análisis de microarrays; y en segundo lugar, a partir de los subconjuntos de genes diferencialmente expresados (GDEs) en cada tejido y grupo de sujetos. Se utilizaron métodos supervisados (en los que se conoce la clasificación, o parte de ella, de las observaciones) y métodos no supervisados (en los que se ignora el grupo al que pertenece cada observación) comunes en el análisis de datos de microarrays.

El análisis de los perfiles de expresión génica se realizó mediante el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) así como con diferentes métodos de agrupamiento o *clustering*, utilizando para ello la aplicación *ClustVis*, disponible en servidor web (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>)<sup>(224)</sup>.

#### 4.3.3.1. Análisis de Componentes Principales (PCA)

Este análisis de tipo no supervisado permite relacionar el conjunto de las muestras analizadas en función de la variabilidad en la expresión génica global, reduciendo la dimensionalidad de las muestras a dos (o tres) dimensiones, de forma que cada muestra se representa gráficamente en base a los dos componentes principales que caracterizan a la mayoría de los genes expresados. El resultado puede representarse en forma de gráfico donde las muestras similares deben aparecer juntas, pudiéndose generar elipses predictivas con un nivel de confianza determinado.

Se realizaron PCA a partir de las intensidades normalizadas y filtradas de todos los genes de matrisoma detectados en el microarrays, así como de la selección de genes de matrisoma diferencialmente expresados para determinar su potencial como clasificador de pacientes y/o tejidos. Se utilizó la Descomposición en Valores Singulares para el cálculo de los componentes principales y el resultado se representó en forma de gráficos de dispersión definidos por los dos primeros componentes. Se incluyeron elipses predictivas con un nivel de confianza del 95%.

#### 4.3.3.2. Métodos de agrupamiento (*clustering*)

Se utilizaron métodos de *clustering* con el objetivo de encontrar, dentro del conjunto de observaciones, grupos (*clusters*) de genes con un mismo patrón de expresión (lo cual sugiere expresión o regulación común), y muestras con patrones comunes de expresión génica que, al igual que el PCA, tuvieran la capacidad de clasificar correctamente a los grupos.

Se aplicaron métodos de *clustering supervisados* (en los que se conoce previamente la clasificación de las observaciones y el objetivo es encontrar una firma molecular o un conjunto reducido de genes cuyo perfil de expresión permita clasificar una determinada muestra), y *no supervisados* (en los que no se conoce a qué grupo pertenece realmente cada observación, y el objetivo principal es determinar qué elementos, ya sean genes o muestras, presentan un patrón de expresión similar). Hay que destacar que los métodos de *clustering* no aportan información cuantitativa sobre qué genes se expresan diferencialmente entre grupos, sino que se trata de métodos exploratorios que tienen como objetivo la búsqueda de patrones similares de expresión entre el conjunto de observaciones. En este tipo de análisis, las particiones se establecen de forma que las observaciones que están dentro de un mismo grupo son similares entre ellas y distintas a las observaciones en otros grupos.

Se realizó una primera exploración de la estructura de los datos (expresión génica de todos los genes del matrisoma) utilizando análisis de agrupamiento o *clustering supervisado*. Posteriormente, mediante análisis no supervisado, se analizó el perfil de expresión de los GDEs en los distintos tejidos entre individuos del grupo de pacientes con obesidad y el grupo control. En todos los casos, se utilizó un método de *clustering jerárquico aglomerativo* a partir de las distancias euclidianas entre genes y condiciones, con un procedimiento de vinculación completo.

Se utilizaron mapas de calor o *heatmaps* como representación de la matriz de valores en forma de un gradiente de color proporcional al valor de cada variable en cada posición, lo cual facilita la identificación visual de posibles patrones de expresión característicos de cada *cluster*. El resultado de estas agrupaciones y de cómo se relacionan entre sí se representa en forma de dendrogramas o “árboles de similitud”.

### 4.3.4. ANALISIS DE LOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS

#### 4.3.4.1. Selección de genes diferencialmente expresados

El análisis estadístico inferencial para la selección de los GDEs en pacientes con obesidad respecto a controles en cada uno de los tejidos se realizó a partir de los datos completos obtenidos en los microrarrays. Dicho análisis se basó en el ajuste de un modelo lineal de análisis (*limma*) con moderación empírica de la varianza de Bayes. El modelo de análisis bayesiano es una técnica estadística similar a ANOVA diseñada específicamente para el análisis de microarrays<sup>(225)</sup>.

Debido a que múltiples comparaciones (una por cada gen) son realizadas al mismo tiempo durante el análisis, los  $p$ -valores se ajustaron para controlar el FDR (*False Discovery Rate*) utilizando el método de Benjamini y Hochberg para comparaciones múltiples <sup>(226)</sup>.

El modelo empírico de la varianza de Bayes utilizado en este estudio genera diferentes medidas o estadísticos que pueden ser utilizados para decidir qué genes se consideran diferencialmente expresados:

- $\log FC$  o  $M$  es el *fold change* estimado (en escala logarítmica,  $\log_2$ ) entre las condiciones experimentales consideradas en el análisis.
- $AveExpr$  es una medida de la expresión media del gen en todos los arrays, expresado en escala logarítmica  $\log_2$ .
- $t$  es una “t-moderada”, que corresponde a la ratio entre  $M$  y su error estándar. Se interpreta de la misma forma que el estadístico  $t$  de Student.
- $P.Value$  es el  $p$  valor correspondiente a  $t$ .
- $adj.P.Val$  es el  $p$  valor ajustado para comparaciones múltiples según el método de Benjamini y Hochberg, y
- $B$  es un estadístico que indica la probabilidad de que un gen se encuentre diferencialmente expresado vs la probabilidad de que no lo esté (en escala logarítmica). Un valor de  $B > 0$  indicaría la probabilidad de una expresión diferencial. Cuando  $B = 0$ , se interpreta como una probabilidad del 50% de que el gen tenga una expresión diferencial. El estadístico  $B$ , que se calcula de forma ajustada para comparaciones múltiples, expresa una probabilidad “a posteriori” que asume inicialmente que una determinada proporción de genes tienen una expresión diferencial. En ausencia de pérdida de datos, el estadístico  $t$  (y su  $p$ -valor) y el estadístico  $B$  clasifican u ordenan los genes exactamente en el mismo orden en base a su expresión.

De los tres estadísticos arrojados por este tipo de análisis ( $t$ , su  $p$  valor asociado y  $B$ ), en este estudio se eligió el  $p$ -valor como base para la selección de GDEs (ya que, a diferencia de  $B$ , no requiere para su cálculo la suposición de una proporción esperada de GDEs).

Así pues y en base a este modelo lineal de análisis bayesiano, para cada comparación o contraste de condiciones se obtuvo un listado de genes ordenados de acuerdo a la evidencia de expresión diferencial, desde la más fuerte a la más débil, en función de la significación estadística de la diferencia ( $p$ -valor) o de acuerdo con la ratio de expresión (*fold change*) entre las condiciones experimentales.

Cabe destacar que el punto de corte ( $p$ -valor o *fold change*) por encima del cual se considera que un gen está diferencialmente expresado es arbitrario y puede ser más o menos restrictivo en función del análisis. En este caso, el criterio estadístico para la selección de GDEs en el análisis inferencial (umbral de expresión) se basó en un valor ajustado de  $p < 0.05$  y un aumento logarítmico (*absolute logaritmik fold change*)  $> 0.5$ .

Las comparaciones en relación a la expresión diferencial del matrisoma se representaron gráficamente en forma de *volcano plots* que muestran la magnitud del cambio en la expresión génica frente a la distribución de la significación estadística.

#### Interpretación del Log Fold Change ( $\log_2FC$ ):

El Log Fold Change ( $\log_2FC$ ) es una medida que se utiliza para comparar la expresión génica entre dos condiciones o grupos diferentes. Representa la magnitud del cambio en la expresión de un gen entre las distintas condiciones analizadas.

Para el cálculo del  $\log_2FC$ , se obtiene el nivel de expresión de cada gen en cada condición o grupo y, tras la normalización de los datos, se calcula el  $\log_2FC$  tomando el logaritmo base 2 de la relación entre los dos valores de expresión:

$$\log_2FC = \log_2 (A/B)$$

- Valor  $\log_2FC$  próximos a 0 ( $\log_2FC = 0$ ) indican que no hay cambio en la expresión del gen entre las dos condiciones.
- Valores  $\log_2FC$  positivos ( $\log_2FC > 0$ ) indican que hay un incremento de la expresión del gen en la condición A con respecto a la B.
- Valores  $\log_2FC$  negativos ( $\log_2FC < 0$ ) indican que hay una disminución de la expresión del gen en la condición A con respecto a la B.

La interpretación de la magnitud del cambio en la expresión puede hacerse en escala decimal elevando 2 al resultado del  $\log_2FC$  ( $2^{\log_2FC}$ ). Por tanto, si el LFC entre las dos condiciones ha resultado positivo, por ejemplo de 1.2 ( $\log_2FC = 1.2$ ), significa que la expresión del gen en la condición A es  $2^{\log_2FC} = 2^{1.2} = 2.30$  veces la expresión del gen en la condición B. Es decir, la expresión del gen aumenta 2.30 veces en A con respecto a B. De la misma forma, si el  $\log_2FC$  entre las dos condiciones ha resultado negativo, por ejemplo de -2.7 ( $\log_2FC = -2.7$ ), significa que la expresión del gen en la condición A es  $2^{\log_2FC} = 2^{-2.7} = 0.15$  veces la expresión del gen en la condición B. Es decir, la expresión del gen disminuye  $1/0.15 = 6.67$  veces en A con respecto a B.

#### 4.3.4.2. Caracterización de los genes diferencialmente expresados

Como se ha expuesto previamente en el apartado **4.3.2.3. Análisis bioinformático de los resultados de los microarrays**, los GDEs en los tejidos analizados fueron clasificadas de acuerdo con las categorías funcionales definidas en la plataforma *The Matrisome Project* (<http://matrisomeproject.mit.edu/>)<sup>(223)</sup>.

#### 4.3.4.3. Análisis de significación biológica

El análisis mediante microarrays y, más concretamente, el análisis de expresión diferencial entre dos condiciones (en este caso grupo de pacientes con obesidad vs grupo control), genera una gran cantidad de información que no puede ser analizada de forma manual. Existen diferentes herramientas de computación o aplicativos especializados para poder realizar este tipo de análisis, destinados a la identificación de categorías funcionales que se encuentran significativamente enriquecidas en un conjunto determinado de genes. En este estudio, el análisis de significación biológica de los conjuntos de GDEs consistió en un análisis de enriquecimiento funcional seguido de un segundo análisis de interacción de proteínas.

Para evaluar estadísticamente las diferencias funcionales en la expresión génica entre dos condiciones, una estrategia habitual ha consistido en cuantificar el interés de cada GDE con un determinado valor de  $p$ , ajustar las  $p$ 's por comparaciones múltiples, elegir un punto de corte determinado y generar una lista de posibles "genes candidatos". Sin embargo, este método analiza los genes de forma individual, sin tener en cuenta los posibles cambios combinados en la expresión y las acciones biológicas coordinadas que se dan entre determinados genes desde un punto de vista funcional. Por ello, en los últimos años se han desarrollado métodos de análisis "de enriquecimiento", que incorporan este enfoque biológico al análisis de expresión diferencial y son capaces de detectar situaciones en las que los genes de un grupo determinado, relacionados entre sí, experimentan pequeñas variaciones de forma coordinada.

Existen dos métodos básicos para realizar este tipo de análisis funcional<sup>(227)</sup>:

- Análisis de sobre-representación o *Over-representation analysis (ORA)*: Consiste en comparar la expresión de un conjunto de genes de interés con un conjunto de genes de referencia. El conjunto de genes de interés se define en este caso estableciendo un punto de corte (por ejemplo, un determinado valor de  $p$ ) para generar un listado de genes candidatos. A continuación, en relación a cada una de las categorías funcionales previamente establecidas (por ejemplo, las diferentes anotaciones definidas en una base de datos previamente seleccionada como *Reactome* o *Gene Ontology*), este método detecta si los genes de esa categoría están sobre-representados o infra-representados en nuestro conjunto de genes y evalúa si lo están con mayor probabilidad de la que sería justificable por azar.
- Análisis de enriquecimiento de conjunto de genes o *Gen Set Enrichment Analysis (GSEA)*: En este tipo de análisis no se parte de un punto de corte concreto para generar un listado de genes candidatos, sino que se ordenan todos los genes del conjunto de acuerdo a un determinado criterio o valor de expresión (generalmente el valor de  $p$  y el *fold change*). En este caso, para cada categoría funcional se pretende analizar si los genes pertenecientes a esa categoría se encuentran acumulados en la parte alta o bien en la parte baja de nuestro listado de genes.

En este estudio, se realizó un ORA para el análisis funcional de los GDEs.

El análisis de enriquecimiento funcional a partir de los listados de GDEs se realizó mediante la herramienta *Metascape* (<https://metascape.org>)<sup>(228)</sup>. *Metascape* incluye diversas bases de datos ontológicas optimizadas, y elimina redundancias mediante un proceso de agrupación de términos. En este caso, se utilizaron las bases de datos de GO (*Gene Ontology*; <http://geneontology.org/>), sin incluir *Cell Compartments* para evitar la redundancia de términos asociados a “matriz extracelular”, KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, <https://www.genome.jp/kegg/>), Reactome (<https://reactome.org/>), MsigDB (*Molecular Signatures Database*, <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/>), Biocarta (<https://maayanlab.cloud/Harmonizome/resource/Biocarta>), Wikipathways (<https://www.wikipathways.org/>), DisGeNet (<https://www.disgenet.org/>) y PaGen Base. *Metascape* utiliza pruebas hipergeométricas y el algoritmo de corrección del valor p de Benjamini-Hochberg para clasificar todos los parámetros ontológicos que contengan un conjunto de genes comunes a la lista de entrada sustancialmente mayor que el esperado por azar. La similitud por pares entre dos términos enriquecidos se calcula a partir de una puntuación de la prueba Kappa. La matriz de similitud se agrupa jerárquicamente y se aplica el umbral de 0,3 para obtener los diferentes clusters. *Metascape* determina el término más significativo (valor p más bajo) en cada cluster para representar el cluster en un gráfico de barras.

Por otra parte, también se llevó a cabo un análisis de interacciones utilizando *Metascape*. Este tipo de análisis puede ayudar a precisar qué complejos bioquímicos o componentes de señales de transducción gobiernan los datos biológicos, en este caso los perfiles de expresión génica. *Metascape* utiliza como principal fuente de datos las interacciones físicas proteína-proteína del interactoma humano capturadas en *BioGrid*, además de *InWeb\_IM* y *OmniPath*. Ante un conjunto de genes o proteínas, primero extrae automáticamente una red de interacción formada por estos candidatos. A continuación, para cada componente de la red conectada, aplica de forma iterativa el algoritmo *MCODE* e identifica los complejos densamente conectados. Para cada complejo, aplica además el análisis de enriquecimiento de funciones y utiliza los tres términos más enriquecidos para la anotación de sus funciones biológicas.

Se estudiaron los grupos de GDEs en los 4 tejidos de pacientes con obesidad, y se compararon los resultados entre sí mediante la capacidad de *Metascape* de realizar meta-análisis de listas múltiples de genes. La visualización de los resultados comprendió:

- La generación de *gráficos de barras de enriquecimiento* con los clusters más enriquecidos y los patrones de enriquecimiento de los GDEs en los 4 tejidos.
- La generación de *redes de enriquecimiento* con nodos representados por gráficos circulares en los que el tamaño del sector es proporcional al número de genes originados en cada lista de genes.

## 4.3.5. VALIDACIÓN DE RESULTADOS MEDIANTE RT-qPCR

### 4.3.5.1. PCR cuantitativa con transcriptasa inversa

El análisis transcriptómico con microarrays es el principal método experimental para el análisis de la expresión génica a gran escala. No obstante, esta técnica está sujeta a una cierta variabilidad experimental que hace necesaria la validación de los datos obtenidos mediante otras técnicas que permitan confirmar los resultados de expresión y detectar posibles falsos positivos. En este sentido, la RT-qPCR es a día de hoy el *gold standard* para la validación de los resultados de expresión obtenidos mediante microarrays<sup>(229)</sup>.

En este estudio, tras el análisis funcional previamente descrito, se seleccionaron los GDEs entre los tejidos de los dos grupos de estudio de acuerdo con los siguientes criterios:

- Expresión diferencial con  $p < 0.05$
- Expresión diferencial superior a 2 ( $\log_2FC > 1$ )
- Intensidad superior a 7

De acuerdo con estos criterios, se seleccionaron los genes más representativos de los procesos enriquecidos en el grupo de pacientes con obesidad. La expresión diferencial de estos genes seleccionados tras el análisis funcional fue validada mediante RT-qPCR.

Las bases técnicas y conceptuales del análisis de expresión génica mediante RT-qPCR se encuentran detallados en el **Anexo II**.

En este caso, la validación de los genes seleccionados se realizó en las muestras de ARN de los cuatro tejidos estudiados de 24 sujetos (15 pacientes con obesidad y 9 sujetos del grupo control). Estos sujetos fueron seleccionados en base a criterios técnicos y logísticos relacionados con la limitación de espacio en las placas, el coste del procedimiento y la calidad de las muestras de ARN disponibles para la validación.

Todas las muestras incluidas en el análisis cumplieron los requerimientos de calidad mínimos necesarios para la realización de una RT-qPCR (*MIQE guidelines*<sup>(213)</sup>).

Se realizaron cuatro transcripciones reversas, correspondientes a los cuatro tejidos a estudio, utilizando el kit *The Transcriptor Universal cDNA Master* de Roche, (Ref. 5893151001) y el termociclador *Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler* de Thermo Fisher Scientific, en el que se programaron los ciclos indicados siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La concentración final de ADNc tras la transcripción reversa fue, en el caso de las muestras a analizar, 750 ng/ $\mu$ L (0.75  $\mu$ g/20  $\mu$ L por reacción). Se trabajó con un pool de muestras de ARN para la realización de las curvas estándar, y con dos controles negativos para excluir posibles contaminaciones a nivel de las muestras analizadas (control sin transcriptasa inversa, *RT Minus* o *RT*, y control sin muestra, *Non-Template Control*, o *NTC*), en este caso a una concentración de 1000 ng/ $\mu$ L (1  $\mu$ g/20  $\mu$ L por reacción). Este pool de muestras se realizó a partir de muestras de

ARN humano de los tejidos estudiados, procedente de pacientes con algún criterio de exclusión y por tanto no incluidos en el análisis transcripcional con microarrays.

Mediante diluciones, se transformaron todas las concentraciones iniciales de las diferentes muestras de ARN a 110 ng/ $\mu$ L. Una vez obtenidas todas las muestras de ADNc, se procedió a la realización de las RT-qPCR's previa dilución 1:20 de las muestras (concentración final del ADNc 1.87 ng/ $\mu$ L; concentración final del pool 2.5 ng/ $\mu$ L).

Se realizaron un total de 11 RT-qPCR's (una por cada uno de los genes a validar), y otras 4 qPCR's para la búsqueda y validación de genes de referencia, utilizando el kit *Power Up<sup>TM</sup> SYBR<sup>TM</sup> Green Master Mix* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Ref. A25778). Se utilizaron placas de 384 pocillos con un volumen final de 10 $\mu$ L por pocillo (cantidad de ADNc por reacción en el caso de las muestras 3.74 ng/10 $\mu$ L; en el caso del pool 5 ng/10 $\mu$ L). Cada una contenía triplicados de las 24 muestras (15 pacientes con obesidad y 9 controles) de cada uno de los cuatro tejidos a estudio (24 sujetos X 4 tejidos X 3 = 288 muestras), triplicados *Non-Template Control*, triplicados del control negativo *RT Minus* y un banco de diluciones de concentración conocida (6 diluciones estándar), por triplicado, para determinar la eficiencia de la reacción para cada par de cebadores.

Los cebadores utilizados fueron diseñados manualmente, y sus eficiencias fueron comprobadas mediante el análisis de la curva estándar realizada con un banco de diluciones a concentraciones decrecientes conocidas (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) en cada una de las placas.

Para placas de 96 pocillos, se utilizó el termociclador de *Applied Biosystem PRISM<sup>®</sup> 7000*; para placas de 384 pocillos, se utilizó el termociclador *7900HT Fast Real-Time PCR System with 384-Well Block Module* (ABI 7900HT). Los ciclos fueron programados en la modalidad estándar de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial. Mediante el programa *Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System Software (SDS v2.4)*, se calcularon los umbrales de ciclo (Ct's) de cada una de las muestras analizadas en la qPCR, lo cual permite la cuantificación de la cantidad (número de copias) de la secuencia de interés presente en la muestra y por tanto el análisis de expresión del gen de interés.

#### 4.3.5.2. Análisis de datos y genes de referencia

En teoría, cuando comparamos dos muestras para un análisis de expresión mediante RT-qPCR, un valor de Ct menor indica una mayor concentración inicial de ARN y por tanto un mayor nivel de expresión del gen de interés. Sin embargo, los cálculos realizados en base al Ct deben realizarse previa normalización de los mismos en base al Ct de una secuencia control para excluir posibles variaciones relacionadas con la técnica. El método para realizar esta corrección se basa en el análisis de la expresión del gen de interés versus la expresión de un gen de referencia (genes de expresión constitutiva que presentan los mismos niveles de expresión en diferentes tipos tisulares). Tras la normalización del Ct del gen de interés en base al Ct del gen de referencia, se utilizó el método *Delta Delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ )* para realizar una cuantificación relativa de la expresión

(230).



El método  $\Delta\Delta Ct$  consiste en:

1. Cálculo de  $\Delta Ct$ : Normalización del  $Ct$  del gen de interés en cada muestra en base al  $Ct$  del gen de referencia:

$$\Delta Ct_{(caso)} = Ct_{gen X (caso)} - Ct_{gen referencia}$$

$$\Delta Ct_{(control)} = Ct_{gen X (control)} - Ct_{gen referencia}$$

2. Cálculo de  $\Delta\Delta Ct$ : Segunda normalización del  $\Delta Ct$  del gen del interés en una muestra determinada respecto del  $\Delta Ct$  del gen de interés en la muestra control:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(caso)} - \Delta Ct_{(control)}$$

3. Cálculo de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ : Cuantificación relativa de la expresión en la muestra respecto a la muestra control (normalizada en base a un gen de referencia).

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{Expression fold change}$$

En general, la expresión génica se representa de forma logarítmica como  $\text{Log}_2$ . Aunque la eficiencia de la reacción nunca es del 100%, cabe destacar que al utilizar este método se asume que la eficiencia de amplificación es la misma entre el gen de interés y el gen de referencia.

### Selección de genes de referencia

Los genes de referencia utilizados deben seleccionarse en función del diseño experimental, teniendo en cuenta el tipo de tejido o el tipo celular con el que se trabaja. La estabilidad de la expresión del gen de referencia debe ser validada en las condiciones experimentales específicas antes de proceder a la normalización de los datos.

En este estudio, se seleccionaron genes de referencia de uso común como  $\beta$ -actina (*ACTB*), importina 8 (*IPO8*) y cadena ligera de ferritina (*FTL*), todos ellos validados mediante RT-qPCR<sup>(231)</sup>. El gen *HPRT1* (hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa), otro gen de referencia habitualmente utilizado, fue desestimado como gen de referencia en este caso por presentar datos de amplificación muy bajos en las muestras de TAS. Por el contrario, el gen *FTL* fue seleccionado específicamente para este análisis a partir de los resultados obtenidos en el análisis con microarrays.

Para realizar las RT-qPCR de los genes de referencia se requieren cebadores o *primers* específicos, algunos de los cuales se encuentran disponibles en la mayoría de laboratorios por ser de uso común, como es el caso de los cebadores para *ACTB*. En el resto de casos, como se ha mencionado anteriormente, los cebadores fueron diseñados de forma manual.

#### 4.3.5.3. Análisis estadístico:

La presencia de diferencias en el nivel de expresión génica entre las muestras del grupo control y del grupo de pacientes con obesidad obtenidas en las RT-qPCR's se analizó mediante el método  $\Delta\Delta Ct$  <sup>(230)</sup>. Estadísticamente, para comparar las Ct's normalizadas de las muestras de ambos grupos de estudio en un mismo tejido, se evaluó la normalidad en la distribución de los datos mediante el test W de Shapiro-Wilk ( $\alpha = 0.05$ ) y la homogeneidad en la distribución de las varianzas (homocedasticidad) con la prueba F de Fisher para varianzas de dos muestras ( $\alpha = 0.05$ ). En el caso de confirmar la hipótesis nula en ambos casos (es decir, se puede asumir normalidad y homogeneidad en las varianzas), se aplicó el test paramétrico *T-Test* o prueba T de Student ( $\alpha = 0.05$ ). En caso de no cumplirse las condiciones de normalidad y homocedasticidad, se aplicó el test paramétrico U de Mann-Whitney ( $\alpha = 0.05$ ) para dos muestras independientes.

## 4.4. RELACIÓN ENTRE EXPRESIÓN GÉNICA Y VARIABLES CLÍNICAS

De acuerdo con los objetivos secundarios de este estudio, se analizó la relación entre la expresión de los genes seleccionados y determinadas variables clínicas de interés en el momento de la intervención ( $t_0$ ) en un subgrupo representativo de controles y pacientes con obesidad. En el grupo de pacientes, se analizó además la relación entre la expresión basal de los genes de interés y la evolución metabólica y ponderal a los 12 meses de la CB ( $t_{12}$ ).

Las variables clínicas de los sujetos estudiados se describieron en forma de  $n$  (%) para las variables cualitativas y en forma de *media* ( $\pm$ *desviación estándar*) en el caso de las variables cuantitativas. No fue necesario comprobar la normalidad de las variables ya que, dado el tamaño muestral, todos los análisis relativos a la comparación de variables clínicas se realizaron con tests no paramétricos. Se consideraron significativos los análisis con significación bilateral  $p < 0,05$ .

En el análisis de las variables clínicas y demográficas basales y la evolución clínica al año de la intervención, se utilizaron los test de McNemar y chi-cuadrado para las variables cualitativas apareadas y no apareadas, respectivamente. Para el análisis de variables cuantitativas, el test de U de Mann-Whitney para muestras independientes y el test de Wilcoxon para muestras apareadas.

Durante el análisis de asociación entre la expresión génica y las variables clínicas cualitativas, se utilizó el test de U de Mann Whitney para muestras independientes. Para el estudio de correlación entre la expresión génica y las variables cuantitativas, se utilizó el test de correlación de Pearson.

El análisis estadístico de las variables clínicas y su asociación con la expresión génica se realizó con el programa *SPSS v26* (*SPSS Inc.*, Chicago, IL, EE.UU.).

## 5. RESULTADOS

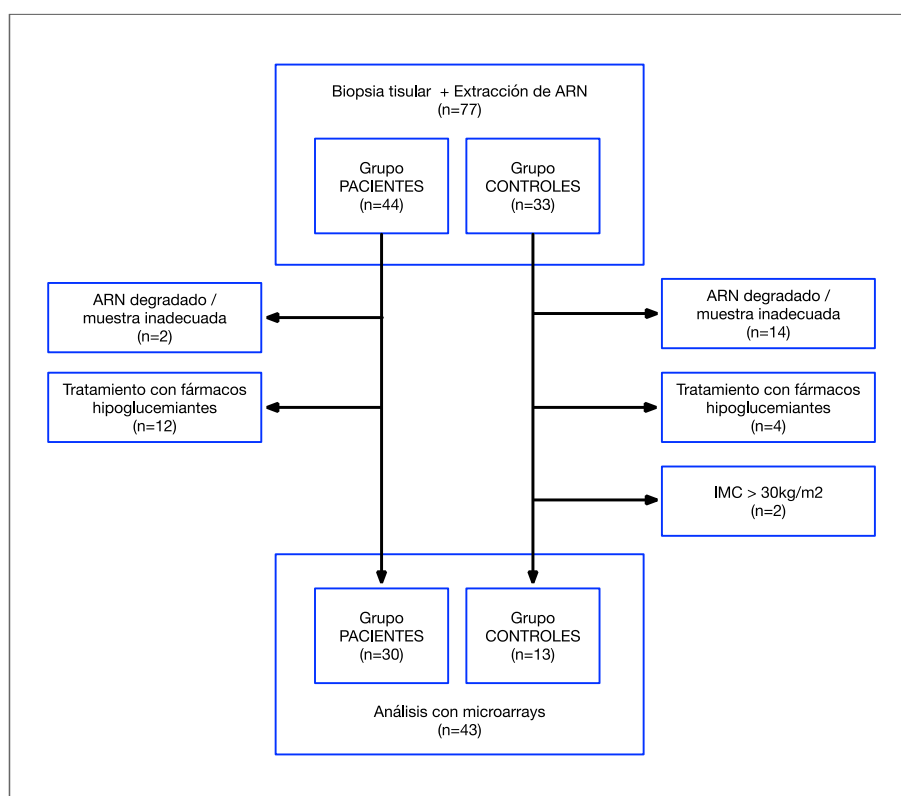


## 5. RESULTADOS

### 5.1. RESULTADOS CLÍNICOS

#### 5.1.1. PACIENTES INCLUIDOS EN EL ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL

Entre enero de 2017 y mayo de 2019 se incluyeron 77 sujetos (44 pacientes y 33 controles). De estos, el 27% de pacientes (12/44) y el 12% de controles (4/33) no fueron finalmente incluidos por estar recibiendo fármacos hipoglucemiantes, lo que constituía un criterio de exclusión (ver apartado **4.1.2.2. Criterios de exclusión**). Además, dado que, como se ha explicado previamente, solo se incluyeron sujetos cuyos cuatro tejidos pudieran ser analizados, las muestras del 4,5% (2/44) de pacientes y del 42% de controles (14/33) se tuvieron que descartar a causa de problemas relacionados con la degradación del ARN en alguno de los tejidos (ver apartado **4.3.1.1 Análisis cuantitativo y cualitativo del RNA**). Así pues, se perdieron 14 pacientes y 20 controles. Finalmente, se incluyeron en el análisis transcripcional mediante microarrays muestras de 30 pacientes y 13 controles (**Figura 16**).



**Figura 16. Sujetos incluidos en el análisis transcripcional.** ARN: Ácido ribonucleico; IMC: Índice de masa corporal.

## 5.1.2. ANÁLISIS DE VARIABLES CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS

### 5.1.2.1. Grupo Pacientes vs Grupo Control

En la **Tabla 1** se muestra la comparación entre los datos demográficos y clínicos basales (en el momento de la intervención) de los sujetos en los dos grupos de estudio.

**Tabla 1. Datos demográficos y clínicos de los sujetos estudiados**

	Grupo Pacientes (n=30)	Grupo Control (n=13)	valor p
Edad (años)	45,7 (±8,5)	45,5 (±8,9)	0,7
Sexo (mujer)	22 (73,3%)	9 (69,2%)	0,8
Tabaco	3 (10%)	0 (0%)	0,2
ASA I/II	26 (86,7%)	13 (100%)	0,2
BMI <sub>t0</sub> (kg/m <sup>2</sup> )	42,2 (±3,9)	26,7 (±1,4)	<0,001*
HbA1c <sub>t0</sub>	5,6 (±0,3)	5,4 (±0,2)	0,03*
Glucosa <sub>t0</sub> (mg/dl)	96 (±10,6)	88,6 (±7,3)	0,03*
Insulina <sub>t0</sub> (mU/l)	22,3 (±10,4)	7,4 (±2)	<0,001*
HOMA-IR <sub>t0</sub>	5,4 (±2,9)	1,6 (±0,5)	<0,001*
HOMA-IR <sub>t0</sub> >3,8	20 (66,7%)	0 (0%)	<0,001*
HTA <sub>t0</sub>	11 (36,7%)	1 (7,7%)	0,052
DLP <sub>t0</sub>	9 (30%)	1 (7,7%)	0,1
SAHS <sub>t0</sub>	20 (66,7%)	0 (0%)	<0,001*

Las variables cualitativas se expresan en forma de n (porcentaje); las variables cuantitativas en forma de media (±desviación estándar).

\* *Diferencias estadísticamente significativas.*

ASA: American Society of Anesthesiology Score; BMI: Body Mass Index; HOMA-IR Homeostatic Model Assessment for Insuline Resistance; HbA1c: Hemoglobina glicosilada; HTA: Hipertensión arterial; DLP: Dislipemia; SAHS: Síndrome de apneas-hipopneas del sueño

Como se observa en la tabla, los grupos de estudio fueron comparables en cuanto a edad, sexo y ASA.

Contrariamente, como es esperable por la propia definición de los grupos, se detectaron diferencias significativas en el IMC y en el HOMA-IR, así como en los valores analíticos relacionados con la insulinoresistencia, todos ellos más elevados en el grupo de pacientes con obesidad. También se observó una mayor proporción de pacientes dislipémicos e hipertensos en el grupo de pacientes (36,7% vs 7,7 y 30% vs 7,7% respectivamente), si bien estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

### 5.1.2.2. Análisis de la evolución ponderal y de las comorbilidades en el grupo de pacientes a los 12 meses de la CB

No se registró ninguna incidencia durante las cirugías ni hubo ninguna complicación postoperatoria en los sujetos analizados.

En la **Tabla 2** se describe la evolución ponderal y respecto a las comorbilidades y variables analíticas analizadas en el grupo de pacientes con obesidad.

Tabla 2. Evolución clínica al año de la CB en el grupo de pacientes

	Basal (t <sub>0</sub> ) (n=30)	12 meses tras CB (t <sub>12</sub> ) (n=30)	valor p
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	42,2 (±3,9)	27,6 (±3)	<0,001*
HbA1c (%)	5,6 (±0,3)	5,2 (±0,3)	<0,001*
Glucosa (mg/dl)	96 (±10,6)	82,1 (±6,7)	<0,001*
Insulina (mU/l)	22,3 (±10,4)	5,8 (±2,2)	<0,001*
HOMA-IR	5,4 (±2,9)	1,2 (±0,5)	<0,001*
HOMA-IR <sub>10</sub> >3,8	20 (66,7%)	0 (0%)	<0,001*
Péptido C (ng/mL)	2,7 (±1,1)	1,4 (±0,6)	<0,001*
HTA	11 (36,7%)	6 (20%)	0,063
DLP	9 (30%)	2 (6,7%)	0,039*
TG (mg/dl)	133 (±47)	87,4 (±23)	<0,001*
Colesterol total (mg/dl)	208 (±31)	186 (±29)	<0,001*
LDL (mg/dl)	133 (±25)	111 (±25)	0,001*
HDL (mg/dl)	49,2 (±10)	57 (±12)	<0,001*

Las variables cualitativas se expresan en forma de n (porcentaje); las variables cuantitativas en forma de media (±desviación estándar). \* *Diferencias estadísticamente significativas*. CB: Cirugía bariátrica; BMI: Body Mass Index; HbA1c: Hemoglobina glicosilada; HOMA-IR Homeostatic Model Assessment for Insuline Resistance; HTA: Hipertensión arterial; DLP: Dislipemia ; TG: Triglicéridos; LDL: Low Density Lipoprotein; HDL: High Density Lipoprotein.

En general se observó una disminución significativa del IMC y una mejoría significativa de las variables relacionadas con la insulinoresistencia y el perfil lipídico. No se detectaron diferencias en la proporción de pacientes hipertensos antes y después de la CB. No obstante, la proporción de individuos hipertensos pasó del 36,7% en el momento de la intervención al 20% a los 12 meses de la CB, evidenciando una tendencia que sin embargo no alcanzó la significación estadística.

## 5.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Tras el control de calidad y el pre-procesamiento de las muestras, se analizaron los resultados de la expresión génica en los tejidos estudiados. En primer lugar, se realizó un análisis comparativo del transcriptoma completo de los diferentes tejidos entre los pacientes con obesidad y los sujetos del grupo control, y se seleccionaron los genes con expresión significativamente diferencial entre ambos grupos mediante un modelo de análisis bayesiano<sup>(225)</sup>. De entre los GDEs, se seleccionaron aquellos relacionados con la MEC tomando como referencia la base de datos de *The Matriosome Project* (<http://matriosomeproject.mit.edu>).

Los genes seleccionados fueron sometidos a distintos análisis bioinformáticos: 1) un primer análisis inferencial para la selección de genes con expresión diferencial entre grupos; 2) un segundo análisis descriptivo para el análisis de perfiles globales de expresión; y 3) un tercer análisis funcional, donde se analizaron las diferencias observadas entre grupos en base a su función o significación biológica. Tras estos análisis, los genes más representativos de los procesos enriquecidos en el grupo de pacientes con obesidad fueron analizados mediante RT-qPCR para validar su expresión diferencial.

Posteriormente, se realizó un análisis exploratorio de las asociaciones entre los niveles de expresión de los genes más representativos en cuanto a su expresión diferencial entre grupos y

el estado clínico basal (ponderal y metabólico) de un subgrupo representativo de pacientes y controles. Asimismo, en el subgrupo de pacientes con obesidad, se analizó la posible correlación entre los niveles de expresión de los genes de interés y la evolución ponderal y metabólica a los 12 meses de la CB.

### 5.2.1. CONTROL DE CALIDAD DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS

Durante el procesamiento de los resultados obtenidos en los microarrays se realizaron diferentes análisis de control de calidad tanto antes como después de la normalización de los datos. Este tipo de análisis permiten comprobar si las muestras analizadas son apropiadas para la normalización y el posterior análisis de expresión diferencial, así como detectar potenciales sesgos inadvertidos (como un posible *batch effect* o efecto lote) que pudiesen alterar los resultados. Los controles de calidad realizados permiten detectar estos errores sistemáticos en una determinada medición o resultado, producidos por factores técnicos y por tanto no relacionados con las variaciones biológicas reales <sup>(232)</sup>, permitiendo su corrección mediante diferentes técnicas estadísticas durante las distintas fases del procesamiento de los datos.

#### Análisis de Componentes Principales

Como parte del control inicial de calidad de las muestras, se realizó un primer análisis de componentes principales (PCA) (ver apartado **4.3.3 Análisis de los perfiles de expresión génica**). Este tipo de análisis antes del procesamiento de los datos permiten la identificación de las muestras o valores atípicos, también conocidos como *outliers*, con el objetivo de decidir si una determinada muestra debe o no ser incluida en el análisis.

En este caso, en base a los resultados obtenidos en el análisis de calidad inicial, todas las muestras analizadas se consideraron adecuadas para el siguiente proceso de normalización y se decidió no excluir ninguna de ellas del análisis.

### 5.2.2. PRE-PROCESAMIENTO: NORMALIZACIÓN Y FILTRADO

#### Normalización

Como se ha explicado previamente (ver apartado **4.3.2.3. Análisis bioinformático de los resultados de los microarrays**), con el objetivo de eliminar posibles sesgos relacionados con la técnica y poder comparar los datos de expresión génica entre las diferentes muestras analizadas en los microarrays, los datos fueron pre-procesados utilizando el método RMA (*Robust Multiarray Averaging*) <sup>(233)</sup>.

Tras el proceso de normalización, se observó que la distribución de la intensidad de señal entre las muestras fue muy similar.

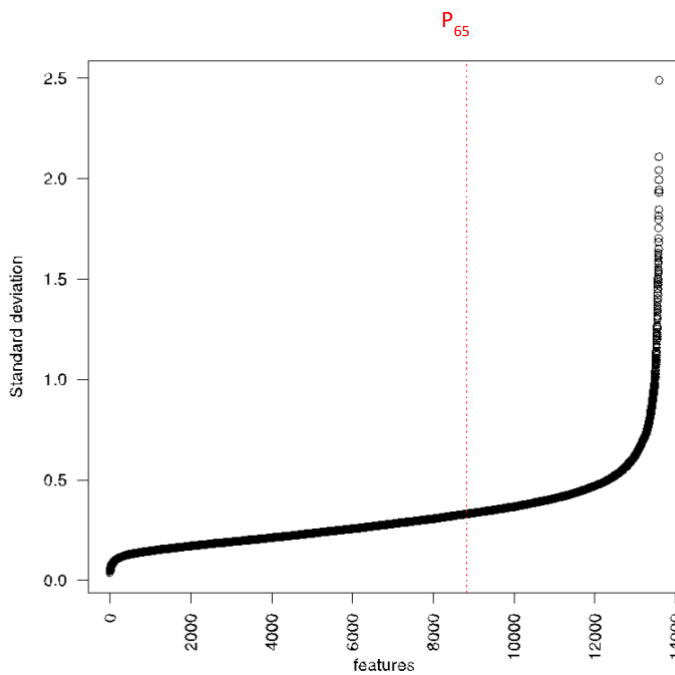


Un nuevo análisis mediante PCA tras la normalización de los datos sugirió la presencia de un *efecto batch* (en este caso relacionado con las dos placas utilizadas para el análisis de los microarrays). Para corregir el *efecto batch*, el factor *batch* se incluyó posteriormente en el modelo lineal utilizado para el análisis de expresión diferencial.

En base a los resultados obtenidos en los análisis de calidad y pre-procesamiento, ninguna de las muestras fue identificada como *outlier* después del proceso de normalización. Por tanto, se decidió no excluir ninguna muestra del estudio y todas ellas se consideraron válidas para el análisis de expresión.

## Filtrado

Como se muestra en la **Figura 17**, los genes con una elevada desviación estándar (los que potencialmente podrían presentar diferencias de expresión entre los grupos de estudio) representan menos del 35% de los genes en el array. De acuerdo con este hallazgo, se eliminaron del análisis aquellos genes cuya desviación estándar estuviese por debajo del percentil 65 de todas las desviaciones estándar calculadas. Este punto de corte, que puede considerarse conservador, se estableció con el objetivo de evitar que se eliminara del análisis algún gen con expresión diferencial entre los grupos.

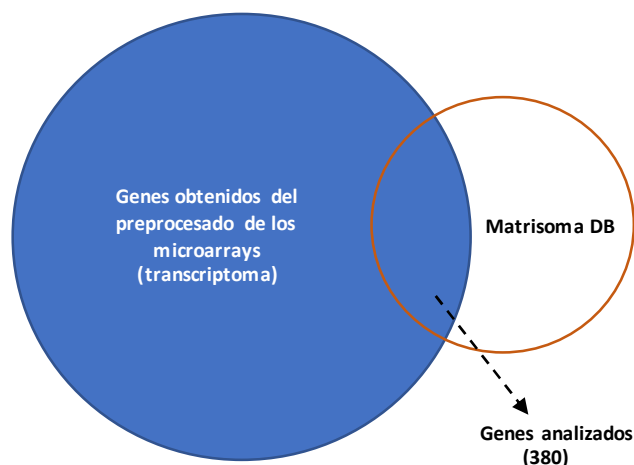


**Figura 17. Desviación estándar de todos los genes en el array.** La línea roja representa el percentil 65 de todas las desviaciones estándar.

Tras el pre-procesamiento de los datos y de acuerdo con los criterios de filtrado, que fueron aplicados a cada condición específica (grupo y tejido), se seleccionaron un total de 6485 genes para su inclusión en el análisis de expresión diferencial.

### 5.2.3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GENERAL

Tomando como referencia la base de datos *The Matrisome Project -Matrisome DB 2.0-* (<http://matrisomeproject.mit.edu>, septiembre de 2021), de entre los 6485 genes inicialmente seleccionados para el análisis, se seleccionaron un total de **380 genes** (6% del total) que codificaban proteínas relacionados con la MEC (ver **Figura 18**).



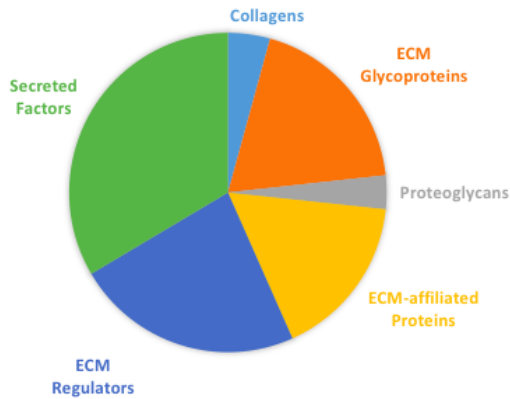
**Figura 18. Genes analizados**

Con el objetivo de comprobar la hipótesis según la cual existe una dinámica transcripcional del matrisoma distinta en los pacientes con obesidad y los sujetos sin obesidad, el análisis del perfil de expresión de genes relacionados con la MEC en los dos grupos de estudio se realizó según el esquema mostrado en la **Figura 15** (ver apartado **4.3.2.3. Análisis bioinformático de los resultados de los microarrays**).

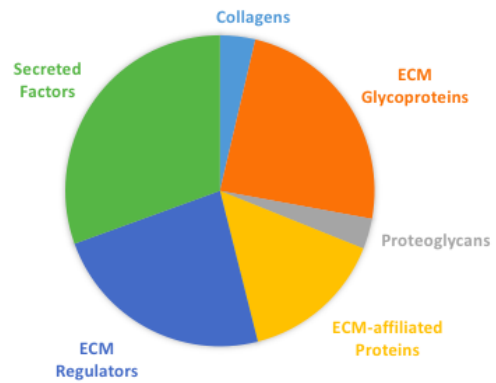
El listado completo de los 380 genes del matrisoma con un nivel de expresión detectable en las muestras analizadas se encuentra en el **Anexo III**.

La proporción de genes identificados en este estudio en cada una de las categorías de matrisoma fue muy similar a la identificada en Matrisome DB 2.0 (*The Matrisome Project*) para el matrisoma humano completo (**Figura 19**).

**MATRISOMA HUMANO COMPLETO**  
(*The Matrisome Project*)

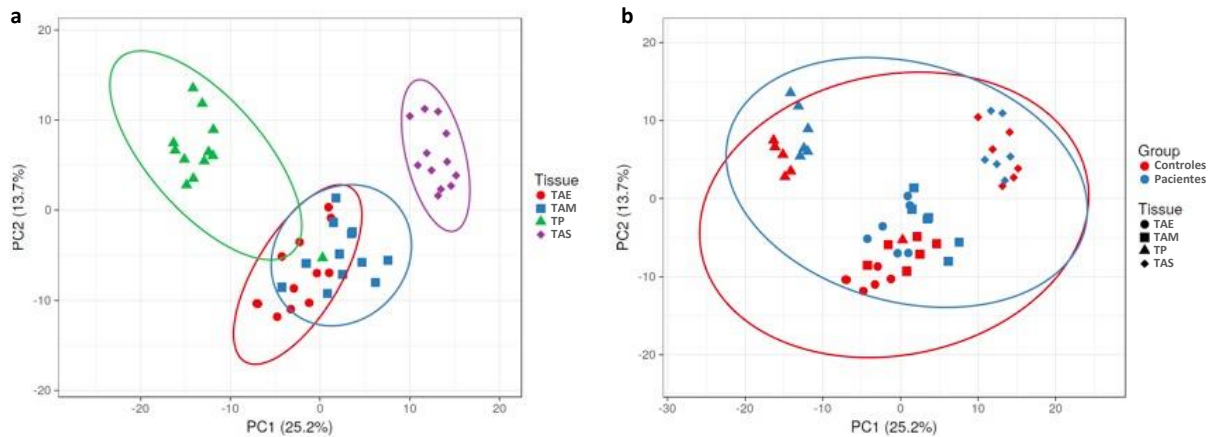


**380 GENES DE MATRISOMA IDENTIFICADOS EN EL ESTUDIO**

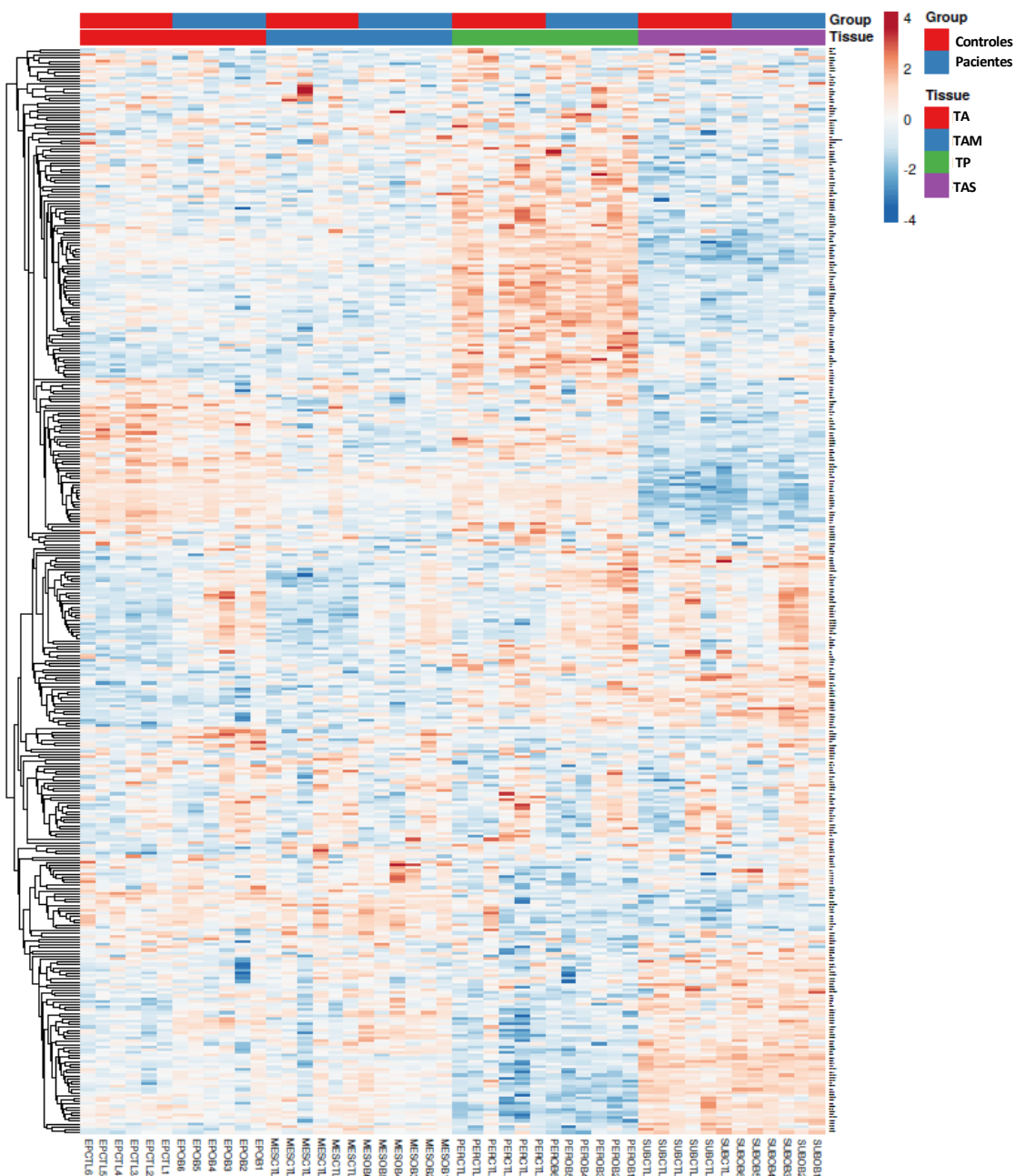


**Figura 19.** Distribución por categorías de los genes de matrisoma identificados en este estudio en comparación con la distribución de los genes del matrisoma humano completo. Los genes se han clasificado en las distintas categorías definidas en *The Matrisome Project*-MIT (<http://matrisomeproject.mit.edu>).

Con los datos de expresión de estos 380 genes en todos los tejidos y grupos de sujetos analizados, se realizaron un primer análisis no supervisado (PCA) y un análisis supervisado (*clustering*), que se muestran en las **Figuras 20 (a y b)** y **21** respectivamente.



**Figura 20.** PCA (análisis no supervisado) incluyendo los 380 genes de matrisoma según su nivel de expresión en cada tejido (a) y en cada grupo de estudio (b). Las elipses representan el área que incluiría una nueva observación de un determinado grupo con una probabilidad del 0.95. TAE: *Tejido adiposo epiploico*; TAM: *Tejido adiposo mesenterico*; TP: *Tejido peritonela*; TAS: *Tejido adiposo subcutáneo*.



**Figura 21. Heatmap (análisis supervisado) incluyendo los 380 genes de matrisoma según su nivel relativo de expresión en cada una de las muestras de ARN de los cuatro tejidos en los dos grupos de estudio. TAE: Tejido adiposo epiloico; TAM: Tejido adiposo mesenterico; TP: Tejido peritonea; TAS: Tejido adiposo subcutáneo.**

Como se muestra en las figuras, la expresión de los genes del matrisoma en los sujetos estudiados mostró en general perfiles de expresión génica propios de cada tejido más que de cada grupo. El TP y el TAS mostraron un patrón de expresión más específico y distinto al de los TAVs (TAE y TAM), que resultaron mucho más parecidos entre sí.

## 5.2.4. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL

Los 380 genes identificados relacionados con la MEC fueron incluidos en el análisis de expresión diferencial entre los grupos de estudio.

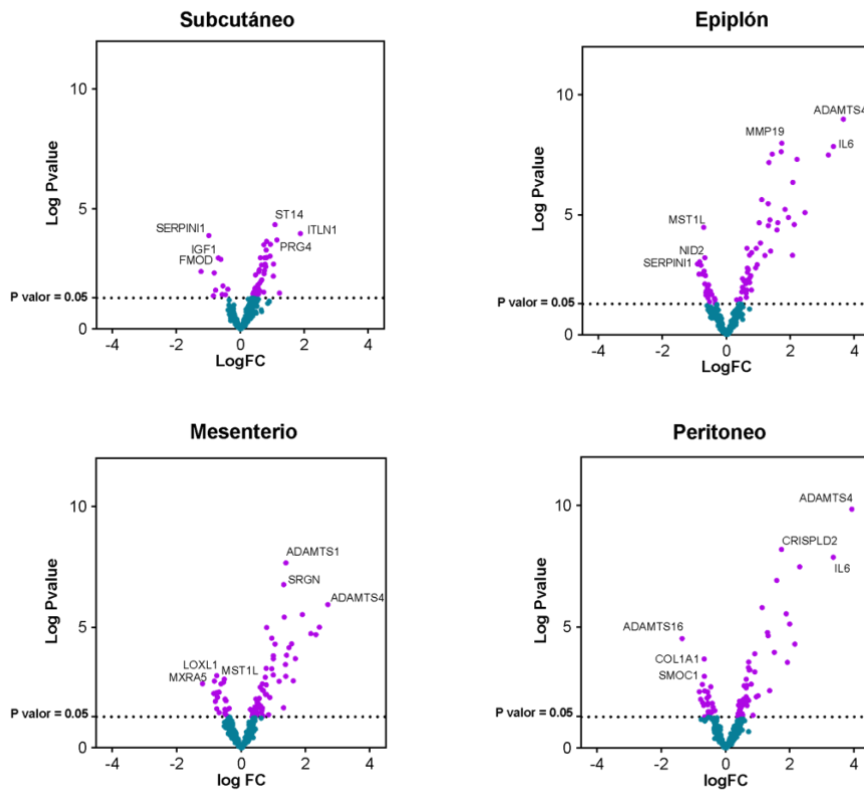
Tras el pre-procesamiento y el análisis de expresión general en nuestra muestra, se realizaron tres tipos diferentes de análisis estadístico de los datos de expresión obtenidos en los microarrays:

1. Análisis de tipo inferencial, para la selección de GDEs en los tejidos analizados entre los dos grupos de estudio.
2. Análisis de tipo descriptivo (análisis no supervisado mediante PCA y *clustering*), para el análisis de perfiles globales de expresión de estos GDEs.
3. Análisis de tipo funcional, donde se analizaron las diferencias observadas entre grupos en base a su función o significación biológica.

### 5.2.4.1. Análisis estadístico inferencial o selección de genes diferencialmente expresados

Como se ha explicado previamente (ver apartado **4.3.4.1. Selección de genes diferencialmente expresados**), el análisis para la selección de GDEs se basó en el ajuste de un modelo lineal de análisis (*limma*) con moderación empírica de la varianza de Bayes<sup>(225)</sup>. En este caso, el criterio estadístico para la selección de genes con expresión diferencial se basó en un valor ajustado de  $p < 0.05$ .

Las comparaciones respecto a los niveles de expresión de los genes relacionados con la MEC expresados en cada tejido entre el grupo de pacientes con obesidad y el grupo control se representaron gráficamente en forma de *volcano plots* (**Figura 22**). En estos gráficos, en qué cada gen es representado en forma de punto, el eje de las abscisas representa la magnitud de la variación de la expresión entre los grupos (*fold change*, en escala logarítmica) y el eje de las ordenadas representa la significación estadística (p-valor, en escala logarítmica). De esta forma, se pueden identificar visualmente los genes con mayores variaciones de expresión entre grupos en cada tejido (tanto sobreexpresados como infraexpresados) y su nivel de significación estadística.

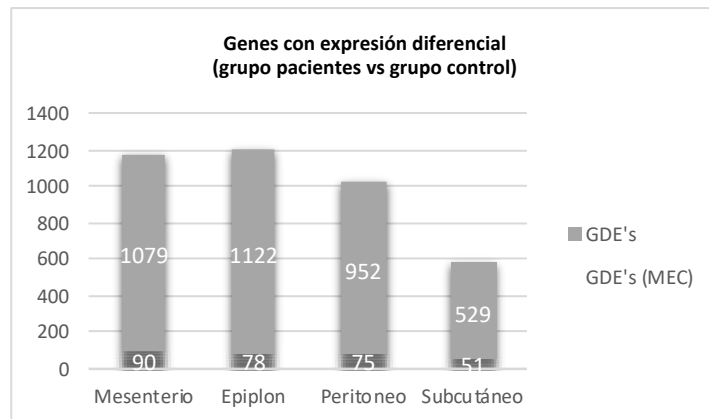


**Figura 22: Volcano plots para la comparación de la expresión génica (genes relacionados con la MEC) entre grupo de pacientes y grupo de controles en cada tejido.** Los símbolos de los genes se muestran para los 3 genes sobreexpresados e infraexpresados con mayor significación estadística en el grupo de pacientes con obesidad respecto a los pacientes no obesos en cada tejido. Los genes se muestran en color violeta si sobrepasan el umbral de expresión y significación previamente establecido (un valor ajustado de  $p < 0.05$  y un aumento logarítmico  $> 0.5$  para todos los tejidos).

Como se muestra en la **Figura 22**, se observan diferencias de expresión en los genes relacionados con la MEC en todos los tejidos entre el grupo de pacientes con obesidad y el grupo control. De hecho, se observa que la mayor parte de diferencias en todos los tejidos vienen dadas por la sobreexpresión de genes en el grupo de pacientes respecto al grupo control, siendo la infraexpresión de genes mucho menos frecuente en los tejidos de pacientes con obesidad en relación a los del grupo control. Además, se observa que las diferencias son mucho más notorias entre los grupos a nivel de los tejidos viscerales (TAE, TAM y TP), en los cuales se aprecia la sobreexpresión de un número mucho mayor de genes en comparación con el TAS. Por el contrario, en el TAS las diferencias de expresión observadas entre los grupos de estudio son mucho menores que las objetivadas en los tejidos viscerales, tanto en el número de genes con expresión diferencial como en el nivel de significación estadística alcanzado por los mismos.

Tras el análisis con microarrays, como se muestra en la **Figura 23**, el TAM fue el tejido con mayor número absoluto de genes de matrisoma con expresión diferencial entre los grupos (90 GDE's

relacionados con la MEC de un total de 1169 GDE's en este tejido, constituyendo un porcentaje relativo del 7.7%). El siguiente tejido en número de GDE's entre grupos fue el TAE (78 genes relacionados con la MEC de un total de 1200 GDE's en este tejido, 6.5%), seguido del TP (75 genes relacionados con la MEC de 1027 GDE's, 7.3%). El tejido con menos genes diferencialmente expresados entre los grupos de estudio y también menor número absoluto de GDE's relacionados con la MEC fue el TAS (51 genes relacionados con la MEC de 580 GDE's, 8.8% del total de GDEs en este tejido).



**Figura 23. Genes con expresión diferencial entre grupos en los cuatro tejidos analizados ( $p < 0,05$ ).** *GDE's: Genes diferencialmente expresados; GDE's (MEC): Genes diferencialmente expresados relacionados con la matriz extracelular*

El listado completo de genes relacionados con la MEC con expresión diferencial entre los grupos de estudio en cada uno de los tejidos analizados se muestra en el **Anexo IV**.

En el **Anexo V** se muestran los 3 genes con mayor expresión diferencial (sobrexpresión, representada por un valor de *log fold change* positivo, o infraexpresión, representada por un valor de *log fold change* negativo) entre pacientes con obesidad y sujetos del grupo control en cada uno de los tejidos analizados. Esta información se acompaña de una breve descripción funcional de cada uno de los genes.

En el grupo de pacientes con obesidad, destaca la sobreexpresión de *ADAMTS4* y de *IL6*, siendo estos los genes de matrisoma con mayor sobreexpresión diferencial en los tres tejidos viscerales analizados (TAE, TAM y TP) respecto al grupo control. Respecto a los genes infraexpresados en el grupo de pacientes con obesidad respecto al grupo control, destaca la infraexpresión de *ADAMTS16* tanto en el TAM como en el TP. El gen *LGALS12* se encuentra infraexpresado en el TP y el TAE de los pacientes con obesidad. También se detectó una menor expresión del gen *SERPINI1* tanto en el TAS como en el TAE de los sujetos con obesidad.

#### 5.2.4.2. Análisis estadístico descriptivo. Análisis no supervisado (PCAs i Clustering)

Tras un primer análisis inferencial, donde se seleccionaron de forma general los genes con expresión diferencial en los diferentes tejidos entre los dos grupos de estudio (ver apartado **5.2.4.1. Análisis estadístico inferencial o selección de genes diferencialmente expresados**), se procedió a realizar un segundo análisis de los perfiles globales de expresión de estos genes con expresión diferencial entre los grupos de estudio. Así pues, se trata de un análisis descriptivo que pretende analizar los diferentes patrones de expresión de los GDEs relacionados con la MEC entre las distintas condiciones experimentales. Este tipo de análisis pretende evaluar hasta que punto el conjunto de genes analizados es capaz de diferenciar entre sí estas distintas condiciones (grupo y tejido).

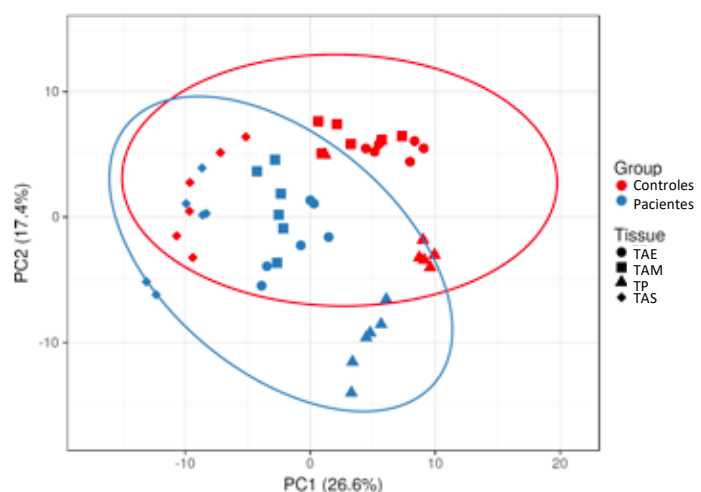
El análisis de los patrones de expresión se realizó mediante dos tipos de análisis no supervisados: PCA y Clustering.

#### Análisis de Componentes Principales (PCA)

Como se ha mencionado anteriormente (ver apartado **4.3.3.1. Análisis de Componentes Principales**), el PCA reduce la dimensionalidad de las muestras a dos dimensiones, de forma que cada muestra se representa gráficamente en base a los dos componentes principales que caracterizan la mayoría de los genes expresados. Al representarlas en un diagrama de dispersión, las muestras consideradas “similares” deberían aparecer agrupadas en una misma zona del gráfico (es decir, deberían aparecer representados como puntos cercanos entre sí).

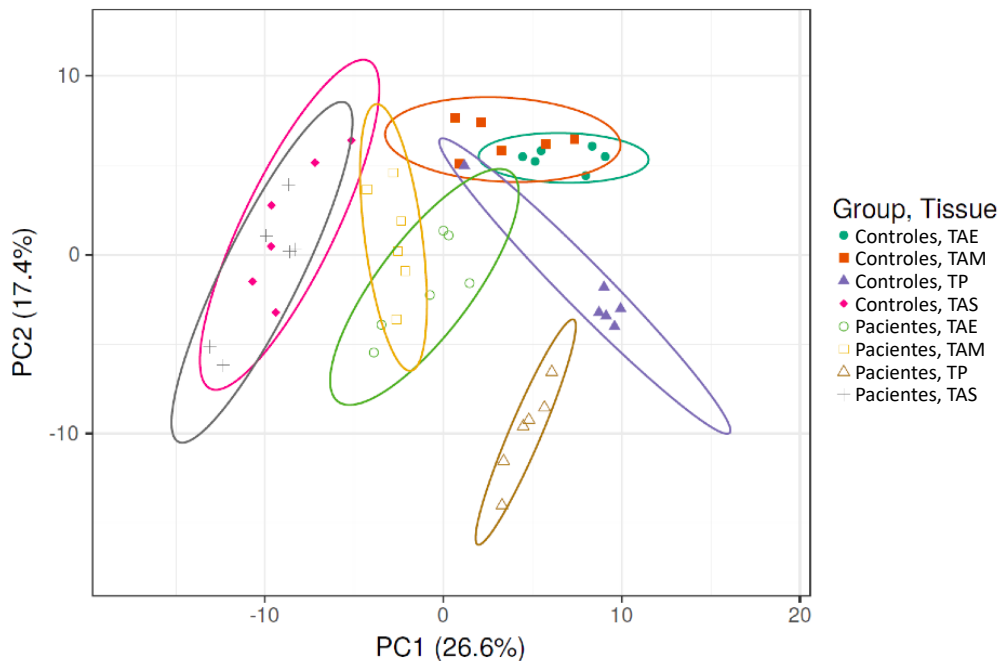
En la **Figura 24**, en la que cada elipse representa uno de los grupos de estudio, se representan los perfiles globales de expresión de los GDEs relacionados con la MEC en los tejidos de ambos grupos utilizando diferentes niveles de significación estadística. Se observa claramente un perfil de expresión diferencial entre los pacientes del grupo con obesidad y los sujetos del grupo control.

**Figura 24. Análisis de Componentes Principales correspondiente al análisis descriptivo de los genes diferencialmente expresados en los tejidos del grupo Control y del grupo de pacientes con obesidad ( $p < 0.05$ ).** Las elipses representan el área que incluiría una nueva observación de un determinado grupo con una probabilidad del 0.95. TAE: Tejido adiposo epiploico; TAM: Tejido adiposo mesentérico; TP: Tejido peritonela; TAS: Tejido adiposo subcutáneo.





En la **Figura 25** se representan los perfiles globales de expresión de los GDEs relacionados con la MEC en cada uno de los cuatro tejidos estudiados en el grupo de pacientes con obesidad y el grupo control. En esta representación podemos observar claramente las diferencias de expresión entre ambos grupos en los tres tejidos viscerales estudiados, mientras que prácticamente no se objetivan diferencias en la expresión de los genes del matrisoma entre el grupo de pacientes con obesidad y el grupo control a nivel del TAS. Cabe destacar además la similitud entre los TAVs (TEA y TAM) dentro de cada uno de los grupos de estudio, que presentan no obstante diferencias de expresión notables entre pacientes con obesidad y controles.



**Figura 25: Análisis de Componentes Principales correspondiente al análisis descriptivo de los genes del matrisoma diferencialmente expresados ( $p < 0.05$ ) en los cuatro tejidos estudiados del grupo control y del grupo de pacientes con obesidad.** Las elipses representan el área que incluiría una nueva observación de un determinado grupo con una probabilidad del 0.95. TAE: *Tejido adiposo epiploico*; TAM: *Tejido adiposo mesenterico*; TP: *Tejido peritonela*; TAS: *Tejido adiposo subcutáneo*.

### Clustering y análisis discriminante

La detección de patrones de expresión común entre los genes y/o entre las muestras analizadas en los microarrays se conoce como agrupación o *clustering*. En este caso, se ha utilizado un método de *clustering* jerárquico de tipo aglomerativo (ver apartado **4.3.3.2 Métodos de agrupamiento (clustering)**).

En este estudio, de la misma forma que en el Análisis de Componentes Principales, los datos se analizaron utilizando la aplicación *ClustVis* (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>). Se utilizó como criterio estadístico un valor ajustado de  $p < 0.05$ .

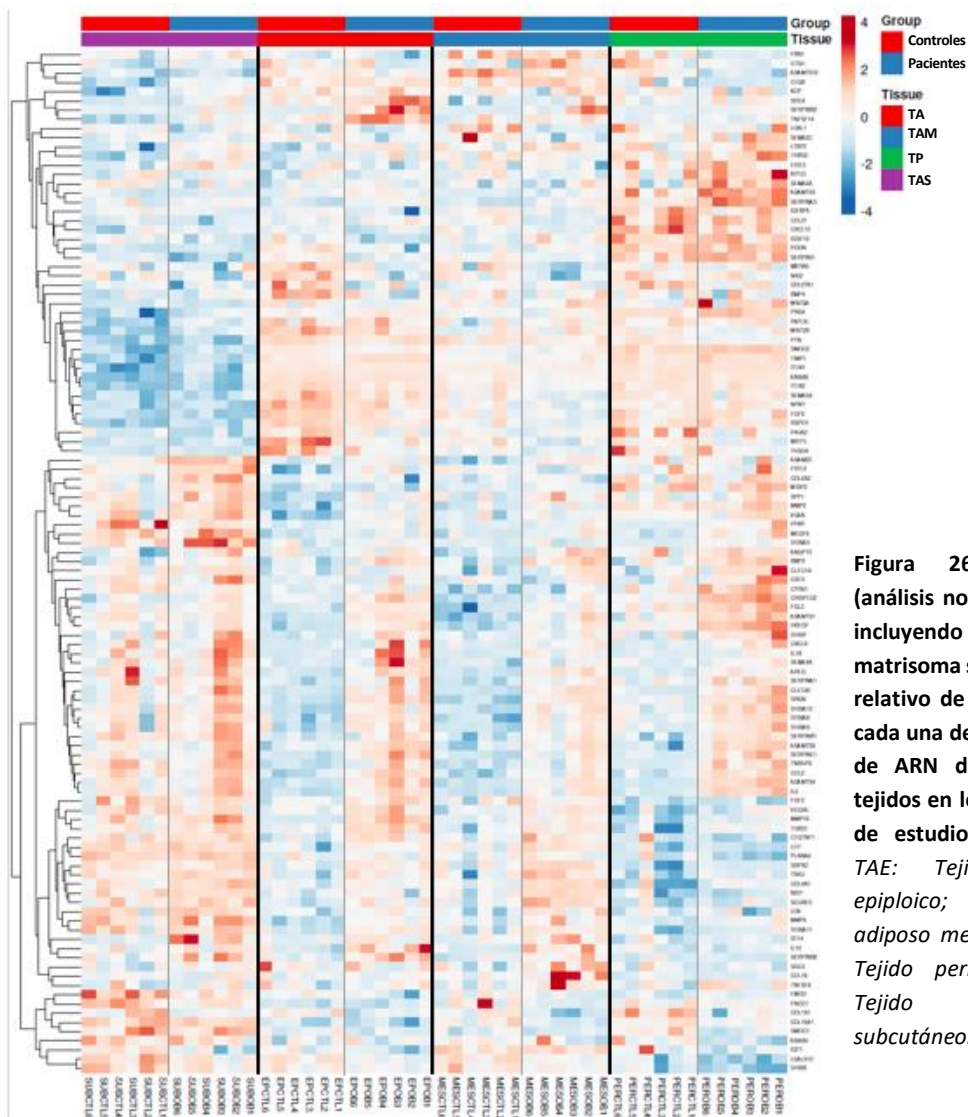
Se utilizaron *heatmaps* para representar la matriz de valores de expresión en forma de un gradiente de color proporcional al valor de cada variable en cada posición. La matriz está

construida de forma que cada línea representa un gen, y cada columna representa una muestra (en este caso un pool de pacientes). El color azul indica infraexpresión, mientras que los genes sobreexpresados aparecen de un color rojo-anaranjado en la matriz (mayor sobre o infraexpresión como más intenso es el color para un determinado gen). Esta gradación facilita la identificación visual de posibles patrones de expresión característicos de cada *cluster*.

En este caso, la agrupación jerárquica aglomerativa clasificó las muestras del mismo tejido en un mismo cluster. Lo mismo sucedió con las muestras procedentes de cada uno de los grupos de estudio.

En el siguiente *heatmap* (**Figura 26**) están representados los diferentes patrones de expresión de los genes seleccionados en las muestras procedentes de cada tejido en cada uno de los grupos de estudio (se han colocado líneas de separación entre los grupos y los tejidos para facilitar su interpretación).

En general, se observa que existen diferencias en los patrones de expresión de genes relacionados con la MEC en los tejidos del grupo de pacientes con obesidad respecto a los del grupo control. Estas diferencias, que se objetivan en los cuatro tejidos estudiados, son sobretodo a expensas de una sobreexpresión de determinados genes en los tejidos del grupo de pacientes con obesidad.



**Figura 26. Heatmap** (análisis no supervisado) incluyendo los genes de matrisoma según su nivel relativo de expresión en cada una de las muestras de ARN de los cuatro tejidos en los dos grupos de estudio ( $p < 0.05$ ). TAE: Tejido adiposo epiloico; TAM: Tejido adiposo mesenterico; TP: Tejido peritonela; TAS: Tejido adiposo subcutáneo.

En general, se evidenció una sobreexpresión de genes en los tejidos del grupo de pacientes respecto al grupo control. No obstante, como se muestra claramente en las elipses parcialmente superpuestas en el PCA correspondiente (ver **Figura 25**), el tejido que muestra menos diferencias de expresión entre los grupos de estudio es el TAS.

En el **Anexo VI** se muestran varios *heatmaps* en qué se observan los distintos patrones de expresión de los genes relacionados con la MEC diferencialmente expresados entre los grupos en cada uno de los tejidos analizados. Los *heatmaps* se acompañan del PCA correspondiente a cada comparación.

En general, se evidenció una sobreexpresión de genes en los tejidos del grupo de pacientes con obesidad respecto al grupo control. No obstante, como se muestra claramente en las elipses parcialmente superpuestas en el PCA correspondiente (ver **Anexo VI**), el tejido que muestra menos diferencias de expresión entre los grupos de estudio es el TAS.

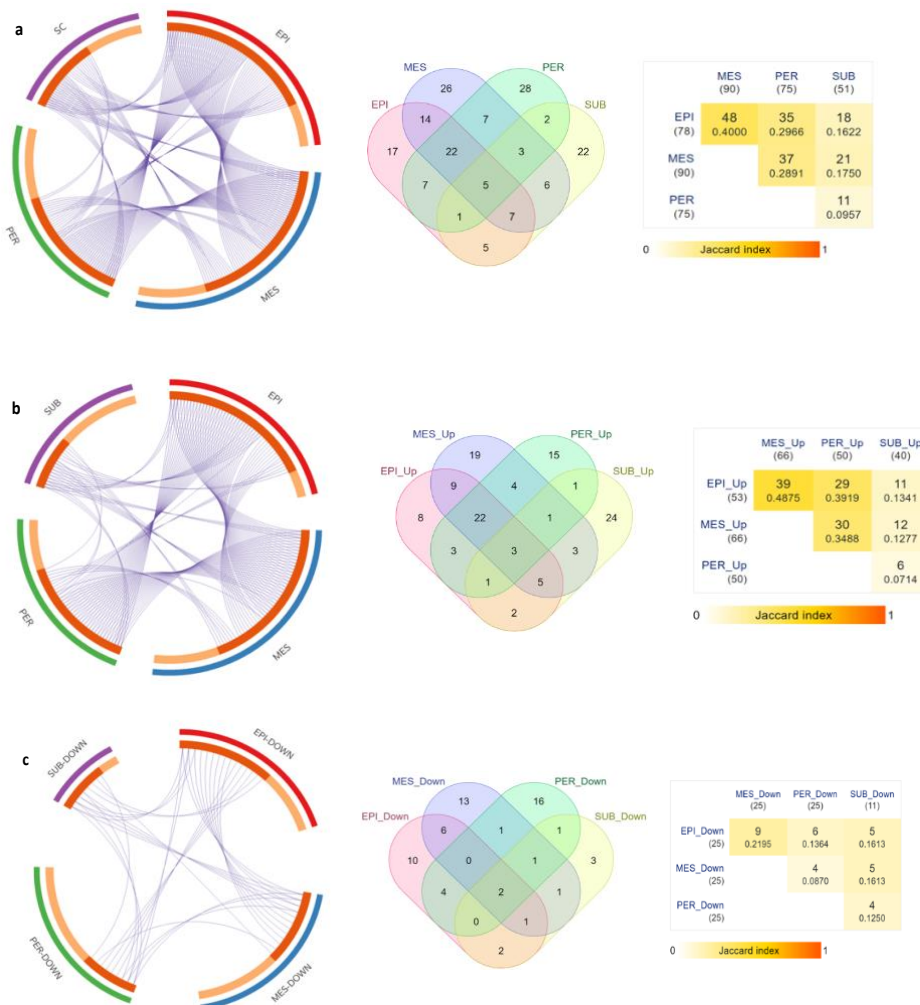
### 5.2.5. ANÁLISIS FUNCIONAL O DE SIGNIFICACIÓN BIOLÓGICA

Dentro del análisis de expresión diferencial se realizó un análisis funcional compuesto por dos partes, una composición global del matrisoma de la obesidad y un análisis de enriquecimiento.

#### 5.2.5.1. Composición global del matrisoma en la obesidad

Para completar el análisis comparativo de los perfiles de expresión de los genes relacionados con la MEC entre los dos grupos de estudio en los cuatro tejidos analizados, analizamos qué genes se encontraban sobre o infra-regulados en cada uno de los tejidos de los pacientes con obesidad y cuáles eran comunes entre los distintos tejidos estudiados (*pairwise intersections*). Los resultados de este análisis se muestran en la **Figura 27 (a-c)**. En este tipo de representación gráfica (gráfico *Circos* de *Metascape*) se muestra cómo se solapan los genes de los diferentes grupos o listados de genes. En el exterior, el arco representa la identidad de cada lista de genes. En el interior, el color naranja representa los genes que aparecen en múltiples listas, y el color amarillo representa los genes que son exclusivos de esa lista de genes. Las líneas moradas enlazan los genes compartidos por las distintas listas de genes. Cuanto mayor sea el número de enlaces morados y más largos los arcos naranjas, mayor es el solapamiento entre las listas de genes. Cada gráfico *Circos* se acompaña del correspondiente diagrama de Venn y la tabla mostrando los diferentes índices de Jaccard.

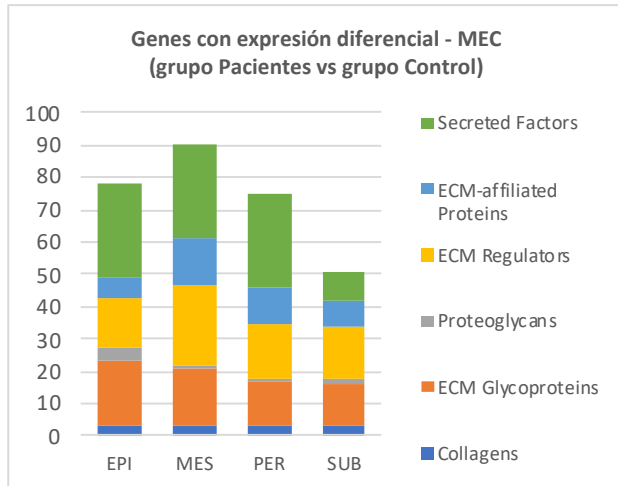
En general, la obesidad se relacionó con una mayor sobre-regulación de genes, siendo la infra-regulación mucho menos significativa. A pesar de que los patrones de expresión de genes relacionados con la MEC fueron específicos de cada tejido, se objetivó una mayor similitud entre los perfiles globales de expresión de los tejidos viscerales, especialmente entre el TAM y el TAE. El TAS mostró un perfil de expresión claramente diferenciado en relación a los genes de MEC respecto a los otros tejidos analizados.



**Figura 27. Composición global del matrisoma.** Genes con expresión diferencial (sobrexpresados e infraexpresados) entre grupos (a); Genes con expresión diferencial entre grupos sobrerregulados en los tejidos de los pacientes con obesidad (b); Genes con expresión diferencial entre grupos infraexpresados en los tejidos de los pacientes con obesidad (c). EPI: Tejido adiposo epiloico; MES: Tejido adiposo mesentérico; PER: Tejido peritoneal; SUB: Tejido adiposo subcutáneo.

Como hemos visto, la condición “obesidad” se acompañó de una mayor activación transcripcional de los genes del matrisoma en comparación con los pacientes control en todos los tejidos.

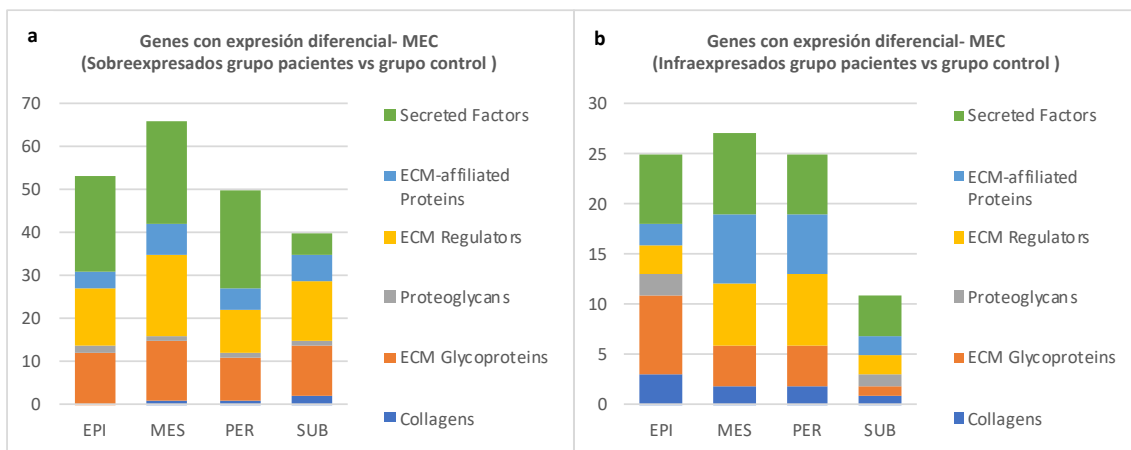
En la **Figura 28** se muestran los genes relacionados con la MEC que mostraron una expresión diferencial entre los grupos de estudio en cada uno de los tejidos estudiados, de acuerdo con las categorías del matrisoma humano descritas en *The Matrisome Project* (<http://matrisomeproject.mit.edu/>). Según esta clasificación, en los pacientes obesos los *factores secretados* destacaron como la fracción de genes transcripcionalmente modificada más numerosa en los tejidos viscerales, mientras que en el TAS se objetivó una mayor activación transcripcional de *genes reguladores de la MEC*. En línea con lo que sucede al analizar el matrisoma humano completo, las fracciones correspondientes a *colágenos* y *proteoglicanos* fueron las de menor actividad transcripcional en los tejidos de los sujetos con obesidad.



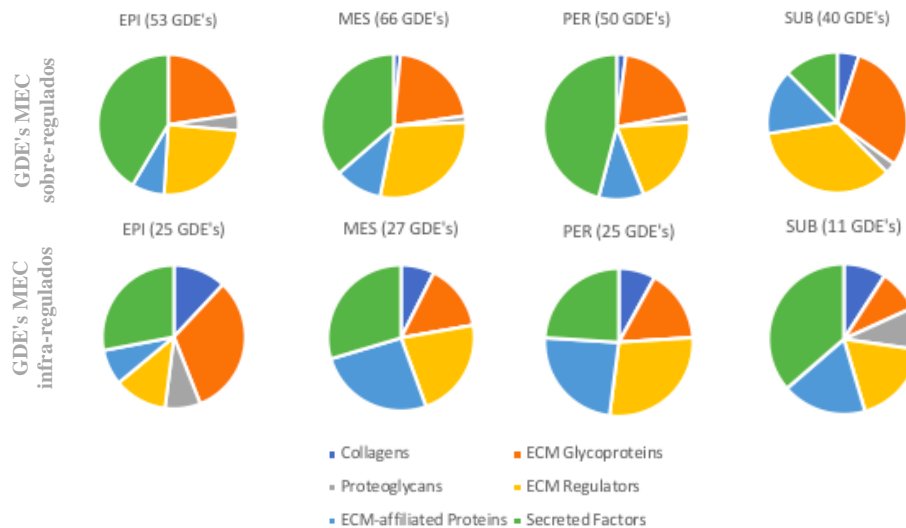
**Figura 28.** Genes con expresión diferencial relacionados con la MEC entre grupos (sobrexpresados e infraexpresados) en los cuatro tejidos analizados ( $p < 0,05$ ), distribuidos por categorías. EPI: Tejido adiposo epiploico; MES: Tejido adiposo mesentérico; PER: Tejido peritoneal; SUB: Tejido adiposo subcutáneo.

En las Figuras 29 (a y b) y 30 se muestra el número absoluto de genes sobre-regulados e infra-regulados en cada uno de los tejidos estudiados en los pacientes del grupo con obesidad respecto al grupo control, clasificados en categorías de *The Matrisome Project* (<http://matrisomeproject.mit.edu/>).

En los tejidos viscerales de los pacientes con obesidad, la proporción de genes sobre-regulados fue aproximadamente el doble que el de los infra-regulados. En el TAS, esta proporción llegó a ser de 3,5 a 1, aunque el número absoluto de genes con expresión diferencial (supra o infra-regulados) fue significativamente menor que en el resto de tejidos analizados (Figuras 27.a y 27.b).



**Figura 29.** Genes con expresión diferencial relacionados con la MEC, sobrexpresados (29.a) e infraexpresados (29.b) en el grupo de pacientes con obesidad ( $p < 0,05$ ). Distribución por categorías. EPI: Tejido adiposo epiploico; MES: Tejido adiposo mesentérico; PER: Tejido peritoneal; SUB: Tejido adiposo subcutáneo.



**Figura 30. Proporción de genes con expresión diferencial relacionados con la MEC sobreexpresados e infraexpresados en el grupo de pacientes con obesidad ( $p < 0,05$ ). Distribución por categorías. GDE's MEC: Genes diferencialmente expresados relacionados con la matriz extracelular; EPI: Tejido adiposo epiloico; MES: Tejido adiposo mesentérico; PER: Tejido peritoneal; SUB: Tejido adiposo subcutáneo.**

Como se muestra en la **Figura 30**, las categorías con mayor activación transcripcional, con una proporción muy similar en los tres tejidos viscerales de los pacientes con obesidad, fueron los *factores secretados*, los *reguladores de la ECM* y las *glicoproteínas de la MEC*. En estos tejidos viscerales se observó una mayor heterogeneidad en las categorías de genes infraexpresados en el grupo de pacientes con obesidad. En el caso del TAS, destaca un perfil transcripcional diferenciado, siendo más significativa la sobreexpresión de *glicoproteínas de la MEC* y encontrándose infra-regulada la transcripción de *factores secretados*, en contraste con la sobre-regulación observada en los tejidos viscerales.

### 5.2.5.2. Análisis de enriquecimiento e interacción entre proteínas

Para ampliar la perspectiva biológica sobre los datos, se llevaron a cabo análisis de enriquecimiento (ver apartado **4.3.4.3 Análisis de significación biológica**).

#### Tejido adiposo epiloico (TAE)

Los resultados del análisis de enriquecimiento funcional en el TAE se muestran en la **Figura 31**. En este tejido, destacaron entre los sobreexpresados genes asociados a la organización de la MEC, de adhesión y migración celular, concretamente de leucocitos, de desarrollo vascular, quimotaxis y degranulación de neutrófilos y señalización de  $TNF\alpha$ . Entre los infra-regulados destacaron genes asociados a proteínas estructurales de MEC y la formación de colágeno.

El mapa de enriquecimiento (**Figura 32**) muestra las categorías funcionales más enriquecidas en el TAE en forma de red. En este tipo de representación, el tamaño de los nodos viene



determinado por el número de genes en esa categoría y las líneas conectan conjuntos de genes que se solapan o superponen entre distintas categorías. Así pues, los conjuntos de genes mutuamente superpuestos entre dos categorías funcionales tienden a aparecer cercanos en la red, haciendo más fácil la identificación de módulos funcionales. En este caso, vemos que en el TAE existe una estrecha relación funcional entre grupos de genes sobreexpresados en este tejido relacionados con la migración celular, la migración de leucocitos, la adhesión celular y la actividad ligando-receptor.

### Tejido adiposo mesentérico (TAM)

Los resultados del análisis de enriquecimiento funcional en el TAM se muestran en la **Figura 33**. A nivel del TAM, de forma similar al TAE, destaca la sobreexpresión de genes relacionados con la organización estructural de la MEC. En segundo lugar, destacaría en este caso la expresión de genes relacionados con la angiogénesis, además de los factores secretores, regulación de la actividad de endopeptidasas, quimiotaxis, degranulación de neutrófilos y señalización de  $TNF\alpha$ . En este tejido los procesos infra-regulados también estuvieron relacionados con la organización estructural de la MEC, además de la regulación negativa de la actividad proteolítica de las endopeptidasas.

El mapa de enriquecimiento (**Figura 34**) muestra las categorías funcionales más enriquecidas en el TAM. En este caso observamos como los procesos de quimiotaxis y migración celular están estrechamente relacionados con la angiogénesis. Por su parte, los genes relacionados con la formación de gránulos secretores aparecen relacionados funcionalmente con la regulación de la actividad de las endopeptidasas y la respuesta inflamatoria. Observamos también una relación entre los genes relacionados con los componentes de la MEC y los relacionados con la actividad de las endopeptidasas.

### Tejido peritoneal (TP)

Los resultados del análisis de enriquecimiento funcional en el TP se muestran en la **Figura 35**. En el TP, encontramos sobreexpresados genes relacionados con la organización estructural de la MEC y en segundo lugar con la actividad de citoquinas, quimiotaxis y migración celular y específicamente leucocitaria. Destacan también los procesos de angiogénesis, secreción de gránulos y nuevamente la vía de señalización de  $TNF\alpha$  así como la respuesta inflamatoria. Respecto a los procesos infra-regulados, destaca nuevamente la organización estructural de la MEC y la regulación de los procesos de quimiotaxis y migración celular.

En el mapa de enriquecimiento (**Figura 36**) podemos ver relacionados funcionalmente en el TP los grupos de genes relacionados con los procesos de regulación de la migración celular, quimiotaxis y regulación de la adhesión celular.

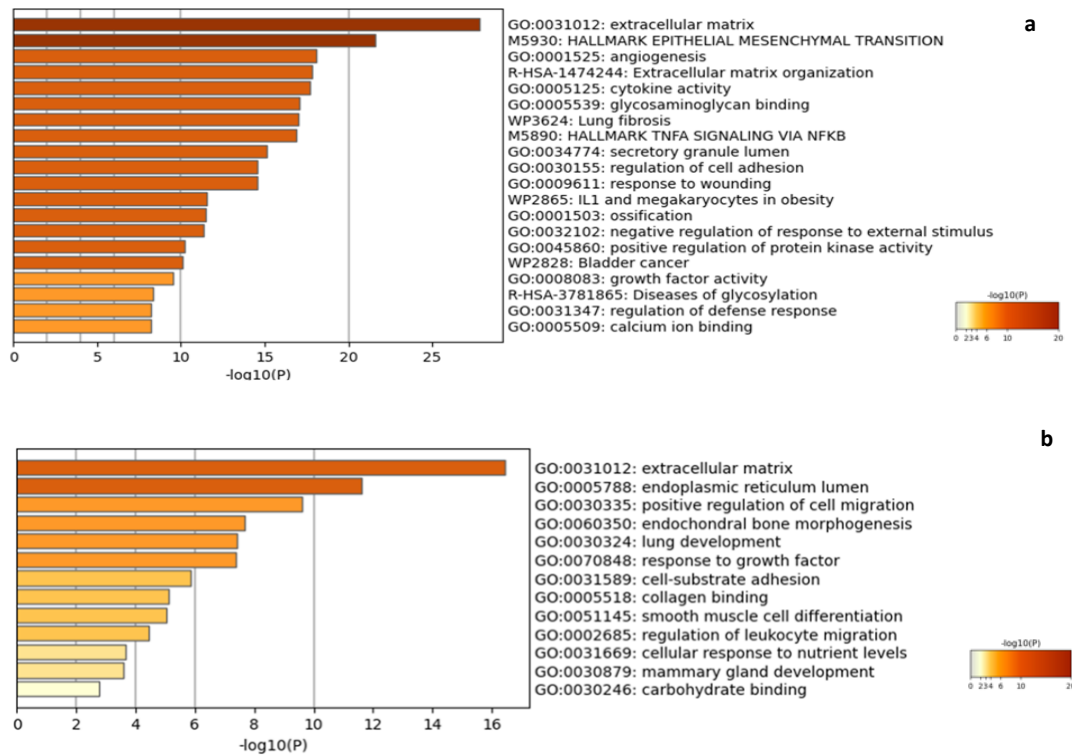
### Tejido adiposo subcutáneo (TAS)

Los resultados del análisis de enriquecimiento funcional en el TAS se muestran en la **Figura 37**. En este tejido destaca la sobre-regulación de los procesos relacionados con la organización y

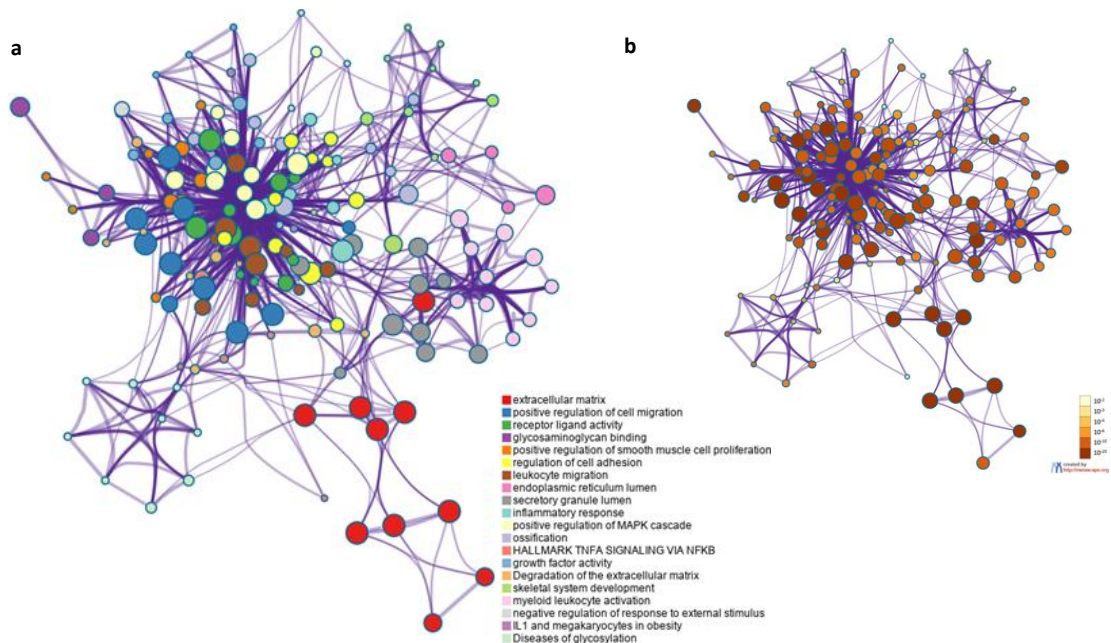
también con la degradación de la MEC. Destaca la infra-regulación de procesos relacionados con la agregación plaquetar y los colágenos.

En el mapa de enriquecimiento (**Figura 38**) observamos claramente como, en comparación con los tejidos viscerales, el TAS presenta un número mucho menor de genes y de categorías funcionales enriquecidas en relación con la MEC. Destaca la relación entre los procesos de organización de la MEC sobre-regulados en este tejido y los grupos de genes asociados a procesos de degradación de colágenos.

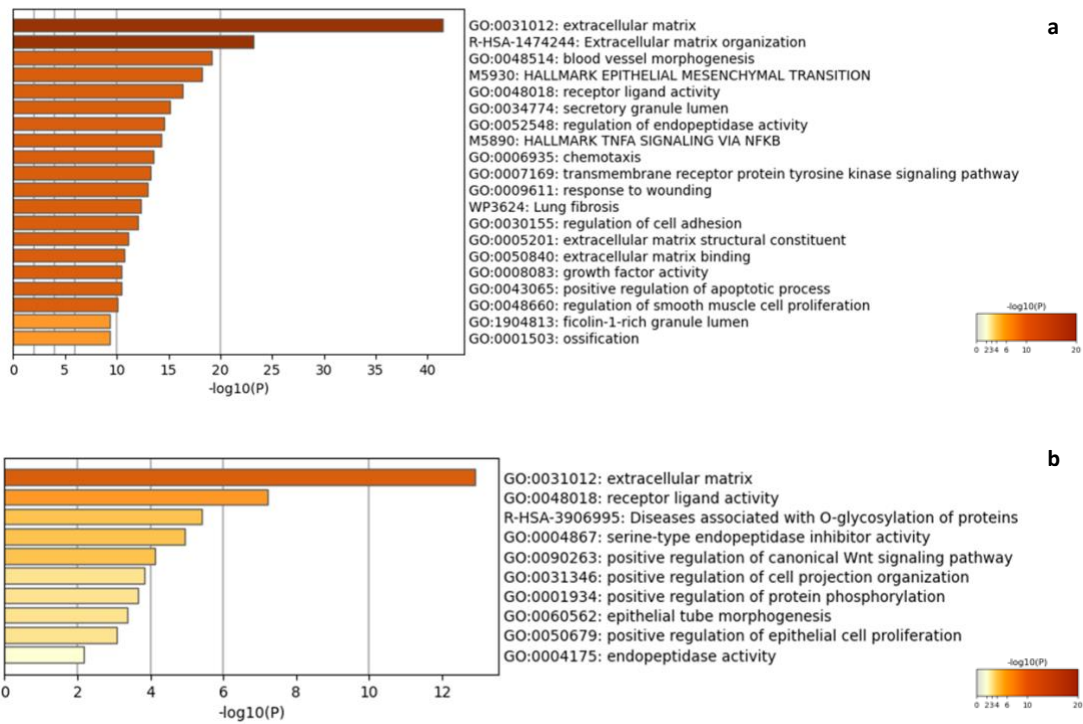




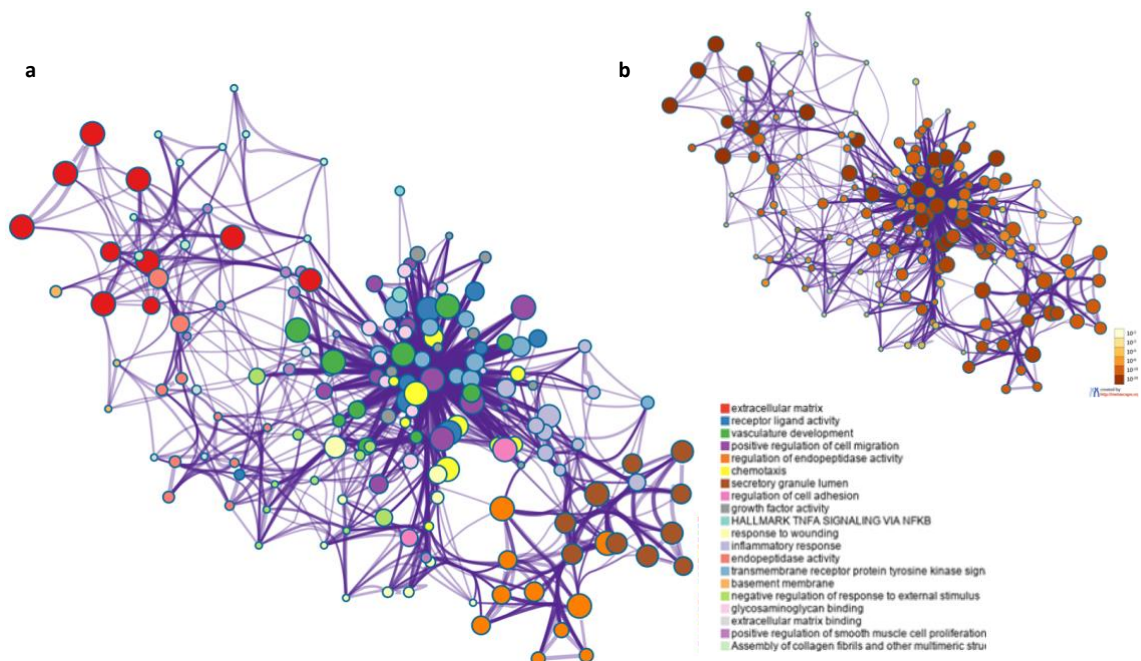
**Figura 31. Gráfico de barras de enriquecimiento funcional en tejido adiposo epiloico (TAE).** Se muestran las categorías funcionales más enriquecidas respecto a los genes diferencialmente expresados sobrerregulados (a) e infraregulados (b) en este tejido.



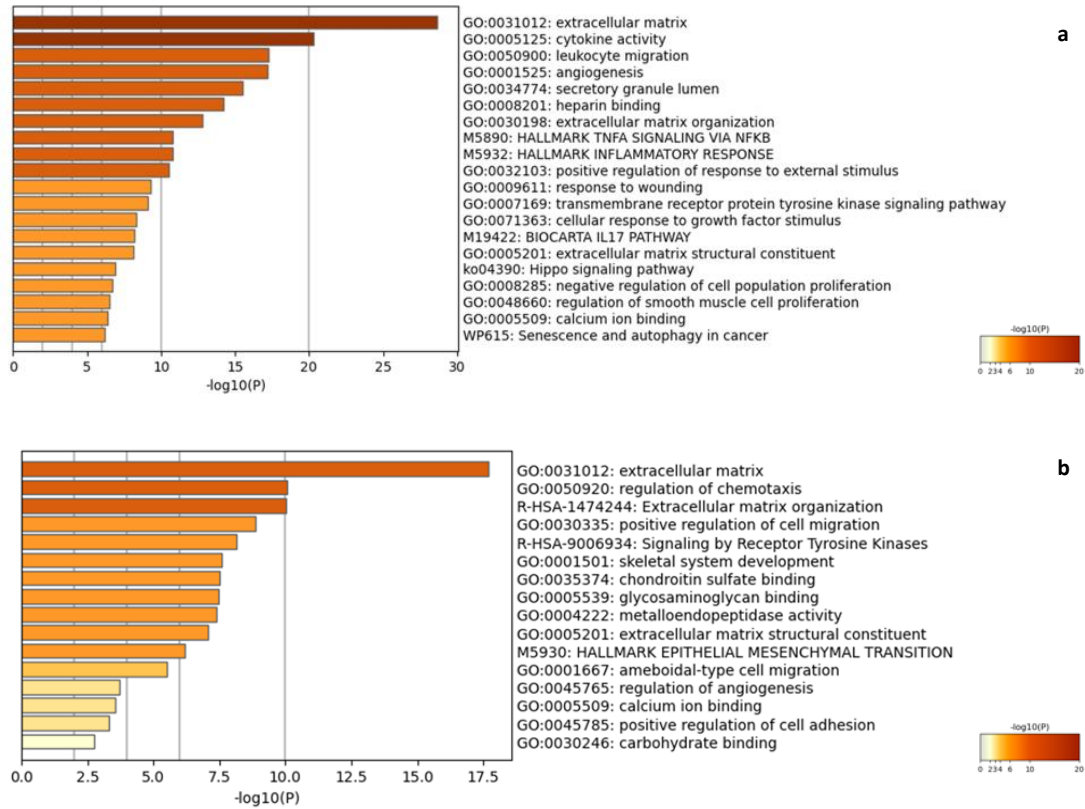
**Figura 32. Mapa de enriquecimiento.** Se muestran las categorías funcionales más enriquecidas en el tejido adiposo epiloico (TAE) (a) y su nivel de significación estadística (b).



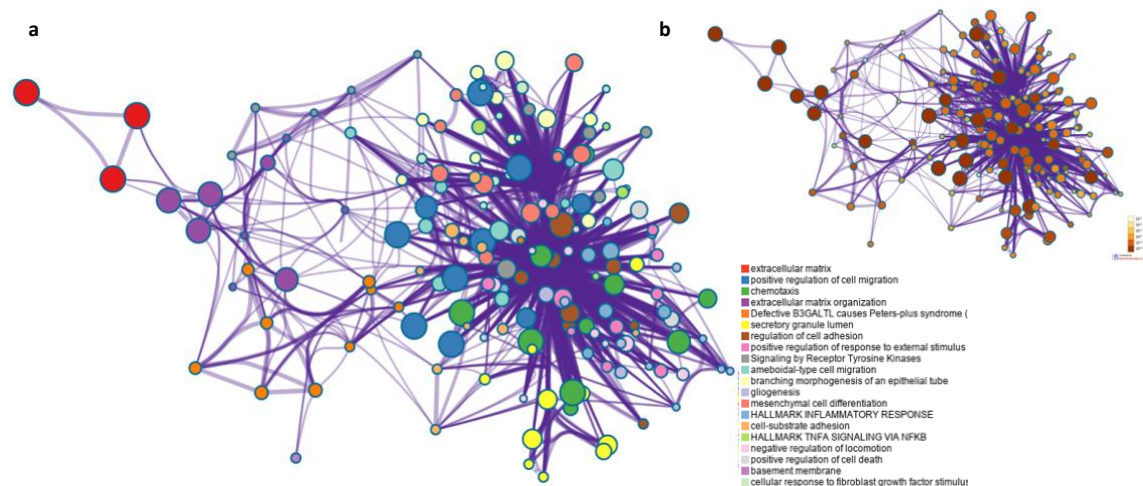
**Figura 33. Gráfico de barras de enriquecimiento funcional en tejido adiposo mesentérico (TAM).** Se muestran las categorías funcionales más enriquecidas respecto a los genes diferencialmente expresados sobre regulados (a) e infra regulados (b) en este tejido.



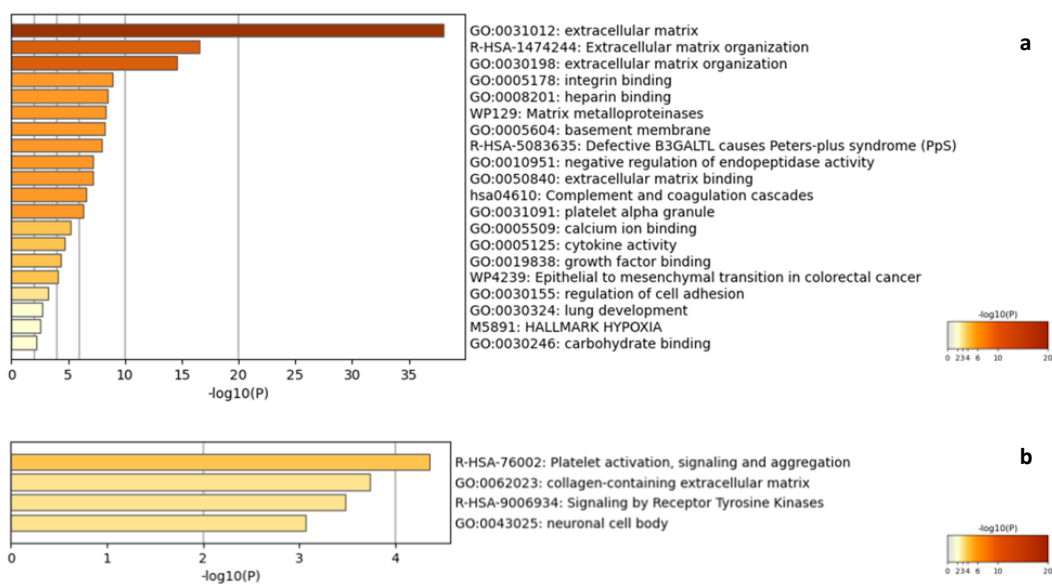
**Figura 34. Mapa de enriquecimiento.** Se muestran las categorías funcionales más enriquecidas en el tejido adiposo mesentérico (TAM) (a) y su nivel de significación estadística (b).



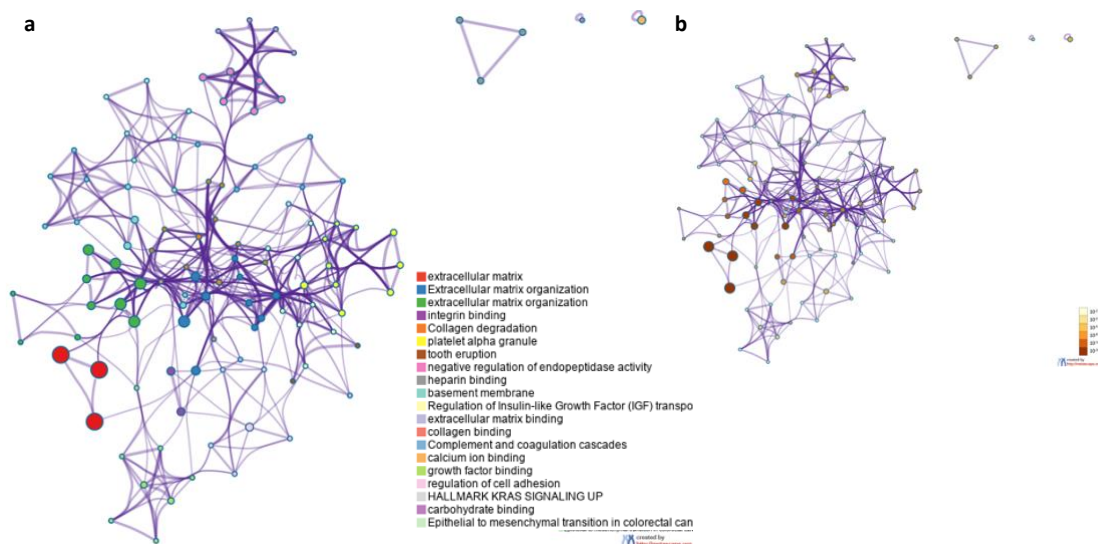
**Figura 35. Gráfico de barras de enriquecimiento funcional en tejido peritoneal (TP).** Se muestran las categorías funcionales más enriquecidas respecto a los genes diferencialmente expresados sobrerregulados (a) e infra regulados (b) en este tejido.



**Figura 36. Mapa de enriquecimiento.** Se muestran las categorías funcionales más enriquecidas en el tejido peritoneal (TP) (a) y su nivel de significación estadística (b).



**Figura 37. Gráfico de barras de enriquecimiento funcional en tejido adiposo subcutáneo (TAS).** Se muestran las categorías funcionales más enriquecidas respecto a los genes diferencialmente expresados sobrerregulados (a) e infra regulados (b) en este tejido.



**Figura 38. Mapa de enriquecimiento.** Se muestran las categorías funcionales más enriquecidas en el tejido adiposo subcutáneo (TAS) (a) y su nivel de significación estadística (b).



## 5.2.6. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN MEDIANTE RT-qPCR

### 5.2.6.1. Genes incluidos

De acuerdo con los criterios previamente expuestos (ver apartado **4.3.5.1 PCR cuantitativa con transcriptasa inversa**), se seleccionaron los 11 genes más representativos de los procesos enriquecidos en el grupo de pacientes con obesidad para validar su expresión diferencial mediante RT-qPCR. Los genes seleccionados fueron los siguientes (según su clasificación en *The Matrisome Project*, <http://matrisomeproject.mit.edu>):

- Proteoglicanos:
  - *VCAN* (versicano)
  - *PRG4* (proteoglicano 4)
  - *SRGN* (serglicina)
- Factores secretados:
  - *S100A8* (calgranulina A)
- Glicoproteínas de la MEC:
  - *CRISPLD2* (proteína secretada rica en cisteína con dos dominios LCCL de unión a lipopolisacáridos)
  - *THBS1* (trombospondina 1)
- Reguladores de la MEC:
  - *ADAMTS1* Desintegrina y metaloproteinasa con dominios trombospondina 1)
  - *ADAMTS4* Desintegrina y metaloproteinasa con dominios trombospondina 4),
  - *ADAMTS9* (Desintegrina y metaloproteinasa con dominios trombospondina 9)
  - *MMP19* (Metaloproteinasa de matriz 19)
- Constituyentes de la MEC (relacionados con la migración celular):
  - *HAS1* (Hialuronano sintasa 1)

En el **Anexo VII** se encuentra una breve descripción funcional de los 11 genes seleccionados.

### 5.2.6.2. Características y evolución de los pacientes incluidos.

Como se ha explicado anteriormente (ver apartado **4.3.5.1 PCR cuantitativa con transcriptasa inversa**), la validación de los niveles de expresión de estos genes se realizó utilizando las muestras de RNA de los cuatro tejidos estudiados de una selección de 24 sujetos (15 del grupo pacientes y 9 del grupo control).

Dado que los pacientes fueron seleccionados de acuerdo a criterios técnicos y de calidad de las muestras de ARN, se realizó una comparación entre los datos clínicos, demográficos y la evolución clínica tras la CB de los 15 pacientes del grupo con obesidad incluidos en la validación y los 15 pacientes con obesidad no incluidos en este análisis. Los resultados de esta comparación, que tiene por objetivo evaluar la presencia de algún posible sesgo de selección en los pacientes sometidos a validación mediante qPCR, se muestran en la **Tabla 3** y la **Tabla 4**.

**Tabla 3. Datos clínicos de los pacientes incluidos en la validación mediante RT-qPCR**

	Pacientes incluidos (n=15)	Pacientes no incluidos (n=15)	valor p
Edad (años)	45,2 (±7,7)	46,1 (±9,6)	0,9
Sexo (mujer)	12 (80%)	10 (66,7%)	0,4
Tabaco	2 (13,3%)	1 (6,7%)	0,5
ASA I/II	14 (93,3%)	12 (80%)	0,3
BMI <sub>t0</sub> (kg/m <sup>2</sup> )	43 (±4,5)	41,5 (±3,2)	0,4
HbA1c <sub>t0</sub> (%)	5,6 (±0,3)	5,7 (±0,3)	0,4
Glucosa <sub>t0</sub> (mg/dl)	96,87 (±8,4)	95,1 (±12,7)	0,4
Insulina <sub>t0</sub> (mU/l)	21,2 (±8,2)	23,5 (±12,4)	0,9
HOMA-IR <sub>t0</sub>	5,2 (±2,3)	5,6 (±3,4)	0,8
HOMA-IR <sub>t0</sub> >3,8	11 (73,3%)	9 (60%)	0,4
Péptido C <sub>t0</sub> (ng/mL)	2,6 (±0,8)	2,9 (±1,3)	0,9
HTA <sub>t0</sub>	3 (20%)	8 (53,3%)	0,06
DLP <sub>t0</sub>	7 (46,7%)	2 (13,3%)	0,046*
TG <sub>t0</sub> (mg/dl)	134 (±21)	132 (±44)	1
Colesterol total <sub>t0</sub> (mg/dl)	210 (±25)	206 (±36)	0,6
LDL <sub>t0</sub> (mg/dl)	134 (±21)	131 (±29)	0,5
HDL <sub>t0</sub> (mg/dl)	51 (±10)	48 (±11)	0,4
Esteatosis hepática <sub>t0</sub>	13 (86,7%)	14 (93,3%)	0,5
SAHS <sub>t0</sub>	9 (60%)	11 (73,3%)	0,4

Las variables cualitativas se expresan en forma de n (porcentaje); las variables cuantitativas en forma de media (±desviación estándar).

\* *Diferencias estadísticamente significativas.*

RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real; ASA: American Society of Anesthesiology Score; BMI: Body Mass Index; HbA1c: Hemoglobina glicosilada; HOMA-IR Homeostatic Model Assessment for Insuline Resistance; HTA: Hipertensión arterial; DLP: Dislipemia ; TG: Triglicéridos; LDL: Low Density Lipoprotein; HDL: High Density Lipoprotein, SAHS: Síndrome de apneas-hipopneas del sueño

**Tabla 4. Evolución clínica a los 12 meses de la CB de los pacientes incluidos en la validación mediante RT-qPCR**

	Pacientes incluidos (n=15)	Pacientes no incluidos (n=15)	valor p
BMI <sub>t12</sub> (kg/m <sup>2</sup> )	27,7 (±3,7)	27,5 (±2,1)	0,7
%TWL <sub>t12</sub> (kg/m <sup>2</sup> )	35,2% (±7,3)	33,5% (±4,4)	0,3
HbA1c <sub>t12</sub> (%)	5,3 (±0,3)	5,1 (±0,3)	0,3
Glucosa <sub>t12</sub> (mg/dl)	80,1 (±5,9)	84,1 (±7,1)	0,2
Insulina <sub>t12</sub> (mU/l)	5,7 (±2,2)	5,8 (±2,2)	1
HOMA-IR <sub>t12</sub>	1,15 (±0,5)	1,2 (±0,4)	0,7
ΔHOMA-IR <sub>t0-t12</sub> (%)	-72% (±18)	-74,1% (±15)	0,9
HOMA-IR <sub>t12</sub> >3,8	0 (0%)	0 (0%)	NA
Péptido C <sub>t12</sub> (ng/mL)	1,3 (±0,5)	1,4 (±0,7)	0,7
HTA <sub>t12</sub>	2 (13,3%)	4 (±26,7%)	0,4
DLP <sub>t12</sub>	0 (0%)	2 (13,3%)	0,1
TG <sub>t12</sub> (mg/dl)	92 (±26)	83 (±20)	0,4
ΔTG <sub>t0-t12</sub> (%)	-21,7% (±38,5)	-33,5% (±18)	0,6
Col. total <sub>t12</sub> (mg/dl)	191 (±24)	180 (±33)	0,3
ΔCol. total <sub>t0-t12</sub> (%)	-8,4% (±8,4)	-11,2% (±17)	0,7
LDL <sub>t12</sub> (mg/dl)	115 (±25)	107 (±25)	0,4
ΔLDL <sub>t0-t12</sub> (%)	-13,2% (±15,6)	-16% (±22)	0,7
HDL <sub>t12</sub> (mg/dl)	58 (±13)	56 (±12)	0,7
ΔHDL <sub>t0-t12</sub>	14,8 (±17,3)	18,9% (±18)	0,7

Las variables cualitativas se expresan en forma de n (porcentaje); las variables cuantitativas en forma de media (±desviación estándar).

\* *Diferencias estadísticamente significativas.*

CB: Cirugía bariátrica; RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real; BMI: Body Mass Index, %TWL: Percentage of Total Weight Loss, HbA1c: Hemoglobina glicosilada; HOMA-IR Homeostatic Model Assessment for Insuline Resistance; Δ: variación HTA: Hipertensión arterial; DLP: Dislipemia; TG: Triglicéridos; LDL: Low Density Lipoprotein; HDL: High Density Lipoprotein,

Como se muestra en la **Tabla 3**, no se detectaron sesgos en la selección de los pacientes del grupo con obesidad incluidos en el análisis de validación de la expresión génica mediante RT-qPCR. De hecho, se demostró que estos pacientes eran comparables en sus características clínicas y demográficas al resto de sujetos del grupo con obesidad no incluidos en el análisis de validación, a excepción del porcentaje de individuos dislipémicos (en este caso se detectó una mayor proporción de individuos dislipémicos en el grupo sometido a validación, hallazgo que podría estar en relación a la n limitada). Tampoco se detectaron diferencias en la evolución ponderal y metabólica de los individuos del grupo con obesidad incluidos en el análisis de validación respecto a los no incluidos (**Tabla 4**).

Por tanto, de acuerdo con estos resultados, los individuos seleccionados para validación de la expresión mediante qPCR se consideraron representativos del grupo de pacientes con obesidad.

### 5.2.6.3. Resultados de la validación de la expresión diferencial mediante RT-qPCR

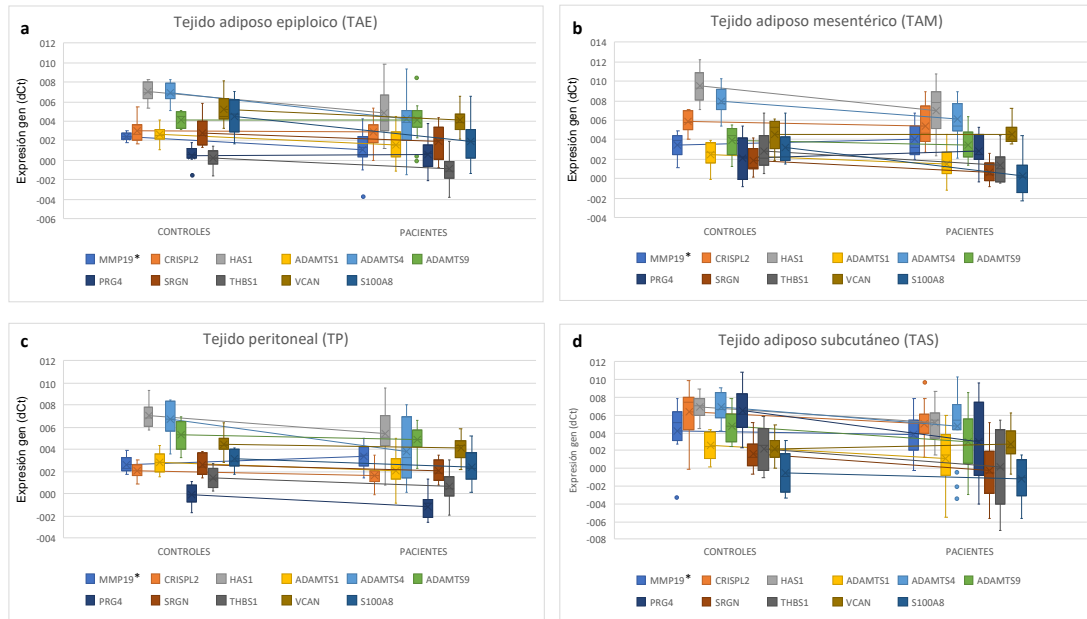
#### Normalización mediante genes de referencia

Como se ha explicado previamente, los cálculos realizados en base al Ct deben realizarse previa normalización de los mismos en base al Ct de una secuencia control o gen de referencia (ver apartado **4.3.5.2. Análisis de datos y genes de referencia**).

En este estudio, se seleccionaron genes de referencia de uso común, como *ACTB* y *IPO8*, y otros específicamente seleccionados en base a los datos obtenidos en el análisis con microarrays, como el gen *FTL*. Dado que no fue posible seleccionar una combinación adecuada de genes de referencia para normalizar los datos de los cuatro tejidos de forma simultánea, se seleccionaron genes de referencia específicos para la normalización de cada tejido: se seleccionó la combinación de *IPO8* y *FTL* para el TAS, y la combinación *ACTB* y *FTL* para el TAM. Aunque sería preferible la normalización con más de un gen de referencia, en el caso del TAE el único gen adecuado fue *IPO8*. En el caso del TP no fue posible la identificación de genes de referencia adecuados, por lo que, con el objetivo de obtener un resultado aproximado de la expresión génica, se decidió trabajar con las Ct's obtenidas en las qPCR de los genes diana, prescindiendo de la normalización mediante cuantificación relativa.

#### Análisis de la validación de la expresión diferencial mediante qPCR

En la **Figura 39** se exponen los resultados de los niveles de expresión objetivados mediante RT-qPCR en los genes seleccionados en cada uno de los tejidos en el grupo de pacientes con obesidad y el grupo control. En este caso se ha utilizado el  $\Delta$ Ct como medida de la expresión del gen de interés en cada una de las muestras.



**Figura 39. Niveles de expresión ( $\Delta Ct$ ).** Valores objetivados en cada grupo mediante qPCR en los 11 genes seleccionados en cada uno de los tejidos: tejido adiposo epiloico (a), tejido adiposo mesentérico (b), tejido peritoneal (c) y tejido adiposo subcutáneo (d). \**MMP19*: Datos de expresión no valorables.

De forma general, como se observa en los gráficos, los valores más bajos de  $\Delta Ct$  objetivados en las RT-qPCR's de los pacientes del grupo con obesidad indican una expresión aumentada de los genes de interés en los tejidos de los pacientes de este grupo respecto al grupo control.

Cabe decir que la expresión del gen *MMP19* no pudo ser validada en ninguno de los tejidos estudiados, ya que se objetivó una morfología irregular en la curva de disociación de la qPCR. Esta morfología irregular (en forma de curva con varios picos) se relaciona con la falta de especificidad de los cebadores utilizados, por lo que los datos de expresión obtenidos para este gen no son valorables. Cabe destacar que, en el caso de *MMP19*, se utilizaron cebadores ya disponibles en el laboratorio diseñados mediante el aplicativo de la casa comercial *Roche*.

Debemos remarcar también, como se ha mencionado anteriormente, que en el caso del TP no se encontraron genes de referencia adecuados para la normalización de los datos obtenidos. Al no haber sido posible la normalización de los resultados de expresión de los genes de interés mediante cuantificación relativa en este tejido, se ha trabajado con los valores de Ct obtenidos para cada gen de interés con el objetivo de obtener un valor aproximado de la expresión peritoneal de cada uno de los genes analizados.

En el **Anexo VIII** se muestra el análisis numérico de las diferencias de expresión entre grupos objetivado en las qPCR's para cada gen de interés comparado con el valor obtenido en el análisis con microarrays. En general, el análisis mediante RT-qPCR mostró una sobreexpresión de los genes analizados en los tejidos viscerales de los pacientes con obesidad con respecto a los individuos no obesos. En el TAE y en el TAM, los genes que mostraron mayor sobreexpresión en el grupo de pacientes con obesidad fueron *ADAMTS4*, *S100A8* y *HAS1* (7.7, 6.9 y 5.6 veces mayor



expresión en el TAE de los pacientes con obesidad en comparación a los individuos del grupo control; 2.7, 5.4 y 4.3 veces mayor expresión en el TAM de los pacientes con obesidad en comparación a los individuos del grupo control, respectivamente).

En la **Tabla 5** se muestra un resumen de los genes cuya expresión diferencial entre los grupos de estudio ha sido validada en el análisis mediante qPCR en cada uno de los tejidos estudiados.

**Tabla 5. Genes utilizados en la validación de la expresión diferencial mediante qPCR**

<i>Gen</i>	<i>Tipo</i>	TAS	TAE	TAM	TP
<i>VCAN</i>	Proteoglicano	*	*		**
<i>PRG4</i>	Proteoglicano				**
<i>SRGN</i>	Proteoglicano			*	**
<i>S100A8</i>	Factor secretado		**	**	**
<i>CRISPLD2</i>	Glicoproteína MEC				**
<i>THBS1</i>	Glicoproteína MEC		*		**
<i>ADAMTS1</i>	Regulador MEC		*		**
<i>ADAMTS4</i>	Regulador MEC		*	*	**
<i>ADAMTS9</i>	Regulador MEC				*
<sup>δ</sup> <i>MMP19</i>	Regulador MEC	-	-	-	-
<i>HAS1</i>	Constituyente MEC / Migración celular		*	*	**

\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$

<sup>δ</sup>*MMP19*: Datos de expresión no valorables.

TAS: tejido adiposo subcutáneo; TAE: Tejido adiposo epiloico, TAM: tejido adiposo mesentérico, TP: tejido peritoneal

A pesar de que, como se muestra en la **Figura 39** y en la **Tabla 5**, los patrones específicos de expresión de los genes analizados presentaron diferencias entre los cuatro tejidos estudiados, el análisis mediante qPCR confirmó en general una sobreexpresión de los genes seleccionados en los tejidos viscerales de los pacientes con obesidad. Por tanto, en términos generales, podemos decir que se observó que los niveles de expresión génica obtenidos en las qPCR's validaron las diferencias de expresión objetivadas previamente en el análisis mediante microarrays en los genes analizados.

Los genes *S100A8*, *ADAMTS4* y *HAS1* validaron su expresión diferencial entre los grupos de estudio en los tres tejidos viscerales analizados, con mayor significación estadística en el caso de *S100A8*.

En cambio, como ya se sugería en el análisis con microarrays, el TAS presentó escasas diferencias en la expresión de genes relacionados con la MEC respecto al grupo de pacientes control. En este caso, el análisis de expresión mediante RT-qPCR únicamente objetivó diferencias en la expresión de *VCAN*, que en este caso mostró una mayor expresión en los pacientes del grupo control respecto a los del grupo de pacientes con obesidad (ver **Anexo VIII**).

## 5.2.7. NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA Y SITUACIÓN CLÍNICA BASAL

### 5.2.7.1. Análisis de asociación entre la expresión de los genes seleccionados en los diferentes tejidos y la situación clínica basal

De acuerdo con los objetivos secundarios del presente estudio, en primer lugar se realizó un análisis exploratorio de la asociación entre los niveles de expresión de los genes seleccionados (obtenidos mediante qPCR) y distintas variables clínicas cualitativas, con especial interés en la obesidad (definida como IMC > 30 kg/m<sup>2</sup>) y la insulinoresistencia (definida como HOMA > 3.8). También se evaluó la asociación entre la expresión de los genes de interés y la presencia de HTA y de DLP, ambas definidas en base a criterios clínicos en relación al riesgo cardiovascular individual (ver apartado **4.2. Variables clínicas y bioquímicas**).

En la **Tabla 6** se muestran los genes cuya expresión se asoció estadísticamente de forma significativa con las distintas variables clínicas basales analizadas en cada uno de los 4 tejidos estudiados. En el **Anexo IX** se pueden encontrar los datos numéricos del estudio de asociación, con los valores medios de  $\Delta Ct$  para cada gen en cada una de las situaciones clínicas analizadas en cada uno de los tejidos estudiados. Cabe recordar que un menor valor de  $\Delta Ct$  indica una mayor expresión basal del gen (ver **Anexo II**).

**Tabla 6. Asociación entre variables clínicas basales y expresión génica**

	IMC > 30 kg/m <sup>2</sup> (n=24)	HOMA-IR > 3.8 (n=24)	HTA (n=24)	DLP (n=24)
<b>TAE</b>	<i>HAS1</i> <i>ADAMTS4</i> <i>THBS1</i> <i>S100A8</i>	<i>HAS1</i> <i>ADAMTS4</i> <i>THBS1</i> <i>S100A8</i> <i>SRGN</i>	<i>ADAMTS1</i>	---
<b>TAM</b>	<i>HAS1</i> <i>ADAMTS4</i> <i>THBS1</i> <i>S100A8</i>	<i>HAS1</i> <i>ADAMTS4</i> <i>THBS1</i> <i>S100A8</i> <i>SRGN</i> <i>ADAMTS1</i> <i>ADAMTS9</i>	---	---
<b>TP</b>	<i>ADAMTS4</i> <i>MMP19</i> <i>PRG4</i>	<i>ADAMTS4</i> <i>THBS1</i>	<i>ADAMTS 4</i> <i>SRGN</i>	---
<b>TAS</b>	<i>HAS1</i>	---	<i>PRG4*</i>	---

En azul se muestran asociaciones observadas tanto en el TAE como en el TAM

\* La variable clínica se asocia a una menor expresión del gen.

TAE: Tejido adiposo epiploico; TAM: Tejido adiposo mesentérico; TP: Tejido peritoneal;

TAS: Tejido adiposo subcutáneo; HOMA-IR Homeostatic Model Assessment for Insuline

Resistance; IMC: Índice de masa corporal; HTA: Hipertensión arterial; DLP: Dislipemia

En general, en el estudio de asociación se observaron diferencias significativas en la expresión de gran parte de los genes analizados en relación con el IMC y con la presencia o no de insulinoresistencia en los sujetos estudiados. Estos hallazgos fueron más evidentes en los tejidos viscerales, especialmente a nivel del TAE y el TAM, mientras que prácticamente no se identificaron variaciones significativas en la expresión de los genes estudiados entre las diversas situaciones clínicas a nivel del TAS.

A nivel del TAE y el TAM, se detectó una expresión significativamente mayor de *HAS1*, *ADAMTS4*, *THBS1* y *S100A8* en los pacientes con IMC > 30 kg/m<sup>2</sup>. Paralelamente, en estos mismos tejidos se objetivó una mayor expresión de estos mismos genes (además de *SRGN*) en los pacientes definidos como insulinoresistentes. En el TAM, no así en el TAE, se detectó también una mayor expresión de otras metalopeptidasas de la familia ADAMTS (*ADAMTS1* y *ADAMTS9*) en los individuos insulinoresistentes.

A nivel del TP, paralelamente a los hallazgos de los otros tejidos viscerales, se observó una mayor expresión de *ADAMTS4* en los individuos obesos y en los insulinoresistentes. Los individuos con IMC > 30 kg/m<sup>2</sup> presentaron también una mayor expresión peritoneal de *PRG4*, mientras que los insulinoresistentes, además de *ADAMTS4*, presentaron una mayor expresión peritoneal de *THBS1*.

En el TAS las diferencias fueron discretas y únicamente se detectó una mayor expresión de *HAS1* en los pacientes con IMC > 30 kg/m<sup>2</sup>.

La asociación entre los niveles de expresión de los genes estudiados y la presencia de HTA fue poco significativa y mucho menos consistente en los tejidos estudiados. Si bien destacó una expresión significativamente mayor de algunas metalopeptidasas de la familia ADAMTS en el TAE y el TP (ver **Tabla 6**), en el TAS se observó una expresión significativamente menor del gen *PRG4* en los individuos hipertensos.

No se objetivaron asociaciones entre la expresión de los 11 genes seleccionados en ninguno de los tejidos estudiados y la presencia de DLP.

#### 5.2.7.2. Análisis de correlación entre la expresión de los genes seleccionados en los diferentes tejidos y la situación clínica basal

En segundo lugar, para evaluar la relación entre la expresión de los genes seleccionados en los diversos tejidos estudiados y las variables clínicas de interés, se realizó un análisis de correlación entre los niveles de expresión en cada tejido y las distintas variables cuantitativas.

En la **Tabla 7** se muestra los genes cuya expresión presentó correlación con las distintas variables clínicas basales analizadas en cada uno de los 4 tejidos estudiados. Los resultados numéricos del análisis de correlación se especifican en el **Anexo X**.

**Tabla 7. Correlación entre variables clínicas basales y expresión génica**

	IMC (n=24)	HOMA-IR (n=24)	DLP (n=15)			
			TG	CT	LDL	HDL
TAE	<i>S100A8</i>	<i>HAS1</i> <i>THBS1</i> <i>VCAN</i> <i>S100A8</i>	---	---	<i>SRGN</i>	<i>VCAN*</i>
TAM	<i>HAS1</i>	---	---	---	---	---
TP	---	<i>ADAMTS4</i> <i>THBS1</i> <i>ADAMTS1</i>	---	<i>HAS1*</i> <i>HBS1*</i>	<i>HAS1*</i>	<i>ADAMTS9*</i>
TAS	<i>HAS1</i>	---	---	---	---	---

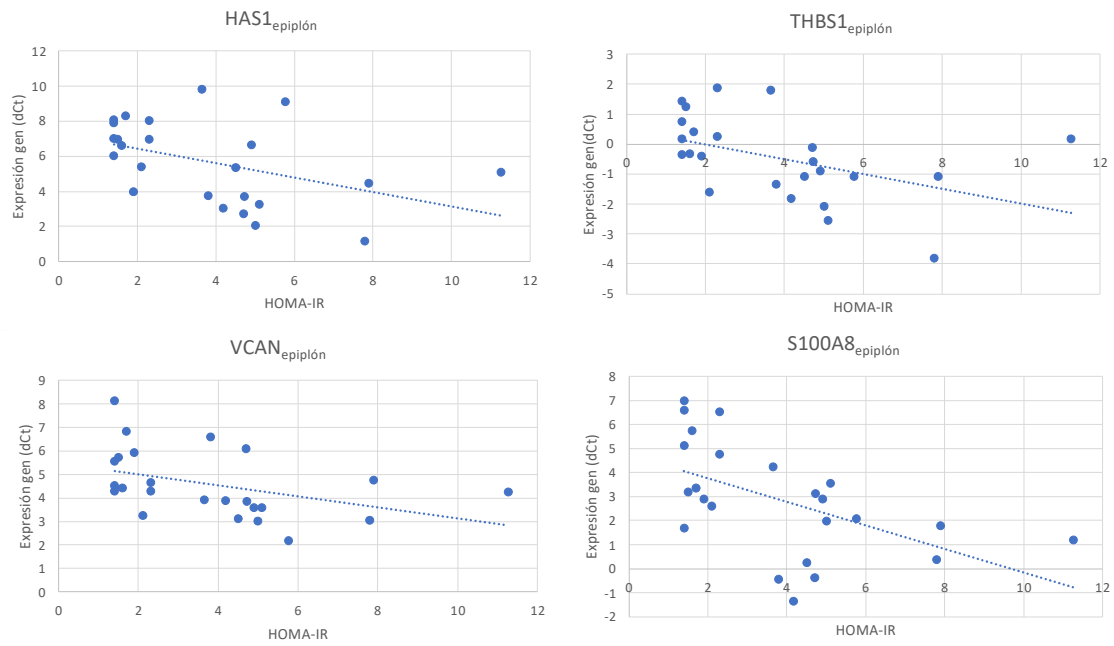
\* *Correlación negativa (a mayor expresión del gen, menor valor de la variable cuantitativa)*

*TAE: Tejido adiposo epiloico; TAM: Tejido adiposo mesentérico; TP: Tejido peritoneal; TAS: Tejido adiposo subcutáneo, IMC: Índice de masa corporal; HOMA-IR Homeostatic Model Assessment for Insuline Resistance; DLP: Dislipemia; TG: Triglicéridos; CT: Colesterol Total; LDL: Low Density Lipoprotein; HDL: High Density Lipoprotein.*

### Insulinorresistencia (HOMA-IR)

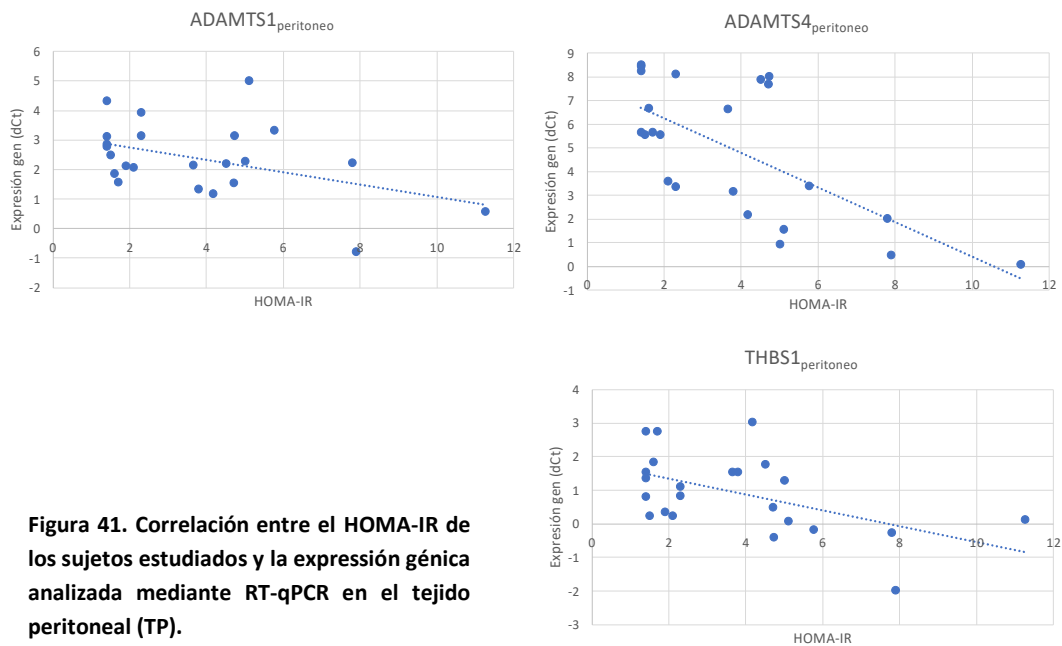
En general, destacan las correlaciones de signo negativo entre la expresión de algunos de los genes de interés y el HOMA-IR en el TAE y en el TP (ver **Anexo X**). No obstante, dado que para el cálculo del coeficiente de correlación lineal de Pearson se ha utilizado el valor medio del  $\Delta Ct$  como medida de la expresión de cada gen, se debe tener en cuenta la correcta interpretación de este valor a la hora de analizar los datos de correlación.

En el TAE, los genes cuya expresión mostraron una correlación negativa significativa entre la media del valor de  $\Delta Ct$  y el valor del HOMA fueron *HAS1*, *THBS1*, *VCAN* y *S100A8* (**Figura 40**). Puesto que a menor  $\Delta Ct$  mayor expresión del gen, en este caso existe una correlación que debe interpretarse como positiva entre las variables: a mayor HOMA-IR, mayor expresión epiloica de los genes mencionados. En este caso, la mayor fuerza en la correlación se evidenció entre el HOMA-IR y la expresión epiloica de *S100A8* ( $r = -0,536$ ,  $p = 0,007$ ).



**Figura 40. Correlación entre el HOMA-IR de los sujetos estudiados y la expresión génica analizada mediante RT-qPCR en el tejido adiposo epiloico (TAE).**

Del mismo modo, a nivel del TP se objetivó una correlación de signo negativo (que debido a significado de Ct debe interpretarse nuevamente como positiva) entre la expresión de *THBS1*, *ADAMTS1* y *ADAMTS4* y el valor del HOMA (Figura 41). Por tanto, a mayor HOMA se observa una mayor expresión de estos genes a nivel peritoneal. En este caso, la correlación más fuerte se detectó entre el HOMA-IR y la expresión peritoneal de *ADAMTS4* ( $r = -0.666$ ,  $p = 0.001$ ).

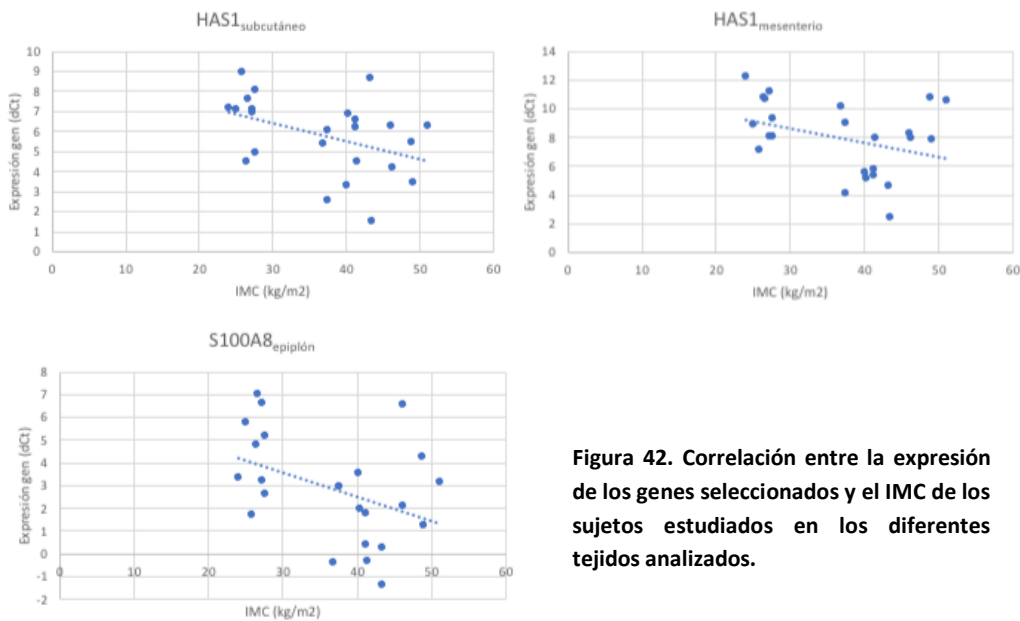


**Figura 41. Correlación entre el HOMA-IR de los sujetos estudiados y la expresión génica analizada mediante RT-qPCR en el tejido peritoneal (TP).**

En el TAM y el TAS no se observó ninguna correlación significativa entre los niveles de expresión de los genes estudiados y el HOMA.

## IMC

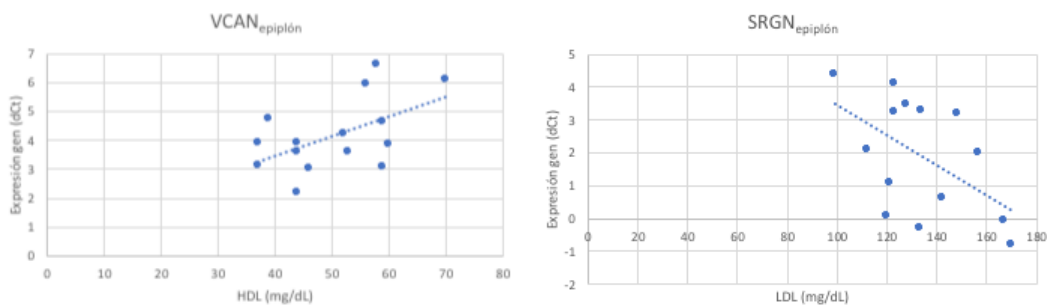
Respecto a la correlación con el IMC (**Figura 42**), la expresión de *HAS1* mostró una correlación positiva con esta variable en el TAS y en el TAM de los sujetos estudiados. En el TAE, se objetivó una correlación positiva del IMC con la expresión de *S100A8*. No se encontraron correlaciones significativas entre el IMC y la expresión génica en el TP.



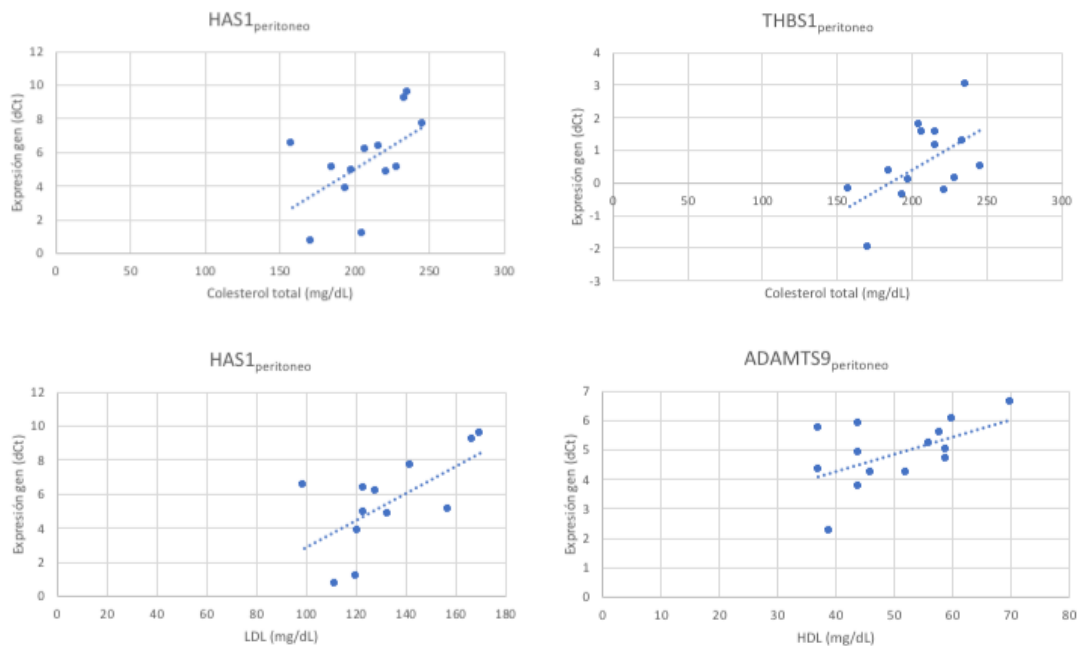
**Figura 42.** Correlación entre la expresión de los genes seleccionados y el IMC de los sujetos estudiados en los diferentes tejidos analizados.

## Perfil lipídico

El análisis de correlación entre la expresión de los genes de interés y el perfil lipídico de los sujetos analizados arrojó resultados variables y poco consistentes en los tejidos estudiados. Los principales hallazgos se dieron a nivel del TAE (**Figura 43**) y del TP (**Figura 44**), mientras que en el resto de tejidos no se observaron correlaciones significativas.



**Figura 43.** Correlación entre la expresión de los genes seleccionados en el tejido adiposo epiloico y el perfil lipídico de los sujetos estudiados.



**Figura 44. Correlación entre la expresión de los genes seleccionados en el tejido peritoneal y el perfil lipídico de los sujetos estudiados.**

### 5.2.8. NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA Y EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA

Por último, de acuerdo con los objetivos secundarios de este estudio, se evaluó la correlación entre la expresión basal de los genes de interés en los tejidos de los pacientes con obesidad en el momento de la CB y la evolución de las distintas variables clínicas analizadas a los 12 meses de la intervención. No se realizó un análisis de asociación debido a la limitada n de las muestras a comparar.

A pesar de que los 15 pacientes analizados fueron sometidos a técnicas quirúrgicas distintas (8 LRYGB, 6 GV y 1 SADIS), dada la limitada n disponible no se realizó un análisis estratificado en función de la técnica.

En la **Tabla 8** se muestra los genes cuya expresión presentó correlación con las distintas variables clínicas analizadas a los 12 meses de la CB en los 4 tejidos estudiados. Los datos detallados del análisis de correlación se muestran en el **Anexo XI**.

**Tabla 8. Correlación entre variables clínicas a los 12 meses de la CB y expresión génica**

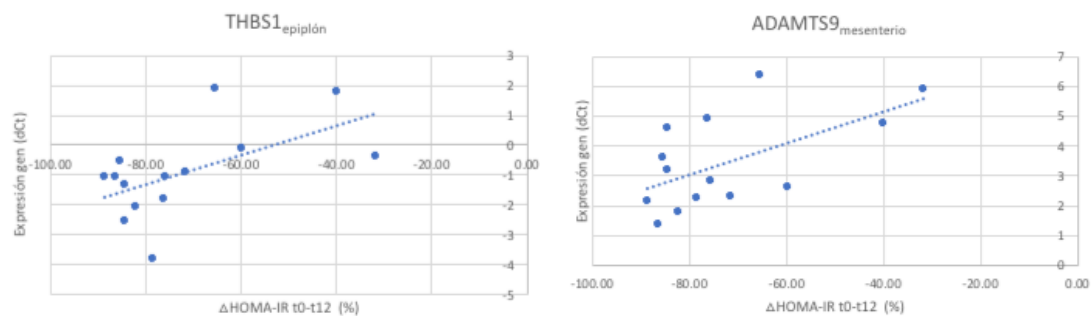
	%TWL <sub>t12</sub> (n=15)	ΔHOMA-IR <sub>t0-t12</sub> (n=15)	ΔTG <sub>t0-t12</sub> (n=15)	ΔCT <sub>t0-t12</sub> (n=15)	ΔLDL <sub>t0-t12</sub> (n=15)	ΔHDL <sub>t0-t12</sub> (n=15)
TAE	---	THBS1	---	---	---	---
TAM	---	ADAMTS9	---	---	---	VCAN
TP	---	---	---	CRISPL2 VCAN	ADAMTS4	---
TAS	---	---	---	---	---	ADAMTS4 PRG4

TAE: Tejido adiposo epiploico; TAM: Tejido adiposo mesentérico; TP: Tejido peritoneal; TAS: Tejido adiposo subcutáneo, DLP: Dislipemia; %TWL<sub>t12</sub>: Porcentaje de peso total perdido a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔHOMA-IR<sub>t0-t12</sub>: Variación relativa (%) del HOMA-IR a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔTG<sub>t0-t12</sub>: Variación relativa (%) del valor de Triglicéridos a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔCT<sub>t0-t12</sub>: Variación relativa (%) del valor de Colesterol Total a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔLDL<sub>t0-t12</sub>: Variación relativa (%) del valor de Low Density Lipoprotein a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔHDL<sub>t0-t12</sub>: Variación relativa (%) del valor de High Density Lipoprotein a los 12 meses de la cirugía bariátrica.

### Insulinorresistencia (HOMA-IR)

Respecto a la variación del HOMA a los 12 meses de la CB, se detectó una correlación significativa fuerte-moderada entre esta variable y la expresión basal de THBS1 en el TAE y la expresión basal de ADAMTS 9 en el TAM ( $r = 0.574$ ,  $p = 0.0032$ ;  $r = 0.579$ ,  $p = 0.03$  respectivamente), evidenciando una mayor mejoría metabólica al año de la intervención en los pacientes con una mayor expresión de estos genes en los tejidos mencionados (**Figura 45**).

En el TAS y en el TP no se detectaron correlaciones significativas entre la expresión de los genes de interés y la evolución ponderal o del perfil de insulinorresistencia al año de la CB.



**Figura 45. Correlación entre la expresión de los genes seleccionados y la variación porcentual del HOMA-IR a los 12m de la CB.**



## Porcentaje de peso total perdido (%TWL)

En este caso, a pesar de que estadísticamente se observó una correlación entre el %TWL y la expresión basal de *MMP19*, como se ha comentado anteriormente (ver apartado 5.2.6.3. **Resultados de la validación de la expresión diferencial mediante RT-qPCR**), debido a las irregularidades observadas en la curva de disociación de la RT-qPCR en el análisis de este gen, debemos considerar los datos de expresión como poco valorables y la consiguiente correlación como no concluyente.

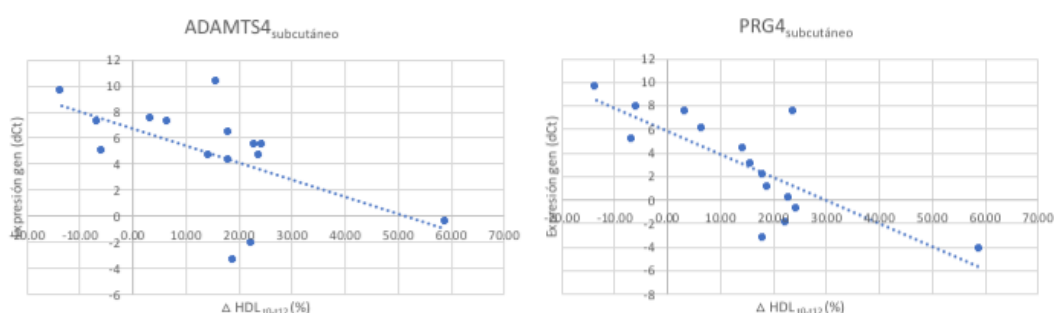
## Perfil lipídico

Las correlaciones respecto a la evolución del perfil lipídico tras la CB fueron poco consistentes.

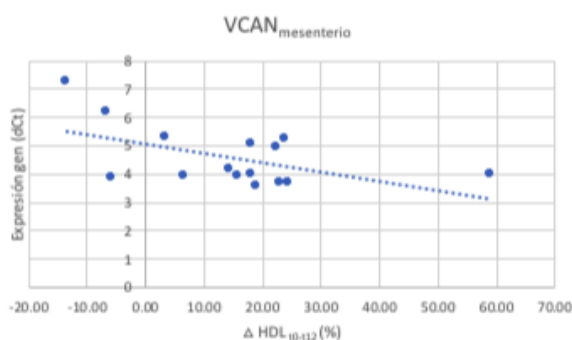
Se observaron correlaciones entre la evolución del valor de HDL tras la CB y la expresión de *ADAMTS4* y *PRG4* en el TAS (**Figura 46**), así como con la expresión de *VCAN* en TAM (**Figura 47**) (mayor expresión basal del gen en los tejidos mencionados se correlacionó con un mayor aumento porcentual del valor de colesterol HDL a los 12 meses de la CB).

También se objetivó una correlación entre la evolución del valor de colesterol total en el subgrupo de pacientes analizados y la expresión de *CRISPL2* y *VCAN* en el TP (mayor expresión basal del gen se correlacionó con una mayor disminución porcentual del valor de colesterol total a los 12 meses de la CB). Del mismo modo, la expresión de *ADAMTS4* en el TP se correlacionó con una mayor disminución porcentual del valor de colesterol LDL a los 12 meses de la CB (**Figura 48**).

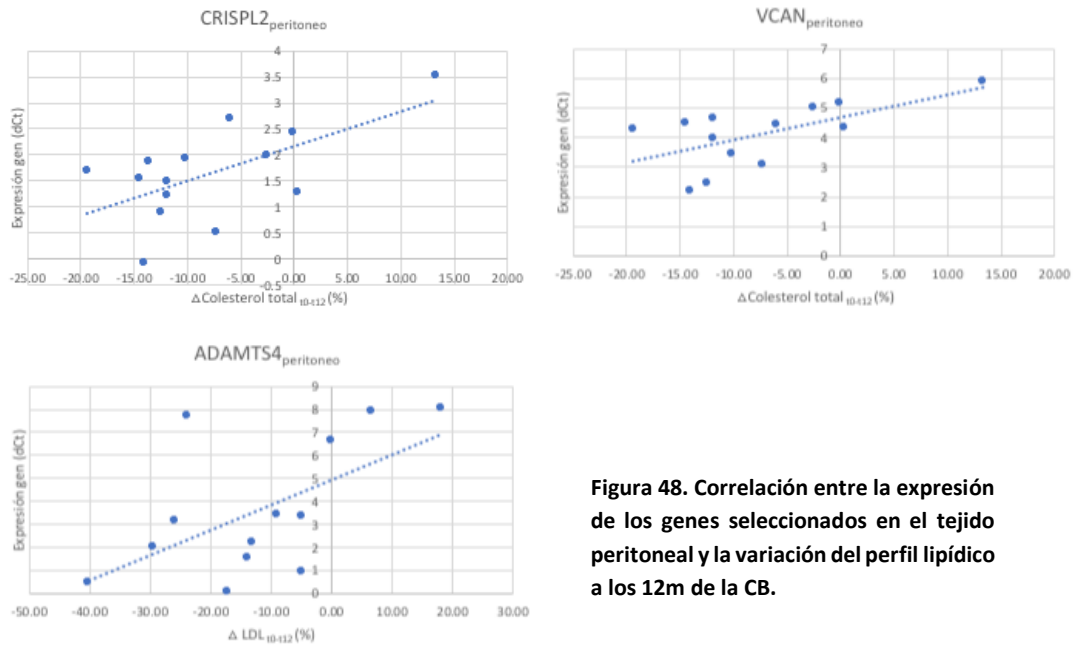
En este caso no se observaron correlaciones significativas a nivel del TAE.



**Figura 46.** Correlación entre la expresión de los genes seleccionados en el tejido adiposo subcutáneo y la variación del perfil lipídico a los 12m de la CB.



**Figura 47.** Correlación entre la expresión de los genes seleccionados en el tejido adiposo mesentérico y la variación del perfil lipídico a los 12m de la CB.



**Figura 48. Correlación entre la expresión de los genes seleccionados en el tejido peritoneal y la variación del perfil lipídico a los 12m de la CB.**

## 6. DISCUSIÓN



## 6. DISCUSIÓN

En los últimos años existe un interés creciente por el estudio fisiopatológico de la obesidad y las bases biomoleculares de la adiposopatía. Existe evidencia de que la hipertrofia del tejido adiposo en los sujetos con obesidad se asocia con la aparición de fibrosis tisular a nivel tanto subcutáneo como visceral<sup>(139,151)</sup>, y de que esta alteración fibrótica se relacionaría con el grado de resistencia insulínica<sup>(135,234)</sup>. Sin embargo, los mecanismos que determinan la aparición de estos cambios fibróticos y su impacto sobre la fisiopatología de la obesidad y de la resistencia insulínica aún no han sido aclarados<sup>(30)</sup>.

Si bien parece claro que la remodelación alterada de la MEC es uno de los factores determinantes en el desarrollo de la adiposopatía, aún no conocemos la posible contribución de los diferentes tipos de tejido adiposo a la disfunción metabólica del paciente con obesidad. De hecho, el TAS ha sido ampliamente estudiado<sup>(179,235-238)</sup>, pero no así los tejidos adiposos intra-abdominales o viscerales (epiploico y mesentérico), mucho menos accesibles para el estudio y cuya disfunción y contribución a la metabolopatía del paciente con obesidad son escasamente conocidos. En este sentido, el papel del mesenterio no ha sido previamente analizado en profundidad a nivel transcriptómico. Sin embargo, en los últimos años existe un interés creciente sobre el papel de las células mesoteliales (presentes en los TAVs pero no así en el TAS) como potenciales precursores adipocitarios<sup>(157)</sup> y como fuente adicional de citoquinas y factores relacionados con la inflamación de los TAVs<sup>(163)</sup>. Estas células mesoteliales podrían ser potenciales contribuidores en los procesos de desarrollo y remodelación del TAV, pudiendo ser uno de los factores determinantes en la disfunción adipocitaria visceral en el paciente con obesidad<sup>(156)</sup>.

Además de la evidencia limitada respecto a la contribución de los diferentes tejidos adiposos y el papel de las células mesoteliales en la disfunción adipocitaria y metabólica del paciente con obesidad, tampoco existen datos concluyentes en la literatura sobre la traducción clínica de estos cambios a nivel de los diferentes componentes del tejido adiposo. No se ha establecido claramente la relación entre la alteración de la MEC en estos tejidos y la resistencia insulínica, y se desconoce de qué forma esta regeneración alterada de la MEC podría relacionarse con la respuesta metabólica y ponderal tras la CB. En este sentido, el análisis de los perfiles de expresión de genes relacionados con la MEC en los diferentes tejidos adiposos de los pacientes con obesidad podría ayudar a una mejor comprensión de las bases biomoleculares y fisiopatológicas de la adiposopatía y del deterioro metabólico en estos pacientes. Asimismo, la relación entre los hallazgos de expresión y el estado de insulino-resistencia o la evolución tras la CB podrían contribuir a esclarecer el papel de la MEC en la metabolopatía del paciente con obesidad, permitiendo investigar posibles dianas terapéuticas e incluso, en un futuro, ayudar a establecer perfiles de pacientes respecto a su potencial respuesta a la CB.

El objetivo de este estudio fue comparar la expresión de genes relacionados con la MEC entre pacientes con obesidad (n = 30) y controles sin obesidad (n = 13) en cuatro tejidos que consideramos de interés: TAS, TAE, TAM y TP. Las muestras fueron obtenidas mediante biopsia quirúrgica en pacientes sometidos a cirugía programada, y posteriormente procesadas y

analizadas mediante microarrays. La expresión de los genes seleccionados con mayor expresión diferencial entre los grupos de estudio se validó mediante RT-qPCR. De forma secundaria, se analizó la relación entre el nivel de expresión de estos genes en los tejidos analizados y diferentes variables clínicas, con especial interés en el IMC y el estado de resistencia insulínica, así como con la evolución ponderal y metabólica al año de la CB en los pacientes con obesidad.

Hasta la fecha, no existe ningún otro estudio transcriptómico comparativo sobre la expresión de genes relacionados con la MEC entre pacientes con obesidad e individuos sin obesidad en los cuatro tejidos analizados. En este sentido, este estudio constituye el primer trabajo en analizar el posible papel diferencial en relación con la adiposopatía del epiplón y el tejido adiposo mesentérico, considerados en este trabajo como dos tipos de TAV diferenciados. Además, en este estudio hemos realizado el primer análisis transcriptómico a gran escala en los tejidos mesentérico y peritoneal en la obesidad, cuyas implicaciones en la disfunción adipocítica y metabólica de estos pacientes no han sido previamente analizadas.

En nuestro estudio, el análisis mediante microarrays detectó diferencias de expresión en los cuatro tejidos analizados entre los pacientes con obesidad y controles sin obesidad, objetivándose principalmente la sobreexpresión de genes relacionados con la MEC asociados a la obesidad. Las diferencias de expresión, validadas mediante RT-qPCR, fueron más significativas en los tejidos viscerales que en el TAS, donde se objetivaron diferencias discretas entre los dos grupos de estudio. Se objetivó una relación positiva entre la expresión de algunos de los genes analizados en los tejidos viscerales y el estado de resistencia insulínica de los sujetos estudiados, así como en menor medida con su IMC. En cambio, prácticamente no se identificaron variaciones significativas de expresión a nivel del TAS en relación con estas variables, evidenciando la escasa contribución de este tejido al estado de alteración inmuno-metabólica del paciente con obesidad (al menos en lo que a la regeneración de la MEC se refiere) en comparación con la de los TAVs. Respecto a la evolución tras la CB, nuestro estudio evidenció una mejoría más notable de la resistencia insulínica en los pacientes con mayor expresión del gen *THBS1* en el epiplón y de *ADAMTS 9* en el tejido mesentérico.

A nivel metodológico, para el análisis transcriptómico se diseñó un estudio genómico observacional de tipo caso-control<sup>(186)</sup>. Se trata de un diseño que requiere un análisis complejo, en el cual resulta imprescindible detectar y corregir potenciales errores sistemáticos en los resultados relacionados con factores técnicos y no relacionados con variaciones reales de la expresión génica<sup>(221)</sup>. Para minimizar estos sesgos potenciales, que constituyen uno de los principales problemas relacionados con este diseño<sup>(232,239)</sup>, en este estudio se adoptaron unos criterios estrictos respecto a la calidad de las muestras de ARN incluidas y se realizaron repetidos procesos de análisis de calidad de los datos mediante diferentes técnicas estadísticas en cada fase del proceso de análisis de expresión génica. En este caso, además, cabe destacar que, al trabajar con un tejido tan poco estudiado como lo es el peritoneo, se constató una notable dificultad en el procesamiento de este tipo de muestras tisulares, obteniendo concentraciones menores y valores de RIN más bajos que con el resto de muestras de ARN analizadas. No obstante, a pesar de las dificultades técnicas, consideramos que las medidas adoptadas nos permitieron trabajar con un diseño sólido y de una gran validez interna.

Cabe destacar que el estudio de expresión se realizó mediante el análisis de *pools* de muestras. Si bien es cierto que las ventajas e inconvenientes del diseño con *pools* para el análisis de expresión con microarrays sigue siendo objeto de debate en la comunidad científica (debido fundamentalmente a la pérdida de información individual), consideramos que la idoneidad y conveniencia de la utilización de *pools* debe ser analizada en relación con el objetivo y diseño general del estudio. En este sentido, si bien la agrupación de muestras no sería adecuada para diseños experimentales en los que se pretenda comparar la expresión entre individuos, esta resulta útil cuando el objetivo es la comparación de la expresión entre poblaciones o grupos distintos. Por tanto, en este caso la utilización de *pools* no solamente resulta adecuada en relación al objetivo del presente estudio, sino que, al disminuir el número de muestras analizadas (y por tanto el coste del análisis), nos permitió realizar un análisis más eficiente. Además, la información individual que se pierde con la agrupación de muestras fue posteriormente obtenida y analizada con la validación de los resultados mediante RT-qPCR.

En los últimos años, numerosas publicaciones en el ámbito de la biología molecular y la estadística han analizado las implicaciones de la agrupación de muestras en los estudios de expresión con microarrays, centrándose especialmente en dos cuestiones. En primer lugar, la definición de diseños equivalentes (es decir, la determinación del número de sujetos, muestras y arrays necesarios en un diseño con *pools* para obtener un poder estadístico determinado equivalente al de un diseño con muestras individuales) <sup>(240,241)</sup>. En segundo lugar, la cuestión sobre si la señal derivada de un *pool* de muestras es o no equivalente al promedio de las expresiones obtenidas en un diseño individual (*Biological Averaging Assumption, BAA*). A pesar de todos los factores matemáticos, estadísticos, técnicos y biológicos a considerar, en estudios recientes que han comparado los diseños con *pools* de muestras y los diseños con muestras individuales, los resultados de expresión para un determinado gen han resultado similares <sup>(215)</sup>.

Respecto a los pacientes incluidos en el estudio, cabe mencionar que, a pesar de que la *n* calculada de 38 pacientes por grupo se reclutó de forma satisfactoria e incluso se superó durante el periodo planificado en el grupo de pacientes con obesidad, sólo se consiguió reclutar a 33 pacientes en el grupo control. Entre las causas relacionadas con la dificultad para el reclutamiento de pacientes en este grupo se encuentran probablemente los estrictos criterios de inclusión y exclusión establecidos con el objetivo de minimizar posibles sesgos de selección. No obstante, resulta remarcable que la principal dificultad para el reclutamiento de sujetos en el grupo control fue determinada por el IMC de los pacientes intervenidos de colecistectomía programada. Una proporción no despreciable de estos pacientes no pudieron ser incluidos por presentar un IMC > 30 kg/m<sup>2</sup>. De hecho, únicamente uno de los pacientes reclutados en este grupo presentó un IMC inferior a 25 kg/m<sup>2</sup>, evidenciando una vez más las proporciones epidémicas del sobrepeso y la obesidad en nuestro medio <sup>(1,2)</sup>. Debido a la extrema dificultad para reclutar individuos con normopeso, nos vimos obligados a establecer como criterio de exclusión en el grupo control un IMC > 30 kg/m<sup>2</sup> (utilizado en otros estudios de diseño similar <sup>(242)</sup>) en lugar del IMC > 25 kg/m<sup>2</sup> que habíamos planteado inicialmente. Por otro lado, en relación a los pacientes con obesidad sometidos a CB, cabe destacar que, dado que los pacientes fueron intervenidos entre enero de 2017 y mayo de 2019, los criterios para la inclusión de pacientes en este grupo se establecieron de acuerdo con la indicación de CB en el momento de la realización del estudio. Según los criterios clásicos recogidos en las guías internacionales

utilizadas por la comunidad médica en el periodo de inclusión de pacientes <sup>(1,41,187)</sup>, se consideraron indicaciones de CB y criterio de inclusión en nuestro estudio un IMC > 40 kg/m<sup>2</sup> o bien un IMC > 35 kg/m<sup>2</sup> con al menos una de las comorbilidades establecidas en las mencionadas guías. Cabe destacar, no obstante, que durante la redacción de este trabajo fueron publicadas las nuevas recomendaciones respecto a las indicaciones de procedimientos en cirugía bariátrica y metabólica por parte de la *American Society for Metabolic and Bariatric Surgery* (ASMBS) y de la *International Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders* (IFSO) <sup>(57)</sup>, las cuales en 2022 establecieron un límite menor respecto al IMC para considerar la indicación de CB en los pacientes con obesidad (IMC > 35 kg/m<sup>2</sup> o bien un IMC > 30 kg/m<sup>2</sup> con comorbilidades asociadas).

No todos los pacientes reclutados pudieron ser finalmente incluidos en el análisis de expresión génica. De hecho, las pérdidas en ambos grupos fueron notablemente mayores a las esperadas. En el grupo de pacientes con obesidad, se excluyeron el 31.5% de los pacientes (14/44), principalmente por encontrarse en tratamiento con fármacos hipoglucemiantes. En el grupo de pacientes control, las pérdidas llegaron hasta el 60.6% (20/33) y se debieron fundamentalmente a problemas técnicos relacionados con el procesamiento del ARN que fueron detectados en los distintos controles de calidad realizados. Estos problemas podrían estar relacionados con múltiples factores, entre ellos la externalización de algunos de las fases del procesamiento de las muestras, la labilidad del ARN respecto a su degradación, o la dificultad técnica evidenciada en el procesamiento de muestras peritoneales (la causa de la cual desconocemos y que no se encuentra descrita en la literatura previa). Cabe mencionar, no obstante, que, priorizando la validez interna del diseño, se decidió incluir en el análisis de expresión sólo las muestras de los pacientes cuyas cuatro muestras de ARN tisular cumplieran los criterios de calidad establecidos. Hasta 12 pacientes con obesidad y 6 de los controles inicialmente reclutados se excluyeron del análisis de expresión diferencial tras un análisis más exhaustivo de los criterios de inclusión y exclusión, bien por estar en tratamiento con fármacos antidiabéticos o bien por tener un IMC > 30 kg/m<sup>2</sup> en el caso de 2 sujetos del grupo control. Consideramos que el error en la selección inicial de estos sujetos, si bien debería haberse evitado, responde probablemente a la dificultad asociada al desarrollo de un proyecto en el que han participado diferentes profesionales (investigadores y facultativos tanto médicos como quirúrgicos) de distintos centros, con unas condiciones asistenciales particulares que por desgracia no siempre favorecen la dedicación necesaria a la actividad extraasistencial. No obstante, a pesar del elevado porcentaje de pérdidas en ambos grupos y de los estrictos criterios aplicados para la selección de muestras de ARN para el análisis, la n final de nuestro estudio fue similar a la utilizada en estudios similares de análisis transcriptómico<sup>(235-238)</sup>.

En relación a los criterios de inclusión y exclusión, en este estudio se decidió excluir a los pacientes en tratamiento con fármacos hipoglucemiantes, independientemente de su diagnóstico clínico. Aunque este criterio no ha sido uniformemente adoptado en los estudios previos sobre la expresión génica o la presencia de fibrosis en los tejidos adiposos, en la misma línea que Roumans <sup>(238)</sup>, Guglielmi <sup>(243)</sup> o Darimont <sup>(163)</sup> decidimos excluir a estos pacientes debido a la evidencia creciente sobre las potenciales alteraciones en los procesos de regeneración y remodelación tisular a nivel de la MEC en diferentes tejidos en los pacientes tratados con fármacos como la metformina <sup>(244-246)</sup>, la sitagliptina <sup>(247)</sup> o la canagliflozina <sup>(248)</sup>.



El tratamiento con metformina, que actualmente constituye la primera línea terapéutica en los pacientes con diagnóstico de DM2 <sup>(249)</sup>, parece tener implicaciones a nivel biomolecular relacionadas con su acción activadora de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) <sup>(244-246,250)</sup>. Esta activación tendría efectos en la homeostasis de la MEC relacionados con la supresión de la respuesta fibrótica mediada por TGF- $\beta$ 1/Smad3. Estos mecanismos se han relacionado en estudios histopatológicos con una disminución del acúmulo intersticial de MEC y de los cambios fibróticos periadipocitarios en el TAE de pacientes con obesidad. Además, este efecto antifibrótico mediado por AMPK se ha relacionado con un aumento de la sensibilidad a la insulina <sup>(183)</sup>, mientras que la disminución de la actividad de AMPK en el TAV de pacientes con obesidad se ha relacionado con un mayor grado de insulino-resistencia <sup>(183,251)</sup>. Otros estudios con cultivos de células adipocíticas murinas <sup>(252)</sup> o en cultivos de células humanas del núcleo pulposo <sup>(253)</sup> sugieren que la metformina podría alterar la expresión de genes relacionados con la MEC como las integrinas, metalopeptidasas de la familia MMP o algunos tipos de colágeno. Por su parte, se ha sugerido que el efecto antifibrótico de la sitagliptina podría también estar relacionado con la respuesta mediada por TGF- $\beta$ /Smad3 <sup>(247)</sup>.

La no inclusión de los individuos con medicación hipoglucemiante supone prescindir en nuestro estudio de aquellos pacientes que representarían la alteración más extrema del metabolismo glicídico. No obstante, consideramos necesario, dado el objetivo del estudio, evitar el posible sesgo en la interpretación de los resultados de expresión génica producido por el uso de fármacos hipoglucemiantes que pudieran interferir con los procesos de remodelación y fibrosis en los diferentes tejidos estudiados. A pesar de que, de acuerdo con estas consideraciones, en nuestra población de estudio no se incluyeron pacientes con diagnóstico clínico de DM2, los sujetos analizados presentaron un espectro de afectación metabólica variable respecto a la resistencia insulínica, cuyo análisis consideramos interesante aún sin los posibles valores más extremos.

A nivel epidemiológico, los dos grupos de pacientes analizados fueron comparables respecto a la edad, el sexo y el ASA, mientras que, como era esperable, presentaron diferencias respecto al IMC y los parámetros clínico-analíticos relacionados con la resistencia insulínica. Curiosamente, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos respecto a la proporción de pacientes con HTA o DLP. De la misma forma, al analizar la evolución de los pacientes con obesidad tras la CB, si bien se observó la mejoría esperable respecto al IMC, la insulino-resistencia y el perfil lipídico, no se detectaron diferencias significativas en la proporción de pacientes hipertensos antes y después de la intervención. En ambos casos, no obstante, las diferencias observadas resultaron clínicamente relevantes aunque no se alcanzara la significación estadística, lo cual podría estar relacionado con la n limitada que con frecuencia encontramos en los estudios de expresión génica.

Respecto al análisis de expresión génica realizado en este estudio, cabe destacar que en la literatura existen múltiples artículos sobre la expresión de genes a nivel del tejido adiposo en la obesidad, la mayoría de los cuales se han centrado en el estudio del TAS (mucho más accesible que los tejidos viscerales). Varios trabajos han señalado previamente diferencias en los perfiles de expresión en el TAS entre pacientes con obesidad y sujetos con normopeso <sup>(235,254-256)</sup>.

Henegar <sup>(235)</sup> realizó un análisis transcriptómico en el TAS de 35 pacientes con obesidad y 10 controles con normopeso, evidenciando diferencias significativas entre ambos. En este mismo estudio, el análisis funcional reveló una marcada sobreexpresión de genes y categorías funcionales relacionados con los constituyentes de la MEC en los pacientes con obesidad como uno de los hallazgos principales del análisis.

En comparación con el TAS, los perfiles de expresión a nivel del TAV han sido poco estudiados. Cabe destacar, en primer lugar, que en la literatura es casi una constante la identificación del tejido adiposo *visceral* con el tejido adiposo *omental o epiploico*. De hecho, en la mayoría de artículos estos términos son utilizados indistintamente. Otros TAVs, como el “depósito epigástrico” situado en la parte proximal del estómago <sup>(257)</sup> o los apéndices epiploicos presentes en el colon <sup>(250)</sup> han suscitado menor interés, y su estudio casi anecdótico ha arrojado resultados poco remarcables. Sorprendentemente, este es el primer trabajo de análisis transcriptómico a gran escala donde se analiza el perfil de expresión génica en el tejido mesentérico y sus posibles implicaciones en la disfunción inmuno-metabólica asociada a la obesidad.

Baranova <sup>(242)</sup> comparó los perfiles de expresión génica en el tejido epiploico entre 50 pacientes con obesidad sometidos a CB y 9 pacientes con IMC < 30 kg/m<sup>2</sup>, observando una expresión diferencial en más de 1200 genes, el 85.5% de los cuales se encontraban sobreexpresados en el TAE de los pacientes del grupo con obesidad respecto al grupo control. Aunque el estudio de Baranova se limita al análisis del tejido epiploico, estos hallazgos están en línea con los resultados del presente estudio, en el que la mayor parte de diferencias observadas en los perfiles de expresión génica entre los grupos de corresponden también a una sobreexpresión de genes en los TAVs de los pacientes con obesidad (entre ellos el TAE). En el estudio de Baranova, las principales diferencias se detectaron en relación a la expresión de genes relacionados con el metabolismo glicídico y lipídico, transportadores de membrana y enzimas relacionadas con el ciclo celular. Cabe destacar, no obstante, que este estudio, realizado en 2005, incluyó pacientes diabéticos en tratamiento hipoglicémico, por lo que los potenciales hallazgos y la importancia relativa de las diferencias entre grupos respecto a la expresión de genes relacionados con la MEC pueden haber sido enmascarados por un potencial sesgo de selección. Más recientemente, Ronquillo <sup>(258)</sup> comparó los perfiles de expresión tanto a nivel del TAS como del TAV en pacientes con obesidad y sujetos con normopeso con un diseño similar al presente estudio, observando diferencias significativas en ambos tejidos y destacando una sobreexpresión de los genes *PPAP2C* (lípidico fosfato fosfohidrolasa 2), *CYP4A11* (citocromo P450 4A11) y *CYP17A1* (citocromo P450 17A1) en el TAV de los pacientes con obesidad. En este caso, cabe destacar que en el artículo no se especifica qué tipo de TAV es analizado, aunque de acuerdo con la literatura previa es probable que se trate de tejido omental, ni tampoco se especifican claramente los criterios de inclusión y exclusión establecidos, lo cual limita la adecuada interpretación de los resultados.

A diferencia de los estudios de Baranova y Ronquillo, en los que se analiza el mapa transcriptómico completo, tras partir de un análisis transcriptómico general en este estudio decidimos realizar un análisis más restrictivo. Dado que bajo el término “adiposopatía” se engloban múltiples alteraciones inmunometabólicas complejas, probablemente interrelacionadas y sólo parcialmente conocidas, decidimos centrar nuestro estudio en el

análisis de uno de los principales componentes de esta compleja alteración fisiopatológica: la remodelación de la MEC. En línea con el análisis llevado a cabo por Henegar<sup>(235)</sup>, en este estudio investigamos el mapa transcriptómico de la MEC, pero en esta ocasión incluyendo el análisis del epiplón y de otros dos tejidos cuya contribución a la adiposopatía no ha sido previamente explorada en profundidad: el mesenterio y el tejido peritoneal. En este sentido, si bien Henegar remarcó la importancia de la alteración de las vías y funciones relacionadas con los constituyentes de la MEC en el TAS del paciente con obesidad, nuestro estudio demuestra que las diferencias observadas en el TAS, si bien presentes, son mínimas en comparación con las objetivadas en los otros tres tejidos viscerales analizados.

En el presente análisis de expresión mediante microarrays, uno de los genes relacionados con la MEC que mostró una mayor expresión diferencial entre los grupos de estudio, siendo uno de los genes más sobre-expresados en el epiplón, el peritoneo y el mesenterio de los pacientes del grupo con obesidad, fue *ADAMTS 4*. La subfamilia ADAMTS está compuesta por 19 metalopeptidasas del espacio extracelular que utilizan zinc como cofactor y que participan en diferentes procesos de remodelación tisular. Esta subfamilia, junto a las MMP's y sus inhibidores endógenos (la subfamilia TIMPS), constituye una de las principales familias de proteasas implicadas en la regulación de la función y estabilidad de la MEC a nivel de diferentes tejidos. La peptidasa ADAMTS4 pertenece, al igual que ADAMTS1 -5, -8, -9, -15 y -20, al subgrupo de las agrecanasas o proteoglicanasas. A pesar de que su papel en humanos no ha sido completamente establecido, Voros describió la expresión de estas agrecanasas en el tejido adiposo murino<sup>(130,259)</sup>, habiéndose evidenciando en varios estudios una marcada sobreexpresión de *ADAMTS4*<sup>(259)</sup> y especialmente de *ADAMTS5* asociada a la adipogénesis y la expansión del TAV en ratones obesos<sup>(132,133,259)</sup>. De forma remarcable, Bauters demostró recientemente que los preadipocitos *knockdown* para *ADAMTS5* presentan in vitro una diferenciación significativamente disminuida respecto a las células que sí expresan este gen, y que los depósitos adiposos viscerales se encuentran disminuidos in vivo en los ratones obesos *ADAMTS5* (-/-). En línea con estos hallazgos, en este estudio se demuestra una sobreexpresión de algunas de estas agrecanasas (especialmente de *ADAMTS4*) en los TAVs del grupo de pacientes con obesidad. Si bien es necesario esclarecer las implicaciones de este hallazgo en humanos y su posible relación causal con el depósito anómalo de otros constituyentes de la MEC en los tejidos de pacientes con obesidad, estos hallazgos podrían sugerir un mecanismo fisiopatológico relacionado con la adipogénesis similar al descrito en el modelo murino<sup>(133)</sup>. Por otro lado, dado que en este estudio *ADAMTS4* resultó fuertemente sobre-expresado no solamente en los TAVs sino también en el peritoneo de los pacientes del grupo con obesidad, en línea con la tesis de Gupta este hallazgo podría apuntar a las células mesoteliales como potenciales precursores adipocíticos<sup>(156,157)</sup>. Además, como sugieren los hallazgos previos de Darimont<sup>(163)</sup>, este hallazgo situaría a las células mesoteliales como posible fuente adicional de péptidos reguladores de la MEC en los tejidos viscerales del paciente con obesidad. Por último, estudios recientes han descrito niveles elevados de ADAMTS4 en plasma y en los monocitos periféricos en pacientes con síndrome coronario agudo<sup>(260)</sup>, sugiriendo una posible relación entre la sobreexpresión de *ADAMTS4* y el riesgo cardiovascular que merece ser explorada con más profundidad en el subgrupo de pacientes con obesidad.

En el análisis transcripcional con microarrays y siguiendo a *ADAMTS4*, el segundo gen con mayor sobreexpresión en los tres tejidos viscerales analizados en los pacientes con obesidad fue *IL6*. Aunque la citoquina pro-inflamatoria *IL6* es secretada por los propios adipocitos <sup>(261)</sup>, los macrófagos que infiltran el TAV de los individuos con obesidad <sup>(262,263)</sup> han demostrado ser también responsables de gran parte de la producción de *IL6* en el tejido adiposo <sup>(263)</sup>. De hecho, si bien el tejido adiposo está formado por diversas poblaciones celulares, en el caso del TAV (tanto epiploico como mesentérico) destaca la presencia de un peritoneo visceral dispuesto en forma de capa que envuelve los adipocitos, que no encontramos en el TAS y que podría ser uno de los factores responsables de las diferencias funcionales entre el TAV y el TAS. Este tejido peritoneal está formado por células mesoteliales y un submesotelio formado por otros tipos celulares como fibroblastos, macrófagos, linfocitos y adipocitos. Estos tipos celulares, entre los que destacan las células mesoteliales, no forman una barrera “pasiva” como se creyó en el pasado, sino que secretan una gran cantidad de citoquinas <sup>(163)</sup> y factores quimiotácticos <sup>(264)</sup> que promueven entre otros la migración de neutrófilos y monocitos desde el espacio vascular a la serosa ante situaciones de inflamación, traumatismo o estrés tisular. En 2008, Darimont publicó un estudio en el que evaluó la contribución de las células mesoteliales presentes en el epiplón en la secreción de citoquinas inflamatorias en 11 mujeres con obesidad, evidenciando la sobreexpresión de hasta 16 citoquinas inflamatorias en las células mesoteliales en comparación con los adipocitos, y siendo *IL18* la que presentó una mayor expresión diferencial. En la misma línea que los hallazgos de Darimont, la evidencia en nuestro estudio de una mayor expresión de *IL6* en los tres tejidos viscerales estudiados sugiere que las células mesoteliales podrían ser una fuente de moléculas proinflamatorias en el epiplón y el mesenterio de los pacientes con obesidad. De hecho, Topley ha descrito previamente la secreción de *IL6* por parte de células peritoneales inducida por otros factores proinflamatorios <sup>(164)</sup>. La expresión de citoquinas inflamatorias en las células mesoteliales, que sin duda debe contribuir al estado de inflamación crónica que experimenta el paciente con obesidad, podría explicar algunas de las diferencias objetivadas en los estudios de expresión génica entre el TAS y el TAV en estos pacientes. Cabe mencionar que, aunque sí se demostró la contribución de las células mesoteliales en relación a la producción de otras citoquinas inflamatorias, a diferencia de nuestro estudio en el estudio de Darimont no se detectó una expresión aumentada de *IL6* en las células mesoteliales respecto a los adipocitos epiploicos. Sin embargo, sí se objetivó una expresión aumentada del transductor de señal de *IL6*, *IL6ST*, en las células mesoteliales en este tejido. Este hallazgo podrían estar en relación con diversos factores, entre los que se encuentran la compleja regulación de *IL6* o la existencia de otros tipos celulares como fuente de citoquinas pro-inflamatorias en los TAVs y el peritoneo, como los macrófagos, fibroblastos u otros componentes de la fracción vascular estromal <sup>(265–267)</sup>. Desgraciadamente, el diseño de nuestro estudio no nos permite identificar los subtipos celulares responsables de la expresión de un determinado gen en los tejidos estudiados, sino que estos tejidos han sido analizados como una única unidad fisiopatológica y funcional.

Es importante añadir que en la literatura existen resultados contradictorios respecto a la expresión de *IL6* en los diferentes tejidos adiposos. Mientras que en algunos estudios con cultivos celulares se describe una mayor producción de *IL6* en el tejido epiploico de los sujetos con obesidad respecto al TAS <sup>(265,266)</sup>, otros estudios han descrito una mayor expresión de esta citoquina en el TAS <sup>(268)</sup>. En este sentido, cabe destacar que, aunque *IL6* es una de las principales

citoquinas inflamatorias relacionada con el estado inflamatorio crónico y la regulación de las alteraciones metabólicas que presenta el paciente con obesidad en múltiples tejidos, los mecanismos fisiopatológicos de la señalización mediada por IL6 son altamente complejos y no del todo conocidos. De hecho, hoy sabemos que los efectos metabólicos derivados de la activación de las vías de señalización mediadas por IL6 son duales respecto a la acción insulínica, que se ve potenciada o inhibida en función de una regulación diferencial en los distintos tejidos <sup>(168,269)</sup>. Además, estas vías de señalización requieren la participación de distintos tipos celulares y de la integración de mecanismos proinflamatorios, antiinflamatorios y no inflamatorios <sup>(270)</sup>. Algunos estudios apuntan a una respuesta diferencial en función del tipo celular secretor de IL6. De esta forma, podría existir un tipo de respuesta inhibitoria de la acción de los macrófagos del tejido adiposo mediada por un mecanismo de señalización canónico ante la secreción de IL6 por parte de las células mieloides, mientras que la secreción de esta citoquina por parte de los adipocitos promovería la respuesta contraria, con acumulación de macrófagos en el tejido adiposo mediada por una vía de señalización no canónica, a su vez promovida por la sobreexpresión de determinadas metalopeptidasas <sup>(271)</sup>. Estas observaciones traducen la complejidad de la regulación inmunometabólica mediada por IL6, cuya fisiología en los diferentes tejidos del paciente con obesidad debe ser aún aclarada.

En el presente estudio, *IL6* no fue uno de los genes seleccionados como más representativos de las vías más enriquecidas en el análisis funcional entre los dos grupos de estudio. A pesar de ser uno de los genes relacionados con la MEC más sobreexpresados en los tejidos viscerales analizados, se consideró que *IL6*, aún siendo un gen regulador de la MEC según la clasificación de *Matriosome*, no es específico de la MEC, sino que interviene en múltiples procesos inflamatorios, inmunológicos y metabólicos. Por este motivo, se decidió no incluirla en el análisis de validación de la expresión mediante qPCR, y se optó por seleccionar un grupo de genes cuya función se consideró más específicamente relacionada con la MEC, como es el caso de *ADAMTS4*, *HAS1* y *S100A8*. Estos tres genes validaron su sobreexpresión en los tres tejidos viscerales analizados mediante RT-qPCR. *HAS1* es el gen que codifica una de las tres isoenzimas responsables de la síntesis celular de ácido hialurónico, uno de los principales componentes estructurales de la MEC en múltiples tejidos formando macromoléculas mediante la unión a proteoglicanos. En los mamíferos, estas tres isoenzimas se encuentran en la membrana plasmática de las células, sintetizando ácido hialurónico directamente alrededor de la superficie celular. La capa de hialuronodano pericelular producida por *HAS1* (enzima con una distribución intracelular mucho mayor en comparación con el resto de isoenzimas) es habitualmente fina en comparación con la producida por *HAS2* y *HAS3*, y los niveles de ARNm y la actividad enzimática de *HAS1* son en la mayoría de tejidos también mucho menores, por lo que la escasa o nula actividad basal de *HAS1* despertó inicialmente poco interés. Sin embargo, la expresión y actividad de esta enzima, mediada por su receptor de membrana CD44, está fuertemente inducida por distintos factores inflamatorios como IL1, TNF $\alpha$  o TGF $\beta$  así como por la disponibilidad de sustratos glicídicos para la síntesis de ácido hialurónico <sup>(272,273)</sup>. Por tanto, de acuerdo con los datos previamente publicados sobre la actividad de *HAS1*, podemos postular que la sobreexpresión de *HAS1* en los tejidos viscerales de los pacientes con obesidad objetivada en nuestro estudio probablemente traduce el estado de inflamación crónica y la situación de estrés glicémico en estos tejidos. Del mismo modo, se ha descrito la producción y liberación de *S100A8* (mayoritariamente en forma de dímero *S100A8/A9* o calprotectina) por parte de los

neutrófilos en respuesta a procesos inflamatorios o de estrés <sup>(274)</sup>. Este heterodímero tiene un papel fundamental en la regulación de la respuesta inflamatoria tisular estimulando el reclutamiento de células inflamatorias e induciendo la secreción de citoquinas, por lo que su sobreexpresión en los tejidos viscerales de los pacientes con obesidad objetivada en el presente estudio sería una muestra más del estado inflamatorio a este nivel.

El análisis mediante RT-qPCR también confirmó la sobreexpresión en el tejido epiploico de los sujetos con obesidad de proteoglicanos y glicoproteínas de la MEC relacionados con la adhesión y migración celular (*VCAN* y *THBS1*), además de reguladores de la MEC como *ADAMTS1*.

En el mesenterio, por su parte, se validó la sobreexpresión de *SRGN* en el grupo de pacientes con obesidad, cuya función está relacionada con los procesos de apoptosis y regeneración tisular y con la regulación de determinadas proteasas.

En general, los hallazgos de nuestro análisis con microarrays en los tejidos epiploico y mesentérico de los pacientes con obesidad (y su posterior validación mediante RT-qPCR) indican que los TAVs en estos sujetos tienen un perfil transcriptómico respecto a la MEC parecido entre ellos y alejado del observado en el TAS. Cabe decir que los estudios sobre la expresión génica a nivel mesentérico en humanos con obesidad han sido hasta hoy prácticamente anecdóticos. Si bien el presente estudio constituye el primer análisis transcriptómico a gran escala en el tejido mesentérico, algunos datos aislados de estudios previos han apuntado similitudes entre epiplón y mesenterio con respecto de la expresión de algunos genes como *UCP1* (termogenina), *PTGDS* (prostaglandina-H2 D-isomerasa), *IL6*, y osteopontina entre otros, mientras que *MCP1* (ligando 2 de quimiocina), *IL1β*, adrenomedulina, *PPARγ* (receptores activados por proliferadores peroxisómicos) y *PAI-1* (inhibidor del activador del plasminógeno-1) se encontrarían menos expresados en el mesenterio <sup>(275)</sup>. También se han descrito niveles más bajos de ARNm del receptor insulínico en el tejido mesentérico respecto al epiploico <sup>(275)</sup>, si bien la traducción fisiopatológica de estos hallazgo no han sido aún establecidos. Yan, por su parte, describió la sobreexpresión de CD36 en el tejido adiposo mesentérico de pacientes diabéticos <sup>(111)</sup>, la cual podría estar relacionada con el papel de CD36 en el transporte de AGL o bien con la activación de vías de señalización intracelular mediadas por la unión a componentes de la MEC como *THBS1* <sup>(112)</sup>.

A pesar de las escasas similitudes y diferencias previamente descritas entre epiplón y mesenterio y como también sucede en nuestro estudio, se desconoce si las diferencias observadas en los niveles de ARNm entre estos tejidos se deben a la expresión en células adipocitarias o en otros tipos celulares. Del mismo modo, se desconocen las diferencias fisiológicas e inmunometabólicas entre ambos TAVs y sus implicaciones en el paciente con obesidad. A pesar de estos interrogantes, nuestros hallazgos respecto a la expresión mesentérica de genes relacionados con la MEC sugieren un patrón de regeneración de la MEC diferenciado en el paciente con obesidad y muy similar al observado en el epiplón de estos pacientes. No obstante y de acuerdo con nuestros hallazgos, si bien los genes sobrerregulados en el mesenterio y el epiplón de los pacientes con obesidad se distribuyen de forma similar en categorías funcionales, nuestros resultados ponen de manifiesto diferencias especialmente respecto al tipo de genes infraregulados en uno y otro tejido en estos pacientes (mayor



infraregulación de glicoproteínas en el epiplón y de proteínas reguladoras de la MEC y moléculas afines en el mesenterio) que deberán ser explorados con mayor profundidad.

Más allá de los hallazgos respecto a los TAVs, este es el primer trabajo de análisis transcripcional a gran escala en el tejido peritoneal del paciente con obesidad. Los escasos estudios previos sobre expresión génica en el tejido peritoneal se han centrado en el estudio de condiciones patológicas como las adherencias postquirúrgicas <sup>(276,277)</sup>, la endometriosis <sup>(278)</sup> o la diálisis peritoneal <sup>(279,280)</sup>. Los resultados obtenidos en este estudio respecto al perfil de expresión peritoneal de genes relacionados con la MEC en la obesidad mostraron importantes diferencias con el peritoneo de los pacientes en el grupo control, evidenciando un patrón de sobrerregulación de genes del matrisoma con ciertas similitudes respecto al de los TAVs. Respecto a los genes infraregulados, aunque se evidenció un mayor número de coincidencias respecto a los genes con infraregulación entre el peritoneo y el epiplón (6/25 genes) que entre el peritoneo y el mesenterio (4/25 genes) en los pacientes con obesidad, la distribución por categorías funcionales de los genes infraregulados en el peritoneo de los sujetos con obesidad mostró mayores similitudes con el patrón de expresión objetivado en el mesenterio. Estos hallazgos son por el momento de difícil interpretación dado el escaso número de genes del matrisoma infraregulados en los tejidos de los pacientes con obesidad y la imposibilidad de diferenciar la expresión génica entre subtipos celulares en este estudio. A pesar de ello, los resultados apoyarían un papel activo del peritoneo, previamente sugerido en la literatura <sup>(163,164,264)</sup>, respecto a la expresión de moléculas relacionadas con la regeneración tisular y la inflamación (ya sea a nivel de las células mesenquimales o en relación a otros tipos celulares). Además, nuestros hallazgos ponen de manifiesto importantes similitudes entre el peritoneo y los tejidos adiposos intra-abdominales respecto al perfil transcripcional del matrisoma, lo cual podría indicar un papel activo en los mecanismos de regulación de la MEC por parte de algunos de los tipos celulares presentes en el peritoneo (que también encontramos en los TAVs), o la presencia de mecanismos comunes respecto a la remodelación de la MEC en estos tejidos en la obesidad. Lamentablemente, en el caso del tejido peritoneal, los datos de expresión obtenidos mediante RT-qPCR's no pudieron ser normalizados debido a la imposibilidad de encontrar genes de referencia adecuados para el análisis de un tejido tan escasamente estudiado. En consecuencia, los datos de expresión obtenidos en este tejido deben considerarse y analizarse en términos de aproximación.

Respecto al TAS, el tejido adiposo sin duda más accesible y estudiado en la obesidad <sup>(235,238,255,256)</sup>, observamos unas diferencias más que discretas entre grupos en comparación con las observadas a nivel de los tejidos viscerales. Estos datos ponen de manifiesto una mayor importancia de los tejidos viscerales respecto al TAS en la alteración inmunometabólica del paciente con obesidad. Si bien esta mayor contribución de los tejidos viscerales ha sido ampliamente señalada en la literatura en relación a la resistencia insulínica y el síndrome metabólico, nuestro estudio demuestra también una mayor importancia fisiopatológica de los tejidos intraabdominales respecto a uno de los principales componentes de la adiposopatía como lo es la regulación alterada de la MEC.

En los últimos años ha habido un creciente interés por el estudio de la remodelación alterada de la MEC en la obesidad y su implicación en la alteración inmunometabólica que sufren estos

pacientes. La MEC es una estructura altamente dinámica, sujeta a múltiples procesos de remodelación en respuesta a diferentes estímulos de carácter lesivo o de reparación. En los tejidos adiposos, la MEC sufre un proceso de remodelación constante, permitiendo que los adipocitos, sus precursores y otros tipos celulares se adapten y cambien a nivel tanto morfológico como funcional en respuesta a diferentes estímulos. Evidencia reciente (obtenida mayoritariamente en estudios con modelo murino) sugiere que la obesidad inducida por dieta se relaciona con un depósito aumentado de proteínas de la MEC y con cambios en vías de señalización mediadas por integrinas y otros reguladores de la MEC, que a su vez se relacionan con la resistencia a la insulina <sup>(138,281)</sup>. Lin et al <sup>(30)</sup>, en la línea de lo que ya habían apuntado previamente Sun et al. <sup>(147)</sup> y Williams et al. <sup>(282)</sup>, postula que el depósito de componentes de la MEC en los tejidos metabólicamente activos (músculo esquelético, tejidos adiposos e hígado) tiene efectos deletéreos en la sensibilidad a la insulina, y que la presencia de estos componentes y sus proteínas reguladoras en los tejidos adiposos se asocia a la insulinoresistencia en el paciente con obesidad. En este sentido, las integrinas y otros receptores relacionados con la MEC expresados en los tejidos adiposos (como CD44) se han relacionado con la regulación de la sensibilidad a la insulina <sup>(30,82,282)</sup>.

Numerosos estudios han demostrado que el depósito aumentado de componentes de la MEC y la presencia y activación de las vías de señalización mediadas por receptores relacionados con la MEC en el tejido adiposo se asocian con la inflamación tisular y la insulinoresistencia en los pacientes con obesidad <sup>(178)</sup>. Sin embargo, los mecanismos concretos mediante los cuales la MEC se relaciona con la resistencia insulínica son desconocidos. Se ha postulado que la inflamación del tejido adiposo y la consecuente activación de vías de señalización “profibróticas” podría alterar la sensibilidad a la insulina en determinados tejidos <sup>(147,178,282)</sup>. A pesar de que se trata de vías de regulación complejas y no del todo conocidas, se ha sugerido que los cambios en la composición de la MEC, con un aumento de la concentración de sus componentes y con una mayor proporción de proteínas fibrilares respecto a las de menor densidad <sup>(282)</sup> así como la consiguiente alteración de la señalización mediada por integrinas, contribuirían a la sensibilidad alterada a la insulina en los tejidos del paciente con obesidad. Otras hipótesis incluyen la barrera mecánica que el aumento de los componentes de la MEC supone para la hipertrofia adipocitaria y para el propio transporte de glucosa e insulina en los tejidos adiposos <sup>(30)</sup>.

A pesar de que los mecanismos fisiopatológicos no son del todo conocidos, en los últimos años existe evidencia creciente en la literatura sobre la relación entre fibrosis y alteración de la sensibilidad a la insulina en los diferentes tejidos adiposos. En general, sabemos que la expansión del tejido adiposo en los individuos con obesidad se asocia a la aparición de fibrosis en el TAS y también en el TAV <sup>(139,151)</sup>. Además, se ha descrito una mayor fibrosis tisular en el TAS de los pacientes resistentes a la insulina <sup>(234)</sup>. No obstante, a pesar de que esta relación parece consistente en el modelo murino <sup>(135,283)</sup>, los hallazgos en humanos y en especial en relación al TAV han sido en ocasiones contradictorios y resultan aún difíciles de interpretar. Guglielmi <sup>(243)</sup>, con unos criterios de inclusión y exclusión superponibles a los del presente estudio, combinó el análisis de expresión de genes relacionados con la MEC en el TAE con el estudio histológico del tejido para evaluar la relación entre el grado de fibrosis y la resistencia insulínica en los pacientes con obesidad. Sus hallazgos mostraron por primera vez un mayor grado de fibrosis epiploica en el grupo de pacientes con mayor resistencia insulínica, si bien no se detectaron diferencias en la



expresión de colágenos entre ambos grupos. Si bien la discrepancia entre los hallazgos histológicos y la expresión de colágenos ya había sido descrita <sup>(284)</sup>, Guglielmi postula que la alteración de la sensibilidad a la insulina podría estar relacionada con la disfunción adipocitaria derivada de los cambios fibróticos observados en el TAV. La aparición de la fibrosis estaría relacionado con complejas interacciones entre la MEC y los receptores de la superficie celular del adipocito que implicarían la activación de vías de señalización mediadas por  $\beta$ 1-integrinas, las cuales darían lugar a la pyroptosis adipocitaria. Estos procesos alterarían la sensibilidad a insulina por alteración de las caveolas en que se localizan los receptores de insulina. Además, Guglielmi sugiere la presencia de mecanismos de estabilización e inhibición de la degradación de los componentes de la MEC que podrían explicar el depósito excesivo de los mismos, más allá de sus niveles de expresión. Contrariamente, Muir <sup>(285)</sup> describió una disminución del grado de fibrosis y de la expresión de genes relacionados con este proceso en los tejidos adiposos (especialmente el visceral) de sujetos con obesidad y DM2 en comparación con sujetos no diabéticos. Si bien no se puede descartar el sesgo potencial asociado a los fármacos hipoglicemiantes en este tipo de estudios en relación a la MEC, Muir hipotetiza sobre la limitación a la hipertrofia adipocitaria condicionada por la fibrosis, que podría ser un mecanismo adaptativo “extremo” del tejido adiposo en el paciente con obesidad favoreciendo la hiperplasia y asociando una mejoría metabólica. Estos hallazgos han sugerido una relación entre fibrosis e insulino-resistencia que podría ser dependiente del IMC. Chabot <sup>(286)</sup>, por su parte, investigó la relación entre la fibrosis del TAS y el TAV y el grado de insulinoresistencia de pacientes con obesidad. Mientras que en el TAS los pacientes diabéticos presentaron un mayor grado de fibrosis, que a su vez mostró correlación con el HOMA-IR y el índice de Matsuda, en el TAV no se detectaron diferencias en el grado de fibrosis entre pacientes con obesidad diabéticos y no diabéticos, y no se objetivó correlación entre la fibrosis del TAV y los distintos índices de resistencia insulínica.

En línea con los hallazgos de Guglielmi, en nuestro estudio de asociación se observó una relación positiva entre los niveles de expresión de algunos de los genes analizados relacionados con la MEC y la resistencia insulínica de los sujetos estudiados. Estos hallazgos fueron notorios en los tejidos viscerales (especialmente a nivel de epiplón y mesenterio), mientras que, contrariamente a los datos aportados por Chabot, resultaron poco significativos en el TAS. Nuestros resultados, por tanto, en línea con lo sugerido por Chan en su estudio de los compartimentos adipocíticos <sup>(287)</sup>, indicarían una mayor importancia de los tejidos viscerales en comparación con el TAS en relación con la homeostasis glicídica.

En relación a nuestros hallazgos, cabe destacar la asociación detectada entre la expresión epiploica y mesentérica de *HAS1*, *ADAMTS4*, *THBS1* y *S100A8* y la presencia de obesidad e insulinoresistencia en los sujetos estudiados. Debemos señalar la limitación a la hora de establecer una relación causal entre la expresión génica en estos tejidos y la presencia de estas dos variables, de por sí relacionadas. No obstante, la sobreexpresión de estos mismos genes del matrisoma tanto en el epiplón como en el mesenterio, descrita por primera vez en este estudio, sugieren la presencia de mecanismos fisiopatológicos comunes o al menos similares en ambos tejidos en relación con la inflamación, el estrés glucídico y la consecuente remodelación alterada de la MEC. Los hallazgos del presente estudio, a diferencia de la extensa literatura en la que se ha utilizado el tejido epiploico como sinónimo de tejido adiposo visceral o intraperitoneal,

ponen de manifiesto la necesidad de considerar el mesenterio como un TAV diferenciado y metabólicamente activo. De hecho, en 2016, Coffey definió por primera vez el mesenterio como un órgano en sí mismo <sup>(288)</sup>, remarcando las peculiaridades anatómicas, histológicas y funcionales del mismo y sus potenciales implicaciones en estados patológicos. En este trabajo, que supuso un cambio de paradigma respecto a la consideración del tejido mesentérico y que contribuyó al desarrollo del marco conceptual en el que se ha desarrollado nuestro trabajo, se remarca la importancia del mesenterio como órgano metabólicamente activo, implicado en sistemas de señalización y respuesta tanto local como sistémica a múltiples estímulos, además de constituir un potencial depósito de *stem cells* mesoteliales con capacidad de transformación y regeneración en distintas situaciones que están siendo actualmente objeto de múltiples investigaciones. Si bien el estudio del mesenterio ha suscitado un gran interés en relación a la enfermedad inflamatoria intestinal <sup>(288–290)</sup>, la posible relevancia clínica de los procesos metabólicos en el mesenterio probablemente va mucho más allá de los tejidos abdominales <sup>(291)</sup>. Además de ser el principal constituyente del TAV <sup>(111)</sup>, el mesenterio es uno de los principales órganos productores de proteína C reactiva, la desregulación de la cual se ha relacionado con la patobiología de la obesidad, la aterosclerosis, la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico <sup>(288)</sup>. A pesar de que el mesenterio sigue siendo un órgano relativamente desconocido y poco estudiado en comparación con el tejido epiploico, existe evidencia reciente que relacionaría la disminución del tejido adiposo mesentérico con una mejoría de la resistencia insulínica y con la pérdida ponderal en babuinos con obesidad <sup>(292)</sup>. De hecho, actualmente se está desarrollando un ensayo clínico para evaluar los efectos de la extracción de tejido adiposo mesentérico en humanos con obesidad y diabetes (identificador de [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03953963): NCT03953963). Además, estudios en ratas obesas con resistencia a la insulina han mostrado una mejoría en el perfil lipídico tras la aplicación mesentérica de ultrasonidos y fotobiomodulación con láser en este tejido <sup>(293)</sup>.

Nuestros hallazgos en relación al tejido mesentérico sugieren una posible implicación fisiopatológica en la obesidad y la homeostasis glicídica que, si bien podría tener similitudes con los hallazgos descritos a nivel epiploico, presenta ciertas características diferenciales. Por ejemplo, en el presente estudio se ha descrito la asociación entre la expresión mesentérica (y no epiploica) de metalopeptidasas como *ADAMTS1* y *ADAMTS9* y la resistencia insulínica en los sujetos estudiados, lo cual podría sugerir un patrón diferencial respecto a la remodelación de la MEC en el tejido mesentérico cuyas características e implicaciones fisiopatológicas deberán estudiarse con mayor profundidad en el futuro.

Respecto a los hallazgos a nivel peritoneal, paralelamente a los hallazgos en el resto de tejidos viscerales estudiados, resulta interesante la asociación observada entre la expresión peritoneal de *ADAMTS4* y *THBS1* y la presencia de insulinorresistencia en los sujetos estudiados. *ADAMTS4* fue uno de los genes cuya expresión peritoneal se asoció también a la presencia de obesidad. Como se ha mencionado anteriormente, los resultados de nuestro estudio muestran un patrón de sobreexpresión de genes del matriosoma con ciertas similitudes respecto al de los TAVs, en los que ya se había descrito previamente, como confirma nuestro estudio, una sobreexpresión de *THBS1* en individuos con obesidad y resistencia a la insulina <sup>(30)</sup>. Nuestros hallazgos podrían sugerir un papel activo por parte de algunos de los tipos celulares presentes en el peritoneo (también presentes en los TAVs) en los mecanismos de regulación de la MEC, o bien la presencia

de mecanismos comunes en relación a la remodelación de la MEC en los tejidos viscerales del paciente con obesidad.

Las implicaciones de las alteraciones en la expresión de genes del matrisoma en los diferentes tejidos viscerales de los pacientes con obesidad y su relación con la homeostasis glicídica, señalada por algunos autores en los últimos años y apoyada por los resultados del presente estudio, son en gran medida aún desconocidas y merecerán sin duda una investigación más exhaustiva en el futuro.

En el presente trabajo, se realizó un análisis de correlación entre los niveles de expresión de los genes con expresión diferencial entre los grupos y la evolución ponderal y metabólica al año de la CB en los pacientes con obesidad. En la literatura existen numerosos estudios que analizan el transcriptoma a nivel del TAS en relación con la pérdida o la reganancia ponderal, la mayoría en base a intervenciones dietéticas<sup>(236–238,294)</sup>. Roumans et al. investigó las variaciones genéticas en genes relacionados con la MEC en los participantes del *European DiOGenes study*<sup>(295)</sup>, analizando 2903 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) correspondientes a 124 genes. Comparando el grupo de pacientes que mantuvo la pérdida ponderal tras una intervención dietética con el grupo de pacientes con reganancia ponderal, identificó 6 SNP's significativamente asociados a la reganancia ponderal (en los genes *POSTN* (periostina), *LAMB1* (laminina subunidad  $\beta$ 1), *COL23A1* (cadena de colágeno  $\alpha$ -1 XXIII) y *FBLN5* (fibulina 5) en hombres, y *FN1* (fibronectina 1) en mujeres), concluyendo que variantes en los genes relacionados con la MEC se asocian a reganancia ponderal tras una pérdida de peso de una forma diferencial en hombres y mujeres. En un ensayo clínico randomizado posterior, Roumans analizó de nuevo la expresión de genes relacionados con la MEC en el TAS durante la pérdida ponderal en 61 pacientes con obesidad considerados "sanos" tras diferentes intervenciones dietéticas y se correlacionaron los cambios en la expresión de 277 genes relacionados con la MEC con el porcentaje de peso reganado. El estudio identificó 26 genes que se correlacionaron con la reganancia ponderal, relacionados especialmente con la actividad de integrinas leucocitarias, la remodelación de la MEC y en menor medida con la sensibilidad a la insulina. En relación a la CB, Lassen<sup>(179)</sup> describió un "FATscore" histológico en pacientes con obesidad que relacionó de forma significativa un mayor grado de fibrosis en el TAS en el momento de la intervención con una mala respuesta ponderal al año de la CB. En otro estudio reciente, se ha relacionado la expresión de genes relacionados con la MEC en el TAS con la pérdida ponderal tras la CB<sup>(180)</sup>. Henegar<sup>(235)</sup>, por su parte, si bien no correlacionó sus hallazgos con la pérdida ponderal ni el estado metabólico de los sujetos analizados, describió un interesante cambio funcional en el mapa transcriptómico del TAS a los 3 meses de la CB, evidenciando una disminución de la expresión de genes relacionados con el espacio extracelular y la membrana celular tras la CB que podría traducir una reversión del estado "profibrótico" del tejido adiposo de los pacientes con obesidad. Canello<sup>(255)</sup> también trabajó con biopsias de TAS tras la CB, en este caso a los 12 meses de la intervención. Su estudio histológico evidenció una persistencia de la fibrosis al año de la intervención, a la vez que el estudio transcripcional evidenció similitudes entre el grupo de pacientes postoperados a los 12 meses de la CB y el grupo de pacientes con obesidad e IMC > 40. Estos hallazgos, contrariamente a lo apuntado por Henegar, podrían indicar una mayor persistencia en el tiempo tanto de los cambios fibróticos como del perfil transcripcional en los tejidos del paciente con obesidad, más allá de la pérdida ponderal.

Si bien los estudios de Roumans y de Osorio-Conles sugieren una relación entre la expresión de genes relacionados con la MEC en el TAS y la pérdida ponderal en los pacientes con obesidad, los mecanismos asociados a la pérdida o reganancia ponderal tras la CB son en gran medida aún desconocidos. Cabe destacar, en este sentido, la ausencia de estudios sobre los cambios funcionales o de expresión génica en tejidos viscerales debido a la dificultad técnica en el acceso y especialmente a los evidentes problemas éticos que plantearía la obtención de las mismas. Por tanto, no existen en la literatura datos sobre los cambios morfológicos o funcionales en el TAV tras la CB. Debido a las mencionadas limitaciones, en nuestro estudio no se planteó la obtención de muestras tras la intervención inicial y decidimos realizar únicamente un estudio exploratorio de correlación con las variables clínicas de interés. Decidimos utilizar el %TWL como medida para analizar la pérdida ponderal tras la CB siguiendo la recomendación más generalizada<sup>(193)</sup> y, dado que la máxima pérdida ponderal tras la CB se alcanza entre el primer y el segundo año tras la intervención<sup>(194,195,197,296)</sup>, decidimos evaluar dicho parámetro a los 12 meses de la cirugía. Si bien en nuestro estudio no se detectaron resultados concluyentes en relación a la expresión de los genes analizados y la pérdida ponderal tras la CB, los resultados observados respecto a la evolución metabólica de los pacientes intervenidos, mucho más notorios en los tejidos viscerales analizados, contrastan con los resultados de Roumans y Osorio-Conles centrados en la expresión de estos genes a nivel del TAS.

En relación a la resistencia insulínica, como sucede en los estudios sobre la evolución ponderal en pacientes sometidos a CB, tampoco existen datos en la literatura que relacionen los cambios clínicos tras la CB con hallazgos a nivel del TAV. Como se ha comentado anteriormente, Chabot<sup>(286)</sup> describió un mayor porcentaje de fibrosis en el TAS de los individuos con obesidad con DM2 respecto a los no diabéticos, si bien no detectó cambios en la fibrosis a nivel de este tejido a los 6 meses de la CB ni pudo establecer ninguna correlación entre la fibrosis y el grado de resistencia insulínica después de la CB. Katsogiannos<sup>(297)</sup> reportó un aumento de los niveles de expresión de genes relacionados con el metabolismo glucídico en el TAS a los 6 meses de la CB (entre ellos el transportador de glucosa tipo IV *SLC2A4*), si bien las implicaciones clínicas de este hallazgo no han podido aún ser determinadas. En nuestro estudio de correlación con la expresión génica basal, dado que la mejoría metabólica respecto al perfil de insulinoresistencia tras la CB se ha evidenciado ampliamente tanto en el postoperatorio temprano como en el seguimiento a medio y largo plazo<sup>(298-301)</sup>, decidimos analizar la variación relativa del HOMA-IR a los 12 meses de la intervención.

Consideramos, en relación a nuestro análisis de la relación entre la expresión génica y determinadas variables clínicas, que el hecho de haber incluido pacientes sometidos a diferentes técnicas quirúrgicas (8 LRYGB, 6 GV y 1 SADI's) puede haber generado diferencias en la evolución ponderal y metabólica de los pacientes incluidos que dificulten la interpretación de los resultados. Sin embargo, dada la limitada n disponible, se desestimó realizar un análisis estratificado en función de la técnica quirúrgica. No obstante, aún considerando nuestro análisis de correlación meramente exploratorio, nos parece remarcable el hecho de que, incluso considerando el posible sesgo en relación a la técnica quirúrgica, las únicas correlaciones observadas respecto a la evolución metabólica tras la CB se han encontrado en el epiplón (mayor expresión epiplóica de *THBS1* correlacionada con mayor disminución del HOMA-IR) y el

mesenterio (mayor expresión mesentérica de *ADAMTS9* correlacionada con mayor disminución del HOMA-IR). En relación a estos resultados, cabe señalar que la expresión de *THBS1* en el TAE se asoció a la presencia de insulinoresistencia y se correlacionó positivamente con el valor de HOMA-IR en el momento de la CB, del mismo modo que la expresión mesentérica de *ADAMTS9* se asoció a la presencia de insulinoresistencia en el momento de la intervención. Por tanto, la mayor disminución del HOMA-IR tras la CB en los pacientes con mayor expresión de *THBS1* en el TAE y de *ADAMTS9* en el TAM no resultaría contradictoria con los resultados previos del análisis de asociación y correlación con las características clínicas basales, sino que podría reflejar un estado de alteración metabólica más significativo en los pacientes con mayor expresión tisular de estos genes, que posteriormente presentarían una mayor mejoría relativa del HOMA-IR tras la CB. Por otro lado, es importante considerar la relación existente entre obesidad e insulinoresistencia a la hora de interpretar los resultados, ya que estas dos variables podrían actuar como potenciales variables confusoras de forma que la primera podría influir en el análisis de la asociación entre la expresión génica y la segunda, y viceversa. No obstante, dado que el diseño del estudio no permite establecer una relación causal concluyente entre la expresión génica y las variables analizadas, este análisis debe considerarse de carácter exploratorio. Además, a pesar de las dificultades de interpretación, en línea con los resultados generales de nuestro estudio consideramos que estos datos señalan la importancia del TAV en contraposición al TAS en relación a la obesidad y a las alteraciones metabólicas asociadas, hallazgos que sin duda podrán ayudar a generar nuevas hipótesis en el futuro.

Nuestro estudio presenta ciertas limitaciones. En primer lugar, se trata de un estudio genómico de tipo observacional, y que por tanto, como se ha comentado anteriormente, proporciona una evidencia limitada respecto a la asociación causal entre exposición y observación en comparación con otros diseños de tipo experimental. En este sentido, no obstante, consideramos que el diseño elegido es adecuado en relación a los objetivos del estudio y que la metodología del mismo nos ha permitido controlar en gran medida los sesgos potenciales.

Por otro lado, debemos destacar que los estudios transcriptómicos con microarrays, si bien nos permiten explorar la expresión de una gran cantidad de genes de forma simultánea, no nos proporcionan evidencia sobre la traducción de un determinado ARNm a proteína funcional<sup>(302)</sup>. De hecho, la expresión de un determinado gen no siempre se correlaciona con la concentración de proteína funcional en un determinado tejido, ya que dicha concentración depende de otros muchos factores como la eficiencia traslacional del ARNm, los procesos de regulación y la velocidad de degradación de la proteína entre otros. Por otro lado, los estudios transcriptómicos no pueden evaluar ciertos cambios post-traslacionales como la fosforilación, que pueden condicionar importantes cambios en las funciones celulares no detectables en estudios de expresión. Si bien la forma más adecuada de analizar las características moleculares y funcionales de un determinado tejido sería mediante técnicas de caracterización del proteoma, los estudios proteómicos en tejidos biológicos resultan técnicamente complejos y requieren de técnicas y equipamientos económicamente costosos. De acuerdo con los recursos disponibles y siendo conscientes de las limitaciones tanto temporales como económicas de nuestro proyecto, consideramos que un análisis transcriptómico proporciona una gran cantidad de información y resulta adecuado para comparar perfiles de expresión y detectar patrones que puedan dar lugar a nuevos estudios sobre procesos específicos.

Cabe considerar, en relación al diseño elegido y como se ha comentado con anterioridad, que en nuestro estudio no es posible diferenciar el papel funcional de diferentes grupos celulares, sino que analizamos el tejido como un “todo”. No podemos, por tanto, analizar el origen celular de los genes diferencialmente expresados, para lo cual se hubiese requerido separar los adipocitos de la fracción vascular estromal y las células mesoteliales en los tejidos adiposo, realizar cultivos celulares o utilizar técnicas inmunohistoquímicas que hubiesen supuesto un aumento considerable de recursos en relación a nuestro estudio. No obstante, teniendo en cuenta los resultados previos de Darimont <sup>(163)</sup>, nuestros datos con respecto a la expresión de genes como *IL6* permiten hipotetizar sobre el posible papel de las células mesoteliales como fuente de citoquinas en los tejidos adiposos viscerales. Dado que nuestro estudio arroja en este sentido únicamente datos indirectos, esta hipótesis deberá ser investigada en el futuro.

En el presente estudio no se realizó una comparación intra-grupo de los cuatro tejidos estudiados. De acuerdo con el objetivo del estudio, si bien el análisis del tejido mesentérico y peritoneal sin duda hubiese tenido cierto interés, las diferencias entre el tejido adiposo subcutáneo y epiploico en los pacientes con obesidad ya han sido previamente reportadas <sup>(303,304)</sup>. Por tanto, de nuevo teniendo en cuenta la complejidad del análisis y la limitación de recursos, no se consideró pertinente extender el análisis más allá de los objetivos marcados.

A pesar de las limitaciones previamente mencionadas, el presente estudio constituye el primer análisis transcripcional comparativo entre pacientes con obesidad e individuos sin obesidad en los cuatro tejidos analizados. Se trata en este caso del primer trabajo en analizar el epiplón y el tejido adiposo mesentérico como dos tipos diferentes de TAV, cuyas implicaciones diferenciales en relación a la adiposopatía del paciente con obesidad no han sido previamente estudiadas.

Además, en este estudio hemos realizado el primer análisis de expresión génica a gran escala en los tejidos mesentérico y peritoneal en el paciente con obesidad, tejidos que no han sido previamente estudiados a nivel transcripcional y cuyas implicaciones en la disfunción adipocítica y metabólica del paciente con obesidad no han sido analizadas con anterioridad.

En general, los resultados de nuestro trabajo nos han permitido evaluar el perfil transcriptómico de los cuatro tejidos analizados en el paciente con obesidad respecto a los genes relacionados con la MEC y explorar posibles relaciones entre la sobreexpresión de determinados genes de interés, el estado metabólico y la posible evolución de los pacientes sometidos a CB. Nuestros resultados ponen de manifiesto la necesidad de considerar el tejido mesentérico como un TAV diferenciado del tejido epiploico, y la posible contribución de las células mesoteliales en estos tejidos en relación a la alteración inmunometabólica del paciente con obesidad. No obstante, la remodelación alterada de la MEC como uno de los componentes de la adiposopatía en la obesidad comprende multitud de procesos, sistemas de regulación y vías de señalización altamente complejas que requerirán de investigaciones futuras para una mejor comprensión fisiopatológica de estos procesos.

Profundizar en el conocimiento de las bases moleculares de la adiposopatía no sólo nos ayudará a comprender las bases de la cirugía metabólica, sino que podría ayudarnos a definir perfiles de

pacientes con una potencial respuesta a la CB e incluso definir potenciales dianas terapéuticas futuras.





## 7. CONCLUSIONES



## 7. CONCLUSIONES

1. El análisis de expresión diferencial mediante microarrays objetivó una sobreexpresión de genes relacionados con la MEC en el grupo de pacientes con obesidad respecto al grupo control en los cuatro tejidos estudiados. El TAS fue el tejido que presentó un menor número de GDEs entre grupos, y, entre los tres tejidos viscerales, el mesenterio fue el que presentó mayor número de GDEs.
2. En el análisis de enriquecimiento funcional, el TAS presentó un menor número de categorías funcionales enriquecidas relacionadas con la MEC en comparación con el resto de tejidos. Se identificaron los 11 genes más representativos de los procesos enriquecidos en el conjunto de los cuatro tejidos estudiados (*VCAN*, *PRG4*, *SRGN*, *S100A8*, *CRISPLD2*, *THBS1*, *ADAMTS1*, *ADAMTS4*, *ADAMTS9*, *MMP19* y *HAS1*).
3. El análisis mediante RT-qPCR validó los resultados del análisis de expresión diferencial entre grupos en 10 de los 11 genes más representativos seleccionados en el análisis de enriquecimiento funcional. Los datos respecto a la expresión de *MMP19* no fueron valorables debido a la falta de especificidad de los cebadores utilizados. Asimismo, en el peritoneo la validación debe considerarse aproximada por la falta de genes de referencia.
4. En un subgrupo representativo de pacientes y controles, la presencia de obesidad e insulinoresistencia en el momento de la intervención se asoció con la sobreexpresión en TAM y TAE de cuatro de los genes seleccionados en el análisis de enriquecimiento funcional (*HAS1*, *ADAMTS4*, *THBS1* y *S100A8*). Además, el HOMA-IR se correlacionó con la expresión de *HAS1*, *THBS1*, *VCAN* y *S100A8* en TAE y *ADAMTS1*, *ADAMTS4* y *THBS1* en TP. No se identificaron relaciones consistentes entre la expresión de los genes analizados y la presencia de HTA y DLP. La expresión en TAS tampoco mostró relaciones destacables.
5. En un subgrupo representativo de pacientes, la disminución del HOMA-IR a los 12 meses de la CB se correlacionó con la sobreexpresión de *ADAMTS9* en TAM y *THBS1* en TAE. Los cambios en el perfil lipídico a los 12 meses de la CB también se correlacionaron con la expresión de algunos de los genes seleccionados (*ADAMTS4* y *PRG4* en TAS, *VCAN* en TAM y *CRISPL2*, *ADAMTS4* y *VCAN* en TP). No se identificaron correlaciones entre la expresión de los genes analizados y la evolución ponderal.



## 8. LÍNEAS DE FUTURO



## 8. LÍNEAS DE FUTURO:

Los resultados del presente estudio apuntan a un perfil transcriptómico diferencial respecto a los genes relacionados con la MEC en los cuatro tejidos analizados de los pacientes con obesidad respecto a los individuos sin obesidad, especialmente a nivel de los tejidos viscerales. En un futuro, el aislamiento y análisis de las diferentes poblaciones celulares presentes en los tejidos estudiados (población adipocitaria, fracción vascular estromal y, en el caso de los tejidos viscerales, también de las células mesoteliales) podría permitir analizar el origen celular de los genes diferencialmente expresados en los pacientes con obesidad objetivados en el presente trabajo. En este sentido, el estudio mediante cultivos celulares y el uso de técnicas inmunohistoquímicas podrían ayudar a esclarecer la contribución de cada uno de estos componentes celulares a la remodelación alterada de la MEC en los diferentes tejidos en los pacientes con obesidad. Este tipo de estudios sin duda permitirán aportar nuevos datos sobre el escasamente conocido papel de las células mesoteliales en los TAVs y seguir avanzando en el estudio funcional de los diferentes tipos de TAVs y sus implicaciones diferenciales en el conjunto de alteraciones inmunometabólicas de los pacientes con obesidad.

Los genes de interés identificados en este trabajo podrían también dar lugar a futuros estudios de caracterización del proteoma en los tejidos analizados. Las técnicas de caracterización del proteoma podrían poner de manifiesto cambios en las funciones celulares o tisulares de los pacientes con obesidad relacionados con la presencia y concentración de una determinada proteína funcional en los tejidos analizados. Los hallazgos a nivel proteómico podrían permitirnos ampliar la información arrojada por el presente estudio transcripcional respecto a los 11 genes evaluados y generar nuevas líneas de trabajo en el estudio funcional de estos tejidos y su relación con la adiposopatía. En este sentido, resulta de especial interés la posibilidad de identificar posibles dianas terapéuticas relacionadas con la MEC que pudieran dar lugar a futuras investigaciones farmacológicas en relación con la resistencia insulínica y las alteraciones inmunometabólicas descritas en los pacientes con obesidad.

Por otro lado, uno de los principales hallazgos del presente trabajo fue la evidencia de una mayor disminución del HOMA-IR a en los pacientes intervenidos mediante CB con una mayor expresión mesentérica basal de *ADAMTS9* y en los que presentaban una mayor expresión epiploica basal de *THBS1*. Del mismo modo, los cambios en el perfil lipídico a los 12 meses de la CB también se correlacionaron con la expresión basal de algunos de los genes analizados en este trabajo en los diferentes tejidos estudiados. Estos hallazgos podrían ayudar en un futuro a definir perfiles de pacientes con una potencial respuesta metabólica más o menos favorable tras la CB. Estos futuros “perfiles moleculares” podrían llegar a condicionar la indicación de una determinada técnica quirúrgica en base a la respuesta esperada en un paciente concreto, avanzando así hacia una medicina personalizada o “de precisión” en el campo de la obesidad y sus enfermedades asociadas.

Por último, cabe decir que actualmente no es posible evaluar los datos de expresión post-CB de los genes analizados en este trabajo debido a las evidentes limitaciones éticas relacionadas con la obtención de muestras tisulares de forma invasiva. No obstante, una posible línea de

investigación futura podría centrarse en la identificación de biomarcadores de expresión génica en otro tipo de muestras biológicas en los pacientes obesos. La identificación de estos biomarcadores, enmarcados en el concepto de “biopsia líquida” que ya se utiliza en determinados tipos de cáncer, podría aportar datos sobre los cambios de expresión de genes relacionados con la MEC en determinados tipos celulares circulantes, exosomas u otros analitos que podrían permitirnos evaluar los cambios funcionales en ciertos tipos celulares después de la CB. Además de ayudarnos a comprender mejor la relación entre la MEC, la obesidad y sus enfermedades asociadas y el papel de los distintos tipos de tejidos adiposos, el conocimiento de estos cambios funcionales y su relación con variables clínicas de interés como la resistencia insulínica sin duda podría facilitar el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas relacionadas con la MEC y el desarrollo de futuros tratamientos dirigidos.



## 9. BIBLIOGRAFÍA



## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Luca MD, Angrisani L, Himpens J, Busetto L, Scopinaro N, Weiner R, et al. Indications for Surgery for Obesity and Weight-Related Diseases: Position Statements from the International Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders (IFSO). *Obes Surg*. 2016;26(8):1659-96.
2. Lecube A, Monereo S, Rubio MÁ, Martínez-de-Icaya P, Martí A, Salvador J, et al. Prevention, diagnosis, and treatment of obesity. 2016 position statement of the Spanish Society for the Study of Obesity. *Endocrinol Diabetes Nutr Engl Ed*. 2017;64(April):15-22.
3. Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of Obesity and Trends in the Distribution of Body Mass Index Among US Adults, 1999-2010. *JAMA*. febrero de 2012;307(5):491.
4. Hales CM, Fryar CD, Carroll MD, Freedman DS, Ogden CL. Trends in Obesity and Severe Obesity Prevalence in US Youth and Adults by Sex and Age, 2007-2008 to 2015-2016. *JAMA*. abril de 2018;319(16):1723-5.
5. Gonzalez AB de, Hartge P, Cerhan JR, Flint AJ, Hannan L, MacInnis RJ, et al. Body-Mass Index and Mortality among 1.46 Million White Adults. *N Engl J Med*. diciembre de 2010;363(23):2211-9.
6. Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI. Association of All-Cause Mortality With Overweight and Obesity Using Standard Body Mass Index Categories. *JAMA*. enero de 2013;309(1):71.
7. OECD. The Heavy Burden of Obesity: The Economics of Prevention [Internet]. OECD; 2019 [citado 9 de abril de 2023]. (OECD Health Policy Studies). Disponible en: [https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/the-heavy-burden-of-obesity\\_67450d67-en](https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/the-heavy-burden-of-obesity_67450d67-en)
8. Taylor VH, Forhan M, Vigod SN, McIntyre RS, Morrison KM. The impact of obesity on quality of life. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2013;27(2):139-46.
9. Peeters A, Barendregt JJ, Willekens F, Mackenbach JP, Mamun AA, Bonneux L. Obesity in Adulthood and Its Consequences for Life Expectancy: A Life-Table Analysis. *Ann Intern Med*. enero de 2003;138(1):24.
10. Abdullah A, Peeters A, Courten M de, Stoelwinder J. The magnitude of association between overweight and obesity and the risk of diabetes: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010;89(3):309-19.
11. Bays HE, Chapman RH, Grandy S. The relationship of body mass index to diabetes mellitus, hypertension and dyslipidaemia: Comparison of data from two national surveys. *Int J Clin Pract*. 2007;61(5):737-47.
12. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34(3):274-85.
13. Onyekwere CA, Ogbera AO, Samaila AA, Balogun BO, Abdulkareem FB. Nonalcoholic fatty liver disease: Synopsis of current developments. *Niger J Clin Pract*. 2015;18(6):703-12.
14. Neuschwander-Tetri BA. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med*. diciembre de 2017;15(1):45.
15. Samson SL, Garber AJ. Metabolic Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*. marzo de 2014;43(1):1-23.
16. Gao WG, Qiao Q, Tuomilehto J, Balkau B, Ruotolo G, Calor G, et al. Does the constellation of risk factors with and without abdominal adiposity associate with different cardiovascular mortality risk? *Int J Obes*. 2008;32(5):757-62.
17. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international

- diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National heart, lung, and blood institute; American heart association; World heart federation; International. *Circulation*. 2009;120(16):1640-5.
18. Bays H. Adiposopathy, «sick fat,» Ockham's razor, and resolution of the obesity paradox. *Curr Atheroscler Rep*. 2014;16(5).
  19. Bays HE. «Sick Fat,» Metabolic Disease, and Atherosclerosis. *Am J Med*. 2009;122(1 SUPPL.):S26-37.
  20. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw*. marzo de 2006;17(1):4-12.
  21. Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes*. 2003;27:S53-5.
  22. Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L'Italien GJ, Pio JR, et al. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation*. 2004;110(10):1245-50.
  23. Goday A, Barneto I, García-Almeida JM, Blasco A, Lecube A, Grávalos C, et al. Obesity as a risk factor in cancer: A national consensus of the Spanish Society for the Study of Obesity and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. octubre de 2015;17(10):763-71.
  24. Pataky Z, Bobbioni-Harsch E, Golay A. Open questions about metabolically normal obesity. *Int J Obes*. 2010;34(S2):S18-23.
  25. Vliet-Ostaptchouk JV van, Nuotio ML, Slagter SN, Doiron D, Fischer K, Foco L, et al. The prevalence of metabolic syndrome and metabolically healthy obesity in Europe: A collaborative analysis of ten large cohort studies. *BMC Endocr Disord*. 2014;14.
  26. Ferrer R, Pardiña E, Rossell J, Oller L, Viñas A, Baena-Fustegueras JA, et al. Morbidly "Healthy" Obese Are Not Metabolically Healthy but Less Metabolically Imbalanced Than Those with Type 2 Diabetes or Dyslipidemia. *Obes Surg*. 2015;25(8):1380-91.
  27. Ray I, Mahata SK, De RK. Obesity: An Immunometabolic Perspective. *Front Endocrinol*. 2016;7(DEC):1-9.
  28. Sun K, Halberg N, Khan M, Magalang UJ, Scherer PE. Selective inhibition of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  ameliorates adipose tissue dysfunction. *Mol Cell Biol*. marzo de 2013;33(5):904-17.
  29. Trayhurn P. Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity. *Physiol Rev*. 2013;93(1):1-21.
  30. Lin D, Chun TH, Kang L. Adipose extracellular matrix remodelling in obesity and insulin resistance. *Biochem Pharmacol*. noviembre de 2016;119:8-16.
  31. Lee YS, Wollam J, Olefsky JM. An Integrated View of Immunometabolism. *Cell*. 2018;172(1-2):22-40.
  32. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- (alpha ): Direct. *Science*. 1993;259(5091):87-92.
  33. Lavin DP, White MF, Brazil DP. IRS proteins and diabetic complications. *Diabetologia*. 2016;59(11):2280-91.
  34. Czech MP, Tencerova M, Pedersen DJ, Aouadi M. Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia*. mayo de 2013;56(5):949-64.
  35. Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest*. enero de 2016;126(1):12-22.
  36. Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation*. 2004;110(12):1564-71.
  37. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*. marzo de 2010;316(2):129-39.
  38. Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, Ard JD, Comuzzie AG, Donato KA, et al. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report

- of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *Circulation*. junio de 2014;129(25 Suppl 2):S102-38.
39. Gudzone KA, Doshi RS, Mehta AK, Chaudhry ZW, Jacobs DK, Vakil RM, et al. Efficacy of commercial weight-loss programs: an updated systematic review. *Ann Intern Med*. abril de 2015;162(7):501-12.
  40. KREMEN AJ, LINNER JH, NELSON CH. An experimental evaluation of the nutritional importance of proximal and distal small intestine. *Ann Surg*. septiembre de 1954;140(3):439-48.
  41. Fried M, Yumuk V, Oppert JM, Scopinaro N, Torres A, Weiner R, et al. Interdisciplinary European guidelines on metabolic and bariatric surgery. *Obes Surg*. 2014;24(1):42-55.
  42. Angrisani L, Santonicola A, Iovino P, Ramos A, Shikora S, Kow L. Bariatric Surgery Survey 2018: Similarities and Disparities Among the 5 IFSO Chapters. *Obes Surg*. mayo de 2021;31(5):1937-48.
  43. Mason EE, Ito C. Gastric bypass in obesity. *Surg Clin North Am*. diciembre de 1967;47(6):1345-51.
  44. Griffen WO, Young VL, Stevenson CC. A prospective comparison of gastric and jejunoileal bypass procedures for morbid obesity. *Ann Surg*. octubre de 1977;186(4):500-9.
  45. Wittgrove AC, Clark GW, Tremblay LJ. Laparoscopic Gastric Bypass, Roux-en-Y: Preliminary Report of Five Cases. *Obes Surg*. noviembre de 1994;4(4):353-7.
  46. Faria GR. A brief history of bariatric surgery. *Porto Biomed J*. 2017;2(3):90-2.
  47. Adams TD, Davidson LE, Litwin SE, Kim J, Kolotkin RL, Nanjee MN, et al. Weight and Metabolic Outcomes 12 Years after Gastric Bypass. *N Engl J Med*. 21 de septiembre de 2017;377(12):1143-55.
  48. Berbiglia L, Zografakis JG, Dan AG. Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass: Surgical Technique and Perioperative Care. *Surg Clin North Am*. 2016;96(4):773-94.
  49. 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):861-4.
  50. Benaiges D, Más-Lorenzo A, Goday A, Ramon JM, Chillarón JJ, Pedro-Botet J, et al. Laparoscopic sleeve gastrectomy: More than a restrictive bariatric surgery procedure? *World J Gastroenterol*. noviembre de 2015;21(41):11804-14.
  51. Hayes K, Eid G. Laparoscopic Sleeve Gastrectomy: Surgical Technique and Perioperative Care. *Surg Clin North Am*. 2016;96(4):763-71.
  52. Angrisani L, Santonicola A, Iovino P, Vitiello A, Zundel N, Buchwald H, et al. Bariatric Surgery and Endoluminal Procedures: IFSO Worldwide Survey 2014. *Obes Surg*. 2017;27(9):1-11.
  53. Sánchez-Pernaute A, Rubio MÁ, Conde M, Arrue E, Pérez-Aguirre E, Torres A. Single-anastomosis duodenoileal bypass as a second step after sleeve gastrectomy. *Surg Obes Relat Dis*. 2015;11(2):351-5.
  54. Admella V, Osorio J, Sorribas M, Sobrino L, Casajoana A, Pujol-Gebellí J. Cruce duodenal de una anastomosis (SADI-S) en uno o dos tiempos: análisis comparativo de 232 casos de un solo centro. *Cir Esp*. agosto de 2021;99(7):514-20.
  55. Sánchez-Pernaute A, Rubio MÁ, Aguirre EP, Barabash A, Cabrerizo L, Torres A. Single-anastomosis duodenoileal bypass with sleeve gastrectomy: Metabolic improvement and weight loss in first 100 patients. *Surg Obes Relat Dis*. 2013;9(5):731-5.
  56. Verhoeff K, Mocanu V, Zalasky A, Dang J, Kung JY, Switzer NJ, et al. Evaluation of Metabolic Outcomes Following SADI-S: a Systematic Review and Meta-analysis. *Obes Surg*. abril de 2022;32(4):1049-63.
  57. Eisenberg D, Shikora SA, Aarts E, Aminian A, Angrisani L, Cohen RV, et al. 2022 American Society of Metabolic and Bariatric Surgery (ASMBS) and International Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders (IFSO) Indications for Metabolic and Bariatric Surgery. *Obes Surg*. enero de 2023;33(1):3-14.

58. Kang JH, Le QA. Effectiveness of bariatric surgical procedures: A systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)*. noviembre de 2017;96(46):e8632.
59. Garg H, Priyadarshini P, Aggarwal S, Agarwal S, Chaudhary R. Comparative study of outcomes following laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy in morbidly obese patients: A case control study. *World J Gastrointest Endosc*. abril de 2017;9(4):162-70.
60. Peterli R, Wolnerhanssen BK, Peters T, Vetter D, Kroll D, Borbely Y, et al. Effect of laparoscopic sleeve gastrectomy vs laparoscopic roux-en-y gastric bypass on weight loss in patients with morbid obesity the sm-boss randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2018;319(3):255-65.
61. Rosenthal RJ. International sleeve gastrectomy expert panel consensus statement: Best practice guidelines based on experience of >12,000 cases. *Surg Obes Relat Dis*. 2012;8(1):8-19.
62. Gagner M, Hutchinson C, Rosenthal R. Fifth International Consensus Conference: Current status of sleeve gastrectomy. *Surg Obes Relat Dis*. 2016;12(4):750-6.
63. Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ, et al. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med*. marzo de 2009;122(3):248-256.e5.
64. Colquitt JL, Pickett K, Loveman E, Frampton GK. Surgery for weight loss in adults. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. agosto de 2014;2014(10). Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD003641.pub4>
65. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. octubre de 2004;292(14):1724-37.
66. Ricci C, Gaeta M, Rausa E, Macchitella Y, Bonavina L. Early impact of bariatric surgery on type II diabetes, hypertension, and hyperlipidemia: a systematic review, meta-analysis and meta-regression on 6,587 patients. *Obes Surg*. abril de 2014;24(4):522-8.
67. Chang SH, Stoll CRT, Song J, Varela E. Bariatric surgery: an updated systematic review and meta-analysis, 2003-2012. *JAMA Surg*. 2014;149(3):275-87.
68. Schauer PR, Bhatt DL, Kirwan JP, Wolski K, Brethauer SA, Navaneethan SD, et al. Bariatric surgery versus intensive medical therapy for diabetes—3-year outcomes. *N Engl J Med*. mayo de 2014;370(21):2002-13.
69. Schauer PR, Bhatt DL, Kirwan JP, Wolski K, Aminian A, Brethauer SA, et al. Bariatric surgery versus intensive medical therapy for diabetes - 5-year outcomes. *N Engl J Med*. 2017;376(7):641-51.
70. Ribaric G, Buchwald JN, McGlennon TW. Diabetes and weight in comparative studies of bariatric surgery vs conventional medical therapy: A systematic review and meta-analysis. *Obes Surg*. 2014;24(3):437-55.
71. Schauer PR, Kashyap SR, Wolski K, Brethauer SA, Kirwan JP, Pothier CE, et al. Bariatric surgery versus intensive medical therapy in obese patients with diabetes. *N Engl J Med*. abril de 2012;366(17):1567-76.
72. Sjöström L. Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial - a prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *J Intern Med*. 2013;273(3):219-34.
73. Neovius M, Narbro K, Keating C, Peltonen M, Sjöholm K, Agren G, et al. Health care use during 20 years following bariatric surgery. *JAMA*. septiembre de 2012;308(11):1132-41.
74. Lee WJ, Chong K, Ser KH, Lee YC, Chen SC, Chen JC, et al. Gastric bypass vs sleeve gastrectomy for type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *Arch Surg Chic Ill 1960*. febrero de 2011;146(2):143-8.
75. Lee WJ, Wang W, Lee YC, Huang MT, Ser KH, Chen JC. Effect of laparoscopic mini-gastric bypass for type 2 diabetes mellitus: comparison of BMI >35 and <35 kg/m<sup>2</sup>. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract*. mayo de 2008;12(5):945-52.

76. Cohen RV, Pinheiro JC, Schiavon CA, Salles JE, Wajchenberg BL, Cummings DE. Effects of gastric bypass surgery in patients with type 2 diabetes and only mild obesity. *Diabetes Care*. julio de 2012;35(7):1420-8.
77. Choi J, Digiorgi M, Milone L, Schrope B, Olivera-Rivera L, Daud A, et al. Outcomes of laparoscopic adjustable gastric banding in patients with low body mass index. *Surg Obes Relat Dis Off J Am Soc Bariatr Surg*. 2010;6(4):367-71.
78. Scopinaro N, Adami GF, Papadia FS, Camerini G, Carlini F, Fried M, et al. Effects of biliopancreatic diversion on type 2 diabetes in patients with BMI 25 to 35. *Ann Surg*. abril de 2011;253(4):699-703.
79. Shoar S, Saber AA. Long-term and midterm outcomes of laparoscopic sleeve gastrectomy versus Roux-en-Y gastric bypass: a systematic review and meta-analysis of comparative studies. *Surg Obes Relat Dis*. 2017;13(2):170-80.
80. Balamurugan G, Leo SJ, Sivagnanam ST, Balaji Prasad S, Ravindra C, Rengan V, et al. Comparison of Efficacy and Safety Between Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB) vs One Anastomosis Gastric Bypass (OAGB) vs Single Anastomosis Duodeno-ileal Bypass with Sleeve Gastrectomy (SADI-S): a Systematic Review of Bariatric and Metabolic Surgery. *Obes Surg*. julio de 2023;33(7):2194-209.
81. Aminian A, Brethauer SA, Andalib A, Nowacki AS, Jimenez A, Corcelles R, et al. Individualized Metabolic Surgery Score: Procedure Selection Based on Diabetes Severity. *Ann Surg*. 2017;266(4):650-7.
82. Ruiz-Ojeda FJ, Méndez-Gutiérrez A, Aguilera CM, Plaza-Díaz J. Extracellular matrix remodeling of adipose tissue in obesity and metabolic diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(19).
83. Nakajima I, Yamaguchi T, Ozutsumi K, Aso H. Adipose tissue extracellular matrix: newly organized by adipocytes during differentiation. *Differ Res Biol Divers*. agosto de 1998;63(4):193-200.
84. Liu X, Xu Q, Liu W, Yao G, Zhao Y, Xu F, et al. Enhanced migration of murine fibroblast-like 3T3-L1 preadipocytes on type I collagen-coated dish is reversed by silibinin treatment. *Mol Cell Biochem*. abril de 2018;441(1-2):35-62.
85. Buechler C, Krautbauer S, Eisinger K. Adipose tissue fibrosis. *World J Diabetes*. mayo de 2015;6(4):548-53.
86. Nomiya T, Perez-Tilve D, Ogawa D, Gizard F, Zhao Y, Heywood EB, et al. Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *J Clin Invest*. octubre de 2007;117(10):2877-88.
87. Kiefer FW, Zeyda M, Todoric J, Huber J, Geyeregger R, Weichhart T, et al. Osteopontin expression in human and murine obesity: extensive local up-regulation in adipose tissue but minimal systemic alterations. *Endocrinology*. marzo de 2008;149(3):1350-7.
88. Chapman J, Miles PD, Ofrecio JM, Neels JG, Yu JG, Resnik JL, et al. Osteopontin is required for the early onset of high fat diet-induced insulin resistance in mice. *PLoS One*. noviembre de 2010;5(11):e13959.
89. Zhang Q, Wang C, Tang Y, Zhu Q, Li Y, Chen H, et al. High glucose upregulates osteopontin expression by FoxO1 activation in macrophages. *J Endocrinol*. agosto de 2019;242(2):51-64.
90. Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology*. diciembre de 2003;13(12):105R-115R.
91. Han CY, Subramanian S, Chan CK, Omer M, Chiba T, Wight TN, et al. Adipocyte-derived serum amyloid A3 and hyaluronan play a role in monocyte recruitment and adhesion. *Diabetes*. septiembre de 2007;56(9):2260-73.
92. Ji E, Jung MY, Park JH, Kim S, Seo CR, Park KW, et al. Inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells and suppression of abdominal fat accumulation in high-fat diet-feeding C57BL/6J mice after downregulation of hyaluronic acid. *Int J Obes*. agosto de 2014;38(8):1035-43.



93. Inoue M, Jiang Y, Barnes RH, Tokunaga M, Martinez-Santibañez G, Geletka L, et al. Thrombospondin 1 mediates high-fat diet-induced muscle fibrosis and insulin resistance in male mice. *Endocrinology*. diciembre de 2013;154(12):4548-59.
94. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. septiembre de 2002;110(6):673-87.
95. Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*. febrero de 1987;48(4):549-54.
96. Sun Z, Costell M, Fässler R. Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces. *Nat Cell Biol*. enero de 2019;21(1):25-31.
97. Calderwood DA, Campbell ID, Critchley DR. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. agosto de 2013;14(8):503-17.
98. Kang L, Mokshagundam S, Reuter B, Lark DS, Sneddon CC, Hennayake C, et al. Integrin-Linked Kinase in Muscle Is Necessary for the Development of Insulin Resistance in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes*. junio de 2016;65(6):1590-600.
99. Hatem-Vaquero M, Griera M, García-Jerez A, Luengo A, Álvarez J, Rubio JA, et al. Peripheral insulin resistance in ILK-depleted mice by reduction of GLUT4 expression. *J Endocrinol*. agosto de 2017;234(2):115-28.
100. Meakin PJ, Morrison VL, Sneddon CC, Savinko T, Uotila L, Jalicy SM, et al. Mice Lacking beta2-Integrin Function Remain Glucose Tolerant in Spite of Insulin Resistance, Neutrophil Infiltration and Inflammation. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138872.
101. Kim J, Bilder D, Neufeld TP. Mechanical stress regulates insulin sensitivity through integrin-dependent control of insulin receptor localization. *Genes Dev*. enero de 2018;32(2):156-64.
102. Zöller M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer*. abril de 2011;11(4):254-67.
103. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*. enero de 2003;4(1):33-45.
104. Kodama K, Horikoshi M, Toda K, Yamada S, Hara K, Irie J, et al. Expression-based genome-wide association study links the receptor CD44 in adipose tissue with type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. mayo de 2012;109(18):7049-54.
105. Liu LF, Kodama K, Wei K, Tolentino LL, Choi O, Engleman EG, et al. The receptor CD44 is associated with systemic insulin resistance and proinflammatory macrophages in human adipose tissue. *Diabetologia*. julio de 2015;58(7):1579-86.
106. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Moreno-Navarrete JM, Sandoval J, Hervas D, Gomez A, et al. Genome-wide DNA methylation pattern in visceral adipose tissue differentiates insulin-resistant from insulin-sensitive obese subjects. *Transl Res J Lab Clin Med*. diciembre de 2016;178:13-24.e5.
107. Nergiz-Unal R, Rademakers T, Cosemans JMEM, Heemskerk JWM. CD36 as a multiple-ligand signaling receptor in atherothrombosis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. enero de 2011;9(1):42-55.
108. Hames KC, Vella A, Kemp BJ, Jensen MD. Free fatty acid uptake in humans with CD36 deficiency. *Diabetes*. noviembre de 2014;63(11):3606-14.
109. Nicholls HT, Kowalski G, Kennedy DJ, Risis S, Zaffino LA, Watson N, et al. Hematopoietic cell-restricted deletion of CD36 reduces high-fat diet-induced macrophage infiltration and improves insulin signaling in adipose tissue. *Diabetes*. abril de 2011;60(4):1100-10.
110. Hajri T, Han XX, Bonen A, Abumrad NA. Defective fatty acid uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to diet in CD36-null mice. *J Clin Invest*. mayo de 2002;109(10):1381-9.
111. Yang YK, Chen M, Clements RH, Abrams GA, Aprahamian CJ, Harmon CM. Human mesenteric adipose tissue plays unique role versus subcutaneous and omental fat in obesity related diabetes. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2008;22(5-6):531-8.



112. Daviet L, Malvoisin E, Wild TF, McGregor JL. Thrombospondin induces dimerization of membrane-bound, but not soluble CD36. *Thromb Haemost.* agosto de 1997;78(2):897-901.
113. Bauters D, Cobbaut M, Geys L, Lint JV, Hemmeryckx B, Lijnen HR. Loss of ADAMTS5 enhances brown adipose tissue mass and promotes browning of white adipose tissue via CREB signaling. *Mol Metab.* julio de 2017;6(7):715-24.
114. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* diciembre de 2014;15(12):786-801.
115. Tsai JP, Liou JH, Kao WT, Wang SC, Lian JD, Chang HR. Increased expression of intranuclear matrix metalloproteinase 9 in atrophic renal tubules is associated with renal fibrosis. *PLoS One.* 2012;7(10):e48164.
116. Xie Y, Mustafa A, Yerzhan A, Merzhakupova D, Yerlan P, Orakov AN, et al. Nuclear matrix metalloproteinases: functions resemble the evolution from the intracellular to the extracellular compartment. *Cell Death Discov.* 2017;3:17036.
117. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* febrero de 2006;69(3):562-73.
118. Tinahones FJ, Coín-Aragüez L, Mayas MD, García-Fuentes E, Hurtado-Del-Pozo C, Vendrell J, et al. Obesity-associated insulin resistance is correlated to adipose tissue vascular endothelial growth factors and metalloproteinase levels. *BMC Physiol.* abril de 2012;12:4.
119. Hopps E, Presti RL, Montana M, Noto D, Averna MR, Caimi G. Gelatinases and their tissue inhibitors in a group of subjects with metabolic syndrome. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res.* agosto de 2013;61(6):978-83.
120. Amor M, Viedma VM, Sarabi A, Grün NG, Itariu B, Leitner L, et al. Identification of matrix metalloproteinase-12 as a candidate molecule for prevention and treatment of cardiometabolic disease. *Mol Med Camb Mass.* octubre de 2016;22:487-96.
121. Arcidiacono B, Chiefari E, Laria AE, Messineo S, Bilotta FL, Britti D, et al. Expression of matrix metalloproteinase-11 is increased under conditions of insulin resistance. *World J Diabetes.* septiembre de 2017;8(9):422-8.
122. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* marzo de 2000;1477(1-2):267-83.
123. Jaworski DM, Sideleva O, Stradecki HM, Langlois GD, Habibovic A, Satish B, et al. Sexually dimorphic diet-induced insulin resistance in obese tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2)-deficient mice. *Endocrinology.* abril de 2011;152(4):1300-13.
124. Mutsaers SE, Birnie K, Lansley S, Herrick SE, Lim CB, Prêle CM. Mesothelial cells in tissue repair and fibrosis. *Front Pharmacol.* 2015;6:113.
125. Menghini R, Menini S, Amoruso R, Fiorentino L, Casagrande V, Marzano V, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 deficiency causes hepatic steatosis and adipose tissue inflammation in mice. *Gastroenterology.* febrero de 2009;136(2):663-72.e4.
126. Menghini R, Casagrande V, Menini S, Marino A, Marzano V, Hribal ML, et al. TIMP3 overexpression in macrophages protects from insulin resistance, adipose inflammation, and nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Diabetes.* febrero de 2012;61(2):454-62.
127. Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol.* noviembre de 2011;12(11):233.
128. Kelwick R, Desanlis I, Wheeler GN, Edwards DR. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biol.* mayo de 2015;16(1):113.
129. Colige A, Vandenberghe I, Thiry M, Lambert CA, Beeumen JV, Li SW, et al. Cloning and characterization of ADAMTS-14, a novel ADAMTS displaying high homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3. *J Biol Chem.* febrero de 2002;277(8):5756-66.
130. Voros G, Maquoi E, Collen D, Lijnen HR. Differential expression of plasminogen activator inhibitor-1, tumor necrosis factor-alpha, TNF-alpha converting enzyme and ADAMTS

- family members in murine fat territories. *Biochim Biophys Acta*. enero de 2003;1625(1):36-42.
131. Li J, Yu X, Pan W, Unger RH. Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. junio de 2002;282(6):E1334-41.
  132. Koza RA, Nikonova L, Hogan J, Rim JS, Mendoza T, Faulk C, et al. Changes in gene expression foreshadow diet-induced obesity in genetically identical mice. *PLoS Genet*. mayo de 2006;2(5):e81.
  133. Bauters D, Scroyen I, Deprez-Poulain R, Lijnen HR. ADAMTS5 promotes murine adipogenesis and visceral adipose tissue expansion. *Thromb Haemost*. septiembre de 2016;116(4):694-704.
  134. Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med Berl Ger*. diciembre de 2007;85(12):1301-7.
  135. Halberg N, Khan T, Trujillo ME, Wernstedt-Asterholm I, Attie AD, Sherwani S, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol Cell Biol*. agosto de 2009;29(16):4467-83.
  136. Sung HK, Doh KO, Son JE, Park JG, Bae Y, Choi S, et al. Adipose vascular endothelial growth factor regulates metabolic homeostasis through angiogenesis. *Cell Metab*. enero de 2013;17(1):61-72.
  137. Bonner JS, Lantier L, Hasenour CM, James FD, Bracy DP, Wasserman DH. Muscle-specific vascular endothelial growth factor deletion induces muscle capillary rarefaction creating muscle insulin resistance. *Diabetes*. febrero de 2013;62(2):572-80.
  138. Kang L, Lantier L, Kennedy A, Bonner JS, Mayes WH, Bracy DP, et al. Hyaluronan accumulates with high-fat feeding and contributes to insulin resistance. *Diabetes*. junio de 2013;62(6):1888-96.
  139. Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N, et al. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol Cell Biol*. marzo de 2009;29(6):1575-91.
  140. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*. febrero de 2012;196(4):395-406.
  141. Sheu BS, Yeh YC. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the gastrointestinal cancers: current knowledge and clinical potential. *Met Med*. agosto de 2014;3.
  142. Nasser NJ. Heparanase involvement in physiology and disease. *Cell Mol Life Sci CMLS*. junio de 2008;65(11):1706-15.
  143. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, DeFuria J, Jick Z, et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*. diciembre de 2007;56(12):2910-8.
  144. Luk CT, Shi SY, Cai EP, Sivasubramaniyam T, Schroer SA, Woo M. Adipocyte-Specific FAK Deletion in Mice Leads to Insulin Resistance but Divergent Adipose Tissue Remodelling Under Lean and Obese Conditions. *Can J Diabetes*. octubre de 2013;37:S8-9.
  145. Kang HS, Liao G, DeGraff LM, Gerrish K, Bortner CD, Garantziotis S, et al. CD44 plays a critical role in regulating diet-induced adipose inflammation, hepatic steatosis, and insulin resistance. *PLoS One*. 2013;8(3):e58417.
  146. Zheng C, Yang Q, Xu C, Shou P, Cao J, Jiang M, et al. CD11b regulates obesity-induced insulin resistance via limiting alternative activation and proliferation of adipose tissue macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. diciembre de 2015;112(52):E7239-48.
  147. Sun K, Tordjman J, Clément K, Scherer PE. Fibrosis and Adipose Tissue Dysfunction. *Cell Metab*. octubre de 2013;18(4):470-7.
  148. Keophiphath M, Achard V, Henegar C, Rouault C, Clément K, Lacasa D. Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. *Mol Endocrinol Baltim Md*. enero de 2009;23(1):11-24.

149. Song E, Ouyang N, Hörbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol.* agosto de 2000;204(1):19-28.
150. Divoux A, Moutel S, Poitou C, Lacasa D, Veyrie N, Aissat A, et al. Mast cells in human adipose tissue: link with morbid obesity, inflammatory status, and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* septiembre de 2012;97(9):E1677-85.
151. Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, et al. Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes.* noviembre de 2010;59(11):2817-25.
152. Shafiei MS, Shetty S, Scherer PE, Rockey DC. Adiponectin regulation of stellate cell activation via PPAR $\gamma$ -dependent and -independent mechanisms. *Am J Pathol.* junio de 2011;178(6):2690-9.
153. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE, Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity Find the latest version : Review series Adipose tissue remodeling and obesity. 2011;121(6):2094-101.
154. Lee MJ, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med.* febrero de 2013;34(1):1-11.
155. Kissebah AH, Krakower GR. Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev.* octubre de 1994;74(4):761-811.
156. Gupta OT, Gupta RK. Visceral Adipose Tissue Mesothelial Cells: Living on the Edge or Just Taking Up Space? *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(10):515-23.
157. Chau YY, Bandiera R, Serrels A, Martínez-Estrada OM, Qing W, Lee M, et al. Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source. *Nat Cell Biol.* 2014;16(4):367-75.
158. Jiang Y, Berry DC, Tang W, Graff JM. Independent stem cell lineages regulate adipose organogenesis and adipose homeostasis. *Cell Rep.* noviembre de 2014;9(3):1007-22.
159. Yung S, Chan TM. Mesothelial cells. *Perit Dial Int J Int Soc Perit Dial.* junio de 2007;27 Suppl 2:S110-5.
160. Takahashi K, Goto T, Mukai K, Sawasaki Y, Hata J. Cobblestone monolayer cells from human omental adipose tissue are possibly mesothelial, not endothelial. *Vitro Cell Dev Biol J Tissue Cult Assoc.* febrero de 1989;25(2):109-11.
161. Mikuła-Pietrasik J, Sosińska P, Kucińska M, Murias M, Maksin K, Malińska A, et al. Peritoneal mesothelium promotes the progression of ovarian cancer cells in vitro and in a mice xenograft model in vivo. *Cancer Lett.* diciembre de 2014;355(2):310-5.
162. Mutsaers SE. The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* enero de 2004;36(1):9-16.
163. Darimont C, Avanti O, Blancher F, Wagniere S, Mansourian R, Zbinden I, et al. Contribution of mesothelial cells in the expression of inflammatory-related factors in omental adipose tissue of obese subjects. *Int J Obes.* 2008;32(1):112-20.
164. Topley N, Brown Z, Jörres A, Westwick J, Davies M, Coles GA, et al. Human peritoneal mesothelial cells synthesize interleukin-8. Synergistic induction by interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol.* junio de 1993;142(6):1876-86.
165. Zemel D, Krediet RT, Koomen GC, Kortekaas WM, Geertzen HG, Berge RJ ten. Interleukin-8 during peritonitis in patients treated with CAPD; an in-vivo model of acute inflammation. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 1994;9(2):169-74.
166. Bruun JM, Lihn AS, Madan AK, Pedersen SB, Schiøtt KM, Fain JN, et al. Higher production of IL-8 in visceral vs. subcutaneous adipose tissue. Implication of nonadipose cells in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* enero de 2004;286(1):E8-13.
167. Kim CS, Park HS, Kawada T, Kim JH, Lim D, Hubbard NE, et al. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int J Obes* 2005. septiembre de 2006;30(9):1347-55.

168. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem*. noviembre de 2003;278(46):45777-84.
169. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. noviembre de 2006;116(11):3015-25.
170. Phan SH. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc*. abril de 2008;5(3):334-7.
171. Yáñez-Mó M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Domínguez-Jiménez C, Jiménez-Heffernan JA, et al. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med*. enero de 2003;348(5):403-13.
172. Rinkevich Y, Mori T, Sahoo D, Xu PX, Birmingham JR, Weissman IL. Identification and prospective isolation of a mesothelial precursor lineage giving rise to smooth muscle cells and fibroblasts for mammalian internal organs, and their vasculature. *Nat Cell Biol*. diciembre de 2012;14(12):1251-60.
173. Billon N, Dani C. Developmental origins of the adipocyte lineage: new insights from genetics and genomics studies. *Stem Cell Rev Rep*. marzo de 2012;8(1):55-66.
174. Lansley SM, Searles RG, Hoi A, Thomas C, Moneta H, Herrick SE, et al. Mesothelial cell differentiation into osteoblast- and adipocyte-like cells. *J Cell Mol Med*. octubre de 2011;15(10):2095-105.
175. Liu Q, Huang X, Oh JH, Lin RZ, Duan S, Yu Y, et al. Epicardium-to-fat transition in injured heart. *Cell Res*. noviembre de 2014;24(11):1367-9.
176. Tang W, Zeve D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, et al. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science*. octubre de 2008;322(5901):583-6.
177. Sanchez-Gurmaches J, Guertin DA. Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nat Commun*. junio de 2014;5:4099.
178. Sun K, Li X, Scherer PE. Extracellular Matrix (ECM) and Fibrosis in Adipose Tissue: Overview and Perspectives. *Compr Physiol*. 2023;13(1):4387-407.
179. Lassen PB, Charlotte F, Liu Y, Bedossa P, Naour GL, Tordjman J, et al. The fat score, a fibrosis score of adipose tissue: Predicting weight-loss outcome after gastric bypass. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(7):2443-53.
180. Osorio-Conles Ó, Olbeyra R, Vidal J, Ibarzabal A, Balibrea JM, Hollanda A de. Expression of Adipose Tissue Extracellular Matrix-Related Genes Predicts Weight Loss after Bariatric Surgery. *Cells* [Internet]. abril de 2023;12(9). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37174662>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC10177079>
181. Chen N, Qian J, Chen J, Yu X, Mei C, Hao C, et al. Phase 2 studies of oral hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor FG-4592 for treatment of anemia in China. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. agosto de 2017;32(8):1373-86.
182. Olson E, Demopoulos L, Haws TF, Hu E, Fang Z, Mahar KM, et al. Short-term treatment with a novel HIF-prolyl hydroxylase inhibitor (GSK1278863) failed to improve measures of performance in subjects with claudication-limited peripheral artery disease. *Vasc Med Lond Engl*. diciembre de 2014;19(6):473-82.
183. Luo T, Nocon A, Fry J, Sherban A, Rui X, Jiang B, et al. AMPK Activation by Metformin Suppresses Abnormal Extracellular Matrix Remodeling in Adipose Tissue and Ameliorates Insulin Resistance in Obesity. *Diabetes*. agosto de 2016;65(8):2295-310.
184. Ilyas Z, Perna S, Al-Thawadi S, Alalwan TA, Riva A, Petrangolini G, et al. The effect of Berberine on weight loss in order to prevent obesity: A systematic review. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. julio de 2020;127:110137.
185. Wang L, Ye X, Hua Y, Song Y. Berberine alleviates adipose tissue fibrosis by inducing AMP-activated kinase signaling in high-fat diet-induced obese mice. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. septiembre de 2018;105:121-9.

186. Potter JD. At the interfaces of epidemiology, genetics and genomics. *Nat Rev Genet.* 2001;2(2):142-7.
187. Brethauer SA. Bariatric surgery in class I obesity (body mass index 30-35 kg/m<sup>2</sup>). *Surg Obes Relat Dis.* 2013;9(1):e1-10.
188. Eknayan G. Adolphe Quetelet (1796-1874) - The average man and indices of obesity. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(1):47-51.
189. Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL. Indices of relative weight and obesity. *Int J Epidemiol.* 2014;43(3):655-65.
190. Corcelles R, Boules M, Froylich D, Hag A, Daigle CR, Aminian A, et al. Total Weight Loss as the Outcome Measure of Choice After Roux-en-Y Gastric Bypass. *Obes Surg.* 2016;26(8):1794-8.
191. Hatoum IJ, Kaplan LM. Advantages of percent weight loss as a method of reporting weight loss after Roux-en-Y gastric bypass. *Obesity.* 2013;21(8):1519-25.
192. Nuttall FQ. Body mass index: Obesity, BMI, and health: A critical review. *Nutr Today.* 2015;50(3):117-28.
193. Brethauer SA, Kim J, Chaar M el, Papasavas P, Eisenberg D, Rogers A, et al. Standardized outcomes reporting in metabolic and bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis.* mayo de 2015;11(3):489-506.
194. Laar AVD. Bariatric outcomes longitudinal database (BOLD) suggests excess weight loss and excess BMI loss to be inappropriate outcome measures, demonstrating better alternatives. *Obes Surg.* 2012;22(12):1843-7.
195. Courcoulas AP, King WC, Belle SH, Berk P, Flum DR, Garcia L, et al. Seven-Year Weight Trajectories and Health Outcomes in the Longitudinal Assessment of Bariatric Surgery (LABS) Study. *JAMA Surg.* 1 de mayo de 2018;153(5):427.
196. Sjöström L. Effects of Bariatric Surgery on Mortality in Swedish Obese Subjects. *N Engl J Med.* 2007;357:741-52.
197. Pereferrer FS, López AM, Gándara DA, Martín JJA, Boileve JB, Moreno AB, et al. Análisis de la pérdida ponderal a medio plazo después del bypass gastroyeyunal en Y de Roux y de la gastrectomía vertical: propuesta de gráficos de percentiles del porcentaje de peso total perdido para su uso en la práctica clínica diaria. *Cir Esp.* febrero de 2020;98(2):72-8.
198. Association AD. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care.* 2020;43(January):S14-31.
199. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Collins KJ, Himmelfarb CD, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Pr. *J Am Coll Cardiol.* 2018;71(19):e127-248.
200. Jellinger P. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Guidelines for Management of Dyslipidemia and Prevention of Cardiovascular Disease. *Endocr Pract.* 2017;23((suppl. 2)):1-87.
201. Olson EJ, Moore WR, Morgenthaler TI, Gay PC, Staats BA. Obstructive Sleep Apnea-Hypopnea Syndrome. *Mayo Clin Proc.* 2003;78(12):1545-52.
202. Park JG, Ramar K, Olson EJ. Updates on definition, consequences, and management of obstructive sleep apnea concise review for clinicians. *Mayo Clin Proc.* 2011;86(6):549-55.
203. Punjabi NM. The epidemiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5(2):136-43.
204. Lopez PP, Stefan B, Schulman CI, Byers PM. Prevalence of sleep apnea in morbidly obese patients who presented for weight loss surgery evaluation: More evidence for routine screening for obstructive sleep apnea before weight loss surgery. *Am Surg.* 2008;74(9):834-8.
205. Flemons WW, Buysse D, Redline S, Oack A, Strohl K, Wheatley J, et al. Sleep-related breathing disorders in adults: Recommendations for syndrome definition and



- measurement techniques in clinical research: The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force. *Sleep*. 1999;22(5):667-89.
206. Leoni S, Tovoli F, Napoli L, Serio I, Ferri S, Bolondi L. Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review with comparative analysis. *World J Gastroenterol*. 2018;24(30):3361-73.
  207. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328-57.
  208. Asrih M, Jornayvaz FR. Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link? *Mol Cell Endocrinol*. 2015;418:55-65.
  209. Ruhl CE, Everhart JE. Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology*. 2003;124(1):71-9.
  210. Fabbrini E. Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Biochemical, Metabolic and Clinical Implications. *Hepatology*. 2010;51(2):679-89.
  211. Tang Q, Li X, Song P, Xu L. Optimal cut-off values for the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and pre-diabetes screening: Developments in research and prospects for the future. *Drug Discov Ther*. 2015;9(6):380-5.
  212. Ascaso JF, Real JT, Priego A, Carmena R, Romero P, Valdecabres C. Insulin resistance quantification by fasting insulin plasma values and HOMA index in a non-diabetic population. *Med Clin (Barc)*. 2001;117(14):530-3.
  213. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-22.
  214. Lipshutz RJ, Fodor SPA, Gingeras TR, Lockhart DJ. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet*. 1999;21(1S):24.
  215. Kendzioriski C, Irizarry RA, Chen KS, Haag JD, Gould MN. On the utility of pooling biological samples in microarray experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(12):4252-7.
  216. Jin W, Riley RM, Wolfinger RD, White KP, Passador-Gurgell G, Gibson G. The contributions of sex, genotype and age to transcriptional variance in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet*. 2001;29(4):389-95.
  217. Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CCA, Rittling SR, Denhardt DT, et al. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science*. 2001;294(5547):1731-5.
  218. Waring JF, Jolly RA, Ciurlionis R, Lum PY, Praestgaard JT, Morfitt DC, et al. Clustering of hepatotoxins based on mechanism of toxicity using gene expression profiles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001;175(1):28-42.
  219. Churchill GA. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet*. 2002;32(4S):490-5.
  220. Simon RM, Dobbin K. Experimental design of DNA microarray experiments. *BioTechniques*. 2003;34(3 SUPPL.).
  221. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The SVA package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics*. 2012;28(6):882-3.
  222. Gentleman R, editor. *Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor*. New York: Springer Science+Business Media; 2005. 473 p. (Statistics for biology and health).
  223. Shao X, Taha IN, Clauser KR, Gao Y (Tom), Naba A. MatrisomeDB: the ECM-protein knowledge database. *Nucleic Acids Res*. enero de 2020;48(D1):D1136-44.
  224. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res*. julio de 2015;43(W1):W566-70.

225. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004;3(1).
226. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol*. enero de 1995;57(1):289-300.
227. Irizarry RA, Wang C, Zhou Y, Speed TP. Gene set enrichment analysis made simple. *Stat Methods Med Res*. 2009;18(6):565-75.
228. Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun*. abril de 2019;10(1):1523.
229. Canales RD, Luo Y, Willey JC, Austermler B, Barbacioru CC, Boysen C, et al. Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nat Biotechnol*. 2006;24(9):1115-22.
230. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
231. Pozo CHD, Calvo RM, Vesperinas-García G, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G, Corripio-Sánchez R, et al. IPO8 and FBXL10: New reference genes for gene expression studies in human adipose tissue. *Obesity*. 2010;18(5):897-903.
232. Leek JT, Scharpf RB, Bravo HC, Simcha D, Langmead B, Johnson WE, et al. Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data. *Nat Rev Genet*. octubre de 2010;11(10):733-9.
233. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003;249-64.
234. Lawler HM, Underkofler CM, Kern PA, Erickson C, Bredbeck B, Rasouli N. Adipose Tissue Hypoxia, Inflammation, and Fibrosis in Obese Insulin-Sensitive and Obese Insulin-Resistant Subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. abril de 2016;101(4):1422-8.
235. Henegar C, Tordjman J, Achard V, Lacasa D, Cremer I, Guerre-Millo M, et al. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol*. 2008;9(1):1-32.
236. Roumans NJT, Camps SG, Renes J, Bouwman FG, Westerterp KR, Mariman ECM. Weight loss-induced stress in subcutaneous adipose tissue is related to weight regain. *Br J Nutr*. 2016;115(5):913-20.
237. Roumans NJT, Vink RG, Gielen M, Zeegers MP, Holst C, Wang P, et al. Variation in extracellular matrix genes is associated with weight regain after weight loss in a sex-specific manner. *Genes Nutr*. 2015;10(6):1-9.
238. Roumans NJT, Vink RG, Fazelzadeh P, Baak MAV, Mariman ECM. A role for leukocyte integrins and extracellular matrix remodeling of adipose tissue in the risk of weight regain after weight loss. *Am J Clin Nutr*. 2017;105(5):1054-62.
239. Espín-Pérez A, Portier C, Chadeau-Hyam M, Veldhoven K van, Kleinjans JCS, Kok TMCM de. Comparison of statistical methods and the use of quality control samples for batch effect correction in human transcriptome data. Krishnan VV, editor. *PLOS ONE*. agosto de 2018;13(8):e0202947.
240. Zhang SD, Gant TW. Effect of pooling samples on the efficiency of comparative studies using microarrays. *Bioinformatics*. diciembre de 2005;21(24):4378-83.
241. Shih JH, Michalowska AM, Dobbin K, Ye Y, Qiu TH, Green JE. Effects of pooling mRNA in microarray class comparisons. *Bioinforma Oxf Engl*. diciembre de 2004;20(18):3318-25.
242. Baranova A, Collantes R, Gowder SJ, Elariny H, Schlauch K, Younoszai A, et al. Obesity-related differential gene expression in the visceral adipose tissue. *Obes Surg*. 2005;15(6):758-65.
243. Guglielmi V, Cardellini M, Cinti F, Corgosinho F, Cardolini I, D'Adamo M, et al. Omental adipose tissue fibrosis and insulin resistance in severe obesity. *Nutr Diabetes*. 2015;5(February).

244. Daval M, Foufelle F, Ferré P. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J Physiol*. 2006;574(1):55-62.
245. Gauthier MS. AMP-activated Protein Kinase Is Activated as a Consequence of Lipolysis in the Adipocyte POTENTIAL MECHANISMAND PHYSIOLOGICAL RELEVANCE. *J Biol Chem*. 2008;283(24):16514-24.
246. Virtanen KA, Hällsten K, Parkkola R, Janatuinen T, Lönnqvist F, Viljanen T, et al. Differential effects of rosiglitazone and metformin on adipose tissue distribution and glucose uptake in type 2 diabetic subjects. *Diabetes*. 2003;52(2):283-90.
247. Liu X, Zhang T, Zhang C. Sitagliptin Inhibits Extracellular Matrix Accumulation and Proliferation in Lung Fibroblasts. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. abril de 2020;26:e922644.
248. Heerspink HJL, Perco P, Mulder S, Leierer J, Hansen MK, Heinzel A, et al. Canagliflozin reduces inflammation and fibrosis biomarkers: a potential mechanism of action for beneficial effects of SGLT2 inhibitors in diabetic kidney disease. *Diabetologia*. julio de 2019;62(7):1154-66.
249. Ferrannini E. The target of metformin in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2014;371(16):1547-8.
250. Xu XJ, Gauthier MS, Hess DT, Apovian CM, Cacicedo JM, Gokce N, et al. Insulin sensitive and resistant obesity in humans: AMPK activity, oxidative stress, and depot-specific changes in gene expression in adipose tissue. *J Lipid Res*. 2012;53(4):792-801.
251. Li X, Li J, Wang L, Li A, Qiu Z, Qi LW, et al. The role of metformin and resveratrol in the prevention of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  accumulation and fibrosis in hypoxic adipose tissue. *Br J Pharmacol*. junio de 2016;173(12):2001-15.
252. Malekpour-Dehkordi Z, Teimourian S, Nourbakhsh M, Naghiaee Y, Sharifi R, Mohiti-Ardakani J. Metformin reduces fibrosis factors in insulin resistant and hypertrophied adipocyte via integrin/ERK, collagen VI, apoptosis, and necrosis reduction. *Life Sci*. septiembre de 2019;233:116682.
253. Kaya YE, Karaarslan N, Yilmaz I, Sirin DY, Akalan H, Ozbek H. A Study of the Effects of Metformin, a Biguanide Derivative, on Annulus Fibrosus and Nucleus Pulposus Cells. *Turk Neurosurg*. 2020;30(3):434-41.
254. Lee YH, Nair S, Rousseau E, Allison DB, Page GP, Tataranni PA, et al. Microarray profiling of isolated abdominal subcutaneous adipocytes from obese vs non-obese Pima Indians: increased expression of inflammation-related genes. *Diabetologia*. septiembre de 2005;48(9):1776-83.
255. Canello R, Zulian A, Gentilini D, Mencarelli M, Barba AD, Maffei M, et al. Permanence of molecular features of obesity in subcutaneous adipose tissue of ex-obese subjects. *Int J Obes*. 2013;37(6):867-73.
256. Rodríguez-Acebes S, Palacios N, Botella-Carretero JI, Olea N, Crespo L, Peromingo R, et al. Gene expression profiling of subcutaneous adipose tissue in morbid obesity using a focused microarray: Distinct expression of cell-cycle- and differentiation-related genes. *BMC Med Genomics*. 2010;3(1):61.
257. Gerhard GS, Styer AM, Strodel WE, Roesch SL, Yavorek A, Carey DJ, et al. Gene expression profiling in subcutaneous, visceral and epigastric adipose tissues of patients with extreme obesity. *Int J Obes*. 2014;38(3):371-8.
258. Ronquillo MD, Mellnyk A, Cárdenas-Rodríguez N, Martínez E, Comoto DA, Carmona-Aparicio L, et al. Different gene expression profiles in subcutaneous & visceral adipose tissues from Mexican patients with obesity. *Indian J Med Res*. mayo de 2019;149(5):616-26.
259. Voros G, Sandy JD, Collen D, Lijnen HR. Expression of aggrecan(ases) during murine preadipocyte differentiation and adipose tissue development. *Biochim Biophys Acta*. diciembre de 2006;1760(12):1837-44.



260. Zha Y, Chen Y, Xu F, Zhang J, Li T, Zhao C, et al. Elevated level of ADAMTS4 in plasma and peripheral monocytes from patients with acute coronary syndrome. *Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc.* diciembre de 2010;99(12):781-6.
261. Skurk T, Herder C, Kräfft I, Müller-Scholze S, Hauner H, Kolb H. Production and release of macrophage migration inhibitory factor from human adipocytes. *Endocrinology.* marzo de 2005;146(3):1006-11.
262. Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab.* abril de 2005;90(4):2282-9.
263. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* diciembre de 2003;112(12):1796-808.
264. Visser CE, Tekstra J, Brouwer-Steenbergen JJ, Tuk CW, Boorsma DM, Sampat-Sardjoepersad SC, et al. Chemokines produced by mesothelial cells: huGRO-alpha, IP-10, MCP-1 and RANTES. *Clin Exp Immunol.* mayo de 1998;112(2):270-5.
265. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology.* mayo de 2004;145(5):2273-82.
266. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* marzo de 1998;83(3):847-50.
267. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* diciembre de 2003;112(12):1821-30.
268. Spoto B, Betta ED, Mattace-Raso F, Sijbrands E, Vilardi A, Parlongo RM, et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in subcutaneous and visceral fat in severe obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014;24(10):1137-43.
269. Bastard JP, Maachi M, Nhieu JTV, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, et al. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* mayo de 2002;87(5):2084-9.
270. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.* mayo de 2011;1813(5):878-88.
271. Han MS, White A, Perry RJ, Camporez JP, Hidalgo J, Shulman GI, et al. Regulation of adipose tissue inflammation by interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci.* febrero de 2020;117(6):2751-60.
272. Siiskonen H, Kärnä R, Hyttinen JM, Tammi RH, Tammi MI, Rilla K. Hyaluronan synthase 1 (HAS1) produces a cytokine-and glucose-inducible, CD44-dependent cell surface coat. *Exp Cell Res.* enero de 2014;320(1):153-63.
273. Siiskonen H, Oikari S, Pasonen-Seppänen S, Rilla K. Hyaluronan Synthase 1: A Mysterious Enzyme with Unexpected Functions. *Front Immunol [Internet].* febrero de 2015;6. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00043/abstract>
274. Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J. S100A8/A9 in Inflammation. *Front Immunol.* 2018;9:1298.
275. Fain JN. Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:513948.
276. Rout UK, Saed GM, Diamond MP. Expression pattern and regulation of genes differ between fibroblasts of adhesion and normal human peritoneum. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005;3:1-14.
277. Ambler DR, Golden AM, Gell JS, Saed GM, Carey DJ, Diamond MP. Microarray expression profiling in adhesion and normal peritoneal tissues. *Fertil Steril.* 2012;97(5):1158-1164.e4.

278. Kyama CM, Overbergh L, Debrock S, Valckx D, Perre SV, Meuleman C, et al. Increased peritoneal and endometrial gene expression of biologically relevant cytokines and growth factors during the menstrual phase in women with endometriosis. *Fertil Steril*. junio de 2006;85(6):1667-75.
279. Liu Y, Guo R, Hao G, Xiao J, Bao Y, Zhou J, et al. The expression profiling and ontology analysis of noncoding RNAs in peritoneal fibrosis induced by peritoneal dialysis fluid. *Gene*. 2015;564(2):210-9.
280. Yung S, Chao TM. Intrinsic cells: Mesothelial cells - Central players in regulating inflammation and resolution. *Perit Dial Int*. 2009;29(SUPPL. 2):21-7.
281. Kang L, Ayala JE, Lee-Young RS, Zhang Z, James FD, Neuffer PD, et al. Diet-induced muscle insulin resistance is associated with extracellular matrix remodeling and interaction with integrin alpha2beta1 in mice. *Diabetes*. febrero de 2011;60(2):416-26.
282. Williams AS, Kang L, Wasserman DH. The extracellular matrix and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. julio de 2015;26(7):357-66.
283. Jiang C, Qu A, Matsubara T, Chanturiya T, Jou W, Gavrilova O, et al. Disruption of hypoxia-inducible factor 1 in adipocytes improves insulin sensitivity and decreases adiposity in high-fat diet-fed mice. *Diabetes*. octubre de 2011;60(10):2484-95.
284. Tam CS, Tordjman J, Divoux A, Baur LA, Clément K. Adipose Tissue Remodeling in Children: The Link between Collagen Deposition and Age-Related Adipocyte Growth. *J Clin Endocrinol Metab*. abril de 2012;97(4):1320-7.
285. Muir LA, Neeley CK, Meyer KA, Baker NA, Brosius AM, Washabaugh AR, et al. Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity. *Obesity*. marzo de 2016;24(3):597-605.
286. Chabot K, Gauthier MS, Garneau PY, Rabasa-Lhoret R. Evolution of subcutaneous adipose tissue fibrosis after bariatric surgery. *Diabetes Metab*. 2017;43(2):125-33.
287. Chan DC, Watts GF, Sussekov AV, Barrett PHR, Yang Z, Hua J, et al. Adipose tissue compartments and insulin resistance in overweight-obese Caucasian men. *Diabetes Res Clin Pract*. febrero de 2004;63(2):77-85.
288. Coffey JC, O'Leary DP, Kiernan MG, Faul P. The mesentery in Crohn's disease: friend or foe? *Curr Opin Gastroenterol*. julio de 2016;32(4):267-73.
289. Bilski J, Mazur-Bialy A, Wojcik D, Surmiak M, Magierowski M, Sliwowski Z, et al. Role of Obesity, Mesenteric Adipose Tissue, and Adipokines in Inflammatory Bowel Diseases. *Biomolecules* [Internet]. noviembre de 2019;9(12). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31779136>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6995528>
290. Coffey CJ, Kiernan MG, Sahebally SM, Jarrar A, Burke JP, Kiely PA, et al. Inclusion of the Mesentery in Ileocolic Resection for Crohn's Disease is Associated With Reduced Surgical Recurrence. *J Crohns Colitis*. noviembre de 2018;12(10):1139-50.
291. Coffey JC, Byrnes KG, Walsh DJ, Cunningham RM. Update on the mesentery: structure, function, and role in disease. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2022;7(1):96-106.
292. Andrew MS, Huffman DM, Rodriguez-Ayala E, Williams NN, Peterson RM, Bastarrachea RA. Mesenteric visceral lipectomy using tissue liquefaction technology reverses insulin resistance and causes weight loss in baboons. *Surg Obes Relat Dis*. 2018;14(6):833-41.
293. Paolillo FR, Campos TYTB, Alvarez C, Sene-Fiorese M, Bagnato VS, Duarte ACGO, et al. Synergic effects of ultrasound and laser therapies on mesentery for management of obesity and diabetes in rats. *J Biophotonics* [Internet]. noviembre de 2021;14(11). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbio.202100109>
294. Márquez-Quiñones A, Mutch DM, Debard C, Wang P, Combes M, Roussel B, et al. Adipose tissue transcriptome reflects variations between subjects with continued weight loss and subjects regaining weight 6 mo after caloric restriction independent of energy intake. *Am J Clin Nutr*. 2010;92(4):975-84.

295. Larsen TM, Dalskov S, Baak M van, Jebb S, Kafatos A, Pfeiffer A, et al. The Diet, Obesity and Genes (Diogenes) Dietary Study in eight European countries - a comprehensive design for long-term intervention. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes.* enero de 2010;11(1):76-91.
296. Sjöström L. Effects of Bariatric Surgery on Mortality in Swedish Obese Subjects. *N Engl J Med.* 2007;357:741-52.
297. Katsogiannos P, Kamble PG, Boersma GJ, Karlsson FA, Lundkvist P, Sundbom M, et al. Early Changes in Adipose Tissue Morphology, Gene Expression, and Metabolism After RYGB in Patients With Obesity and T2D. *J Clin Endocrinol Metab.* julio de 2019;104(7):2601-13.
298. Rao SR. Inflammatory markers and bariatric surgery: A meta-analysis. *Inflamm Res.* 2012;61(8):789-807.
299. Mingrone G, Panunzi S, Gaetano AD, Guidone C, Iaconelli A, Nanni G, et al. Bariatric-metabolic surgery versus conventional medical treatment in obese patients with type 2 diabetes: 5 Year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial. *The Lancet.* 2015;386(9997):964-73.
300. Mingrone G, Panunzi S, Gaetano AD, Guidone C, Iaconelli A, Capristo E, et al. Metabolic surgery versus conventional medical therapy in patients with type 2 diabetes: 10-year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl.* enero de 2021;397(10271):293-304.
301. Koliaki C, Liatis S, Roux CW le, Kokkinos A. The role of bariatric surgery to treat diabetes: current challenges and perspectives. *BMC Endocr Disord.* 2017;17(1):50.
302. Brockman D, Chen X. Proteomics in the characterization of adipose dysfunction in obesity. *Adipocyte.* enero de 2012;1(1):25-37.
303. Vohl MC, Sladek R, Robitaille J, Gurd S, Marceau P, Richard D, et al. A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res.* agosto de 2004;12(8):1217-22.
304. Wolfs MGM, Rensen SS, Dijk EJBV, Verdam FJ, Greve JW, Sanjabi B, et al. Co-expressed immune and metabolic genes in visceral and subcutaneous adipose tissue from severely obese individuals are associated with plasma HDL and glucose levels: a microarray study. *BMC Med Genomics.* agosto de 2010;3:34.
305. Li X, Gu W, Mohan S, Baylink DJ. DNA microarrays: their use and misuse. *Microcirc N Y N* 1994. enero de 2002;9(1):13-22.
306. Nakanishi T, Oka T, Akagi T. Recent advances in DNA microarrays. *Acta Med Okayama.* diciembre de 2001;55(6):319-28.
307. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärnlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* julio de 1998;4(7):844-7.
308. Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, et al. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* agosto de 1999;5(8):1966-75.
309. Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet.* diciembre de 2004;66(6):488-95.
310. Hegde P, Qi R, Abernathy K, Gay C, Dharap S, Gaspard R, et al. A concise guide to cDNA microarray analysis. *BioTechniques.* septiembre de 2000;29(3):548-50, 552-4, 556 passim.
311. Pereira DM, Fernandes JC, Valentão P, Andrade PB. "Omics" Technologies. En: *Principles of Translational Science in Medicine* [Internet]. Elsevier; 2015 [citado 26 de agosto de 2023]. p. 25-39. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128006870000037>
312. Staal FJT, Burg M van der, Wessels LFA, Barendregt BH, Baert MRM, Burg CMM van den, et al. DNA microarrays for comparison of gene expression profiles between diagnosis and relapse in precursor-B acute lymphoblastic leukemia: choice of technique and purification influence the identification of potential diagnostic markers. *Leukemia.* julio de 2003;17(7):1324-32.

313. Uciechowski P, Dempke WCM. Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. *Oncology*. 2020;98(3):131-7.
314. Heink S, Yogev N, Garbers C, Herwerth M, Aly L, Gasperi C, et al. Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol*. enero de 2017;18(1):74-85.
315. Benedetti FD, Rucci N, Fattore AD, Peruzzi B, Paro R, Longo M, et al. Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum*. noviembre de 2006;54(11):3551-63.
316. Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Hagihara K, Kishimoto T, Yoshizaki K, et al. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. junio de 2003;48(6):1521-9.
317. Wolsk E, Mygind H, Grøndahl TS, Pedersen BK, Hall G van. IL-6 selectively stimulates fat metabolism in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. noviembre de 2010;299(5):E832-40.
318. Xiong D, Li G, Li K, Xu Q, Pan Z, Ding F, et al. Exome sequencing identifies MXRA5 as a novel cancer gene frequently mutated in non-small cell lung carcinoma from Chinese patients. *Carcinogenesis*. septiembre de 2012;33(9):1797-805.
319. Poveda J, Sanz AB, Fernandez-Fernandez B, Carrasco S, Ruiz-Ortega M, Cannata-Ortiz P, et al. MXRA5 is a TGF- $\beta$ 1-regulated human protein with anti-inflammatory and anti-fibrotic properties. *J Cell Mol Med*. enero de 2017;21(1):154-64.
320. Lu Q, Zhu L. The Role of Semaphorins in Metabolic Disorders. *Int J Mol Sci* [Internet]. agosto de 2020;21(16). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32781674> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC7460634>
321. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet*. agosto de 2008;40(8):955-62.
322. Batista CM de S, Yang RZ, Lee MJ, Glynn NM, Yu DZ, Pray J, et al. Omentin Plasma Levels and Gene Expression Are Decreased in Obesity. *Diabetes*. junio de 2007;56(6):1655-61.
323. Pemberton AD, Rose-Zerilli MJ, Holloway JW, Gray RD, Holgate ST. A single-nucleotide polymorphism in intelectin 1 is associated with increased asthma risk. *J Allergy Clin Immunol*. noviembre de 2008;122(5):1033-4.
324. Wesener DA, Wangkanont K, McBride R, Song X, Kraft MB, Hodges HL, et al. Recognition of microbial glycans by human intelectin-1. *Nat Struct Mol Biol*. agosto de 2015;22(8):603-10.
325. Yang RZ, Lee MJ, Hu H, Pray J, Wu HB, Hansen BC, et al. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. junio de 2006;290(6):E1253-61.
326. Das N, Schmidt TA, Krawetz RJ, Dufour A. Proteoglycan 4: From Mere Lubricant to Regulator of Tissue Homeostasis and Inflammation: Does proteoglycan 4 have the ability to buffer the inflammatory response? *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. enero de 2019;41(1):e1800166.
327. Islam S, Watanabe H. Versican: A Dynamic Regulator of the Extracellular Matrix. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. noviembre de 2020;68(11):763-75.
328. Trexler M, Bányai L, Patthy L. The LCCL module. *Eur J Biochem*. septiembre de 2000;267(18):5751-7.
329. Lan J, Ribeiro L, Mandeville I, Nadeau K, Bao T, Cornejo S, et al. Inflammatory cytokines, goblet cell hyperplasia and altered lung mechanics in Lgl1+/- mice. *Respir Res*. septiembre de 2009;10(1):83.

## 10. ANEXOS



## 10.1. ANEXO I: BASES DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROARRAYS

Los microarrays o chips de ADN son formatos experimentales basados en la presencia de un determinado número de fragmentos de ADN (sondas o *probes*) fijados en una posición concreta sobre un sustrato sólido o membrana (de cristal, plástico, sílice u otros materiales), los cuales se unen específicamente a moléculas diana complementarias de ADN (secuencias diana o *target sequences*) durante el proceso conocido como “hibridación”<sup>(305)</sup>. Las secuencias diana son previamente sometidas a procesos de amplificación y marcaje con una molécula detectable o un componente fluorescente, de forma que tras el proceso de hibridación la fluorescencia o señal emitida por la secuencia marcada puede ser detectada y cuantificada mediante técnicas de análisis de imagen (*laser scan*), lo que permite cuantificar el nivel de expresión de los genes específicos correspondientes a cada sonda en la muestra problema<sup>(305,306)</sup>.

Existen diferentes tipos de microarrays:

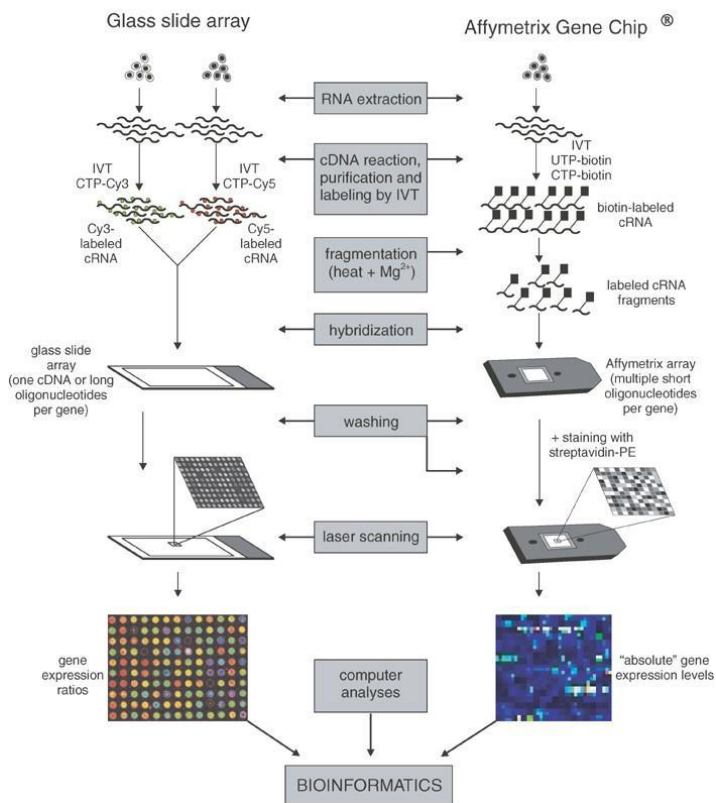
- De Proteínas: Permiten el análisis masivo y simultáneo de interacciones proteicas.
- De Tejidos: Permiten al análisis de centenares de muestras histológicas en una sola placa o array, las cuales pueden ser analizadas mediante diferentes técnicas inmunohistoquímicas de forma simultánea<sup>(307,308)</sup>.
- De DNA:
  - Arrays de CGH (*arrays de hibridación genómica comparada*): Basados en la hibridación competitiva, permiten el análisis comparativo del genoma de un individuo con un genoma de referencia, de forma que identifica las diferencias y localiza regiones de desequilibrios genómicos en la muestra problema, pudiéndose detectar variaciones estructurales como microdeleciones o alteraciones cromosómicas<sup>(309)</sup>.
  - SNPs (*polimorfismo de un único nucleótido*): Permiten detectar diferentes polimorfismos en una población mediante la detección de variaciones o polimorfismos en un único nucleótido (SNP), que constituyen las variaciones más frecuentes en el genoma (algunas de estas variaciones presentan una frecuencia > 1% en determinadas poblaciones). A diferencia de los arrays de CGH, no se basan en la hibridación competitiva.
- De Expresión: Permiten realizar análisis transcriptómicos mediante la detección y cuantificación de los ARNm presentes en una muestra. Según el tipo de moléculas utilizadas como sonda en el microarray, estos pueden ser:
  - De ADNc
  - De oligonucleótidos
- Otros (de carbohidratos, de células, etc.)

### Microarrays de expresión

En este estudio, para el análisis del transcriptoma de los tejidos estudiados hemos utilizado microarrays de expresión. Con respecto a este tipo de microarrays, existen básicamente dos



tipos de plataformas, bien basadas en la síntesis in vitro y posterior adhesión de ADNc's o oligonucleótidos largos (de 70-80 nucleótidos) en una matriz sólida, o bien basadas en técnicas fotolitográficas, en las que oligonucleótidos de 25 nucleótidos son sintetizados in situ en al propio array. Estos dos tipos de plataforma también difieren en el tipo de marcaje con fluorocromos y el tipo de análisis de expresión que se realiza en cada tipo de chip (análisis mediante ratios de expresión versus cuantificación absoluta). En el primer tipo de plataforma (microarrays de ADNc), el análisis de expresión se realiza de forma simultánea en las distintas muestras mediante hibridación competitiva en un mismo array<sup>(310)</sup>, mientras que en los chips de oligonucleótidos el análisis de las diferentes muestras se realiza en arrays independientes<sup>(311)</sup>. El primer tipo de arrays, denominados también "de doble canal" o arrays de dos colores, utilizados habitualmente para la comparación de la expresión génica entre una muestra experimental y una muestra control, se basan en la hibridación de las dos muestras de forma simultánea en un mismo chip, cada una de las cuales ha sido marcada con un fluoróforo diferente (habitualmente Cyanine 3, Cy3, y Cyanine 5, Cy5). De esta forma, se realiza una hibridación competitiva, tras la cual se mide la señal de fluorescencia de forma relativa entre ambos fluoróforos en cada sonda, representando así la expresión génica de una muestra respecto a la otra. Por el contrario, en los microarrays "de oligonucleótidos" (o arrays de un color), habitualmente marcados con biotina, los niveles de expresión de los genes de cada muestra se analizan en chips diferentes, de forma que se obtiene una medida absoluta y por separado del nivel de expresión de cada uno de los genes en cada muestra. Este es el sistema utilizado por los chips de Affymetrix utilizados en el presente estudio (ver **Figura A1**).

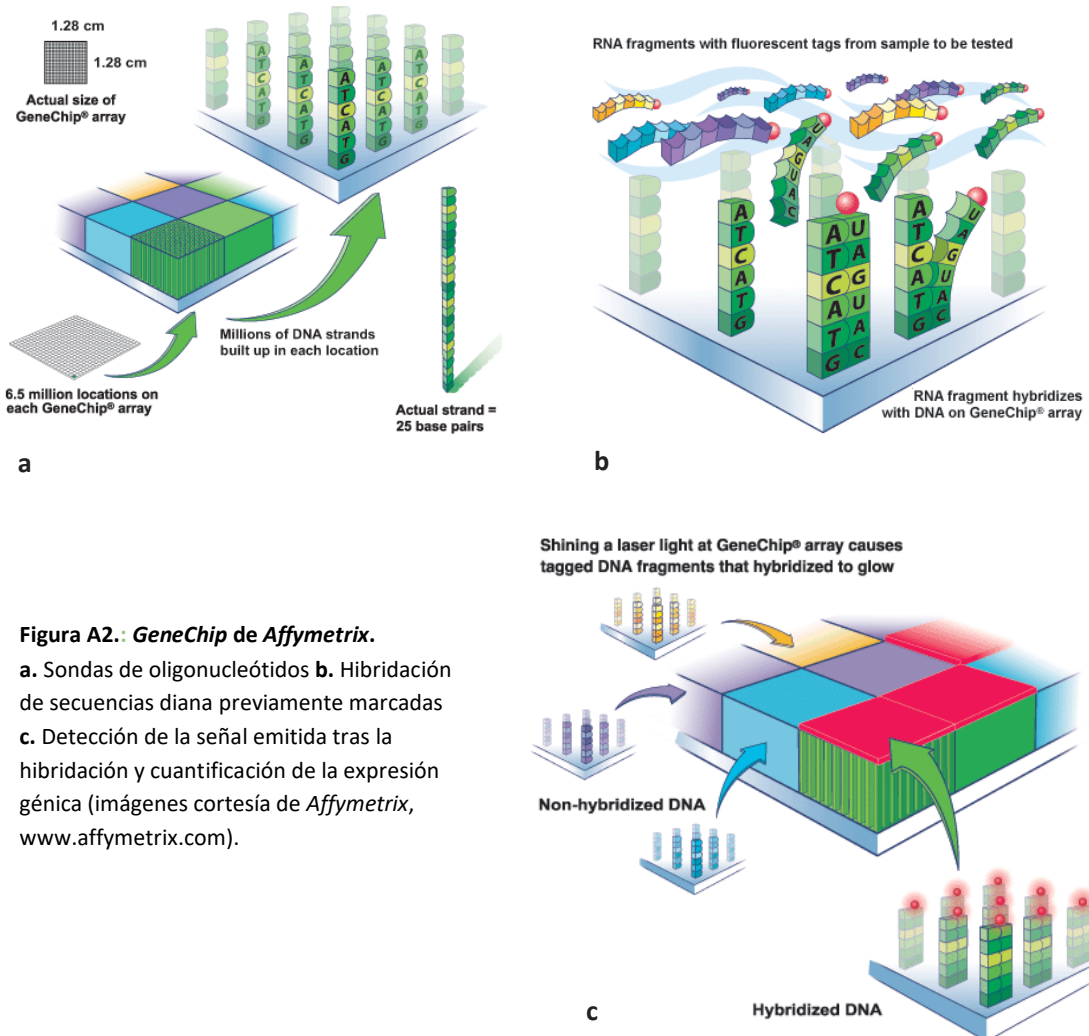


**Figura A1. Tipos de microarrays de expresión.** Reproducido de Staal et al, Leukemia 2003<sup>(312)</sup>.



## GeneChip de Affymetrix

En este estudio, hemos utilizado microarrays de oligonucleótidos sintetizados in situ de Affymetrix (Affymetrix *Clariom™ S Pico Assay HT, human*, de Thermo Fisher Scientific). Se trata en este caso de una matriz de 1.28 cm<sup>2</sup>, dividida en múltiples celdas de 50µm<sup>2</sup>. En este tipo de microarrays, cada gen está representado por un grupo de sondas cortas (en este caso únicamente exones constitutivos, presentes en todas las posibles isoformas de un gen) en lugar de por una única sonda. En el caso de los chips de Affymetrix, para cada gen, el microarray contiene un conjunto de sondas o “probe-set” constituido por oligonucleótidos de 11 tipos distintos (11 hebras simples distintas de oligonucleótidos de tamaño 25 nucleótidos). Cada oligonucleótido se encuentra miles de veces adherido en cada celda del “microarray”, constituyendo la sonda sobre la que se hibridará la secuencia diana de un gen determinado. Estos microarrays permiten medir simultáneamente el nivel de expresión de >20,000 genes correctamente anotados (ver **Figura A2**).



**Figura A2.: GeneChip de Affymetrix.**

**a.** Sondas de oligonucleótidos **b.** Hibridación de secuencias diana previamente marcadas **c.** Detección de la señal emitida tras la hibridación y cuantificación de la expresión génica (imágenes cortesía de Affymetrix, [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)).

## 10.2. ANEXO II: BASES DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-qPCR

### PCR cuantitativa con transcriptasa inversa

La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa es una variación de la PCR convencional que permite utilizar esta técnica de amplificación para la cuantificación de ácidos nucleicos presente en una muestra. La reacción en cadena de la polimerasa puede iniciarse a partir de una molécula de ADN o bien de ARN, en cuyo caso el primer paso del procedimiento consistirá en la síntesis de ADNc a partir de la molécula inicial de ARN mediante la enzima Transcriptasa Inversa.

Si bien en la PCR convencional el producto amplificado únicamente puede detectarse al final del proceso mediante electroforesis, en el caso de la RT-qPCR la detección del producto amplificado se realiza en tiempo real en cada ciclo de la PCR, lo que permite la cuantificación exacta del número de copias de la secuencia de interés presentes al inicio del proceso en la que se basará el análisis de expresión.

La cuantificación del producto amplificado en la RT-qPCR se basa en la adición de una molécula fluorescente (fluoróforo) que se une al producto amplificado, de forma que a mayor cantidad de producto amplificado mayor nivel de fluorescencia emitida por el fluoróforo. Los sistemas de RT-qPCR detectan la cantidad de fluorescencia emitida en cada ciclo, y los softwares de análisis conectados al termociclador permiten representar gráficamente el nivel de fluorescencia emitida respecto al número de ciclos. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de RNA/DNA iniciales presentes en la muestra, de forma que en aquellas muestras con mayor expresión del gen la fluorescencia del producto amplificado será detectada en ciclos anteriores.

### Productos necesarios para la RT-qPCR

- Una secuencia molde de ADN (de cadena simple o doble), en la que esté incluida la secuencia de interés que se quiere amplificar (en caso de partir de una muestra de ARN, previamente se sintetizará su ADN complementario mediante una transcripción inversa).
- Dos cebadores o *primers*, uno directo y otro reverso (secuencias cortas de nucleótidos, de unos 20 pares de bases, complementarias al inicio y al final de la secuencia específica que se quiere amplificar).
- Abundantes desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) de los cuatro tipos que conforman el ADN (adenosina, guanina, citosina y timina).
- Una polimerasa termoestable, la enzima encargada de incorporar los nucleótidos a los nuevos duplicados de la secuencia diana.
- Marcador fluorescente que se une al producto amplificado y permita la cuantificación del mismo de forma proporcional al número de copias realizadas.
- Una solución *buffer* rica en magnesio y libre de potasio. El magnesio actúa como cofactor de la polimerasa. El potasio, en cambio, propicia la formación de superestructuras en la cadena de nucleótidos que dificultan la acción de esta enzima.

## Etapas de un ciclo de RT-qPCR

La RT-qPCR se basa en tres etapas básicas que constituyen un ciclo. Mediante cambios sucesivos de temperatura, las etapas se repiten en los sucesivos ciclos de la reacción:

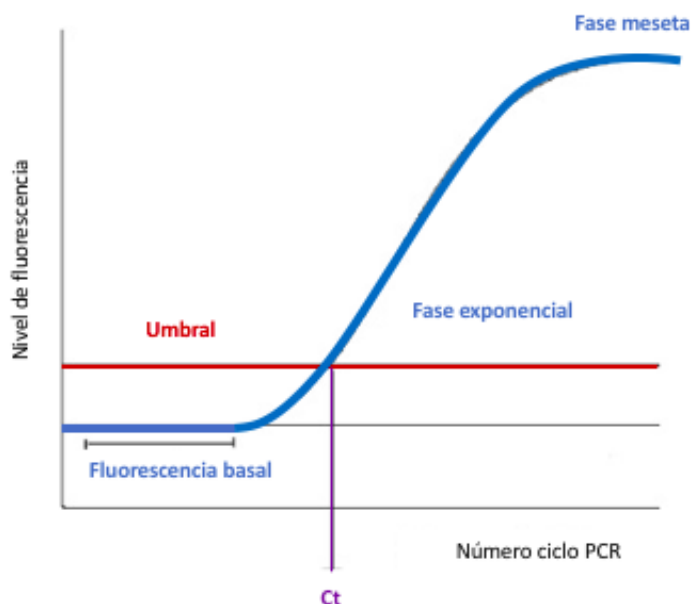
- Etapa 1: Desnaturalización o separación de las cadenas de ADN (a 94-95 °C).
- Etapa 2: Anillamiento o unión (hibridación) de los oligonucleótidos cebadores específicos del ADN molde (a 50-65°C, dependiendo de la composición del oligonucleótido).
- Etapa 3: Elongación o síntesis de la cadena complementaria al ADN molde por la acción de una polimerasa (a 68-72°C).

## Representación gráfica e interpretación de las curvas de fluorescencia

La detección y cuantificación del producto amplificado en la PCR depende de la detección de la fluorescencia emitida. Esta detección se puede expresar gráficamente en una curva de amplificación elaborada por el software conectado al termociclador. En el eje de ordenadas se representa la fluorescencia emitida por el fluoróforo, mientras que en el eje de abscisas se representan los sucesivos ciclos de amplificación (**Figura A3**).

La curva resultante tras los sucesivos ciclos se puede dividir en tres fases:

- En una primera fase, correspondiente a los primeros ciclos de la PCR, el nivel de fluorescencia emitida es bajo y no se observan grandes cambios en la detección de la misma. Esta etapa permite el cálculo de la fluorescencia basal o *baseline*.
- La segunda fase es la denominada exponencial, durante la cual se produce un incremento exponencial de la señal de fluorescencia detectada.
- La tercera fase es la denominada fase de meseta, en que la fluorescencia detectada se estanca tras un número determinado de ciclos debido a que alguno de los componentes de la reacción actúa como factor limitante, de forma que se satura la reacción.



**Figura A3.** Curva de amplificación y fases durante los sucesivos ciclos de PCR.

Es importante destacar que la cuantificación de la fluorescencia se limita a la fase exponencial, cuando la fluorescencia supera un determinado valor por encima de la línea de base (umbral o *threshold*). Este umbral determina el momento en que la fluorescencia detectada es significativamente mayor a la fluorescencia basal, y marca el punto a partir del cual empieza la fase de crecimiento exponencial de la fluorescencia (única fase en que la relación entre la fluorescencia emitida y el producto de amplificación guardan una relación directa).

El ciclo en el que la fluorescencia supera el umbral se conoce como Ct (*cycle threshold*, o umbral de ciclo). Este parámetro es importante para la cuantificación relativa y el análisis de la expresión diferencial. Esto se debe a que, en una qPCR estándar, todas las curvas de fluorescencia se saturan en el mismo nivel dado que partirán de concentraciones controladas e idénticas de todos los reactivos necesarios previamente descritos. Por ello, la cuantificación relativa del producto amplificado no vendrá determinada por el final de la reacción, sino por el número de ciclos necesarios para que la fluorescencia supere un determinado umbral definido por el investigador (en este caso el Ct). A mayor concentración inicial de la secuencia de ADN de interés, menor será el número de ciclos requeridos para que la fluorescencia supere dicho umbral (menor será el Ct). Esto permite el cálculo relativo de las concentraciones iniciales de las secuencias de ácidos nucleicos (en función de los Ct's obtenidos) en el que se basa el análisis de expresión.

## 10.3. ANEXO III: CONJUNTO DE GENES DEL MATRISOMA

Categorías	MATRISOMA CENTRAL			PROTEÍNAS ASOCIADAS A MATRISOMA		
	COLÁGENOS	GLUCOPROTEÍNAS DE MEC	PROTEOGLICANOS	LIGADAS A MEC	REGULADORAS DE MEC	FACTORES DE SECRECIÓN
<b>Definición</b>	Genes codificantes de colágenos	Genes codificantes de glucoproteínas estructurales de ECM	Genes codificantes de proteoglicanos	Genes codificantes de proteínas vinculadas estructuralmente o funcionalmente a proteínas de MEC	Genes codificantes de enzimas y reguladores implicados en la remodelación de la MEC	Genes codificantes de factores solubles de secreción
<b>Nº genes (% matrisoma)</b>	<b>14 (3,7%)</b>	<b>92 (24,21 %)</b>	<b>12 (3,16 %)</b>	<b>57 (15 %)</b>	<b>89 (23,42%)</b>	<b>116 (30,53%)</b>
<b>Genes</b>	COL14A1 COL15A1 COL18A1 COL1A1 COL22A1 COL27A1 COL4A1 COL4A2 COL5A1 COL6A2 COL6A3 COL6A5 COL6A6 COL8A1	ABI3BP ADIPOQ AGRN CILP CRELD1 CRELD2 CRISPLD1 CRISPLD2 CTGF CTHRC1 CYR61 EDIL3 EFEMP1 EGFLAM ELN EMILIN1 EMILIN2 FBLN1 FBLN2 FBLN5 FBN1 FGL2 FNDC1 FRAS1 GAS6 GLDN HMCN1 IGFBP2 IGFBP4 IGFBP5 IGFBP6 IGSF10 KCP LAMA1 LAMB1 LAMB2 LAMC1 LG4 LRG1 LTBP1 LTBP2 LTBP3 LTBP4 MATN2 MFAP1 MFAP3 MFAP5 MFGE8 MGP MIMRN1 MXRA5 NDNF NELL2 NID1 NID2 NPNT NTN1	ASPN BGN FMOD HAPLN3 LUM OGN OMD PODN PRG4 SPOCK1 SRGN VCAN	ANXA2 ANXA3 ANXA4 ANXA5 ANXA6 ANXA8 ANXA9 C1QA C1QB C1QC C1QTNF1 C1QTNF3 CD209 CLC CLEC10A CLEC12A CLEC1A CLEC2D CLEC3B CLEC4A CLEC4E CLEC4G COLEC12 CSPG4 EMCN FCN1 FREM1 GPC3 GPC4 GPC6 ITLN1 ITLN2 LGALS12 LGALS2 LGALS9 MUC1 MUC16 PLXDC1 PLXNA3 PLXNA4 PLXNB3 PLXNC1 SDC2 SDC3 SDC4 SEMA3A SEMA3D SEMA3F SEMA3G SEMA4A SEMA4B SEMA4C SEMA4D SEMA5A SEMA6A SEMA6C SEMA6D	ADAM10 ADAM12 ADAM15 ADAM20 ADAM22 ADAM23 ADAM33 ADAM9 ADAMTS1 ADAMTS12 ADAMTS16 ADAMTS17 ADAMTS18 ADAMTS2 ADAMTS3 ADAMTS4 ADAMTS5 ADAMTS6 ADAMTS9 ADAMTSL1 ADAMTSL3 ADAMTSL5 AGT BMP1 C17orf58 CD109 CST6 CSTA CSTB CTSB CTSC CTSD CTSF CTSG CTSH CTSK CTSL CTSS CTS2 EGLN1 F10 F13A1 FAM20A HPSE2 HTRA3 HYAL1 HYAL2 ITIH4 ITIH5 LOX LOXL1 MASP1 MMP14 MMP16 MMP17 MMP19 MMP2	ANGPT1 ANGPT2 ANGPTL1 ANGPTL2 ANGPTL7 AREG ARTN BMP2 BMP3 BMP4 BMP5 BMP6 BMP7 CBLN3 CCBE1 CCL16 CCL18 CCL19 CCL2 CCL21 CCL23 CCL24 CCL5 CCL8 CHRD1 CLCF1 CRHBP CRLF3 CSF3 CX3CL1 CXCL12 CXCL14 CXCL2 CXCL8 EGFL6 FGF1 FGF10 FGF16 FGF2 FGF7 FGF9 FGFBP2 FLT3LG FRZB FST FSTL3 GDF10 GH1 HBEGF HCFC2 HGF HHIP IGF1 IGF2 IL10 IL15 IL16

**Tabla A1. Conjunto de genes de matrisoma (n=380).** Identificados tras normalización y filtrado de los resultados obtenidos en los microarrays y clasificado en los distintos compartimentos o categorías definidos en *The Matrisome Project-MIT* (<http://matrisomeproject.mit.edu>).

## 10.4. ANEXO IV: GENES DEL MATRISOMA CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL ENTRE GRUPOS POR TEJIDOS

A continuación, se muestran los datos correspondientes a la expresión diferencial entre los grupos de estudio respecto a los genes relacionados con la MEC en cada uno de los tejidos analizados.

En cada una de las tablas los genes han sido ordenados en función del aumento logarítmico (*log fold change*) de la expresión objetivada en los sujetos del grupo con obesidad respecto a los del grupo control. De esta forma, los genes que aparecen en la parte superior de cada una de las tablas serían los genes con una mayor sobreexpresión en el grupo de pacientes con obesidad en ese tejido, mientras que los genes que aparecen al final de la tabla serían los genes que presentan una mayor expresión diferencial negativa (es decir, los más infra-expresados en el grupo con obesidad respecto al grupo control) en el tejido analizado.

### TEJIDO ADIPOSO EPIPLOICO (TAE)

Tabla A2. Genes del matrisoma con expresión diferencial entre grupos en el tejido adiposo epiploico.

GENE SYMBOL	Log FOLD CHANGE	P VALOR	MATRISOME DIVISION	MATRISOME CATEGORY
ADAMTS4	3,65	1,01E-09	Matrisome-associated	ECM Regulators
IL6	3,34	1,38E-08	Matrisome-associated	Secreted Factors
SERPINE1	3,18	3,10E-08	Matrisome-associated	ECM Regulators
S100A12	2,45	7,85E-06	Matrisome-associated	Secreted Factors
SERPINB2	2,20	4,75E-08	Matrisome-associated	ECM Regulators
S100A8	2,12	2,46E-05	Matrisome-associated	Secreted Factors
CCL2	2,08	4,30E-07	Matrisome-associated	Secreted Factors
SPP1	2,06	4,75E-04	Core matrisome	ECM Glycoproteins
TNFAIP6	1,93	1,24E-05	Core matrisome	ECM Glycoproteins
CLEC4E	1,83	5,80E-06	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
MMP19	1,72	1,01E-08	Matrisome-associated	ECM Regulators
HBEGF	1,71	2,27E-08	Matrisome-associated	Secreted Factors
AREG	1,60	2,07E-05	Matrisome-associated	Secreted Factors
ADAMTS9	1,58	4,18E-05	Matrisome-associated	ECM Regulators
SRGN	1,43	2,86E-08	Core matrisome	Proteoglycans
S100A9	1,38	3,16E-04	Matrisome-associated	Secreted Factors
IL1B	1,36	1,57E-05	Matrisome-associated	Secreted Factors
ADAMTS1	1,32	6,38E-08	Matrisome-associated	ECM Regulators
THBS1	1,30	2,75E-05	Core matrisome	ECM Glycoproteins
CRISPLD2	1,30	3,33E-06	Core matrisome	ECM Glycoproteins
MMP9	1,20	4,76E-04	Matrisome-associated	ECM Regulators
TNFSF14	1,10	2,25E-06	Matrisome-associated	Secreted Factors
VCAN	1,06	1,45E-04	Core matrisome	Proteoglycans
IL10	1,02	2,08E-05	Matrisome-associated	Secreted Factors
LEP	0,96	1,16E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
SEMA4A	0,93	2,44E-04	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
SERPINA3	0,91	1,57E-03	Matrisome-associated	ECM Regulators
BMP2	0,78	3,62E-04	Matrisome-associated	Secreted Factors
EGFLAM	0,78	1,31E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
S100P	0,76	3,33E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
CXCL8	0,73	3,93E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
SRPX2	0,72	6,41E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
SERPINB8	0,72	4,58E-04	Matrisome-associated	ECM Regulators
SDC4	0,68	4,90E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
C1QTNF1	0,68	1,86E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
SERPINA1	0,65	2,42E-03	Matrisome-associated	ECM Regulators
MMP2	0,65	1,60E-03	Matrisome-associated	ECM Regulators
FGL2	0,63	2,39E-04	Core matrisome	ECM Glycoproteins
LTBP2	0,63	5,26E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
SCUBE2	0,62	1,29E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
CCL8	0,61	2,67E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
CYR61	0,61	1,81E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
TSKU	0,61	1,54E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
FGF2	0,60	7,16E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
SERPINB1	0,55	5,63E-03	Matrisome-associated	ECM Regulators
VEGFA	0,53	1,39E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
FSTL3	0,50	1,02E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
S100A11	0,50	4,45E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
TIMP1	0,48	1,59E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
CCL23	0,43	3,12E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
THBS2	0,41	3,49E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins

ANGPTL1	0,39	4,98E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
IGFBP4	0,31	3,39E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
IGF1	-0,36	4,89E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
MMP14	-0,36	3,37E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
COL1A1	-0,37	2,95E-02	Core matrisome	Collagens
PDGFD	-0,47	2,00E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
FMOD	-0,51	1,48E-02	Core matrisome	Proteoglycans
RSPO1	-0,53	4,13E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
GAS6	-0,54	4,30E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
IGFBP5	-0,56	8,06E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
ANGPTL7	-0,58	2,80E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
COL14A1	-0,59	2,02E-02	Core matrisome	Collagens
P4HA2	-0,60	1,05E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
MXRA5	-0,64	1,44E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
ITLN2	-0,64	2,16E-02	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
WNT2B	-0,65	1,72E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
PODN	-0,66	3,32E-03	Core matrisome	Proteoglycans
NPNT	-0,68	7,36E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
NID2	-0,68	5,98E-04	Core matrisome	ECM Glycoproteins
COL27A1	-0,70	3,02E-03	Core matrisome	Collagens
IGSF10	-0,70	2,16E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
MST1L	-0,72	3,26E-05	Matrisome-associated	Secreted Factors
THSD4	-0,78	2,85E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
FGF9	-0,80	1,22E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
SERPINI1	-0,84	8,78E-04	Matrisome-associated	ECM Regulators
LGALS12	-0,87	2,92E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
BMP4	-0,91	1,09E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors

## TEJIDO ADIPOSO MESENTÉRICO (TAM)

Tabla A3. Genes del matrisoma con expresión diferencial entre grupos en el tejido adiposo mesentérico

GENE SYMBOL	Log FOLD CHANGE	P VALOR	MATRISOME DIVISION	MATRISOME CATEGORY
ADAMTS4	2,69	1,12E-06	Matrisome-associated	ECM Regulators
IL6	2,42	9,58E-06	Matrisome-associated	Secreted Factors
S100A12	2,32	1,97E-05	Matrisome-associated	Secreted Factors
S100A8	2,16	1,79E-05	Matrisome-associated	Secreted Factors
CLEC4E	1,90	2,90E-06	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
CCL18	1,68	1,94E-04	Matrisome-associated	Secreted Factors
SERPINE1	1,62	1,61E-03	Matrisome-associated	ECM Regulators
ADAMTS9	1,57	4,69E-05	Matrisome-associated	ECM Regulators
AREG	1,48	6,75E-05	Matrisome-associated	Secreted Factors
SERPINB2	1,41	1,41E-04	Matrisome-associated	ECM Regulators
ADAMTS1	1,39	2,07E-08	Matrisome-associated	ECM Regulators
TNFAIP6	1,39	1,04E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
CCL2	1,37	3,38E-04	Matrisome-associated	Secreted Factors
HBEGF	1,34	3,71E-06	Matrisome-associated	Secreted Factors
SRGN	1,32	1,66E-07	Core matrisome	Proteoglycans
SPP1	1,31	2,11E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
S100A9	1,18	1,71E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
ADAM22	1,05	4,88E-05	Matrisome-associated	ECM Regulators
SCUBE2	1,00	1,48E-04	Matrisome-associated	Secreted Factors
CRISPLD2	1,00	1,96E-04	Core matrisome	ECM Glycoproteins
THBS1	0,99	9,15E-04	Core matrisome	ECM Glycoproteins
BMP2	0,95	2,72E-05	Matrisome-associated	Secreted Factors
SRPX2	0,95	5,08E-04	Core matrisome	ECM Glycoproteins
MMP9	0,89	7,97E-03	Matrisome-associated	ECM Regulators
CLC	0,85	4,11E-02	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
FGL2	0,79	1,00E-05	Core matrisome	ECM Glycoproteins
SERPINA3	0,78	5,96E-03	Matrisome-associated	ECM Regulators
TSKU	0,78	2,38E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
COL4A1	0,77	4,89E-04	Core matrisome	Collagens
TNFSF8	0,76	5,92E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
IL10	0,75	1,14E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
LOX	0,69	4,14E-03	Matrisome-associated	ECM Regulators
PLXNC1	0,67	4,54E-02	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
SDC3	0,66	3,87E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
ANGPT2	0,66	2,16E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
LEP	0,66	2,19E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
CTSS	0,64	2,85E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
IL1B	0,62	3,37E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
FGF10	0,60	1,78E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
MMP19	0,60	2,11E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
SERPINB1	0,59	2,98E-03	Matrisome-associated	ECM Regulators
CYR61	0,59	2,18E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
ST14	0,58	2,05E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
SERPINA1	0,56	8,60E-03	Matrisome-associated	ECM Regulators
CTSH	0,56	8,81E-03	Matrisome-associated	ECM Regulators
VEGFA	0,53	1,36E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
TNFSF14	0,49	1,98E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
SERPINB8	0,49	1,27E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
CLEC1A	0,47	4,25E-02	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
C1QTNF1	0,46	2,99E-02	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
NID1	0,45	9,20E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
CTSD	0,45	2,02E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
ANGPTL1	0,43	3,42E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
VEGFC	0,42	1,95E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
ELN	0,41	4,81E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
MEGF9	0,41	2,97E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
CSTA	0,40	3,99E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators

TNFSF13	0,39	2,98E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
MMP2	0,39	4,84E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
INHBB	0,39	3,45E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
LAMC1	0,37	2,81E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
S100A11	0,35	3,79E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
MATN2	0,33	4,92E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
FBLN5	0,30	2,68E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
SVEP1	0,28	2,48E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
MUC1	-0,37	2,25E-02	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
S100A1	-0,45	4,56E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
SEMA4C	-0,45	2,52E-02	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
GPC4	-0,47	1,08E-02	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
SLPI	-0,48	4,05E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
CCL21	-0,50	9,87E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
NID2	-0,50	9,29E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
ADAM20	-0,51	2,47E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
SERPINI1	-0,51	3,60E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
MST1L	-0,53	1,37E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
COL1A1	-0,55	1,85E-03	Core matrisome	Collagens
COL15A1	-0,63	2,18E-03	Core matrisome	Collagens
ANXA8	-0,69	3,38E-02	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
FGF9	-0,69	4,78E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
SEMA5A	-0,74	7,79E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
FNDC1	-0,75	7,48E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
RSP01	-0,75	4,93E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
LOXL1	-0,76	9,78E-04	Matrisome-associated	ECM Regulators
AGT	-0,77	2,31E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
ITLN2	-0,79	5,22E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
BMP3	-0,81	1,14E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
LGALS12	-0,81	5,36E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
MXRA5	-0,84	1,65E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
ADAMTS16	-0,86	5,40E-03	Matrisome-associated	ECM Regulators
SEMA6C	-1,21	2,11E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins

## TEJIDO PERITONEAL (TP)

Tabla A4. Genes del matrisoma con expresión diferencial entre grupos en el tejido peritoneal

GENE SYMBOL	Log FOLD CHANGE	P VALOR	MATRISOME DIVISION	MATRISOME CATEGORY
ADAMTS4	3,93	1,37E-10	Matrisome-associated	ECM Regulators
IL6	3,35	1,32E-08	Matrisome-associated	Secreted Factors
ADAMTS9	2,30	3,25E-08	Matrisome-associated	ECM Regulators
SERPINE1	2,15	5,01E-05	Matrisome-associated	ECM Regulators
TNFAIP6	1,99	7,43E-06	Core matrisome	ECM Glycoproteins
S100A12	1,92	2,79E-04	Matrisome-associated	Secreted Factors
CCL2	1,88	2,81E-06	Matrisome-associated	Secreted Factors
CRISPLD2	1,74	6,28E-09	Core matrisome	ECM Glycoproteins
HBEGF	1,59	1,18E-07	Matrisome-associated	Secreted Factors
CLEC4E	1,51	1,09E-04	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
S100A8	1,37	4,13E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
THBS1	1,32	2,26E-05	Core matrisome	ECM Glycoproteins
SERPINA3	1,30	1,66E-05	Matrisome-associated	ECM Regulators
ADAMTS1	1,13	1,55E-06	Matrisome-associated	ECM Regulators
S100A9	1,00	6,69E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
AREG	0,95	7,42E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
CYR61	0,90	6,96E-04	Core matrisome	ECM Glycoproteins
SRGN	0,90	1,25E-04	Core matrisome	Proteoglycans
PPBP	0,85	4,25E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
S100P	0,79	2,22E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
BMP2	0,75	5,78E-04	Matrisome-associated	Secreted Factors
ADAMTS3	0,73	5,82E-04	Matrisome-associated	ECM Regulators
MMRN1	0,71	1,06E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
MEGF9	0,71	2,73E-04	Matrisome-associated	Secreted Factors
SERPINB1	0,71	4,63E-04	Matrisome-associated	ECM Regulators
SRPX2	0,68	9,55E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
CCL8	0,66	1,70E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
COL4A1	0,66	2,51E-03	Core matrisome	Collagens
CLEC1A	0,64	7,42E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
KITLG	0,64	3,19E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
CSF3	0,63	1,39E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
CXCL8	0,63	1,26E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
BMP5	0,57	1,06E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
SEMA6A	0,57	2,62E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
VEGFA	0,56	9,18E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
WNT5A	0,53	9,99E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
MMP19	0,53	4,06E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
CLEC4A	0,51	1,75E-02	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
LG14	0,51	3,66E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
CTSG	0,49	1,25E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
CSTA	0,47	1,67E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
ANGPTL1	0,46	2,35E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
CTGF	0,45	2,29E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
IL15	0,44	2,42E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
CCL24	0,43	1,12E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
THBS2	0,43	2,68E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
FGL2	0,40	1,65E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
INHBB	0,38	3,74E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
MEGF6	0,38	4,65E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
GPC4	0,38	3,71E-02	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
MDK	-0,34	2,74E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors



MMP14	-0,40	1,99E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
PLXNA3	-0,40	2,92E-02	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
SBSPOP	-0,42	1,37E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
CTSH	-0,45	3,33E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
FBN1	-0,47	2,88E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
SEMA3G	-0,50	3,07E-02	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
CXCL12	-0,53	7,13E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
THSD4	-0,54	3,55E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
FGF10	-0,55	3,04E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
ADAM20	-0,56	1,35E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
COL27A1	-0,56	1,58E-02	Core matrisome	Collagens
ANXA6	-0,56	4,67E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
ADAM12	-0,57	4,62E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
PTN	-0,58	8,39E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
S100B	-0,66	4,24E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
CD209	-0,66	4,99E-02	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
SMOC1	-0,67	1,07E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
COL1A1	-0,67	2,04E-04	Core matrisome	Collagens
TLL1	-0,69	1,68E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
CCL16	-0,72	1,30E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
P4HA2	-0,73	2,28E-03	Matrisome-associated	ECM Regulators
PLXNA4	-0,78	9,34E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
LGALS12	-0,82	4,57E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
ADAMTS16	-1,36	2,97E-05	Matrisome-associated	ECM Regulators

## TEJIDO ADIPOSOS SUBCUTÁNEO (TAS)

Tabla A5. Genes del matrisoma con expresión diferencial entre grupos en el tejido adiposo subcutáneo

GENE SYMBOL	Log FOLD CHANGE	P VALOR	MATRISOME DIVISION	MATRISOME CATEGORY
ITLN1	1,87	1,04E-04	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
SPP1	1,22	3,11E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
PRG4	1,14	1,91E-04	Core matrisome	Proteoglycans
ST14	1,08	4,39E-05	Matrisome-associated	ECM Regulators
ANXA8	1,03	1,95E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
CLEC4E	1,03	6,20E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
C1QB	0,94	2,92E-04	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
WNT2B	0,93	9,10E-04	Matrisome-associated	Secreted Factors
TNFSF14	0,82	2,19E-04	Matrisome-associated	Secreted Factors
WISP2	0,82	1,03E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
LTBP2	0,80	5,06E-04	Core matrisome	ECM Glycoproteins
CRISPLD2	0,79	2,48E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
ADAM22	0,77	1,96E-03	Matrisome-associated	ECM Regulators
S100A3	0,75	1,06E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
SMOC2	0,75	3,55E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
MMP19	0,74	4,90E-03	Matrisome-associated	ECM Regulators
THBS2	0,73	3,01E-04	Core matrisome	ECM Glycoproteins
MMP9	0,72	2,83E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
EDIL3	0,66	8,75E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
ANGPT2	0,66	2,12E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
PAPLN	0,65	9,31E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
COL6A2	0,62	1,05E-03	Core matrisome	Collagens
HTRA3	0,60	1,20E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
RSPO1	0,59	2,39E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
TIMP1	0,59	3,34E-03	Matrisome-associated	ECM Regulators
SERPINB8	0,58	4,03E-03	Matrisome-associated	ECM Regulators
F13A1	0,56	3,44E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
ADAMTS18	0,55	1,40E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
FAM20A	0,55	1,84E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
C1QA	0,50	4,68E-02	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
COL4A1	0,49	2,23E-02	Core matrisome	Collagens
ADAMTS5	0,47	1,90E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
MMP2	0,47	1,87E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
KCP	0,47	5,47E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
ADAMTS2	0,45	2,00E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
ITIH5	0,45	3,09E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
TGFBI	0,43	4,57E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
TNFSF12	0,41	2,80E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
VWF	0,40	3,13E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
GPC4	0,39	3,39E-02	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
COL1A1	-0,40	2,17E-02	Core matrisome	Collagens
ADAM20	-0,47	3,63E-02	Matrisome-associated	ECM Regulators
S100B	-0,55	1,58E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
FNDC1	-0,58	3,61E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
IGF1	-0,61	1,22E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
FMOD	-0,70	1,08E-03	Core matrisome	Proteoglycans
CRHBP	-0,78	2,38E-02	Matrisome-associated	Secreted Factors
LGALS12	-0,82	4,54E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
CLC	-0,85	4,07E-02	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
SERPINI1	-0,99	1,25E-04	Matrisome-associated	ECM Regulators
PPBP	-1,23	3,89E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors

## 10.5. ANEXO V: GENES CON MAYOR EXPRESIÓN DIFERENCIAL ENTRE GRUPOS POR TEJIDOS

De todos los GEDs entre grupos del matrisoma listados en el **Anexo IV**, a continuación se listan (**Tabla A6**) y se explica la función de los 3 genes con mayor sobre e infraexpresión en el grupo de pacientes con obesidad en cada uno de los 4 tejidos.

**Tabla A6. Genes del matrisoma con mayor expresión diferencial entre grupos**

<b>TEJIDO ADIPOSO EPIPLOICO (TAE)</b>				
<b>GEN</b>	<b>Log2 FOLD CHANGE</b>	<b>P VALOR</b>	<b>MATRISOME DIVISION</b>	<b>MATRISOME CATEGORY</b>
ADAMTS4	3,65	1,01E-09	Matrisome-associated	ECM Regulators
IL6	3,34	1,38E-08	Matrisome-associated	Secreted Factors
SERPINE1	3,18	3,10E-08	Matrisome-associated	ECM Regulators
SERPINI1	-0,84	8,78E-04	Matrisome-associated	ECM Regulators
LGALS12	-0,87	2,92E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
BMP4	-0,91	1,09E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors
<b>TEJIDO ADIPOSO MESENTÉRICO (TAM)</b>				
<b>GEN</b>	<b>Log2 FOLD CHANGE</b>	<b>P VALOR</b>	<b>MATRISOME DIVISION</b>	<b>MATRISOME CATEGORY</b>
ADAMTS4	2,69	1,12E-06	Matrisome-associated	ECM Regulators
IL6	2,42	9,58E-06	Matrisome-associated	Secreted Factors
S100A12	2,32	1,97E-05	Matrisome-associated	Secreted Factors
MXRA5	-0,84	1,65E-03	Core matrisome	ECM Glycoproteins
ADAMTS16	-0,86	5,40E-03	Matrisome-associated	ECM Regulators
SEMA6C	-1,21	2,11E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
<b>TEJIDO PERITONEAL (TP)</b>				
<b>GEN</b>	<b>Log2 FOLD CHANGE</b>	<b>P VALOR</b>	<b>MATRISOME DIVISION</b>	<b>MATRISOME CATEGORY</b>
ADAMTS4	3,93	1,37E-10	Matrisome-associated	ECM Regulators
IL6	3,35	1,32E-08	Matrisome-associated	Secreted Factors
ADAMTS9	2,30	3,25E-08	Matrisome-associated	ECM Regulators
PLXNA4	-0,78	9,34E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
LGALS12	-0,82	4,57E-03	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
ADAMTS16	-1,36	2,97E-05	Matrisome-associated	ECM Regulators
<b>TEJIDO ADIPOSO SUBCUTANEO (TAS)</b>				
<b>GEN</b>	<b>Log2 FOLD CHANGE</b>	<b>P VALOR</b>	<b>MATRISOME DIVISION</b>	<b>MATRISOME CATEGORY</b>
ITLN1	1,87	1,04E-04	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
SPP1	1,22	3,11E-02	Core matrisome	ECM Glycoproteins
PRG4	1,14	1,91E-04	Core matrisome	Proteoglycans
CLC	-0,85	4,07E-02	Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins
SERPINI1	-0,99	1,25E-04	Matrisome-associated	ECM Regulators
PPBP	-1,23	3,89E-03	Matrisome-associated	Secreted Factors

## TEJIDO ADIPOSO EPIPLOICO (TAE)

### Genes con mayor sobre-expresión

#### *ADAMTS4 (Desintegrina y metaloproteinasa con dominios trombospondina 4)*

Metalopeptidasa de la familia ADAMTS, que incluye 19 proteasas secretadas que utilizan iones metálicos como cofactor. Está implicada en la degradación de la MEC. Se localiza en el espacio extracelular.

Se trata de una endopeptidasa que se une al agregano (uno de los principales proteoglicanos presente en la MEC de los tejidos cartilagosos) y se cree que participa en su degradación. Utiliza el zinc como cofactor.

Se ha relacionado con la degradación del cartílago en enfermedades artríticas y con la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer.

#### *IL6 (Interleuquina 6)*

Citoquina con una amplia variedad de funciones biológicas en relación a la inmunidad, la regeneración tisular y el control metabólico.

La unión de IL6 al receptor específico IL6R (CD126) da lugar a la activación de la vía de señalización intracelular IL6<sup>(313)</sup>. Para una señalización intracelular efectiva, IL6R debe asociarse a gp130. El receptor IL6R puede estar en la membrana de ciertos tipos celulares, en cuyo caso la interacción IL6-IL6R da lugar a la estimulación de la “vía de señalización clásica” (con acción anti-inflamatoria), o puede encontrarse en forma soluble (sIL6R), pudiendo asociarse a la molécula gp130 de cualquier tipo celular activando la “transeñalización” (con efecto pro-inflamatorio). Recientemente se ha descrito una tercera forma de señalización de IL6, la llamada “transpresentación”<sup>(314)</sup>, en la que una célula que expresa IL6R en su membrana, tras la unión de IL6, presenta esta citoquina a otra célula próxima que sólo expresa gp130.

IL6 es un potente inductor de la respuesta de fase aguda. La rápida producción de esta citoquina contribuye a la defensa del organismo durante la infección y el daño tisular; sin embargo, el exceso de su síntesis se relaciona con diversos estados patológicos. En la respuesta inmune innata, IL6 es sintetizada por las células mieloides (como los macrófagos y las células dendríticas) en respuesta al reconocimiento de patógenos mediado por los receptores toll-like (TLRs) en el lugar de la infección o el tejido lesionado. En la respuesta inmune adaptativa, IL6 es necesaria para la diferenciación de células B en células secretoras de inmunoglobulinas, y participa también en el proceso de diferenciación de las células T CD4+ en sus diferentes subtipos.

Actúa como factor esencial en la homeostasis del tejido óseo y vascular, ya sea de forma directa o mediante la inducción por parte de VEGF, provocando un aumento de la actividad angiogénica

y de la permeabilidad vascular<sup>(315)</sup>. Mediante la vía de transeñalización y de forma sinérgica con IL1 y TNF, IL6 induce la síntesis de VEGF<sup>(316)</sup>.

Respecto a sus funciones en el control metabólico, IL6 es abocada al torrente sanguíneo tras la contracción muscular, incrementando la lipólisis y mejorando la resistencia a la insulina<sup>(317)</sup>. A nivel del sistema nervioso central y mediante transeñalización también actúa en el control de la homeostasis energética y de la glucosa. Además, mediante la acción de GLP-1, interviene en la señalización entre los tejidos sensibles a la insulina, las células L intestinales y los islotes pancreáticos, participando en la adaptación de los mismos a los cambios insulínicos.

### *SERPINE1 (Serpina Familia E Miembro 1)*

Las serpinas (del inglés, serine protease inhibitors) son una superfamilia de proteínas caracterizadas principalmente por ser inhibidores de proteasas (en este caso de serin-proteasas).

*SERPINE1* es un gen que codifica para una proteína llamada “inhibidor del activador del plasminógeno 1” (PAI-1, *Plasminogen activator inhibitor 1*). PAI-1 es el principal inhibidor fisiológico del sistema fibrinolítico, por lo que su actividad se considera pro-trombótica.

PAI-1 actúa a nivel del espacio extracelular y también de la membrana plasmática. Actúa como inhibidor de PLAT (*tissue-type plasminogen activator*) y de PLAU (*urokinase-type plasminogen activator*). Como inhibidor de PLAT, es un factor necesario para la regulación de la fibrinólisis y es responsable del control de la degradación del coágulo. Como inhibidor de PLAU, está implicado en la regulación de la adhesión y migración celular (de forma independiente de su actividad proteasa).

También está implicado en los procesos de regeneración y senescencia celular.

### **Genes con mayor infra-expresión**

#### *SERPINI1 (Neuroserpina)*

*SERPINI1* es un gen que codifica para una proteína llamada “neuroserpina”, involucrada en la formación y organización de sinapsis y en la plasticidad sináptica del sistema nervioso adulto en el humano.

#### *LGALS12 (Galectina 12):*

La galectina 12 es una proteína con dominios de unión a carbohidratos, que en este caso se une a la lactosa.

Se ha relacionado con el proceso de apoptosis adipocitaria.

### *BMP4 (Proteína morfogénica ósea 4):*

El factor morfogénico del hueso 4 es un polipéptido perteneciente a la superfamilia TGF- $\beta$ , la cual incluye una gran cantidad de familias de factores de crecimiento y diferenciación celular.

BMP4 se relaciona con los procesos de desarrollo del tejido óseo y cartilaginoso, así como en la reparación tisular tras la fractura.

También se ha relacionado con la regulación de vías de señalización dependientes de MAP quinasas.

## **TEJIDO ADIPOSO MESENTÉRICO (TAM)**

### **Genes con mayor sobre-expresión**

#### *ADAMTS4:*

Ver genes con mayor sobre-expresión en TAE.

#### *IL-6*

Ver genes con mayor sobre-expresión en TAE.

#### *S100A12 (proteína de unión al calcio S100 A12)*

Gen que codifica para una proteína también conocida como *calgranulina C*.

Se trata de una proteína con dominios de unión a calcio, zinc y cobre, que juega un importante papel en la regulación de la inflamación y la respuesta inmune.

Tiene actividad pro-inflamatoria relacionada con el reclutamiento de leucocitos, producción de citoquinas y regulación de la adhesión y migración leucocitaria.

### **Genes con mayor infra-expresión**

#### *MXRA5 (Adlicán)*

También conocido como “adlicán”, es una proteína de adhesión relacionada con la remodelación de la MEC y la adhesión entre células<sup>(318)</sup>. Dispone de varios dominios de unión al perlacán (gran proteoglicano implicado en la unión de múltiples componentes de la MEC con moléculas de adhesión de las membranas celulares). Presenta una elevada expresión en el tejido renal y en tejidos lesionados.

Aunque sus funciones aún no están completamente establecidas, se ha demostrado una regulación por parte de TGF- $\beta$ 1 y se le han atribuido propiedades anti-inflamatorias y anti-fibróticas. Su inhibición se ha relacionado con una sobreexpresión de proteínas de matriz extracelular <sup>(319)</sup>.

#### *ADAMTS16 (Desintegrina y metaloproteinasa con dominios trombospondina 16)*

Metalopeptidasa de la familia ADAMTS, que incluye 19 proteasas secretadas que utilizan iones metálicos como cofactor.

La proteína codificada por este gen debe ser procesada mediante proteólisis para generar la forma proteica madura. Aunque su función es poco conocida, ADAMTS16 se expresa en el cartílago humano y se encuentra sobre-expresado en la artritis. Se cree que su actividad puede inhibir la proliferación y migración celular en el condrosarcoma, y se ha postulado también un papel en la regulación de la tensión arterial.

#### *SEMA6C (Semaforina 6C)*

La semaforina 6C es una proteína de la familia de las semaforinas, encargadas de la regulación de múltiples procesos de señalización relacionados con la respuesta celular a la lesión neuronal, por lo que se cree que pueden estar implicadas en la regeneración neuronal.

Las semaforinas han sido también relacionadas con el crecimiento tumoral, la angiogénesis, la regulación de la respuesta inmune, y en los últimos años también con alteraciones metabólicas incluyendo la obesidad, la inflamación del tejido adiposo y las complicaciones microvasculares de la diabetes <sup>(320)</sup>.

## **TEJIDO PERITONEAL (TP)**

### **Genes con mayor sobre-expresión**

#### *ADAMTS4*

Ver genes con mayor sobre-expresión en TAE.

#### *IL-6*

Ver genes con mayor sobre-expresión en TAE.

#### *ADAMTS9 (Desintegrina y metaloproteinasa con dominios trombospondina 9)*

Metalopeptidasa implicada en la degradación de los grandes proteoglicanos de la MEC como el agregano y el versican. Utiliza el zinc como cofactor.

ADAMTS9 posee además una función independiente de su actividad peptidasa promoviendo el transporte de diferentes componentes secretados desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi.

### Genes con mayor infra-expresión

#### *PLXNA4 (Plexina A4)*

Proteína de la membrana plasmática, que actúa como co-receptor necesario para la activación de receptores de las semaforinas de clase 3, implicadas en la remodelación del citoesqueleto.

Esta proteína está implicada en la axonogénesis y el desarrollo del sistema nervioso.

#### *LGALS12*

Ver genes con mayor infra-expresión en TAE.

#### *ADAMTS16*

Ver genes con mayor infra-expresión en TAM.

## TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO (TAS)

### Genes con mayor sobre-expresión

#### *ITLN1 (Interlectina 1)*

Las intelectinas son proteínas secretadas y multiméricas, con un dominio de unión a carbohidratos dependiente de calcio. Se trata de un tipo de proteínas que han sido preservadas durante la evolución del phylum Chordata y que se expresan en numerosas superficies mucosas, lo cual sugiere un papel de estas proteínas en la inmunidad innata.

Las intelectinas han sido relacionadas con varios estados patológicos como la enfermedad inflamatoria intestinal, la obesidad, la diabetes y el asma <sup>(321–323)</sup>.

La intelectina 1 se une específicamente a cadenas de carbohidratos de bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas, incluyendo *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *Y. pestis*, *P. mirabilis* entre otros <sup>(324)</sup>. Por el contrario, ITLN1 no se une a glicanos humanos.

Además de su función en el sistema de defensa contra microorganismos, ITLN1 puede funcionar como adipocina estimulando la captación adipocitaria de glucosa dependiente de insulina <sup>(325)</sup>.

### *SPP1 (fosfoproteína secretada 1 o osteopontina 1)*

La osteopontina es una proteína extracelular estructural perteneciente a una familia de proteínas ácidas secretadas llamada SIBLINGs (*Small Integrin Binding Ligand N-Glycosylated proteins*), cuyos miembros están compuestos por abundantes aminoácidos de carga negativa.

La osteopontina puede unirse fuertemente a átomos de calcio presentes en la superficie de gran cantidad de biominales, de forma que es uno de los principales reguladores de la mineralización a nivel de la matriz extracelular del tejido óseo.

La osteopontina es además un factor anti-apoptótico para diferentes tipos celulares como macrófagos, células T, fibroblastos y células endoteliales.

Otras de las funciones de la osteopontina están relacionadas con la quimiotaxis, promoviendo el reclutamiento de células inflamatorias, además de intervenir en mecanismos de adhesión celular.

### *PRG4 (Proteoglicano 4)*

Proteoglicano también llamado *lubricina* por su papel lubricante a nivel articular. El proteoglicano 4, como componente estructural de la MEC a nivel articular, evita los depósitos proteicos del líquido sinovial en el cartílago de las superficies articulares mediante la inhibición de la adhesión de las células sinoviales a la superficie cartilaginosa. Existen diferentes isoformas descritas.

Si bien fue inicialmente descrito a nivel articular, evidencia reciente ha sugerido un importante papel del proteoglicano 4 como regulador de la respuesta inflamatoria tisular. En este sentido, se ha postulado que el proteoglicano 4 podría unirse a diferentes receptores de membrana celulares implicados en diferentes vías de señalización, actuando como molécula mediadora de la inflamación y reguladora de la homeostasis tisular<sup>(326)</sup>.

## **Genes con mayor infra-expresión**

### *CLC (Galectina 10)*

Gen que codifica para una proteína de la superfamilia de las galectinas, un grupo de proteínas de unión a  $\beta$ -galactósidos. Poseen dominios de unión a carbohidratos.

La galectina 10 es una enzima de la familia de las lisofosfolipasas, que actúan a nivel de las membranas celulares regulando la función de los lisofosfolípidos.

La galectina 10 se expresa en eosinófilos y basófilos, hidrolizando lisofosfatidilcolina en glicerofosfocolina y un ácido graso libre.



También se ha relacionado esta proteína con procesos inflamatorios.

### *SERPINI1 (Neuroserpina)*

Ver genes con mayor infra-expresión en TAE.

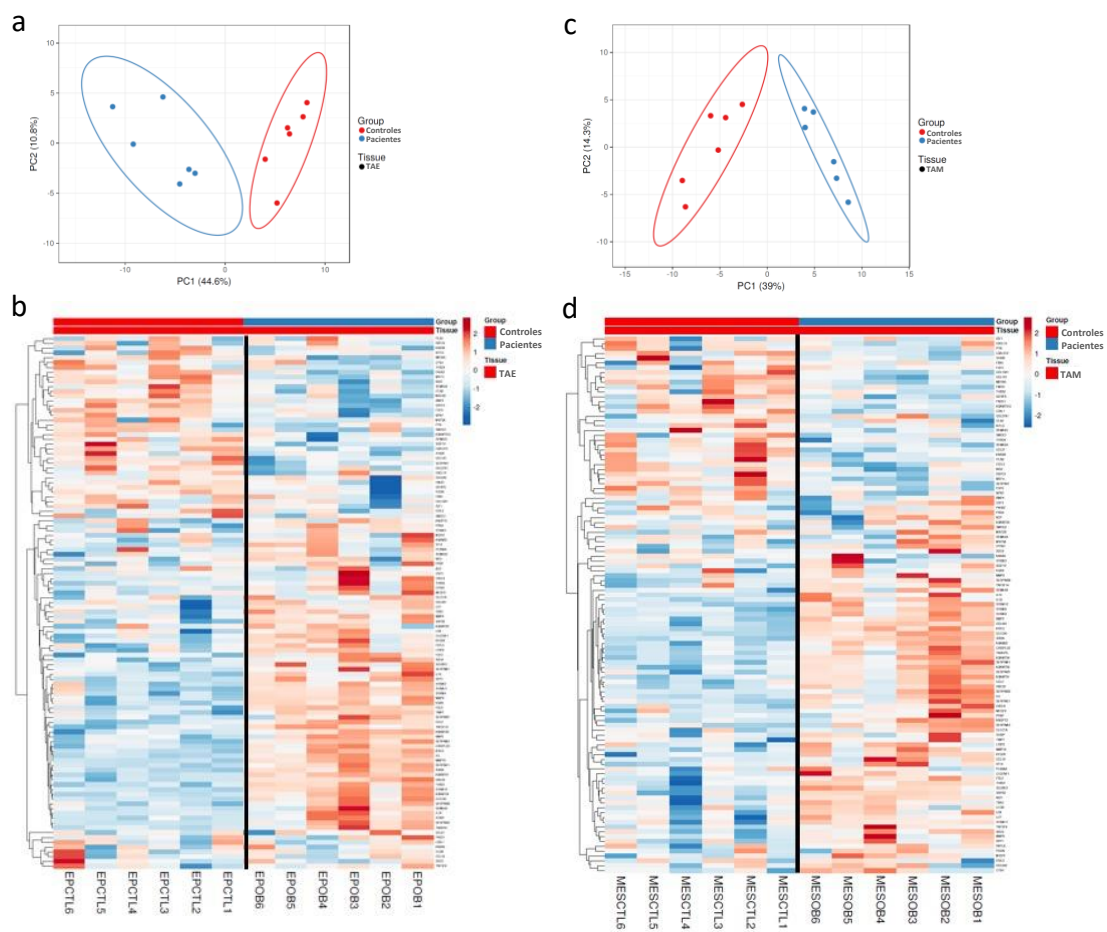
### *PPBP (Proteína básica pro-plaquetar)*

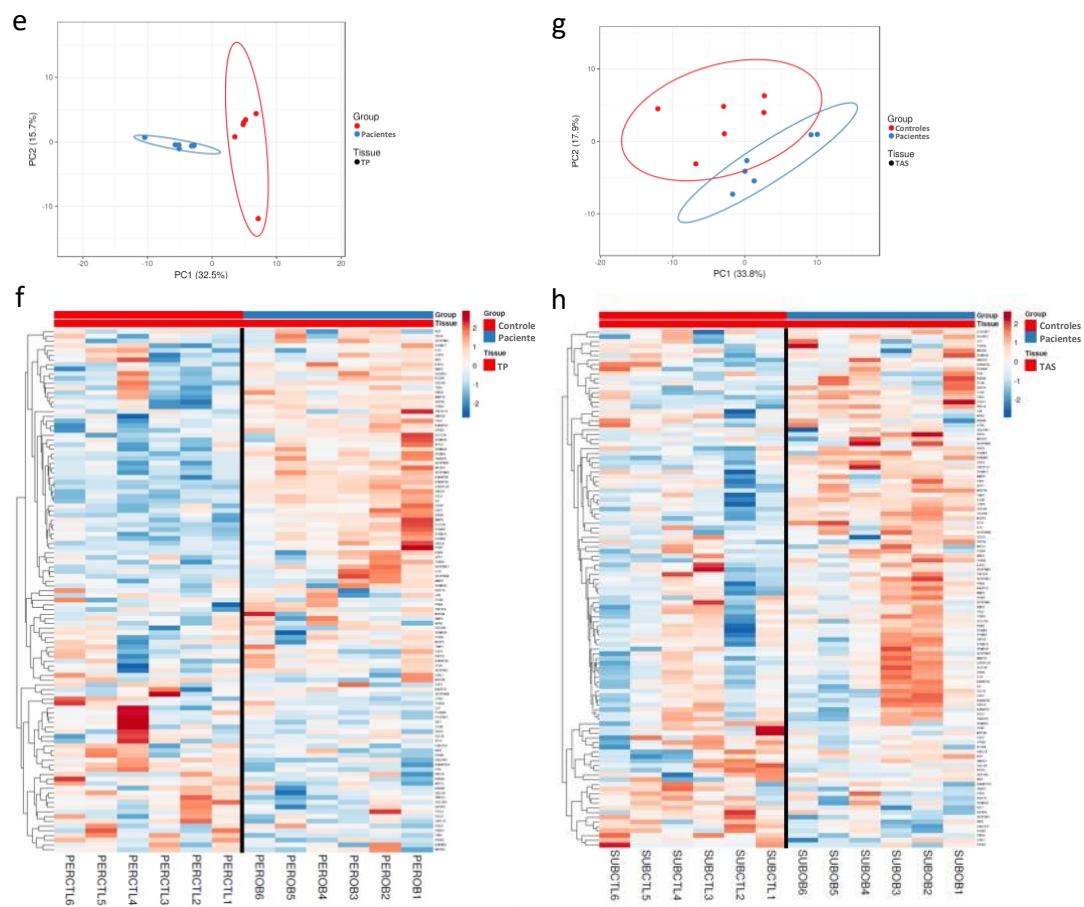
También llamado CXCL7, este gen codifica para una proteína que es secretada en grandes cantidades por parte de las plaquetas tras su activación. Esta proteína precursora será posteriormente procesada en plasma a  $\beta$ -tromboglobulina (TGB) y péptido activador de neutrófilos 2 (NAP2).

Sus funciones incluyen la estimulación de procesos tales como la mitogénesis, la síntesis de componentes de matriz extracelular, la regulación del metabolismo glucídico y la síntesis de activador del plasminógeno.

## 10.6. ANEXO VI: ANÁLISIS NO SUPERVISADO (PCAs y CLUSTERING)

A continuación, se representan varios *heatmaps* mediante los cuáles se representan por separado los distintos patrones de expresión de los genes con expresión diferencial relacionados con la MEC en cada uno de los cuatro tejidos estudiados entre el grupo de pacientes con obesidad y el grupo control (**Figura 4A**). Los *heatmaps* se acompañan del PCA correspondiente a cada comparación para facilitar la interpretación de las diferencias entre los tejidos de ambos grupos.





**Figura 4A. PCA y heatmap para comparaciones múltiples por grupos y tejidos.** Expresión de genes relacionados con la matriz extracelular en el tejido adiposo epiloico (TAE, **a** y **b**), tejido adiposo mesentérico (TAM, **c** y **d**), tejido peritoneal (TP, **e** y **f**) y tejido adiposo subcutáneo (TAS, **g** y **h**) en el grupo de pacientes y el grupo control. Valor ajustado de  $p < 0.05$ .

## 10.7. ANEXO VII: SELECCIÓN DE GENES MÁS REPRESENTATIVOS DE LOS PROCESOS ENRIQUECIDOS

De entre los genes relacionados con procesos enriquecidos en los tejidos de los pacientes con obesidad, se seleccionaron los siguientes 11 genes representativos:

- Proteoglicanos:
  - VCAN
  - PRG4
  - SRGN
- Factores secretados:
  - S100A8
- Glicoproteínas de la MEC:
  - CRISPLD2
  - THBS1
- Reguladores de la MEC:
  - ADAMTS1
  - ADAMTS4
  - ADAMTS9
  - MMP19
- Constituyentes de la MEC (relacionados con la migración celular):
  - HAS1

### PROTEOGLICANOS

#### *VCAN (Versicano)*

Gran condroitin-sulfato-proteoglicano de la familia de los lecticanos o hialectanos (junto al agregano, brevicano y neurocano). Como los demás componentes de la familia de los lecticanos, posee un dominio de unión al ácido hialurónico.

El versicano uno de los principales macro-componentes de la MEC (masa molecular superior a 1000kDa). Se han descrito múltiples variantes transcripcionales del gen *VCAN* dando lugar a diferentes isoformas presentes en la MEC.

El versicano tiene un papel fundamental en la adhesión inter-celular y la adhesión de las células a la MEC, participando en procesos de señalización intracelular relacionados con la migración, crecimiento y diferenciación celular, así como la angiogénesis.

La expresión de versicano se encuentra aumentada en múltiples situaciones patológicas que condicionan grandes cambios a nivel de la MEC, como pueden ser procesos de inflamación y

regeneración tisular o diferentes procesos neoplásicos, donde la expresión de versicano se ha relacionado con los mecanismos de progresión tumoral y metástasis<sup>(327)</sup>.

#### *PRG4 (Proteoglicano 4)*

Ver **Anexo V**: Genes con sobre-expresión en TAS.

#### *SRGN (Serglicina)*

También conocida como serglicina, proteína del núcleo del proteoglicano hematopoyético o proteína del núcleo del proteoglicano del gránulo secretor. Se expresa en células hematopoyéticas y es secretada de forma constitutiva por células endoteliales y macrófagos.

Está implicada en la formación de los gránulos secretores de los mastocitos y en el almacenamiento de diferentes compuestos en forma de vesículas secretoras.

Participa en el almacenaje de proteasas en diferentes localizaciones, y es esencial para el almacenaje de granzima B en los linfocitos T citotóxicos. En este sentido, *SRGN* tiene un papel esencial en el proceso de apoptosis mediada por gránulos citotóxicos secretados por los linfocitos T activados. La proteína *SRGN* participa en la formación de un complejo con la granzima B, que en respuesta a determinadas señales de activación es secretado en forma de gránulos y penetra en las células mediante la acción de la perforina para inducir la apoptosis.

También regula la secreción de TNF- $\alpha$  y determinadas proteasas.

## **FACTORES SECRETADOS**

#### *S100A8 (Calgranulina A)*

También llamada calgranulina A, *S100A8* es una proteína de la familia *S100* localizadas predominantemente en el citoplasma de ciertos tipos celulares y relacionadas con la regulación de una gran cantidad de procesos como la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la diferenciación celular, así como la respuesta inflamatoria.

*S100A8* es una proteína con dominios de unión a calcio y zinc relacionada con los procesos de inflamación y respuesta inmune, induciendo la quimiotaxis y adhesión de neutrófilos.

Su expresión es inducida por citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$ , y se han descrito diferentes isoformas.

La proteína *S100A8* se encuentra predominantemente en forma de heterodímero *S100A8/A9* o calprotectina, la cual se ha relacionado con múltiples funciones intra y extracelulares.

La calprotectina supone el 45% del componente proteico soluble en el citosol de los neutrófilos, y es secretada por medio de un mecanismo no completamente definido durante los procesos

inflamatorios. La producción de calprotectina se encuentra fuertemente estimulada en procesos traumáticos, de estrés, infecciosos e inflamatorios.

La expresión alterada de *S100A8* se asocia a situaciones patológicas como la fibrosis quística<sup>(274)</sup>.

## GLICOPROTEÍNAS DE LA MEC

### *CRISPLD2 (Proteína secretada rica en cisteína con dos dominios LCCL de unión a lipopolisacáridos)*

También llamada *CRISP11 (Cysteine-rich secretory protein 11)*. Se trata de una proteína secretada rica en cisteína con dos dominios LCCL de unión a lipopolisacáridos (componente inmunoestimulador de las bacterias gram-negativas). Los dominios LCCL se relacionan con la protección frente a la endotoxina, y están implicados en la respuesta inmune independiente de anticuerpos<sup>(328)</sup>.

CRISPLD2 modula la morfogénesis de la vía aérea y la alveologénesis durante la etapa embrionaria y tiene un papel en la maduración del epitelio pulmonar<sup>(329)</sup>

A nivel de la MEC, CRISPLD2 promueve el ensamblaje de diferentes componentes mediante la unión a glicosaminoglicanos.

### *THBS1 (Trombospondina 1)*

Proteína de la familia de las trombospondinas, con funciones antiangiogénicas y antitumorales.

La trombospondina-1 es una glicoproteína de adhesión con múltiples dominios que actúa como mediadora en las interacciones célula-célula y célula-MEC. Se une a fibronectina, laminina y a los colágenos tipo V y VII entre otros. Se expresa predominantemente en el tejido adiposo visceral.

La trombospondina 1 se ha relacionado con la modulación tanto positiva como negativa de los procesos de adhesión migración y crecimiento de las células endoteliales. De hecho, esta proteína interacciona con al menos 12 receptores relacionados con la adhesión celular, incluyendo CD36 (actúa como ligando de CD36 activando una respuesta antiangiogénica), integrinas- $\alpha$ V y  $\beta$ 1, sindecano y proteína asociada a integrinas (IAP o CD47). También interacciona con múltiples proteasas relacionadas con la angiogénesis como el plasminógeno, la uroquinasa, las MMP's, la trombina, la catepsina y la elastasa.

Tiene un papel en la agregación plaquetar y también en la respuesta adaptativa al estrés del retículo endoplasmático por medio de la interacción con ATF6 (*activating transcription factor 6 alpha*).

Se ha descrito la sobre-expresión de THBS1 asociada a la obesidad, y su expresión se encuentra elevada en pacientes con obesidad y resistencia a la insulina<sup>(30,282)</sup>. En ratones, la dieta rica en

grasas induce la expresión de THBS1 en el tejido adiposo y aumenta los niveles de THBS1 circulante<sup>(282)</sup>. La delección del gen THBS1 en ratones ha demostrado ser un factor protector contra la inflamación del tejido adiposo y la resistencia insulínica inducida por dieta<sup>(282)</sup>.

## REGULADORES DE LA MEC

### *ADAMTS1 (Desintegrina y metaloproteinasa con dominios trombospondina 1)*

Metalopeptidasa implicada en la degradación de la MEC. Se localiza en el espacio extracelular, en la membrana basal y también en las vesículas citoplasmáticas. Implicada en la degradación del agregano, uno de los principales proteoglicanos presente en la MEC de los tejidos cartilagosos. Utiliza el zinc como cofactor.

Su actividad como peptidasa se asocia con múltiples procesos inflamatorios, así como con el desarrollo de caquexia en las enfermedades neoplásicas.

Posee actividad inhibitoria de la angiogénesis.

### *ADAMTS4 (Desintegrina y metaloproteinasa con dominios trombospondina 4)*

Ver **Anexo V**: Genes con sobre-expresión en TAE.

### *ADAMTS9 (Desintegrina y metaloproteinasa con dominios trombospondina 9)*

Ver **Anexo V**: Genes con sobre-expresión en TP.

### *MMP19 (Metaloproteinasa de matriz 19)*

Las MMP's son una familia de metalopeptidasas localizadas en el espacio extracelular que juegan un papel esencial en la regulación de la remodelación de la MEC, estando implicadas en la degradación de prácticamente todos los componentes de la MEC (elastasas, colagenasas, etc). Se trata de endopeptidasas con varios dominios de unión a iones zinc y dependientes de iones calcio como cofactores.

Específicamente inhibidas por la familia de peptidasas TIMP, la desregulación de la actividad de MMP's se relaciona con la fisiopatología de la obesidad y de la resistencia a la insulina en humanos<sup>(30)</sup>.

MMP19 esta implicada en la degradación de varios componentes de la MEC como el agregano. Hidroliza el colágeno tipo IV, el nidógeno, la laminina y la fibronectina, entre otros. Se cree que también podría tener un papel en los procesos de neovascularización o angiogénesis a nivel de la MEC.

Fuertemente inhibida por TIMP-2, TIMP-3 TIMP-4, y en menor medida por TIMP-1.

Al igual que *ADMTS4*, *MMP19* se ha relacionado con la degradación del cartílago en enfermedades artríticas.

## CONSTITUYENTES DE LA MEC

### *HAS1 (Hialuronano sintasa 1)*

Es uno de las tres isoenzimas responsables de la síntesis celular de ácido hialurónico o hialuronano, uno de los componentes estructurales principales de la MEC en múltiples tipos tisulares formando macromoléculas mediante la unión a proteoglicanos.

HAS1 despertó inicialmente poco interés, ya que su papel como enzima productor de hialuronano es mucho menor que el de HAS2 o HAS3. De hecho, *HAS1* presenta habitualmente una baja expresión tisular y requiere de altas concentraciones de azúcares precursores para la síntesis de hialuronano. Sin embargo, HAS1 ha demostrado tener una regulación asociada a los estados inflamatorios, siendo su expresión y actividad fuertemente inducidas por distintos factores pro-inflamatorios (citoquinas e interleuquinas entre otros).

La capa de hialuronano pericelular producida por HAS1 (enzima con una distribución intracelular mucho mayor en comparación con el resto de isoenzimas) es habitualmente fina en ausencia de la inducción mediada por agentes inflamatorios o situaciones de estrés relacionadas con el metabolismo glicídico. Estas interacciones específicas, mediadas por la interacción hialuronano-CD44, regulan la organización del hialuronano en una matriz reclutadora de leucocitos y factores quimiotácticos durante la respuesta inflamatoria <sup>(30)</sup>. La interacción hialuronano-CD44 también se ha relacionado con la migración celular <sup>(1)</sup> y con la activación de vías de señalización aberrante relacionadas con la progresión tumoral <sup>(30)</sup>. Por tanto, a pesar de su aparentemente escasa actividad enzimática en condiciones normales, HAS1 tiene un importante papel regulador de la MEC en situaciones como la inflamación, el estrés glicémico en el síndrome metabólico y otras situaciones patológicas como algunos procesos neoplásicos.



## 10.8. ANEXO VIII: DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN ENTRE GRUPOS MEDIANTE MICROARRAYS Y RT-qPCR

A continuación, se muestra el análisis numérico de las diferencias de expresión de cada gen en cada uno de los tejidos analizados entre el grupo de pacientes con obesidad y los individuos sin obesidad (expresadas como  $\log^2FC$  y como *Fold Change*) obtenidos mediante microarrays y mediante RT-qPCR. Valores de  $p < 0.05$  indican una expresión diferencial significativa entre los dos grupos en ese tejido en el análisis mediante cada una de las técnicas.

Tabla A7. Valores de expresión en tejido adiposo epiloico (TAE) en los pacientes con obesidad respecto a los individuos sin obesidad

Gen	Microarrays			RT-qPCR		
	Log <sup>2</sup> FC	FC	p-valor	Log <sup>2</sup> FC	FC	p-valor
CRISPLD2	1.298	2.459	$3.66 \times 10^{-4}$	1.280	2.428	$2.47 \times 10^{-1}$
THBS1	1.304	2.469	$1.79 \times 10^{-3}$	1.350	2.550	$1.80 \times 10^{-2}$
ADAMTS1	1.321	2.498	$1.29 \times 10^{-5}$	1.600	3.031	$2.93 \times 10^{-2}$
ADAMTS4	3.652	12.570	$7.26 \times 10^{-7}$	2.950	7.727	$2.17 \times 10^{-2}$
ADAMTS9	1.578	2.986	$2.51 \times 10^{-3}$	0.350	1.275	$3.49 \times 10^{-1}$
MMP19*	1.724	3.304	$1.65 \times 10^{-2}$	3.200	9.190	$1.57 \times 10^{-2}$
PRG4	0.398	1.318	$4.78 \times 10^{-1}$	0.130	1.094	$3.16 \times 10^{-1}$
SRGN	1.429	2.692	$8.06 \times 10^{-6}$	1.070	2.099	$1.24 \times 10^{-1}$
VCAN	1.058	2.082	$6.76 \times 10^{-3}$	1.320	2.497	$5.09 \times 10^{-2}$
HAS1	2.857	7.245	$1.19 \times 10^{-9}$	2.480	5.579	$1.33 \times 10^{-2}$
S100A8	2.118	4.341	$1.64 \times 10^{-3}$	2.790	6.916	$3.88 \times 10^{-3}$

FC: ratio de expresión (*Fold Change*) entre las condiciones experimentales; \*MMP19: Datos de expresión no valorables

Tabla A8. Valores de expresión en tejido adiposo mesentérico (TAM) en los pacientes con obesidad respecto a los individuos sin obesidad

Gen	Microarrays			RT-qPCR		
	Log <sup>2</sup> FC	FC	p-valor	Log <sup>2</sup> FC	FC	p-valor
CRISPLD2	0.996	1.994	$8.64 \times 10^{-3}$	1.030	2.042	$2.74 \times 10^{-1}$
THBS1	0.995	1.993	$2.54 \times 10^{-2}$	1.090	2.129	$1.28 \times 10^{-1}$
ADAMTS1	1.386	2.614	$1.19 \times 10^{-5}$	0.790	1.729	$2.00 \times 10^{-1}$
ADAMTS4	2.691	6.458	$2.50 \times 10^{-4}$	1.410	2.657	$1.03 \times 10^{-2}$
ADAMTS9	1.566	2.961	$3.23 \times 10^{-3}$	0.090	1.064	$2.63 \times 10^{-1}$
MMP19*	0.595	1.510	$9.76 \times 10^{-2}$	0.517	1.431	$1.79 \times 10^{-1}$
PRG4	0.022	1.015	$9.77 \times 10^{-1}$	-1.170	0.306	$2.05 \times 10^{-1}$
SRGN	1.322	2.500	$6.32 \times 10^{-5}$	0.860	1.815	$1.75 \times 10^{-2}$
VCAN	0.263	1.200	$6.49 \times 10^{-1}$	-0.490	0.712	$3.38 \times 10^{-1}$
HAS1	1.615	3.063	$9.86 \times 10^{-5}$	2.120	4.347	$4.58 \times 10^{-2}$
S100A8	2.161	4.472	$1.63 \times 10^{-3}$	2.430	5.389	$1.61 \times 10^{-3}$

FC: ratio de expresión (*Fold Change*) entre las condiciones experimentales; \*MMP19: Datos de expresión no valorables

Tabla A9. Valores de expresión en tejido peritoneal (TP) en los pacientes con obesidad respecto a los individuos sin obesidad

Gen	Microarrays			RT-qPCR		
	Log <sup>2</sup> FC	FC	p-valor	Log <sup>2</sup> FC	FC	p-valor
CRISPLD2	1.739	3.338	$3.89 \times 10^{-6}$	-	-	$1.63 \times 10^{-3}$
THBS1	1.321	2.498	$1.93 \times 10^{-3}$	-	-	$1.28 \times 10^{-4}$
ADAMTS1	1.133	2.193	$1.94 \times 10^{-4}$	-	-	$2.85 \times 10^{-3}$
ADAMTS4	3.929	15.232	$1.48 \times 10^{-7}$	-	-	$2.01 \times 10^{-4}$
ADAMTS9	2.301	4.928	$1.00 \times 10^{-5}$	-	-	$1.40 \times 10^{-2}$
MMP19*	0.525	1.439	$3.69 \times 10^{-1}$	-	-	$9.65 \times 10^{-2}$
PRG4	0.482	1.397	$4.24 \times 10^{-1}$	-	-	$6.01 \times 10^{-5}$
SRGN	0.902	1.869	$7.26 \times 10^{-3}$	-	-	$1.63 \times 10^{-3}$
VCAN	0.348	1.273	$5.48 \times 10^{-1}$	-	-	$3.18 \times 10^{-3}$
HAS1	2.263	4.800	$2.96 \times 10^{-7}$	-	-	$4.82 \times 10^{-3}$
S100A8	1.366	2.578	$8.18 \times 10^{-2}$	-	-	$1.85 \times 10^{-3}$

FC: ratio de expresión (*Fold Change*) entre las condiciones experimentales; \*MMP19: Datos de expresión no valorables

Tabla A10. Valores de expresión en tejido adiposo subcutáneo (TAS) en los pacientes con obesidad respecto a los individuos sin obesidad

Gen	Microarrays			RT-qPCR		
	Log <sup>2</sup> FC	FC	p-valor	Log <sup>2</sup> FC	FC	p-valor
CRISPLD2	0.788	1.727	$2.08 \times 10^{-1}$	1.170	2.250	$1.61 \times 10^{-1}$
THBS1	0.522	1.436	$6.22 \times 10^{-1}$	1.790	3.458	$1.95 \times 10^{-1}$
ADAMTS1	-0.111	0.926	$9.49 \times 10^{-1}$	0.600	1.516	$7.88 \times 10^{-1}$
ADAMTS4	0.853	1.806	$6.66 \times 10^{-1}$	1.190	2.282	$5.31 \times 10^{-1}$
ADAMTS9	0.380	1.301	$8.49 \times 10^{-1}$	0.660	1.580	$4.56 \times 10^{-1}$
MMP19*	0.736	1.666	$4.91 \times 10^{-1}$	0.630	1.548	$7.43 \times 10^{-1}$
PRG4	1.138	2.201	$9.51 \times 10^{-2}$	2.250	4.757	$1.61 \times 10^{-1}$
SRGN	0.397	1.317	$6.30 \times 10^{-1}$	1.180	2.266	$3.55 \times 10^{-1}$
VCAN	0.416	1.334	$7.12 \times 10^{-1}$	-1.230	0.426	$1.96 \times 10^{-2}$
HAS1	0.805	1.747	$3.96 \times 10^{-2}$	0.900	1.866	$1.52 \times 10^{-1}$
S100A8	0.650	1.569	$7.61 \times 10^{-1}$	-0.340	0.790	$4.71 \times 10^{-1}$

FC: ratio de expresión (*Fold Change*) entre las condiciones experimentales; \*MMP19: Datos de expresión no valorables

## 10.9. ANEXO IX: ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE EXPRESIÓN GÉNICA Y SITUACIÓN CLÍNICA BASAL

A continuación, se muestran los datos del análisis de asociación (test U de Mann Whitney) entre la situación clínica basal y la expresión génica en los diferentes tejidos.

Tabla A11. Análisis de asociación entre situación clínica basal y expresión génica en tejido adiposo epiloico (TAE)

	IMC>30 (n=15)	IMC<30 (n=9)	valor p	IR (n=11)	No IR (n=13)	valor p	HTA (n=3)	No HTA (n=21)	valor p	DLP (n=8)	No DLP (n=16)	valor p
<b>MMP19*</b>	1,02 (±1,9)	2,44 (±0,4)	0,018	0,83 (±2,1)	2,16 (±0,8)	0,041	0,29 (±1,8)	1,73 (±1,6)	0,17	0,78 (±2,3)	1,94 (±1,2)	0,11
<b>CRISPL2</b>	2,88 (±1,4)	2,97 (±1,2)	0,86	2,44 (±1,3)	3,32 (±1,2)	0,19	1,61 (±0,9)	3,1 (±1,3)	0,052	2,52 (±1,5)	3,11 (±1,2)	0,57
<b>HAS1</b>	4,82 (±2,6)	7,03 (±1)	0,018	4,25 (±2,2)	6,84 (±1,7)	0,004	3,4 (±1,6)	5,97 (±2,3)	0,07	4,5 (±2,3)	6,23 (±2,2)	0,08
<b>ADAMTS1</b>	1,54 (±1,7)	2,67 (±0,8)	0,064	1,4 (±1,9)	2,44 (±0,9)	0,12	0,26 (±1,3)	2,21 (±1,4)	0,041	1,5 (±1,7)	2,2 (±1,4)	0,32
<b>ADAMTS4</b>	4,23 (±2,9)	6,92 (±1)	0,012	3,57 (±2,7)	6,65 (±1,7)	0,003	2,94 (±1,9)	5,57 (±2,6)	0,12	4,13 (±3,2)	5,8 (±2,3)	0,19
<b>ADAMTS9</b>	4,07 (±2,1)	4,16 (±0,8)	0,86	3,38 (±1,8)	4,71 (±1,4)	0,12	3,86 (±0,5)	4,14 (±1,8)	0,45	4,42 (±2,3)	3,94 (±1,3)	0,42
<b>PRG4</b>	0,62 (±1,4)	0,49 (±0,9)	0,86	0,001 (±1)	1,06 (±1,3)	0,047	-0,26 (±0,8)	0,69 (±1,3)	0,2	0,44 (±1,3)	0,64 (±1,3)	0,93
<b>SRGN</b>	1,98 (±1,7)	2,79 (±1,7)	0,56	1,41 (±1,7)	3,02 (±1,4)	0,026	0,38 (±1,4)	2,56 (±1,6)	0,052	1,74 (±1,8)	2,56 (±1,7)	0,38
<b>THBS1</b>	-0,87 (±1,5)	0,22 (±0,9)	0,030	-1,35 (±1,1)	0,3 (±1,1)	0,002	-1,24 (±1,2)	-0,35 (±1,4)	0,23	-0,76 (±1,6)	-0,31 (±1,3)	0,61
<b>VCAN</b>	4,17 (±1,2)	5,22 (±1,5)	0,07	3,76 (±1)	5,24 (±1,4)	0,004	3,72 (±0,6)	4,68 (±1,5)	0,2	4,44 (±1,1)	4,63 (±1,6)	0,93
<b>S100A8</b>	1,92 (±2,1)	4,45 (±1,8)	0,08	1,41 (±1,5)	4,1 (±2,2)	0,005	0,61 (±1,7)	3,19 (±2,2)	0,07	2,49 (±2,8)	3,06 (±2,1)	0,61

Expresión génica se muestra como media ΔCT (±desviación estándar)

IMC: Índice de masa corporal; IR: Insulinorresistencia (HOMA-IR>3,8); HTA: Hipertensión arterial; DLP: Dislipemia

\*MMP19: Datos de expresión no valorables.

Tabla A12. Análisis de asociación entre situación clínica basal y expresión génica en tejido adiposo mesentérico (TAM)

	IMC>30 (n=15)	IMC<30 (n=9)	valor p	IR (n=11)	No IR (n=13)	valor p	HTA (n=3)	No HTA (n=21)	valor p	DLP (n=8)	No DLP (n=16)	valor p
<b>MMP19*</b>	4,01 (±1,6)	3,47 (±1,2)	0,45	3,8 (±1,7)	3,82 (±1,3)	0,82	2,69 (±0,4)	3,97 (±1,5)	0,2	3,45 (±1,5)	3,99 (±1,4)	0,29
<b>CRISPL2</b>	5,4 (±2,1)	5,87 (±1,1)	0,48	4,82 (±2)	6,21 (±1,3)	0,055	4,84 (±2,8)	5,68 (±1,7)	0,4	5,52 (±2,2)	5,61 (±1,6)	0,98
<b>HAS1</b>	6,99 (±2,5)	9,55 (±1,7)	0,015	6,08 (±2,3)	9,53 (±1,5)	<0,001	5,84 (±1,8)	8,25 (±2,5)	0,07	7,29 (±2,3)	8,28 (±2,7)	0,35
<b>ADAMTS1</b>	1,51 (±1,5)	2,53 (±1,3)	0,14	0,93 (±1,1)	2,71 (±1,3)	0,004	0,35 (±1,4)	2,11 (±1,4)	0,1	2,16 (±1,3)	1,76 (±1,7)	0,53
<b>ADAMTS4</b>	6,11 (±1,9)	7,95 (±1,5)	0,041	5,87 (±1,3)	7,59 (±2,1)	0,009	6,39 (±2,1)	6,86 (±2)	0,68	6,06 (±2,6)	7,17 (±1,5)	0,21
<b>ADAMTS9</b>	3,39 (±1,5)	3,92 (±1,5)	0,38	2,79 (±1,1)	4,27 (±1,5)	0,015	3,01 (±1,7)	3,67 (±1,5)	0,51	3,79 (±1,7)	3,49 (±1,5)	0,61
<b>PRG4</b>	2,81 (±1,7)	2,08 (±2,3)	0,48	2,5 (±1,6)	2,57 (±2,2)	0,91	1,24 (±2)	2,72 (±1,9)	0,27	2,57 (±1,9)	2,52 (±2)	1
<b>SRGN</b>	0,62 (±1)	1,91 (±1,3)	0,015	0,4 (±1)	1,69 (±1,2)	0,004	-0,02 (±0,3)	1,26 (±1,3)	0,07	0,65 (±0,6)	1,33 (±1,5)	0,32
<b>THBS1</b>	1,32 (±1,5)	2,85 (±2)	0,048	0,74 (±1,3)	2,87 (±1,7)	0,001	0,44 (±0,7)	2,1 (±1,9)	0,2	1,59 (±1,8)	2,04 (±1,9)	0,57
<b>VCAN</b>	4,58 (±1,1)	4,53 (±1,5)	0,77	4,49 (±1,1)	4,62 (±1,3)	0,36	5,46 (±1,7)	4,43 (±1,1)	0,45	5 (±1,3)	4,34 (±1,1)	0,32
<b>S100A8</b>	0,33 (±1,9)	3,2 (±1,8)	0,002	-0,17 (±1,6)	2,74 (±2)	0,001	0,03 (±1,4)	1,6 (±2,4)	0,23	1,41 (±1,7)	1,4 (±2,6)	0,93

Expresión génica se muestra como media ΔCT (±desviación estándar)

IMC: Índice de masa corporal; IR: Insulinorresistencia (HOMA-IR>3,8); HTA: Hipertensión arterial; DLP: Dislipemia

\*MMP19: Datos de expresión no valorables.

Tabla A13. Análisis de asociación entre situación clínica basal y expresión génica en tejido peritoneal (TP)

	IMC>30 (n=15)	IMC<30 (n=9)	valor p	IR (n=11)	No IR (n=13)	valor p	HTA (n=3)	No HTA (n=21)	valor p	DLP (n=8)	No DLP (n=16)	valor p
<b>MMP19*</b>	3,38 (±1,1)	2,58 (±0,7)	0,039	3,04 (±1)	3,09 (±1)	0,88	2,95 (±1,7)	3,08 (±0,9)	0,9	3,21 (±0,9)	3 (±1,1)	0,77
<b>CRISPL2</b>	1,64 (±0,9)	2,11 (±0,7)	0,11	1,54 (±1)	2,04 (±0,7)	0,088	1,33 (±0,1)	1,9 (±0,9)	0,14	1,96 (±0,9)	1,76 (±0,9)	0,87
<b>HAS1</b>	5,47 (±2,6)	7,02 (±1,2)	0,11	5,36 (±3)	6,73 (±1,2)	0,2	7,95 (±2,5)	5,81 (±2,1)	0,23	6,15 (±2)	6,08 (±2,4)	0,68
<b>ADAMTS1</b>	2,11 (±1,4)	2,78 (±0,9)	0,28	2,08 (±1,6)	2,6 (±0,9)	0,52	1,35 (±0,9)	2,53 (±1,2)	0,12	2,18 (±0,7)	2,46 (±1,4)	0,49
<b>ADAMTS4</b>	3,79 (±2,9)	6,72 (±1,7)	0,007	3,43 (±3,2)	6,1 (±1,9)	0,026	1,07 (±1,1)	5,52 (±2,5)	0,012	5,08 (±2,5)	4,87 (±3)	0,97
<b>ADAMTS9</b>	4,89 (±1,1)	5,29 (±1,3)	0,44	4,68 (±1,2)	5,33 (±1,1)	0,19	4,26 (±0,1)	5,16 (±1,2)	0,12	5,29 (±0,8)	4,94 (±1,3)	0,62
<b>PRG4</b>	-1,13 (±1,1)	-0,05 (±0,9)	0,039	-1,23 (±0,9)	-0,3 (±1,2)	0,07	-1,7 (±1)	-0,56 (±1,1)	0,2	-1,22 (±0,9)	-0,49 (±1,2)	0,31
<b>SRGN</b>	2,04 (±1)	2,59 (±1)	0,14	2,04 (±1)	2,42 (±0,9)	0,28	1,14 (±0,4)	2,42 (±0,9)	0,026	2,25 (±0,7)	2,26 (±1,1)	0,87
<b>THBS1</b>	0,62 (±1,2)	1,38 (±1)	0,14	0,4 (±1,4)	1,31 (±0,8)	0,042	1,48 (±1,5)	0,83 (±1,1)	0,57	0,89 (±1,2)	0,93 (±1,2)	0,82
<b>VCAN</b>	4,1 (±1,1)	4,48 (±1)	0,65	4,09 (±1,1)	4,36 (±1)	0,46	4,32 (±0,3)	4,23 (±1,1)	0,96	4,32 (±1,2)	4,2 (±1)	0,91
<b>S100A8</b>	2,41 (±1,6)	3,12 (±0,9)	0,11	2,25 (±1,4)	3,02 (±1,3)	0,1	1,78 (±1,1)	2,82 (±1,4)	0,31	2,22 (±1,8)	2,89 (±1,2)	0,25

Expresión génica se muestra como media ΔCT (±desviación estándar)

IMC: Índice de masa corporal; IR: Insulinorresistencia (HOMA-IR>3,8); HTA: Hipertensión arterial; DLP: Dislipemia

\*MMP19: Datos de expresión no valorables.

Tabla A14. Análisis de asociación entre situación clínica basal y expresión génica en tejido adiposo subcutáneo (TAS)

	IMC>30 (n=15)	IMC<30 (n=9)	valor p	IR (n=11)	No IR (n=13)	valor p	HTA (n=3)	No HTA (n=21)	valor p	DLP (n=8)	No DLP (n=16)	valor p
<b>MMP19*</b>	3,82 (±2,1)	4,24 (±3,2)	0,41	4,15 (±2,3)	3,83 (±2,8)	0,78	5,69 (±2,3)	3,73 (±2,5)	0,2	4,94 (±1,7)	3,49 (±2,8)	0,17
<b>CRISPL2</b>	5,01 (±2,1)	6,34 (±3)	0,17	5,28 (±2,2)	5,7 (±2,8)	0,53	7,14 (±2,9)	5,28 (±2,4)	0,35	5,26 (±2,6)	5,63 (±2,6)	0,57
<b>HAS1</b>	5,12 (±1,9)	6,92 (±1,4)	0,008	5,2 (±2)	6,29 (±1,7)	0,11	6,3 (±2,7)	5,72 (±1,8)	0,68	5,97 (±1,8)	5,71 (±2)	0,93
<b>ADAMTS1</b>	1,05 (±3,5)	2,52 (±1,6)	0,38	1,75 (±3,6)	1,47 (±2,5)	0,61	1,78 (±3,1)	1,57 (±3,1)	0,81	3,03 (±2,2)	0,88 (±3,1)	0,09
<b>ADAMTS4</b>	4,79 (±3,9)	6,89 (±1,7)	0,16	5,07 (±4)	6,01 (±2,9)	0,46	6,44 (±2,8)	5,45 (±3,5)	1	6,9 (±1,6)	4,92 (±3,9)	0,26
<b>ADAMTS9</b>	3 (±3,1)	4,76 (±1,8)	0,18	3,31 (±3,4)	3,98 (±2,3)	0,74	5,31 (±2,9)	3,45 (±2,8)	0,46	4,48 (±2,3)	3,27 (±3)	0,43
<b>PRG4</b>	2,98 (±4,4)	6,44 (±2,6)	0,064	3,18 (±4,8)	5,2 (±3,3)	0,42	8,35 (±1,1)	3,69 (±4)	0,041	4,78 (±3,5)	4,02 (±4,4)	0,79
<b>SRGN</b>	-0,22 (±3)	1,58 (±1,7)	0,22	-0,26 (±3,4)	1,06 (±1,9)	0,33	-0,09 (±3,7)	0,54 (±2,7)	0,94	1,47 (±2,7)	-0,05 (±2,7)	0,17
<b>THBS1</b>	0,1 (±4,6)	2,18 (±2,5)	0,29	-0,51 (±4,7)	2,05 (±3)	0,3	1,6 (±4,9)	0,78 (±4)	0,68	1,81 (±4,1)	0,41 (±4)	0,35
<b>VCAN</b>	2,74 (±1,9)	2,17 (±1,4)	0,41	2,42 (±2,1)	2,63 (±1,5)	0,78	2,06 (±3)	2,6 (±1,6)	0,62	1,97 (±1,5)	2,81 (±1,8)	0,38
<b>S100A8</b>	-1,2 (±2,3)	-0,56 (±2,2)	0,6	-1,27 (±2,3)	-0,7 (±2,3)	0,53	-1,17 (±2)	-0,93 (±2,3)	0,68	-0,72 (±2,5)	-1,08 (±2,2)	0,61

Expresión génica se muestra como media ΔCT (±desviación estándar)

IMC: Índice de masa corporal; IR: Insulinorresistencia (HOMA-IR>3,8); HTA: Hipertensión arterial; DLP: Dislipemia

\*MMP19: Datos de expresión no valorables.

## 10.10. ANEXO X: ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE EXPRESIÓN GÉNICA Y SITUACIÓN CLÍNICA BASAL

A continuación, se muestran los datos del análisis de correlación (coeficiente de correlación de Pearson) entre la situación clínica basal y la expresión génica en los diferentes tejidos.

**Tabla A15. Análisis de correlación entre situación clínica basal y expresión génica en tejido adiposo epiloico (TAE)**

	IMC t0 (n=24)	valor p	HOMA-IR (n=24)	valor p	TG (n=15)	valor p	CT (n=15)	valor p	LDL (n=15)	valor p	HDL (n=15)	valor p
MMP19*	-0,215	0,313	-0,1	0,642	0,015	0,958	-0,325	0,237	-0,44	0,115	0,069	0,808
CRISPL2	0,021	0,923	-0,251	0,236	0,061	0,829	-0,338	0,219	-0,425	0,129	0,107	0,705
HAS1	-0,288	0,172	-0,444	0,03	0,197	0,482	-0,329	0,231	-0,401	0,155	-0,223	0,424
ADAMTS1	-0,278	0,188	-0,334	0,111	0,133	0,636	-0,479	0,071	-0,437	0,118	-0,206	0,462
ADAMTS4	-0,304	0,149	-0,495	0,014	0,09	0,749	-0,374	0,169	-0,411	0,145	-0,112	0,692
ADAMTS9	0,045	0,835	-0,37	0,075	0,09	0,751	0,02	0,943	-0,06	0,837	0,182	0,516
PRG4	0,108	0,614	-0,234	0,271	-0,038	0,894	-0,172	0,541	-0,198	0,498	0,346	0,207
SRGN	-0,215	0,313	-0,273	0,196	0,018	0,949	-0,516	0,049	-0,535	0,049	0,102	0,719
THBS1	-0,2	0,348	-0,455	0,026	0,135	0,63	0,03	0,915	-0,096	0,745	0,17	0,545
VCAN	-0,445	0,029	-0,416	0,043	-0,063	0,823	0,138	0,624	0,076	0,796	0,528	0,043
S100A8	-0,409	0,047	-0,536	0,007	0,204	0,466	-0,263	0,345	-0,324	0,259	0,083	0,768

IMC: Índice de masa corporal; HOMA-IR Homeostatic Model Assessment for Insuline Resistance; TG: Triglicéridos; CT: Colesterol Total; LDL: Low Density Lipoprotein; HDL: High Density Lipoprotein. \*MMP19: Datos de expresión no valorables

**Tabla A16. Análisis de correlación entre situación clínica basal y expresión génica en tejido adiposo mesentérico (TAM)**

	IMC t0 (n=24)	valor p	HOMA-IR (n=24)	valor p	TG (n=15)	valor p	CT (n=15)	valor p	LDL (n=15)	valor p	HDL (n=15)	valor p
MMP19*	-0,036	0,867	-0,111	0,604	-0,193	0,49	0,441	0,1	0,508	0,063	0,073	0,796
CRISPL2	-0,239	0,26	-0,227	0,286	-0,048	0,864	0,223	0,425	0,454	0,103	-0,385	0,156
HAS1	-0,417	0,043	-0,367	0,077	-0,356	0,192	0,328	0,233	0,423	0,132	0,016	0,956
ADAMTS1	-0,132	0,537	-0,085	0,694	-0,328	0,233	0,153	0,585	0,122	0,677	0,229	0,412
ADAMTS4	-0,137	0,524	-0,24	0,258	-0,253	0,363	0,125	0,658	0,194	0,506	0,17	0,546
ADAMTS9	-0,202	0,356	-0,189	0,388	-0,246	0,396	0,007	0,98	0,296	0,325	0,025	0,933
PRG4	-0,237	0,266	-0,225	0,291	-0,002	0,994	0,362	0,185	0,524	0,054	0,07	0,805
SRGN	-0,342	0,101	-0,401	0,052	0,04	0,887	0,418	0,121	0,29	0,314	0,237	0,396
THBS1	-0,124	0,564	-0,374	0,072	0,058	0,838	0,428	0,112	0,295	0,306	0,177	0,529
VCAN	0,233	0,274	0,172	0,423	-0,015	0,957	-0,324	0,239	-0,38	0,18	0,206	0,461
S100A8	-0,161	0,453	-0,011	0,958	0,047	0,868	0,199	0,477	0,18	0,538	0,295	0,287

IMC: Índice de masa corporal; HOMA-IR Homeostatic Model Assessment for Insuline Resistance; TG: Triglicéridos; CT: Colesterol Total; LDL: Low Density Lipoprotein; HDL: High Density Lipoprotein. \*MMP19: Datos de expresión no valorables

**Tabla A17. Análisis de correlación entre situación clínica basal y expresión génica en tejido peritoneal (TP)**

	IMC t0 (n=24)	valor p	HOMA-IR (n=24)	valor p	TG (n=15)	valor p	CT (n=15)	valor p	LDL (n=15)	valor p	HDL (n=15)	valor p
MMP19*	0,292	0,177	-0,142	0,517	0,109	0,711	-0,085	0,772	-0,078	0,8	-0,097	0,741
CRISPL2	-0,14	0,524	-0,345	0,106	-0,181	0,535	-0,022	0,94	-0,022	0,944	0,438	0,117
HAS1	-0,343	0,118	-0,414	0,056	-0,27	0,372	0,555	0,049	0,639	0,025	0,209	0,494
ADAMTS1	-0,206	0,345	-0,439	0,036	0,166	0,571	-0,135	0,645	-0,275	0,363	0,095	0,747
ADAMTS4	-0,411	0,052	-0,666	0,001	0,235	0,419	-0,001	0,996	-0,27	0,372	0,299	0,299
ADAMTS9	-0,088	0,689	-0,393	0,064	0,098	0,738	0,289	0,317	-0,02	0,949	0,54	0,046
PRG4	-0,282	0,193	-0,239	0,272	-0,018	0,952	-0,311	0,279	-0,248	0,414	0,047	0,872
SRGN	-0,142	0,518	-0,246	0,258	0,084	0,774	-0,101	0,731	-0,377	0,204	0,265	0,36
THBS1	-0,335	0,119	-0,523	0,01	0,426	0,128	0,56	0,037	0,544	0,055	-0,182	0,534
VCAN	-0,104	0,654	-0,13	0,576	-0,251	0,408	-0,12	0,695	0,11	0,735	0,217	0,477
S100A8	-0,243	0,264	-0,188	0,391	-0,023	0,938	0,294	0,308	-0,043	0,89	0,097	0,741

IMC: Índice de masa corporal; HOMA-IR Homeostatic Model Assessment for Insuline Resistance; TG: Triglicéridos; CT: Colesterol Total; LDL: Low Density Lipoprotein; HDL: High Density Lipoprotein. \*MMP19: Datos de expresión no valorables

**Tabla A18. Análisis de correlación entre situación clínica basal y expresión génica en tejido adiposo subcutáneo (TAS)**

	IMC t0 (n=24)	valor p	HOMA-IR (n=24)	valor p	TG (n=15)	valor p	CT (n=15)	valor p	LDL (n=15)	valor p	HDL (n=15)	valor p
MMP19*	-0,036	0,867	-0,111	0,604	-0,193	0,49	0,441	0,1	0,508	0,063	0,073	0,796
CRISPL2	-0,239	0,26	-0,227	0,286	-0,048	0,864	0,223	0,425	0,454	0,103	-0,385	0,156
HAS1	-0,417	0,043	-0,367	0,077	-0,356	0,192	0,328	0,233	0,423	0,132	0,016	0,956
ADAMTS1	-0,132	0,537	-0,085	0,694	-0,328	0,233	0,153	0,585	0,122	0,677	0,229	0,412
ADAMTS4	-0,137	0,524	-0,24	0,258	-0,253	0,363	0,125	0,658	0,194	0,506	0,17	0,546
ADAMTS9	-0,202	0,356	-0,189	0,388	-0,246	0,396	0,007	0,98	0,296	0,325	0,025	0,933
PRG4	-0,237	0,266	-0,225	0,291	-0,002	0,994	0,362	0,185	0,524	0,054	0,07	0,805
SRGN	-0,342	0,101	-0,401	0,052	0,04	0,887	0,418	0,121	0,29	0,314	0,237	0,396
THBS1	-0,124	0,564	-0,374	0,072	0,058	0,838	0,428	0,112	0,295	0,306	0,177	0,529
VCAN	0,233	0,274	0,172	0,423	-0,015	0,957	-0,324	0,239	-0,38	0,18	0,206	0,461
S100A8	-0,161	0,453	-0,011	0,958	0,047	0,868	0,199	0,477	0,18	0,538	0,295	0,287

IMC: Índice de masa corporal; HOMA-IR Homeostatic Model Assessment for Insuline Resistance; TG: Triglicéridos; CT: Colesterol Total; LDL: Low Density Lipoprotein; HDL: High Density Lipoprotein. \*MMP19: Datos de expresión no valorables

## 10.11. ANEXO XI: ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE EXPRESIÓN GÉNICA Y EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA

A continuación, se muestran los datos del análisis de correlación (coeficiente de correlación de Pearson) entre la evolución clínica a los 12 meses de la cirugía bariátrica y la expresión génica en los diferentes tejidos.

**Tabla A19. Análisis de correlación entre evolución postoperatoria y expresión génica en tejido adiposo epiloico (TAE)**

	%TWL <sub>12</sub> (n=15)	valor p	ΔHOMA-IR <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p	ΔTG <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p	ΔCT <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p	ΔLDL <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p	ΔHDL <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p
MMP19*	0,144	0,607	0,097	0,741	0,021	0,941	0,025	0,93	0,067	0,82	-0,166	0,553
CRISPL2	-0,143	0,612	0,487	0,078	-0,144	0,609	0,203	0,467	0,151	0,606	0,235	0,4
HAS1	0,007	0,981	0,285	0,323	-0,35	0,201	0,063	0,824	0,263	0,364	-0,006	0,983
ADAMTS1	0,107	0,705	0,181	0,535	-0,31	0,261	0,139	0,622	0,133	0,651	0,196	0,485
ADAMTS4	-0,232	0,406	0,317	0,269	-0,187	0,506	0,264	0,341	0,35	0,219	-0,003	0,992
ADAMTS9	-0,398	0,142	0,35	0,22	-0,047	0,869	0,179	0,523	0,285	0,323	-0,223	0,425
PRG4	-0,065	0,819	0,501	0,068	-0,148	0,598	0,285	0,303	0,115	0,696	0,061	0,83
SRGN	-0,111	0,695	0,22	0,449	-0,427	0,113	-0,046	0,871	-0,077	0,794	0,157	0,576
THBS1	-0,317	0,249	0,574	0,032	-0,003	0,99	0,212	0,449	0,322	0,261	-0,109	0,699
VCAN	-0,336	0,221	0,382	0,178	0,19	0,498	-0,122	0,664	-0,365	0,199	0,15	0,593
S100A8	-0,045	0,873	0,285	0,324	-0,428	0,112	0,221	0,429	0,334	0,243	-0,021	0,94

%TWL<sub>12</sub>: % Total Weight Loss a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔHOMA-IR<sub>10-12</sub>: Variación relativa (%) del HOMA-IR a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔTG<sub>10-12</sub>: Variación relativa (%) del valor de Triglicéridos a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔCT<sub>10-12</sub>: Variación relativa (%) del valor de Colesterol Total a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔLDL<sub>10-12</sub>: Variación relativa (%) del valor de Low Density Lipoprotein a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔHDL<sub>10-12</sub>: Variación relativa (%) del valor de High Density Lipoprotein a los 12 meses de la cirugía bariátrica. \*MMP19: Datos de expresión no valorables.

**Tabla A20. Análisis de correlación entre evolución postoperatoria y expresión génica en tejido adiposo mesentérico (TAM)**

	%TWL <sub>12</sub> (n=15)	valor p	ΔHOMA-IR <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p	ΔTG <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p	ΔCT <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p	ΔLDL <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p	ΔHDL <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p
MMP19*	-0,577	0,024	0,054	0,855	-0,415	0,124	-0,308	0,264	-0,185	0,528	0,284	0,305
CRISPL2	-0,062	0,826	0,414	0,141	0,124	0,661	-0,074	0,793	0,17	0,56	-0,167	0,551
HAS1	-0,369	0,175	0,357	0,21	0,1	0,724	0,414	0,125	0,222	0,445	-0,106	0,707
ADAMTS1	-0,128	0,65	0,454	0,103	-0,084	0,767	-0,01	0,972	0,245	0,398	-0,344	0,209
ADAMTS4	-0,264	0,341	-0,171	0,558	0,232	0,405	0,057	0,84	0,218	0,453	-0,042	0,882
ADAMTS9	-0,132	0,638	0,579	0,03	-0,407	0,132	0,077	0,785	0,342	0,232	-0,428	0,112
PRG4	0,547	0,035	0,448	0,108	-0,424	0,115	-0,033	0,908	-0,153	0,6	0,394	0,146
SRGN	0,272	0,327	0,381	0,179	-0,453	0,09	-0,018	0,95	0,437	0,118	-0,147	0,602
THBS1	-0,155	0,582	0,159	0,588	-0,467	0,079	0,232	0,406	0,494	0,073	-0,341	0,214
VCAN	-0,165	0,558	-0,148	0,614	-0,14	0,618	-0,255	0,358	-0,03	0,918	-0,528	0,043
S100A8	-0,323	0,24	0,121	0,681	0,116	0,68	0,017	0,951	0,209	0,474	-0,477	0,072

%TWL<sub>12</sub>: % Total Weight Loss a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔHOMA-IR<sub>10-12</sub>: Variación relativa (%) del HOMA-IR a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔTG<sub>10-12</sub>: Variación relativa (%) del valor de Triglicéridos a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔCT<sub>10-12</sub>: Variación relativa (%) del valor de Colesterol Total a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔLDL<sub>10-12</sub>: Variación relativa (%) del valor de Low Density Lipoprotein a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔHDL<sub>10-12</sub>: Variación relativa (%) del valor de High Density Lipoprotein a los 12 meses de la cirugía bariátrica. \*MMP19: Datos de expresión no valorables.

**Tabla A21. Análisis de correlación entre evolución postoperatoria y expresión génica en tejido peritoneal (TP)**

	%TWL <sub>12</sub> (n=15)	valor p	ΔHOMA-IR <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p	ΔTG <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p	ΔCT <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p	ΔLDL <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p	ΔHDL <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p
MMP19*	-0,165	0,574	0,261	0,389	-0,292	0,311	-0,048	0,87	0,026	0,933	-0,027	0,926
CRISPL2	-0,029	0,92	0,342	0,252	0,084	0,774	0,611	0,02	0,506	0,078	-0,303	0,292
HAS1	-0,311	0,301	0,141	0,661	0,325	0,279	0,027	0,93	0,029	0,928	-0,472	0,104
ADAMTS1	0,124	0,672	-0,022	0,942	-0,36	0,206	0,275	0,342	0,541	0,056	-0,314	0,274
ADAMTS4	0,06	0,839	0,467	0,108	0,038	0,897	0,504	0,066	0,588	0,035	-0,017	0,954
ADAMTS9	0,085	0,773	0,436	0,136	0,132	0,654	0,366	0,198	0,515	0,072	-0,315	0,272
PRG4	0,192	0,511	0,374	0,207	-0,086	0,771	0,283	0,326	0,16	0,6	0,011	0,97
SRGN	0,391	0,166	0,325	0,279	0,12	0,684	0,208	0,475	0,296	0,327	-0,149	0,61
THBS1	0,076	0,796	0,25	0,41	-0,215	0,46	-0,051	0,863	0,36	0,228	-0,526	0,053
VCAN	0,012	0,97	0,108	0,739	0,018	0,954	0,616	0,025	0,425	0,168	-0,321	0,284
S100A8	0,067	0,82	0,159	0,603	0,156	0,593	-0,468	0,092	-0,251	0,408	0,064	0,829

%TWL<sub>12</sub>: % Total Weight Loss a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔHOMA-IR<sub>10-12</sub>: Variación relativa (%) del HOMA-IR a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔTG<sub>10-12</sub>: Variación relativa (%) del valor de Triglicéridos a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔCT<sub>10-12</sub>: Variación relativa (%) del valor de Colesterol Total a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔLDL<sub>10-12</sub>: Variación relativa (%) del valor de Low Density Lipoprotein a los 12 meses de la cirugía bariátrica; ΔHDL<sub>10-12</sub>: Variación relativa (%) del valor de High Density Lipoprotein a los 12 meses de la cirugía bariátrica. \*MMP19: Datos de expresión no valorables.

**Tabla A22. Análisis de correlación entre evolución postoperatoria y expresión génica en tejido adiposo subcutáneo (TAS)**

	%TWL <sub>12</sub> (n=15)	valor p	ΔHOMA-IR <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p	ΔTG <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p	ΔCT <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p	ΔLDL <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p	ΔHDL <sub>10-12</sub> (n=15)	valor p
MMP19*	-0,064	0,821	-0,198	0,497	0,258	0,353	0,1	0,724	0,175	0,549	-0,524	0,045
CRISPL2	-0,075	0,791	-0,025	0,931	0,26	0,35	0,262	0,345	0,143	0,627	-0,004	0,987
HAS1	-0,219	0,433	-0,282	0,328	0,198	0,48	-0,099	0,726	-0,175	0,55	-0,145	0,606
ADAMTS1	-0,066	0,815	-0,039	0,895	0,397	0,143	-0,017	0,951	-0,025	0,932	-0,487	0,066
ADAMTS4	-0,158	0,573	0,141	0,63	0,276	0,319	0,188	0,502	0,174	0,552	-0,567	0,028
ADAMTS9	-0,238	0,413	0,119	0,699	0,417	0,137	0,326	0,255	0,068	0,825	-0,492	0,074
PRG4	-0,044	0,875	0,124	0,674	0,21	0,453	0,302	0,273	0,386	0,172	-0,775	0,001
SRGN	0,373	0,171	-0,126	0,668	-0,146	0,604	-0,121	0,668	0,083	0,778	-0,377	0,166
THBS1	0,115	0,682	-0,017	0,953	-0,065	0,818	0,181	0,518	0,447	0,109	-0,483	0,068
VCAN	0,038	0,892	0,278	0,336	-0,039	0,89	0,265	0,339	0,257	0,375	-0,112	0,692

<b>S100A8</b>	0,394	0,147	0,431	0,124	0,21	0,452	-0,132	0,639	-0,169	0,563	-0,271	0,328
---------------	-------	-------	-------	-------	------	-------	--------	-------	--------	-------	--------	-------

%TWL<sub>12</sub>: % Total Weight Loss a los 12 meses de la cirugía bariátrica;  $\Delta$ HOMA-IR<sub>0-12</sub>: Variación relativa (%) del HOMA-IR a los 12 meses de la cirugía bariátrica;  $\Delta$ TG<sub>0-12</sub>: Variación relativa (%) del valor de Triglicéridos a los 12 meses de la cirugía bariátrica;  $\Delta$ CT<sub>0-12</sub>: Variación relativa (%) del valor de Colesterol Total a los 12 meses de la cirugía bariátrica;  $\Delta$ LDL<sub>0-12</sub>: Variación relativa (%) del valor de Low Density Lipoprotein a los 12 meses de la cirugía bariátrica;  $\Delta$ HDL<sub>0-12</sub>: Variación relativa (%) del valor de High Density Lipoprotein a los 12 meses de la cirugía bariátrica. \*MMP19: Datos de expresión no valorables.





*“(Science) is not the most important thing. Love is”.*

*Richard P. Feynman (1918 – 1988)*







