



Comorbilitats associades a l'obesitat mòrbida i la seva evolució amb la cirurgia bariàtrica: diabetis, dislipèmia i esteatosi hepàtica

Eva Pardina Arrese

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAT DE BIOLOGIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

COMORBILITATS ASSOCIADES A L'OBESITAT MÒRBIDA I

LA SEVA EVOLUCIÓ AMB LA CIRURGIA BARIÀTRICA:

DIABETIS, DILIPÈMIA I ESTEATOSI HEPÀTICA

Memòria presentada per la llicenciada en Biologia

EVA PARDINA ARRESE

per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Aquesta tesi s'ha inscrit dins del programa de doctorat de Biomedicina del departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona, bienni 2005 - 2007.

La interessada

Vist i plau de la directora

Eva Pardina Arrese

Dra. Julia Peinado Onsurbe
Professora agregada
Dept. Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona
Barcelona, 2012

Al Joan
Als meus pares

AGRAÏMENTS

Ja fa temps tots em preguntaveu “Què! Què s’acabarà abans, la casa o la tesi?”. Després, amb molt bon criteri, vau deixar de preguntar-m’ho. Doncs bé, la resposta la teniu a les vostres mans/pantalles.

Després de tot aquest temps escrivint, només falten els agraïments... Segurament em deixaré coses per dir i espero no oblidar-me de ningú. Per si de cas, agrair-vos a TOTS els que m’he anat trobant al llarg d’aquesta aventura el suport i l’ajuda que m’heu donat: LPLencs, exLPL, EGFins, la gent de Vall d’Hebron, les secres... Mooooltes gràcies a tots!

Entrant més en detall, voldria donar-li les gràcies a la Julia, per haver-me ensenyat tantes coses, dins i fora del laboratori (fins i tot com cordar-se les sabatilles i que no es tornin a descordar!!), per haver buscat subvencions fins i tot sota les pedres, per estar sempre disposada a ajudar en el que fes falta i per haver-me donat l’oportunitat de fer aquesta tesi.

Al Miquel i la Dolores per tenir sempre un moment per resoldre dubtes i per permetre’m endinsar-me, alhora que feia la tesi, en l’altre món que m’apassiona, la qualitat.

No em puc deixar als del lab, que ara som quatre gats, però els millors companys de gatera que una podria imaginar! Al David per tots els consells i suggerències que m’ha donat durant tot aquest temps. Espero que poguem seguir treballant plegats a CEREMET moooolts i moooolts anys més! Ah!! I per la foto de la portada... Ets un artista, ho portes a la sang!

A la Miriam per ser una amiga amiga i per tenir sempre, sempre, sempre una rialla a punt (i un ibuprofeno, si fa falta!). Els dinars de ben segur que no serien el mateix sense tu! ^_^

Al Pere per tots els moments compartits que alguns (no se per què...) consideren frikis... Al cap de vall, enganxar-se a jocs o sèries o representar bicapes lipídiques tampoc es tant estrany, oi? A que no hi ha per tant?! Vaja, que fas que em senti una mica més “normal”. Uish... això no se si es bó o dolent... o_O

A l’Albert per saber trobar sempre aquella pregunta que t’ajudava a tirar endavant.

A l’equip de Vall d’Hebron per decidir embrancar-se en aquest projecte uns 8 anys enrere i engrescar als pacients a participar-hi. Als Drs. Baena i Fort per preocupar-se que “els de la lletera” tinguéssim prou mostra, al Dr. Lecube per controlar el seguiment dels pacients i al Dr. Catalán i la (quasi) Dra. Ferrer per perseguir les mostres de plasma i els resultats per mig Hospital. Sense ells aquest treball tampoc hagués estat possible.

I sortint de l'àmbit de la feina, voldria agrair-li al Joan toooota la paciència que ha tingut i toooots els brownies de la casa que s'ha menjat, sense ell cap dels dos projectes estarien com estan ara. Ya tenemos una cosa hecha... a por la siguiente!

Als pares del Joan pel suport rebut i per aguantar-me a casa, encara que sovint estigués adormida. I com diuen els angelsos, els darrers però no menys importants, als meus pares per tot el que m'han ensenyat, per escoltar-me els dies que tornava a casa amb xarrera i per permetre'm dedicar-me a això de "fer ciència", que no sempre és un camí amb un destí clar.

PC: no voldria acabar sense afegir un parell de cosetes més. La primera demanar-vos (si m'ho permeteu...) que seguiu amb el bon criteri i no em pregunteu "I ara la casa per quan?" ;P; i la segona dir-vos sincerament, que sempre portaré l'LPL al cor (i no només en el sentit fisiològic!).

Moltíssimes gràcies a tots!

ÍNDIX GENERAL

| | |
|--|-----------|
| Índex de figures | VII |
| Índex de taules | XI |
| Sigles i abreviatures | XIV |
| 1. INTRODUCCIÓ | 1 |
| 1.1 L'obesitat: perspectiva històrica | 3 |
| 1.1.1 Epidemiologia: l'obesitat mòrbida | 4 |
| 1.2 El teixit adipós blanc | 5 |
| 1.2.1 Distribució del greix corporal | 6 |
| 1.2.2 Determinació de les diferents masses grasses | 7 |
| 1.2.3 Fisiologia del teixit adipós | 8 |
| 1.2.4 Principals lipases del teixit adipós | 9 |
| 1.2.4.1 Triacilglicerol lipasa de l'adipós | 9 |
| 1.2.4.2 Lipasa sensible a hormones | 10 |
| 1.2.4.3 Lipoproteïna lipasa | 11 |
| 1.2.5 Principals adipocitoquines del teixit adipós | 12 |
| 1.2.5.1 Leptina | 13 |
| 1.2.5.2 Adiponectina | 13 |
| 1.2.5.3 Resistina | 13 |
| 1.2.5.4 Factor de necrosi tumoral α | 14 |
| 1.2.5.5 Interleuquina 6 | 14 |
| 1.2.5.6 Visfatina | 14 |
| 1.2.5.7 Activador de l'inhibidor del plasminogen de tipus I | 15 |
| 1.2.6 Diferències entre teixit adipós subcutani i adipós visceral | 15 |
| 1.3 Comorbiditats | 18 |
| 1.3.1 Alteracions del metabolisme glucídic | 18 |
| 1.3.1.1 Resistència a insulina i <i>diabetes mellitus</i> tipus II | 19 |
| 1.3.1.2 Possibles mecanismes implicats en la resistència a la insulina | 21 |
| 1.3.2 Alteracions del metabolisme lipídic | 25 |
| 1.3.2.1 Dislipèmia | 29 |
| 1.3.2.2 Fetge gras no alcoholíic | 31 |
| 1.3.3 Malalties cardiovasculars | 35 |
| 1.3.3.1 Hipertensió arterial | 35 |
| 1.3.3.2 Arteriosclerosi | 36 |
| 1.3.4 Síndrome metabòlica | 37 |
| 1.3.5 Altres comorbiditats | 39 |
| 1.3.5.1 Aparell digestiu | 39 |
| 1.3.5.2 Aparell respiratori | 40 |
| 1.3.5.3 Aparell reproductor | 41 |
| 1.3.5.4 Aparell locomotor | 41 |
| 1.3.5.5 Malalties neoplàsiques | 41 |

| | | |
|------------|---|----|
| 1.4 | Tractament de l'obesitat i pèrdua de pes | 42 |
| 1.4.1 | Dieta | 42 |
| 1.4.2 | Activitat física..... | 43 |
| 1.4.3 | Fàrmacs | 44 |
| 1.4.4 | Cirurgia bariàtrica..... | 45 |
| 1.4.4.1 | Tipus de cirurgia bariàtrica..... | 45 |
| 1.4.4.2 | Mortalitat i complicacions de la cirurgia bariàtrica..... | 48 |
| 1.4.4.3 | Efectes de la cirurgia bariàtrica i la pèrdua de pes | 49 |
| 2. | OBJECTIUS | 51 |
| 3. | PACIENTS, MATERIALS I MÈTODES | 55 |
| 3.1 | Disseny experimental | 57 |
| 3.2 | Selecció de pacients | 58 |
| 3.3 | Procediment quirúrgic | 59 |
| 3.3.1 | Bypass gàstric | 59 |
| 3.3.2 | Dieta | 60 |
| 3.4 | Obtenció de mostres | 61 |
| 3.4.1 | Plasmes | 61 |
| 3.4.2 | Teixits | 61 |
| 3.5 | Obtenció de mesures antropomètriques | 62 |
| 3.5.1 | Pes, alçada, índex de massa corporal i excés de pes..... | 62 |
| 3.5.2 | Perímetre de cintura, de maluc i índex cintura-maluc | 62 |
| 3.5.3 | Estimació del percentatge de greix | 63 |
| 3.5.4 | Estimació de l'àrea de greix | 63 |
| 3.5.5 | Estimació dels kilograms de greix..... | 63 |
| 3.6 | Tractaments previs de les mostres | 64 |
| 3.6.1 | Extracció de lípids | 64 |
| 3.6.2 | Homogenat de teixits | 65 |
| 3.6.3 | Aïllament de lipoproteïnes..... | 66 |
| 3.6.4 | Observació de lipoproteïnes per microscopia electrònica | 68 |
| 3.7 | Determinació de metabòlits | 69 |
| 3.7.1 | Àcids grassos no esterificats..... | 69 |
| 3.7.2 | Colesterol total..... | 71 |
| 3.7.3 | Colesterol lliure i esterificat | 72 |
| 3.7.4 | Cossos cetònics..... | 74 |
| 3.7.5 | Fosfolípids | 75 |
| 3.7.6 | Glicerol..... | 76 |
| 3.7.7 | Òxid nítric..... | 78 |
| 3.7.8 | Proteïna..... | 79 |
| 3.7.9 | Triacilglicèrids..... | 80 |
| 3.8 | Determinació d'altres proteïnes | 81 |
| 3.8.1 | Activador de l'inhibidor del plasminogen de tipus 1..... | 81 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 3.8.2 | Adiponectin..... | 83 |
| 3.8.3 | Apolipoproteïna AI..... | 84 |
| 3.8.4 | Apolipoproteïna B..... | 85 |
| 3.8.5 | Grelina..... | 86 |
| 3.8.6 | Leptina..... | 88 |
| 3.8.7 | Proteïna C reactiva..... | 89 |
| 3.9 | Determinació d'activitats lipases | 91 |
| 3.9.1 | Activitat lipasa hepàtica..... | 92 |
| 3.9.2 | Activitat lipasa sensible a hormones..... | 94 |
| 3.9.3 | Activitat lipoproteïna lipasa..... | 95 |
| 3.10 | Immunodetecció d'apoAIV | 97 |
| 3.11 | Determinació de l'expressió gènica | 101 |
| 3.11.1 | Extracció d'RNA..... | 101 |
| 3.11.2 | Estudi de la qualitat de l'RNA..... | 102 |
| 3.11.3 | Retrotranscripció..... | 103 |
| 3.11.4 | PCR en temps real..... | 105 |
| 3.12 | Quantificació de DNA (mètode DABA) | 110 |
| 3.13 | Determinació del HOMA-IR | 111 |
| 3.14 | Mètodes estadístics i suport informàtic | 112 |
| 4. | RESULTATS I DISCUSSIÓ | 113 |
| 4.1 | Paràmetres antropomètrics i greixos corporals | 115 |
| 4.1.1 | Pes corporal..... | 115 |
| 4.1.2 | Índex de massa corporal..... | 116 |
| 4.1.3 | Percentatge d'excés de pes..... | 116 |
| 4.1.4 | Perímetre de cintura..... | 117 |
| 4.1.5 | Perímetre de maluc..... | 117 |
| 4.1.6 | Índex cintura-maluc..... | 118 |
| 4.1.7 | Percentatge de greix corporal..... | 118 |
| 4.1.8 | Distribució dels greixos corporals..... | 119 |
| 4.1.9 | Discussió sobre paràmetres antropomètrics i greixos corporals..... | 120 |
| 4.2 | Hormones reguladores de la ingesta | 123 |
| 4.2.1 | Leptina..... | 123 |
| 4.2.2 | Grelina..... | 125 |
| 4.2.3 | Adiponectina..... | 126 |
| 4.2.4 | Discussió sobre les hormones reguladores de la ingesta..... | 127 |
| 4.3 | Metabolisme glucídic: resistència a la insulina i diabetis mellitus tipus II .. | 129 |
| 4.3.1 | Paràmetres plasmàtics: glucosa i insulina..... | 130 |
| 4.3.2 | Índex HOMA-IR..... | 131 |
| 4.3.3 | Discussió sobre metabolisme glucídic..... | 132 |
| 4.4 | Metabolisme lipídic: dislipèmia | 133 |
| 4.4.1 | Paràmetres plasmàtics..... | 133 |
| | • Triacilglicèrids..... | 133 |

| | |
|---|-----|
| • Colesterol | 134 |
| • Apolipoproteïnes AI i B | 138 |
| • Apolipoproteïna AIV | 140 |
| • Àcids grassos lliures i glicerol | 141 |
| • Cossos cetònics | 142 |
| 4.4.2 Lipoproteïnes: mida | 143 |
| 4.4.3 Lipases | 144 |
| • Lipoproteïna lipasa | 144 |
| • Lipasa hepàtica | 145 |
| 4.4.4 Discussió sobre dislipèmies | 146 |
| 4.5 Metabolisme lipídic: teixit adipós | 151 |
| 4.5.1 Contingut de DNA | 151 |
| 4.5.2 Composició lipídica | 152 |
| 4.5.3 Lipases al teixit adipós: activitat i expressió | 154 |
| • Lipoproteïna lipasa | 155 |
| • Lipasa sensible a hormones | 157 |
| • Triacilglicerol lipasa de l'adipós | 159 |
| 4.5.4 Transportadors de metabòlits | 159 |
| 4.5.5 Proteïnes implicades en la resposta a insulina | 160 |
| 4.5.6 Discussió sobre metabolisme lipídic al teixit adipós | 162 |
| 4.6 Metabolisme lipídic: NAFLD | 166 |
| 4.6.1 Paràmetres plasmàtics | 166 |
| • Transaminases | 166 |
| • Índex AST/ALT | 167 |
| 4.6.2 Histologia i classificació de Brunt | 167 |
| 4.6.3 DNA | 169 |
| 4.6.4 Composició lipídica | 169 |
| 4.6.5 Lipases: activitat i expressió | 171 |
| • Lipasa hepàtica | 171 |
| • Lipoproteïna lipasa | 172 |
| • Triacilglicerol lipasa de l'adipós | 173 |
| 4.6.6 Proteïnes implicades en el metabolisme del colesterol a fetge | 173 |
| • Hidroximetil-glutaril CoA reductasa | 173 |
| • Receptor escombriaire de tipus B1 | 173 |
| • 7 α hidroxilasa | 174 |
| 4.6.7 Proteïnes implicades en el metabolisme hepàtic de les lipoproteïnes | 174 |
| • Receptor d'LDL | 174 |
| • Apolipoproteïna B | 175 |
| • CD36 | 175 |
| 4.6.8 Discussió sobre NAFLD | 175 |
| 4.7 Inflamació | 179 |
| 4.7.1 Marcadors d'inflamació inespecífics | 179 |
| • Recompte leucocitari i hematologia | 179 |

| | |
|--|------------|
| • Albúmina..... | 180 |
| • Fosfatasa alcalina | 181 |
| • Fibrinogen | 181 |
| 4.7.2 Activador de l'inhibidor del plasminogen de tipus 1..... | 182 |
| 4.7.3 Òxid nítric i sintases d'òxid nítric | 183 |
| 4.7.4 Proteïna C reactiva..... | 185 |
| 4.7.5 Interleuquina 6 | 187 |
| 4.7.6 Factor de necrosi tumoral α | 188 |
| 4.7.7 Paràmetres relacionats amb els glucocorticoides | 189 |
| • Hormona adrenocorticotropa | 189 |
| • Cortisol..... | 189 |
| • 11 β hidroxisteroid deshidrogenasa de tipus 1 | 189 |
| 4.7.8 Discussió sobre marcadors d'inflamació..... | 190 |
| 4.8 Discussió final | 194 |
| 5. CONCLUSIONS..... | 199 |
| 6. BIBLIOGRAFIA..... | 203 |
| 7. ANNEXOS..... | 229 |
| Annex I: Determinacions realitzades de rutina a l'Hospital de la Vall d'Hebron..... | 231 |
| 1. Analítiques d'hematologia | 231 |
| 1.1 Comptatge cel·lular..... | 231 |
| 1.1.1 Sèrie vermella..... | 231 |
| • Hematies o glòbuls vermells..... | 231 |
| • Hemoglobina..... | 231 |
| 1.1.2 Sèrie blanca | 231 |
| 1.1.3 Reticulòcits..... | 233 |
| 1.1.4 Plaquetes | 233 |
| 1.2 Hemostàsia..... | 233 |
| 1.2.1 Fibrinogen | 233 |
| 2. Analítiques bioquímica | 233 |
| 2.1 Albúmina | 233 |
| 2.2 Colesterol d'HDL | 234 |
| 2.3 Colesterol d'LDL | 234 |
| 2.4 Cortisol | 234 |
| 2.5 Fosfatasa alcalina..... | 235 |
| 2.6 Glucosa | 235 |
| 2.7 Hormona adrenocorticotropa..... | 235 |
| 2.8 Insulina | 236 |
| 2.9 Transaminases..... | 236 |
| 2.9.1 ALT | 236 |
| 2.9.1 AST | 236 |

| | |
|---|------------|
| 2.9.1 GGT..... | 237 |
| 3. Histologia..... | 237 |
| Annex II: Taules de resultats..... | 238 |

ÍNDIX DE FIGURES

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Balanç energètic en l'obès. | 3 |
| Figura 2. Esquema que representa la distribució del greix en l'obesitat androide (esquerra) i ginoide (dreta).. | 6 |
| Figura 3. Relació curvilínia entre el volum adipocitari i la massa grassa. | 9 |
| Figura 4. Adipoquines secretades per l'AT. | 12 |
| Figura 5. Risc relatiu de patir DM en funció del BMI en dones entre 30 i 55 anys. | 19 |
| Figura 6 Efectes adversos d'una lipòlisi i una concentració de NEFA circulants augmentada. | 22 |
| Figura 7. Secreció d'adipoquines a l'AT d'individus obesos amb IR. | 23 |
| Figura 8. Representació de la hipòtesi de les antiincretines. | 24 |
| Figura 9. Diagrama que resumeix com un balanç energètic positiu pot portar a la DM. | 25 |
| Figura 10. Representació esquemàtica del transport de lípids exògens (en taronja) i endògens (en verd). | 28 |
| Figura 11. Representació esquemàtica del transport revers de colesterol. | 29 |
| Figura 12. Imatges histològiques d'una biòpsia hepàtica (augment original x400). | 32 |
| Figura 13. Esquema representatiu de la hipòtesi del múltiple impacte. | 34 |
| Figura 14. Mecanismes implicats en la hipertensió associada a obesitat. | 36 |
| Figura 15. Esquema d'un bypass jejunoileal. | 46 |
| Figura 16. Esquema de les diferents tècniques restrictives. | 46 |
| Figura 17. Esquema de les diferents tècniques malabsortives. | 47 |
| Figura 18. Esquema d'un bypass gàstric en Y-de-Roux. | 47 |
| Figura 19. Mitjanes del percentatge de canvi de pes durant un seguiment de 15 anys en funció de la tècnica de cirurgia bariàtrica aplicada. | 49 |
| Figura 20. Línia de temps per l'obtenció de les mostres. | 58 |
| Figura 21. Representació esquemàtica d'un RYGBP. | 60 |
| Figura 22. Exemple de resultats obtinguts amb el Bioanalyzer 2100. | 103 |
| Figura 23. Bases matemàtiques del mètode $2^{-\Delta\Delta CT}$ | 108 |
| Figura 24. Evolució del pes en la població estudiada. | 115 |
| Figura 25. Evolució del BMI en la població estudiada. | 115 |
| Figura 26. Percentatge d'excés de pes en la població estudiada. | 117 |
| Figura 27. Evolució del perímetre de cintura en la població estudiada. | 117 |
| Figura 28. Evolució del perímetre de maluc en la població estudiada. | 118 |
| Figura 29. Índex cintura-maluc (WHR) de la població estudiada. | 118 |
| Figura 30. Percentatge de greix corporal segons la fórmula de Deurenberg. | 119 |
| Figura 31. Pes de greix total, visceral i subcutani segons les fórmules de Bonora i col·laboradors. | 120 |
| Figura 32. Concentració plasmàtica de leptina en la població estudiada. | 124 |
| Figura 33. Expressió de leptina a l'AT subcutani i visceral de la població estudiada. | 124 |
| Figura 34. Concentració de grelina plasmàtica en la població estudiada. | 125 |
| Figura 35. Concentració plasmàtica d'adiponectina en la població estudiada. | 126 |

| | |
|--|-----|
| Figura 36. Expressió d'adiponectina a AT subcutani i visceral de la població estudiada. | 127 |
| Figura 37. Concentració de glucosa plasmàtica en la població estudiada. | 130 |
| Figura 38. Concentració d'insulina plasmàtica en la població estudiada. | 131 |
| Figura 39. Índex HOMA-IR de resistència a la insulina a la població estudiada. | 131 |
| Figura 40. Concentració plasmàtica de TAG a la població estudiada. | 134 |
| Figura 41. Concentració plasmàtica de colesterol total a la població estudiada. | 134 |
| Figura 42. Concentració plasmàtica d'LDLc en la població estudiada. | 135 |
| Figura 43. Concentració plasmàtica d'HDLc en la població estudiada. | 136 |
| Figura 44. Concentració plasmàtica de colesterol no-HDL en la població estudiada. | 137 |
| Figura 45. Relacions entre el colesterol de partícules aterogèniques i el de partícules no aterogèniques en la població estudiada. | 138 |
| Figura 46. Concentració plasmàtica d'apoAI en la població estudiada. | 139 |
| Figura 47. Concentració plasmàtica d'apoB a la població estudiada. | 139 |
| Figura 48. Relació apoB/apoAI en la població estudiada. | 140 |
| Figura 49. Percentatge d'apoAIV a plasma en la població estudiada. | 141 |
| Figura 50. Concentració plasmàtica de NEFA a la població estudiada. | 141 |
| Figura 51. Concentració plasmàtica de glicerol a la població estudiada. | 142 |
| Figura 52. Concentració plasmàtica de KB en la població estudiada. | 142 |
| Figura 53. Estimació de la mida de les lipoproteïnes. | 143 |
| Figura 54. Imatge de microscopia electrònica de les lipoproteïnes a diferents temps. | 143 |
| Figura 55. Activitat LPL preheparínica a plasma en la població estudiada. | 144 |
| Figura 56. Concentració d'LPL preheparínica a plasma en la població estudiada. | 145 |
| Figura 57. Activitat HL a plasma de la població estudiada. | 145 |
| Figura 58. Concentració de lípids a l'AT subcutani i visceral de la població estudiada. | 152 |
| Figura 59. Quantitat de lípid total per cèl·lula a l'AT subcutani i visceral de la població estudiada. | 154 |
| Figura 60. Activitat LPL als diferents AT. | 155 |
| Figura 61. Expressió d'LPL als diferents dipòsits grassos. | 156 |
| Figura 62. Activitat HSL als diferents AT. | 157 |
| Figura 63. Expressió d'HSL a l'AT subcutani i visceral. | 158 |
| Figura 64. Expressió d'ATGL a l'AT subcutani i visceral. | 159 |
| Figura 65. Expressió d'AQ7 a l'AT de la població estudiada. | 159 |
| Figura 66. Expressió de FABP4 i CD36 a l'AT de la població estudiada. | 160 |
| Figura 67. Expressió del receptor d'insulina a l'AT de la població estudiada. | 161 |
| Figura 68. Expressió de GLUT4 a l'AT de la població estudiada. | 161 |
| Figura 69. Representació esquemàtica del metabolisme lipídic a l'adipós de la població estudiada. | 166 |
| Figura 70. Quocient AST/ALT en la població estudiada. | 167 |
| Figura 71. Imatges de microscopia de les biòpsies analitzades. | 168 |
| Figura 72. Concentració de lípids al fetge de la població estudiada. | 169 |
| Figura 73. Percentatge de lípids al fetge de la població estudiada. | 170 |

| | |
|--|-----|
| Figura 74. Activitat i expressió de l'HL a fetge en la població estudiada..... | 171 |
| Figura 75. Activitat i expressió de l' LPL a fetge de la població estudiada..... | 172 |
| Figura 76. Expressió d'SRB1 a fetge de la població estudiada..... | 173 |
| Figura 77. Expressió de la CYP7 α 1 al fetge de la població estudiada..... | 174 |
| Figura 78. Expressió hepàtica de l'LDLr en la població estudiada..... | 174 |
| Figura 79. Expressió hepàtica d'apoB en la població estudiada.. | 175 |
| Figura 80. Expressió hepàtica de CD36 en la població estudiada..... | 175 |
| Figura 81. Recompte leucocitari en la població estudiada..... | 179 |
| Figura 82. Concentració d'albumina plasmàtica a la població estudiada..... | 181 |
| Figura 83. Concentració plasmàtica de fibrinogen en la població estudiada.. | 181 |
| Figura 84. Concentració plasmàtica de PAI1 a la població estudiada..... | 182 |
| Figura 85. Expressió de PAI1 a l'AT subcutani i visceral i afetge de la població estudiada..... | 183 |
| Figura 86. Concentració plasmàtica d'NO en la població estudiada..... | 183 |
| Figura 87. Expressió de les NOS induïble i endotelial a l'AT de la població estudiada..... | 184 |
| Figura 88. Expressió de les NOS induïble i endotelial a fetge de la població estudiada..... | 185 |
| Figura 89. Concentració plasmàtica de CRP en la població estudiada..... | 186 |
| Figura 90. Concentracions tissulars de CRP en la població estudiada..... | 187 |
| Figura 91. Expressió d'IL6 a AT subcutani i visceral en la població estudiada.. | 187 |
| Figura 92. Expressió de TNF α a l'AT subcutani i visceral i al fetge de la població estudiada..... | 188 |
| Figura 93. Concentració plasmàtica d'ACTH a la població estudiada..... | 189 |
| Figura 94. Concentració plasmàtica de cortisol a la població estudiada..... | 189 |
| Figura 95. Expressió relativa d'11HSD β 1 a AT subcutani i visceral i a fetge en la població estudiada..... | 190 |
| Figura 96. Esquema resum del metabolisme en l'obès mòrbid i de la relació que s'estableix entre l'AT i el fetge..... | 197 |
| Figura 97. Esquema resum del metabolisme en l'obès mòrbid a l'any de la intervenció de RYGP i de la relació que s'estableix entre l'AT i el fetge..... | 197 |

ÍNDIX DE TAULES

| | |
|--|-----|
| Taula 1. Criteri SEEDO per definir en graus l'obesitat adulta segons el BMI..... | 4 |
| Taula 2. Sistema de classificació del grau i l'estadi del NAFLD..... | 32 |
| Taula 3. Evolució del criteris clínics pel diagnòstic de la Síndrome Metabòlica..... | 38 |
| Taula 4. Classificació del tipus de menjadors en funció del tipus d'alteració en l'hàbit alimentari que presenten. | 42 |
| Taula 5. Característiques de les lipoproteïnes humanes. | 67 |
| Taula 6. Taula de densitats de NaBr per l'aïllament de lipoproteïnes humanes. | 67 |
| Taula 7. Condicions del termociclador per dur a terme la retrotranscripció de l'RNA a cDNA en les mostres d'AT i fetge. | 104 |
| Taula 8. Gens analitzats a l'AT. | 106 |
| Taula 9. Gens analitzats al fetge. | 107 |
| Taula 10. Condicions per dur a terme la PCR en temps real en les mostres d'AT i fetge. | 108 |
| Taula 11. Relació de Ct obtingudes per als tres gens control, en cada teixit i per a cada situació..... | 109 |
| Taula 12. Concentració de lípids a l'AT de la població estudiada. | 153 |
| Taula 13. Concentració de transaminases plasmàtica en la població estudiada..... | 167 |
| Taula 14. Puntuació histològica segons la classificació de Brunt. | 168 |
| Taula 15. Resultats de les analítiques d'hematologia de la població estudiada. | 180 |
| Taula 16. Valors de referència de l'Hospital pels diferents tipus de leucòcits..... | 232 |
| Taula 17. Paràmetres antropomètrics: | 238 |
| Taula 18. Greixos corporals: | 238 |
| Taula 19. Hormones reguladores de la ingesta:..... | 238 |
| Taula 20. Paràmetres de metabolisme glucídic: | 239 |
| Taula 21. Paràmetres lipídics a plasma: | 239 |
| Taula 22. Lipases a plasma:..... | 240 |
| Taula 23. Composició lipídica de l'AT subcutani i visceral: | 240 |
| Taula 24. Lipases a l'AT subcutani i visceral: | 240 |
| Taula 25. Transaminases: | 241 |
| Taula 26. Composició lipídica del fetge:..... | 241 |

| | |
|--|-----|
| Taula 27. Lipases a fetge:..... | 241 |
| Taula 28. Paràmetres hematològics:..... | 242 |
| Taula 29. Paràmetres inflamatoris:..... | 243 |
| Taula 30. Expressió relativa dels gens estudiats a l'AT subcutani i visceral:..... | 244 |
| Taula 31. Expressió relativa dels gens estudiats al fetge: | 245 |

SIGLES I ABREVIATURES

11 β HSDH: 11 beta hidrioxoesteroid deshidrogenasa
ABCA: proteïna transportadora d'unió a ATP
ACS: acil coenzim A sintetasa
ACTH: hormona adrenocorticotropa
AE: activitat específica
AgRP: proteïna relacionada amb agouti
ALT: alanina aminotransferasa
ANGPTL: angiopoietina
apo: apolipoproteïna
AQ: aquaporina
AST: aspartat aminotransferasa
AT: teixit adipós blanc
ATGL: triacilglicerol lipasa de l'adipós
AUC: àrea sota la corba
BMI: de l'anglès *body mass index*, índex de massa corporal
BMR: de l'anglès *basal metabolic rate*, taxa metabòlica basal
BPD: derivació biliopancreàtica
B_T: unió total
cAMP: adenosina monofosfat cíclic
CART: transcrit regulat per cocaïna i amfetamina
CBG: proteïna d'unió a glucocorticoides
cDNA: DNA còpia
CETP: proteïna transferidora d'esters de colesterol
CHOL: colesterol
CPAP: pressió continua positiva
CPM: volum plaquetari mitjà
CRP: proteïna C reactiva
Ct: cicle
CT: comptes totals
CYP7 α 1: 7 α hidroxilasa 1
DABA: àcid diamino benzoic
DAG: diacilglicerols
DEXA: densitometria de doble fotó dual
DM: diabetes mellitus de tipus II
DTT: ditiotreitòl
EC: colesterol esterificat
EDTA: àcid etilen diamino tetraacètic
ELS: endoluminal sleeve
eNOS: síntasa d'òxid nítric endotelial
FABPpm: proteïna d'unió a àcids grassos de membrana plasmàtica

FAT/CD: translocasa d'àcids grassos/grup de diferenciació
FATP: proteïnes transportadores d'àcids grassos
FC: colesterol lliure
FID: Federació Internacional de Diabetis
GB: de l'anglès *gastric banding*, banda gàstrica ajustable
GGT: gamma glutamil transpeptidasa
GIP: pèptid insulino tròpic depenent de glucosa
GLP: pèptid similar al glucagó
GLUT: transportador de glucosa
GNG: gluconeogènesi
GPIHBP: proteïna d'unió a glicosil-fosfatidil-inositol d'HDL de tipus
HDL: de l'anglès *high density lipoprotein*; lipoproteïna d'alta densitat
HDLc: colesterol d'HDL
HEPES: àcid 2-[4(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etanulfònic
HL: de l'anglès *hepatic lipase*; lipasa hepàtica
HMGC_oA: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
HOMA-IR: de l'anglès *homeostasis model assesment of insulin resistance*
HPA: eix hipòfisi-pituitària-adrenal
HSL: lipasa sensible a hormones
HSPG: proteoglicans de tipus heparan sulfat
IDF: *International Diabetes Federation*
IDL: de l'anglès *intermediate density lipoprotein*, lipoproteïna de densitat intermitja
IL: interleuquina
iNOS: sintasa d'òxid nítric induïble
IR: resistència a la insulina
IRS: substrat del receptor d'insulina
KB: cossos cetònics
KO: *knock-out*
LDL: de l'anglès *low density lipoprotein*; lipoproteïna de baixa densitat
LDLc: colesterol d'LDL
LDLr: receptor d'LDL
LPL: lipoproteïna lipasa
LRP: proteïna similar a l'LDLr
MAG: monoacilglicerols
MTP: proteïna microsomal de transferència de TAG
NAFLD: de l'anglès *non alcoholic fatty liver disease*; malaltia del fetge gras no
alcohòlic
NASH: de l'anglès *non-alcoholic steatohepatitis*; esteatohepatitis no alcohòlica
NCEP ATPIII: Tercer panell d'experts per a la detecció, avaluació i tractament de la
hipercolesterolemia en adults.
NEFA: de l'anglès *non-esterified fatty acids*, àcids grassos no esterificats
NIH: National Institute of Health
NO: òxid nítric

no-HDLc: colesterol no HDL
NPY: neuropèptid Y
NSB: unió no específica
NTB: *nitroblue tetrazolium*
OMS: Organització Munidal de la Salut
OPD: ortofenilen diamina
PAI1: activador de l'inhibidor del plasminògen 1
PCR: reacció en cadena de la polimerasa
PL: fosfolípids
POMC: propiomelanocortina
PPAR: de l'anglès *peroxisome proliferator-activated receptors*, receptors activadors de la proliferació peroxisomal
QM: quilomicrons
QMr: romanents de quilomicro
RIN: número d'integritat de l'RNA
RM: ressonància magnètica
ROS: espècies reactives de l'oxigen
RYGB: de l'anglès *Roux-en-Y gastric bypass*, bypass gàstric en Y-de-Roux
sdLDL: de l'anglès *small dense LDL*; LDL petites i denses
SDS: dodecil sulfat sòdic
SEEDO: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad
SG: de l'anglès *sleeve gastrectomy*; gastrectomia tubular
SGLT: cotrasportador de sodi-glucosa
SOS: *Swedish Obeses Subjects*
SRB1: receptor escombriaire de tipus 1
SREBP: proteïnes d'unió a elements regulats per esterols
TAG: triacilglicèrids
TEMED: N, N, N, N-tetrametil-etilen-diamina
TFA: àcid trifluoroacètic
TLDA: de l'anglès *Taqman Low Density Array*
TMB: tetrametil bencidina
TNF α : factor de necrosi tumoral α
UCP: proteïna desacopladora de la cadena de protons
UI: unitats internacionals
VBG: de l'anglès *vertical banded gastroplasty*, gastroplàstia vertical anellada
VCM: volum corpuscular mitjà
VLCD: de l'anglès *very low calorie diets*, dietes molt baixes en calories
VLDL: de l'anglès *very low density lipoproteins*; lipoproteïnes de molt baixa densitat
WHR: de l'anglès *waist-to-hip ratio*, perímetre cintura-maluc

1. INTRODUCCIÓ

Introducció

1.1 L'obesitat: perspectiva històrica

L'obesitat és una malaltia crònica i multifactorial que apareix com a resultat d'un desequilibri entre la ingesta calòrica i la despesa energètica, en benefici d'un balanç energètic positiu perllongat en el temps (Figura 1). En aquest equilibri hi intervenen tant factors genètics com ambientals.

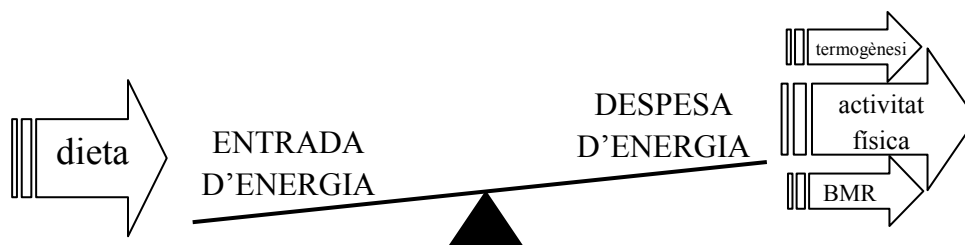


Figura 1. Balanç energètic en l'obès. El balanç energètic és la diferència entre l'energia que aporten els aliments i l'energia que es gasta (ja sigui en activitat física, en taxa metabòlica basal (BMR) o en termogènesi). En el cas dels obesos el balanç energètic està desplaçat cap a la banda de les entrades.

El disseny de l'organisme i el metabolisme humà són el resultat de milions d'anys d'evolució biològica. Durant aquest temps, la selecció natural ha triat aquelles característiques que han permès la supervivència de l'espècie humana i dels seus ancestres. En la prehistòria, els homínids eren caçadors i recol·lectors, la seva alimentació (és a dir, l'entrada d'energia) era rica en hidrats de carboni complexes i fibra, i l'esforç que els suposava aconseguir aquests aliments (és a dir, la sortida d'energia) era important. D'aquesta manera la selecció natural va acabar triant el que en J.V. Neel, al 1962, va definir com a "genotip estalviador" [1], el qual es caracteritza per permetre l'acumulació en forma de greix de l'energia excedent consumida durant les èpoques d'abundància d'aliments per poder-la fer servir durant les èpoques d'escassetat. Amb el desenvolupament de l'agricultura i la ramaderia, l'esforç que suposava aconseguir aliments es va anar reduint progressivament, tot i això l'home continuava veient-se sotmès a períodes d'escassetat d'aliments deguts a condicions ambientals adverses (guerres, pèrdua de collites, epidèmies, etc.); de manera que el fet de tenir el genotip estalviador continuava sent un avantatge evolutiu. No ha estat fins al segle XIX, amb l'inici de la revolució industrial, que les condicions de vida de l'ésser humà han canviat dràsticament. Poc a poc, la nostra dieta s'ha anat enriquint en aliments amb un elevat contingut calòric i proteic, un elevat contingut en greixos saturats i hidrats de carboni d'absorció ràpida; per contra, el nostre nivell d'activitat física s'ha reduït considerablement i ha augmentat el sedentarisme. Resumint: les nostres entrades d'energia han augmentat considerablement mentre que les sortides s'han reduït. El resultat de tot això és que l'equilibri energètic que existia entre entrades i sortides d'energia a l'organisme s'ha trencat, inclinant la balança cap a les entrades.

Podríem dir que els nostres gens paleolítics i el nostre estil de vida modern estan en conflicte i el resultat n'és l'obesitat.

Introducció

1.1.1 Epidemiologia: l'obesitat mòrbida

L'obesitat és una malaltia que es caracteritza principalment per un excés de greix corporal. Així doncs, es podrien definir com a persones obeses aquelles que tenen percentatges de greix superiors als considerats normals o ideals, que són del 25% en homes i del 33% en dones [2]. Tot i això, per definir el grau d'obesitat és molt més freqüent utilitzar l'índex de Quetelet o índex de massa corporal (BMI) [3], entès com el quocient entre el pes d'un individu en kilograms, dividit entre la seva alçada al quadrat en metres. La classificació que proposa l'Organització Mundial de la Salut (OMS), i que va ser adoptada (amb algunes modificacions) el 1993 en el nostre país per la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO), és la que figura a la Taula 1.

| Rang de BMI | Classificació |
|-------------|-----------------------------------|
| < 18.5 | Pes insuficient |
| 18.5 – 24.9 | Normopès |
| 25.0 – 26.9 | Sobrepès de grau I |
| 27.0 – 29.9 | Sobrepès de grau II (preobesitat) |
| 30.0 – 34.9 | Obesitat de tipus I |
| 35.0 – 39.9 | Obesitat de tipus II |
| 40.0 – 49.9 | Obesitat de tipus III (mòrbida) |
| ≥ 50 | Obesitat de tipus IV (extrema) |

Taula 1. Criteri SEEDO per definir en graus l'obesitat adulta segons el BMI. Extret del Consens SEEDO 2007 [4].

Segons aquesta classificació, en la població adulta espanyola (entre 25 i 64 anys) la prevalença del sobrepès ha passat d'un 12.4% al 2004 a un 39.4% el 2011 (46.4% en homes i 32.5% en dones) i la d'obesitat d'un 15.6% a un 22.9% (24.4% en homes i 21.4% en dones). Finalment, la prevalença d'obesitat mòrbida ha passat d'un 0.63% (un 4.0% de la població d'obesos) el 2004 a un 1.2% el 2011 (0.6% en homes i 1.8% en dones), que representa el 5.2% de la població d'obesos. Dades obtingudes dels estudis DORICA [5] i ENRICA [6].

Va ser Van Itallie, als anys 80, el primer que va descriure l'obesitat mòrbida com aquella obesitat que comprometia l'esperança de vida dels individus que la patien [7]. L'obesitat mòrbida és responsable d'un increment del 52% de la taxa de mortalitat en els homes i d'un 62% en les dones, si es compara amb persones amb normopès [8]. Per altra banda, l'obesitat mòrbida predisposa a una elevada comorbiditat com ara la resistència a la insulina (IR) que pot evolucionar a *diabetes mellitus* de tipus II (DM), dislipèmies, fetge gras no alcohòlic (NAFLD) i hipertensió arterial entre d'altres [9].

La utilització del BMI per classificar l'estat d'obesitat es basa en associacions epidemiològiques entre aquest índex i la morbiditat i mortalitat que porta associades [10]. El BMI potser no és el millor sistema per mesurar el grau d'obesitat ja que no pot diferenciar entre l'excés de pes provocat per l'excés de greix o el provocat per una

Introducció

hipertròfia muscular (per exemple, en el cas dels atletes) o per un edema. Tampoc no és una mesura de la composició corporal (tot i que sí que està correlacionat amb el greix corporal). Tot i això, s'accepta com a classificació per al grau d'obesitat, ja que la forma d'obtenir-lo és ràpida, senzilla, no invasiva i econòmica. A més, s'ha demostrat que presenta una relació molt estreta amb els problemes de salut associats a l'obesitat. Segons Clegg i col·laboradors, el risc de mortalitat augmenta en un 50% per a un BMI de 30 en comparació a un individu normopès i es duplica a partir d'un BMI de 35, seguint a partir d'aquí una relació lineal [11].

Els motius que poden portar a un individu a convertir-se en obès mòrbid poden ser molt diversos, però bàsicament es poden reduir a dues situacions: o bé existeix una ingesta d'energia superior a la despesa, o bé tot i mantenir una ingesta d'energia estable, la despesa disminueix. Estudis realitzats per en Prentice i col·laboradors [12] van demostrar que per terme mig els obesos tenen taxes metabòliques més altes si es comparen amb individus normopès, degut a que juntament amb el greix (teixit metabòlicament menys actiu) també augmenta la massa lliure de greix (teixit metabòlicament més actiu). D'aquest estudi es conclou que, al menys en una part de la població obesa, la causa de la seva obesitat no és un defecte de la despesa energètica sinó un lleuger però mantingut augment de la taxa d'ingesta energètica per sobre dels valors considerats d'equilibri. Aquesta situació pot empitjorar amb el temps, com en el cas dels obesos mòrbids, si l'acumulació de greix dificulta la realització d'activitat física, ja que el consum energètic actiu encara disminueix més. Un cop assolida l'obesitat mòrbida és freqüent que els individus se sotmetin a programes de pèrdua de pes. S'ha observat que un 50% dels pacients que se sotmeten a tractaments de pèrdua de pes no invasius pateixen trastorns afectius (depressió i ansietat), que podrien ser decisius en l'elevat nombre d'abandonaments del tractament [13]. Pel que fa als aspectes psicològics de l'individu, hi ha autors que consideren que són un dels factors causants de l'obesitat, mentre que d'altres consideren que són una conseqüència de la discriminació social que pateix l'obès [14].

1.2 El teixit adipós blanc

Durant molt de temps s'ha considerat que el teixit adipós blanc (AT) era un teixit més aviat passiu i bàsicament se li atribuïa la funció d'emmagatzemar energia en forma de triacilglicèrids (TAG) per proporcionar-la a la resta de l'organisme en situacions de dèficit energètic. Tanmateix, en els darrers anys s'ha avançat de forma notòria en la comprensió de la fisiopatologia d'aquest teixit. S'ha pogut comprovar que aquest no és simplement un reservori de greix, sinó que és un important òrgan endocrí que participa activament no només en el manteniment de l'homeòstasi energètica, sinó que també regula diversos processos fisiològics implicats en el sistema de control de la glucèmia, el sistema immunitari i la reproducció. És per això que la seva alteració, situació que es dona en casos com l'obesitat o les lipodistròfies, té conseqüències negatives per a la salut.

Introducció

1.2.1 Distribució del greix corporal

El 1974, J. Vague va descriure que hi ha dos patrons de distribució del greix corporal: el ginoide, observat normalment en dones i l'androide, més freqüent en els homes [15]. En l'obesitat ginoide els dipòsits grassos s'acumulen a la zona femoral i dels glutis (distribució perifèrica dels greixos) i generalment no va associada a un augment del risc per a la salut. En canvi, en l'obesitat de tipus androide els dipòsits grassos s'acumulen a la zona abdominal (distribució central dels greixos) i sí que està associada a un augment de la morbimortalitat (Figura 2) [16-18]. Així doncs, dues persones amb el mateix grau de sobrepès poden tenir una distribució del greix corporal diferent i per tant un risc de patir malalties associades diferent. Cal tenir present que tant el sexe [19] com l'ètnia [20] són factors que afecten a la distribució i al metabolisme de l'AT.

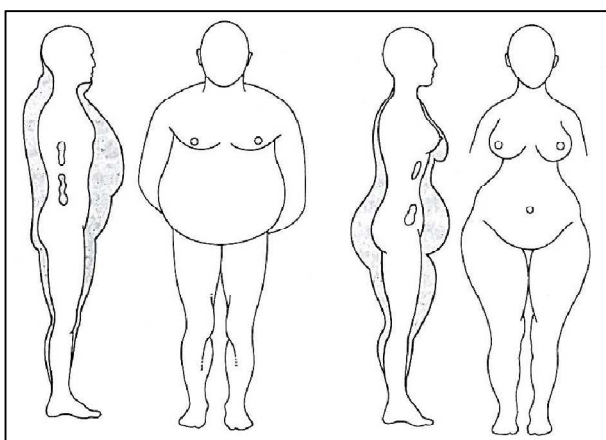


Figura 2. Esquema que representa la distribució del greix en l'obesitat androide (esquerra) i ginoide (dreta). A destacar que en l'obesitat androide el contingut de greix abdominal és superior que en la ginoide. Adaptat de Foz M. i Formiguera X. [16].

L'AT abdominal inclou el greix subcutani situat a la regió abdominal i el greix visceral, situat a la cavitat abdominal al voltant dels principals òrgans. Aquest darrer es subdivideix en omental (al voltant de les vísceres), mesentèric (al voltant de l'intestí) i el retroperitoneal (al voltant dels ronyons). El greix visceral pot arribar a representar el 20% del greix corporal total en els homes i un 5-8% en les dones en els normopès [21].

El punt de tall per establir quan hi ha obesitat abdominal varia en funció del criteri que se segueixi; la primera definició d'obesitat central la va proposar l'OMS basant-se en el quocient cintura/maluc (WHR). Així, es parlava d'obesitat central quan el quocient era igual o superior a 1 en homes i a 0.9 en dones [22]. La segona definició, probablement la més popular, la va proposar el tercer panell d'experts per a la detecció, avaluació i tractament de la hipercolesterolèmia en adults (NCEP-ATPIII) la qual es basa només en el perímetre de la cintura. Segons aquesta definició, existeix obesitat central quan el perímetre de cintura està per sobre de 102 cm en l'home i de 88 cm en la dona [23]. Finalment, l'any 2005 la Federació Internacional de Diabetes (IDF) va introduir dos canvis: per una banda va disminuir els punts de tall per a la definició d'obesitat central i per altra banda va proposar diferents punts de tall en funció de l'ètnia dels individus. Segons aquest criteri, en el cas dels europeus es parla d'obesitat central quan el perímetre de cintura és superior a 94 cm en el cas del homes i a 80 cm en el cas de les dones [24].

Introducció

1.2.2 Determinació de les diferents masses grasses

Tot i la gran utilitat que presenta el BMI alhora d'establir el grau d'obesitat d'un individu, es tracta més aviat d'un marcador de corpulència i no pas d'adipositat i a més, no té en compte la distribució regional del greix. És per això que s'han desenvolupat diverses metodologies per poder estudiar la composició corporal i en especial les quantitats de greix visceral. La composició corporal en els obesos és diferent de la d'un individu amb normopès: mentre que en un individu amb normopès la massa grassa pot suposar un 20% del pes corporal (per tant la massa magra serà del 80%), en un obès la massa grassa pot arribar a suposar el 36.5% del pes corporal [8]. Això fa que a l'hora d'estimar els dipòsits grassos no hi hagi unanimitat en variables com el nivell d'hidratació de l'AT, la densitat dels diferents teixits o la proporció dels elements químics en aquests.

Actualment, un dels mètodes més emprats per a l'estimació de la composició corporal és la bioimpedància, definida com l'oposició d'un conductor biològic al pas d'un corrent altern. Es tracta d'una tècnica relativament econòmica, no invasiva i que es basa en les propietats corporals d'impedància. Mesura l'aigua corporal aplicant unes equacions predictives obtingudes mitjançant altres tècniques de referència [25] i obté la massa grassa de restar la massa total de l'organisme menys la massa lliure de greix mesurada. Aquesta tècnica però, no està recomanada per individus amb un BMI > 35 kg/m² [26], ja que per una banda encara no es disposa d'equacions predictives validades per a aquesta població i per altra banda, la tècnica assumeix una hidratació constant de la massa lliure de greix, cosa que s'ha vist que està alterada en el pacient obès [8, 27]. Aquest darrer inconvenient podria quedar resolt amb la bioimpedància multifreqüència, ja que treballa amb diverses freqüències que van des de 5 a 1000 kHz i d'aquesta manera té en compte les diferents freqüències que es poden donar al teixit muscular [25].

Un altre mètode que s'està imposant en els darrers anys per a la mesura de la composició corporal és la densitometria de doble fotó dual (DEXA). Es tracta d'una tècnica amb un cost econòmic elevat i no invasiva que es basa en l'atenuació fotònica diferencial que presenten els teixits corporals, assumint que el cos està dividit en tres compartiments: os, teixit gras i teixit magre. Aquesta tècnica, igual que la bioimpedància, també assumeix una hidratació constant del teixit magre, però no l'utilitza per a la determinació de la massa grassa. Alguns equips de DEXA permeten la quantificació de la massa grassa abdominal, però no poden diferenciar entre subcutània i visceral [28]. Tanmateix, l'aplicació d'aquesta tècnica en pacients amb obesitat i obesitat mòrbida presenta les següents limitacions: amb gruixos superiors a 25 cm (freqüentment observats en BMI > 35 kg/m²) s'infrestima la massa grassa i l'AT situat immediatament per sobre de l'os no es pot determinar directament i s'ha d'extrapol·lar dels teixits adjacents. Tot i això, la limitació principal d'aquesta tècnica a l'hora d'analitzar individus amb obesitat mòrbida és que els aparells de mesura no tenen les mides adaptades a les dimensions d'aquest tipus de pacients, dificultant l'exploració del cos sencer [8].

La determinació de la distribució del greix corporal és cada cop més important en la valoració de la composició corporal. Per això s'han desenvolupat diverses tècniques,

Introducció

entre les que destaquen la **tomografia computeritzada** i la **ressonància magnètica**, que permeten fer aquestes determinacions reduint la variabilitat interobservador. La tomografia computeritzada es basa en l'atenuació que experimenten els rajos X quan travessen les diferents estructures corporals, abans d'arribar als receptors de l'aparell. Aquests receptors tradueixen el senyal en diferents tonalitats de gris per a cada teixit. La ressonància magnètica en canvi, no utilitza radiacions ionitzants, sinó que mitjançant un camp magnètic extern i polsos de radiofreqüència aconseguix captar l'energia alliberada pels protons dels nuclis d'hidrogen del cos, quan aquests alliberen l'energia absorbida. L'alliberació d'aquesta energia és captada per un receptor que la tradueix en imatge. L'avantatge que té la ressonància magnètica sobre la tomografia computeritzada és que en la primera el senyal produït pel greix és el més alt d'entre tots els teixits i això permet diferenciar bé entre el greix subcutani i el visceral de forma automàtica [29]. Aquests mètodes però, tenen un cost elevat i no és fàcil emprar-los en la rutina clínica.

Tot i disposar d'aquestes tècniques, avui en dia encara continua sent imprescindible la **valoració antropomètrica** del pacient. A part de les mesures necessàries per al càlcul del BMI, la mesura dels perímetres de cintura i maluc i el posterior càlcul del seu quocient (perímetre de cintura/perímetre de maluc) per obtenir el WHR permet diferenciar entre obesitat androide (WHR>1 en homes i >0.9 en dones) o ginoide (WHR<1 en homes i <0.9 en dones) [30]. A més, un forma senzilla i econòmica d'obtenir una estimació del risc que presenta un individu amb obesitat central és mitjançant la mesura del perímetre de la cintura. Aquesta mesura té ben establerts els punts de tall [31]. Tanmateix, aquest tipus de mesures no estan exemptes de limitacions: la relació directa entre el BMI i el perímetre de la cintura en el pacient obès disminueix de forma progressiva a partir de BMI>35 kg/m², probablement degut a dificultats pròpiament tècniques del sistema de mesura (en un pacient obès mòrbid el greix abdominal freqüentment penja per sota de les referències anatòmiques on s'han de prendre aquestes mesures).

Per altra banda, hi ha autors que han desenvolupat **fórmules predictives** tant de la massa de greix total, com de la subcutània i la visceral a partir de mesures antropomètriques senzilles [8, 32-34].

1.2.3 Fisiologia del teixit adipós

Des d'un punt de vista histològic, l'AT està format per adipòcits madurs, preadipòcits en diferents estadis de diferenciació, cèl·lules mesenquimàtiques, endotelials i neuronals, i cèl·lules del sistema immune; totes elles incloses dins d'una matriu extracel·lular (col·lagen i metal·loproteases) [35].

L'adipòcit, la unitat bàsica de l'AT, té el seu origen en una cèl·lula precursora de tipus fibroblast: el preadipòcit. El preadipòcit, sota l'efecte de diferents hormones (insulina i glucocorticoides), citoquines, factors de creixement (factor de creixement insulínic-1) i nutrients (àcids grassos, vitamina A), inicia un procés de diferenciació morfològica i funcional fins a convertir-se en adipòcit madur. En aquesta fase de l'adipogènesi és molt important l'expressió de factors de transcripció com ara el receptor activador de la proliferació peroxisomal (PPAR) γ o el factor depenent de la

Introducció

determinació i diferenciació adipocitària (SREBP), ja que són els reguladors centrals de la transcripció durant la diferenciació adipocitària [36].

L'adipogènesi, o procés de creació de nous adipòcits, té lloc al llarg de tota la vida d'un individu i és clau en el manteniment del nombre de cèl·lules a l'AT (en els adults, aproximadament el 10% dels adipòcits es renova anualment, independentment del BMI, amb una vida mitjana de 10 anys) [37]. L'adipòcit pot créixer en mida (hipertròfia) i/o en nombre (hiperplàsia), i tots dos processos estan relacionats [38]. El nombre d'adipòcits presents a l'AT i el seu volum són els factors determinants per establir la massa grassa d'un individu, fet que queda demostrat per que la massa grassa i el volum adipocitari tenen una relació curvilínia (Figura 3) [37, 39].

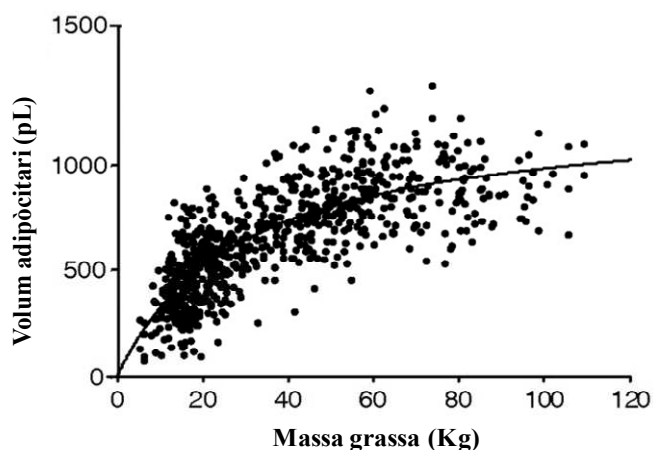


Figura 3. Relació curvilínia entre el volum adipocitari i la massa grassa. Adaptat d'Arner, E. i col·laboradors [39].

S'ha descrit que el nombre d'adipòcits queda fixat durant la infància i la pubertat i es manté constant durant l'edat adulta (tant en individus normopès com en individus obesos); fins i tot, després d'una pèrdua de pes important ($18 \pm 11\%$). És a dir, que en els adults el que varia és el volum dels adipòcits [37]. Tanmateix, s'ha de destacar que hi ha autors que han descrit que hi ha individus que presenten un AT més aviat hiperplàsic (amb un elevat nombre d'adipòcits però petits) i taxes altes de recanvi cel·lular, i individus amb un AT hipertròfic (amb un nombre d'adipòcits menor però més grans) i taxes de renovació baixes [39].

1.2.4 Principals lipases del teixit adipós

1.2.4.1 Triacilglicerol lipasa de l'adipós

L'any 2004, tres laboratoris van identificar simultàniament la triacilglicerol lipasa de l'adipós (ATGL), una proteïna de 54 KDa [40-42], també coneguda amb el nom de desnitrina o fosfolipasa $A_2\zeta$. L'ATGL és un enzim que s'expressa principalment a l'AT, tot i que també s'ha trobat en menor quantitat a múscul esquelètic i cardíac, macròfags i a testicles [43]. A les cèl·lules que tenen gotes lipídiques, com els adipòcits, es troba inactiva tant al citosol com associada a les gotes lipídiques.

Hi ha evidències de que l'ATGL catalitza de forma selectiva el primer pas de la hidròlisi dels TAG, donant lloc a la formació de diacilglicerols (DAG) i àcids grassos

Introducció

no esterificats (NEFA). L'activitat TAG-hidrolasa és 10 vegades superior a la DAG-hidrolasa i no presenta activitat envers altres substrats com ara els EC [42]. En humans, per acció dels glucocorticoides, el pèptid natriurètic o mitjançant els receptors β -adrenèrgics [44, 45], s'allibera el cofactor de l'ATGL (la proteïna CGI-58) i s'inicia l'activitat TAG hidrolasa. La insulina i el factor de necrosi tumoral α (TNF α) inhibeixen l'expressió de l'ATGL; el dejuni i els agonistes PPAR α i PPAR γ l'augmenten [43]. Es creu que l'ATGL està principalment implicada en la lipòlisi basal.

Els ratolins *knock-out* (KO) per l'ATGL tenen més massa adiposa, l'activitat TAG-hidrolasa a l'AT està reduïda en un 80% i són més sensibles al fred, ja que els seus adipòcits no són capaços de mobilitzar suficients reserves energètiques. Com que tenen una disponibilitat de NEFA reduïda com a font d'energia, aquests animals presenten un augment en la utilització dels carbohidrats i això va acompanyat d'una millor tolerància a la glucosa i una major sensibilitat a la insulina. Per altra banda, aquest ratolins acumulen TAG a la pràctica totalitat dels teixits del cos, fet que els provoca una mort prematura [46]. Pel que fa als humans deficientes en ATGL, desenvolupen una malaltia que cursa amb miopatia i acumulació anòmala de lípids neutres als teixits, però contràriament al que succeeix en ratolí, no són obesos [43]; això fa pensar que la lipòlisi a l'AT mitjançant l'ATGL en humans no és tan importat com en ratolí.

1.2.4.2 Lipasa sensible a hormones

La lipasa sensible a hormones (HSL) és un enzim citoplasmàtic de 84 KDa que es troba expressat a AT, múscul esquelètic, pàncrees, testicles i macròfags [45]. Tot i que presenta activitat lipàsica envers una gran varietat de substrats (TAG, DAG, EC i de retinol), presenta una especificitat de substrat deu vegades més alta pels DAG que pels TAG [43].

Per que l'HSL pugui exercir la seva activitat és necessari que transloqui del citosol cap a la superfície de les gotes lipídiques. S'ha vist que per que aquesta translocació tingui lloc és necessària la fosforil·lació de l'enzim per la proteïna quinasa A, com a conseqüència d'una activació β -adrenèrgica. Un cop a la membrana de la gota lipídica, la perilipina A fosforil·lada afavorirà l'entrada en contacte de l'HSL amb els seus substrats. La insulina inhibeix l'activitat de l'HSL. A més, també està inhibida per TNF α i resistina i activada per interleuquina 6 (IL-6), leptina i PPAR- γ , implicant així la senyalització inflamatòria en el mecanisme de control lipolític [45].

Els ratolins KO per HSL presenten una disminució de la massa grassa i una acumulació de DAG a l'AT. Això, sumat al fet que aquests ratolins encara mantinguin certa activitat TAG hidrolasa estimable per catecolamines (40-50% de la dels no mutats) fa pensar que l'HSL és l'enzim limitant per a la hidròlisi dels DAG, mentre que la mobilització dels TAG requereix d'una segona lipasa. Aquests ratolins estan protegits contra l'obesitat provocada per dietes riques en greixos. Sorprenentment, la sensibilitat a la insulina en aquests ratolins no es veu afectada [43, 45].

Introducció

1.2.4.3 Lipoproteïna lipasa

La lipoproteïna lipasa (LPL) és un enzim glicoproteïc de 55 KDa que es troba expressat a AT, cor, múscul esquelètic, pulmó, glàndula mamària alletant, cervell, ronyó i macròfags. La funció principal de l'LPL és la d'hidrolitzar els TAG dels quilomicrons (QM) i les lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) per generar NEFA que puguin ser utilitzats pels teixits. A més, també s'ha descrit que té activitat fosfolipasa, que facilita l'accés de l'enzim al nucli de la lipoproteïna [47].

L'LPL se sintetitza al parènquima dels teixits en els que es localitza. Posteriorment, se secreta a l'espai intersticial i, per un mecanisme que encara es desconeix, transloca fins a la llum de l'endoteli. Hi ha autors que suggereixen que aquest transport el duen a terme proteoglicans de tipus heparan sulfat (HSPG) [48], mentre que d'altres suggereixen que qui fa de llançadora entre les cèl·lules del parènquima de l'AT o del múscul i la cara luminal de les cèl·lules de l'endoteli és la proteïna d'unió a glicosilfosfatidil-inositol d'HDL de tipus 1 (GPIHBP1) [49]. Tradicionalment s'ha pensat que un cop arriba a la llum dels vasos sanguinis l'LPL hi queda ancorada en la seva forma homodimèrica (activa) mitjançant cadenes d'HSPG [50]. Tanmateix, aquest model està canviant, ja que alguns autors han suggerit un model en el que els HSPG, que unirien l'LPL amb baixa afinitat, facilitarien la transferència de l'enzim cap a la GPIHBP1, que té 10 vegades més afinitat per l'LPL que els HSPG [48, 51]. Estudis recents suggereixen que aquesta proteïna, juntament amb l'apolipoproteïna (apo) AV, és la principal plataforma per que l'LPL pugui hidrolitzar els TAG de les lipoproteïnes riques en TAG [51, 52].

L'apoAV regula la hidròlisi de les lipoproteïnes riques en TAG mitjançant la inhibició de la producció hepàtica de VLDL o facilitant la interacció de l'LPL amb aquestes lipoproteïnes [53]. Per altra banda, la relació entre la quantitat d'apoCII i apoCIII present a les lipoproteïnes riques en TAG és un altre modulador de l'activitat de l'LPL. Quan la balança es decanta cap a l'apoCII, els QM i les VLDL són bons substrats per l'LPL i en canvi, quan proporcionalment hi ha més apoCIII, aquestes lipoproteïnes deixen de ser un bon substrat per l'enzim.

Unes altres proteïnes que modulen l'activitat de l'LPL a l'endoteli són les proteïnes semblants a angiopoietina 3 i 4 (ANGPTL 3 i 4). Aquestes proteïnes promouen la monomerització de l'LPL de manera que en disminueixen la seva activitat [54].

Després d'una vida mitja curta, l'LPL s'allibera al torrent sanguini i es transporta, majoritàriament en forma inactiva i monomèrica, associada a lipoproteïnes circulants (sobretot lipoproteïnes de baixa densitat o LDL i lipoproteïnes d'alta densitat o HDL), fins al fetge, on finalment és captada i degradada [55].

A nivell transcripcional els SREBP 1 i 2 i els PPAR α i γ activen l'expressió d'LPL i el TNF α a fetge l'activa [56], mentre que a la resta de teixits l'inhibeix [57]. A nivell fisiològic, l'LPL està sotmesa a una regulació específica de teixit que permet dirigir la distribució dels substrats lipídics entre els diferents teixits i adaptar-la al context metabòlic de l'organisme. Així doncs, s'ha descrit que després d'una ingesta (nivells alts d'insulina) l'AT presenta uns nivells d'activitat LPL elevats que afavoreixen la

Introducció

captació de NEFA i l'acumulació de TAG en aquest teixit; mentre que en el dejuni (nivells elevats de glucagó), l'activitat LPL disminueix a l'AT però augmenta a cor i múscul esquelètic, de manera que es produeix un flux de TAG cap aquests teixits per satisfer les seves demandes energètiques. Els glucocorticoides provoquen un augment de l'activitat LPL tant a l'AT com a cor, mentre que les catecolamines provoquen un augment a múscul (cardíac i esquelètic) i una disminució a l'AT [58].

L'LPL tissular pot tenir un efecte antiaterogènic ja que afavoreix la maduració de les HDL, mentre que L'LPL dels macròfags pot tenir un efecte proaterogènic afavorint la formació de cèl·lules escumoses [57].

1.2.5 Principals adipocitoquines del teixit adipós

Com hem dit abans, l'AT cada cop s'entén més com un òrgan endocrí actiu més que no pas un simple reservori energètic. Els adipòcits produeixen i secreten diverses proteïnes, anomenades adipocitoquines, que actuen com a veritables hormones responsables de la regulació de la ingesta i de la despesa energètica. A més, s'ha vist que algunes d'aquestes adipocitoquines també estan implicades en processos inflamatoris i arterioscleròtics (Figura 4). A continuació es presenten algunes de les adipocitoquines més importants.

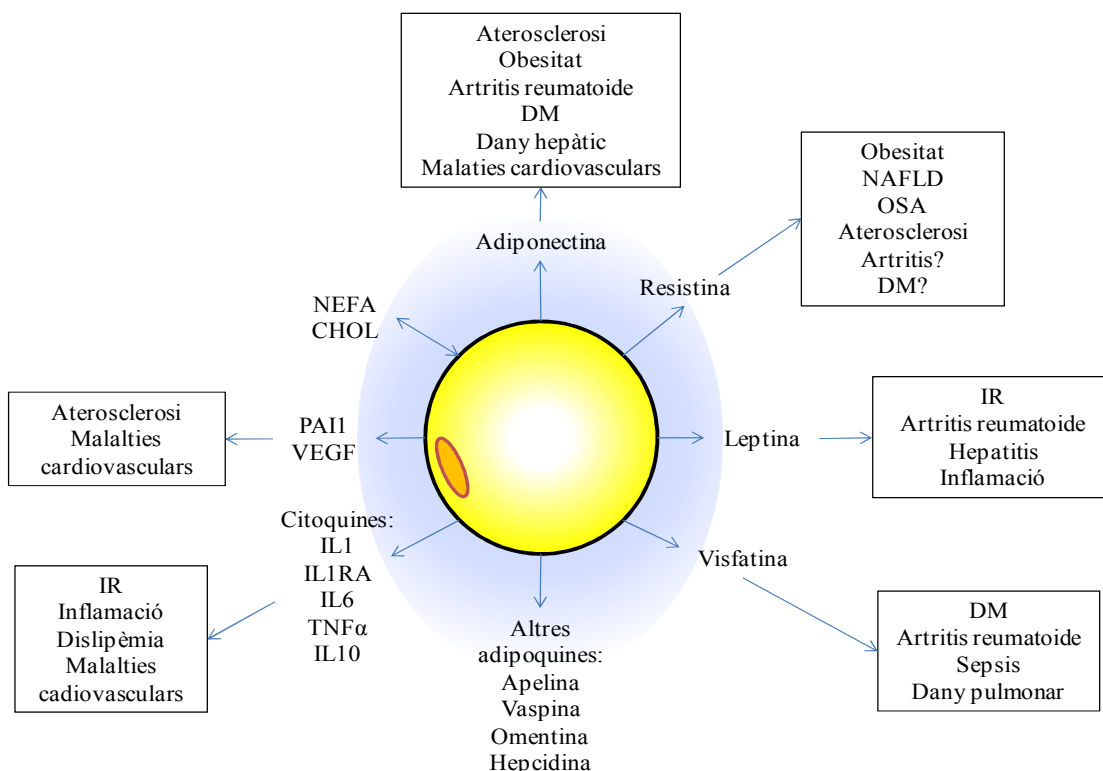


Figura 4. Adipoquines secretades per l'AT. Les adipoquines secretades per l'AT estan esdevenint mediadores del metabolisme, de la resposta immune i de la inflamació. NEFA, àcids grassos no esterificats; CHOL, colesterol; DM, diabetes mellitus de tipus 2; NAFLD, fetge gras no alcohòlic; OSA, apnea obstructiva de la son; PAI1, activador de l'inhibidor del plasminògen de tipus 1; VEGF, factor de creixement endotelial vascular; IL, interleuquina; TNF, factor de necrosi tumoral. Adaptat de Lago F. i col·laboradors [59].

Introducció

1.2.5.1 Leptina

La leptina és una adipocitoquina de 16 KDa que es sintetitza principalment als adipòcits, tot i que també se n'ha vist expressió a teixit adipós marró, estómac, múscul esquelètic, fetge i glàndula mamària [60, 61]. Com a citoquina anorexigènica, les seves funcions principals a nivell central són les de disminuir la ingesta d'aliments i augmentar el consum d'energia mitjançant l'estimulació a l'hipotàlem de factors anorexigènics, com el transcrit regulat per cocaïna i amfetamina (CART) i la propiomelanocortina (POMC) i inhibint factors orexigènics, com el neuropèptid Y (NPY) i la proteïna relacionada amb agouti (AgRP) [59]. Per altra banda, la leptina també té accions a nivell sistèmic/perifèric com ara augmentar l'oxidació dels NEFA a fetge o interferir en la senyalització del receptor d'insulina [61]. A més, la leptina actua com a sensor del balanç energètic de l'organisme: en situació d'equilibri energètic (és a dir, en una situació en la que el pes corporal es manté estable) la concentració plasmàtica de leptina reflecteix la massa grassa total; mentre que en una situació de desequilibri energètic (guany o pèrdua de pes) els augments o disminucions de la concentració de leptina indiquen al sistema nerviós central que s'està emmagatzemant un excés d'energia (o que hi ha un dèficit d'energia en cas de pèrdua de pes); en aquesta situació, els nivells de leptina no reflecteixen l'adipositat [60, 62]. En contra del que s'esperaria, en els obesos els nivells de leptina es troben augmentats [62].

1.2.5.2 Adiponectina

L'adiponectina és una adipocitoquina de 30 KDa (pes molecular del monòmer) sintetitzada a l'AT. Existeixen adiponectines de diferents pesos moleculars en funció de la quantitat de monòmers que s'associïn i s'està estudiant si aquestes tenen funcionalitats diferents [63]. La seva funció principal és la de sensibilitzar l'organisme envers la insulina; per una banda augmenta la transducció del senyal del receptor d'insulina (Ins_r) incrementant l'expressió de molècules implicades en el transport de NEFA (CD36) i la seva oxidació (acetilCoA oxidasa), i la dissipació d'energia (proteïna desacobladora de la cadena de transport d'electrons o UCP2). Per altra banda, via PPAR α i AMP quinasa, augmenta la captació de glucosa i l'oxidació de NEFA a múscul i inhibeix la síntesi hepàtica de glucosa. En conjunt, comporta un augment del consum de TAG, per tant en redueix la seva lipotoxicitat [63, 64]. L'adiponectina també té activitat antiaterogènica i antiinflamatòria [65]. S'ha descrit que existeix una correlació inversa entre l'adiponectina i l'obesitat, i en particular amb l'obesitat central [64].

1.2.5.3 Resistina

La resistina és una proteïna dimèrica de 12.5 KDa secretada de forma específica a l'AT. En models murins s'ha vist que inhibeix la captació tissular de glucosa estimulada per insulina, alhora que augmenta les concentracions plasmàtiques de glucosa i insulina. Per altra banda, la resistina inhibeix la diferenciació adipocitària i estimula la secreció de citoquines proinflamatòries com TNF α , IL6 i IL12 [21, 66].

Introducció

El fet de trobar valors de resistina incrementats en ratolins obesos va fer que se la proposés com a nexa d'unió entre l'obesitat i la IR [61], però estudis més recents han posat en dubte aquesta hipòtesi [59]. En humans però, s'ha vist que s'expressa preferencialment a les cèl·lules de l'estroma vascular presents a l'AT (monòcits i macròfags) més que als adipòcits, i la majoria d'estudis no troben correlació entre les concentracions plasmàtiques de resistina i el BMI o la IR [21, 59, 61], tot i que hi ha autors que discrepen [67].

1.2.5.4 Factor de necrosi tumoral α

El TNF α és una citoquina proinflamatòria que es produeix en diversos tipus cel·lulars. En el cas de l'AT, es troba expressada pels adipòcits, però sobretot pels macròfags residents al teixit. La seva expressió és similar a l'AT subcutani i al visceral en el cas d'individus normopès; però en l'obès, en general es troba sobreexpressada, amb un marcat increment a l'AT visceral en comparació amb el subcutani [21, 66, 68].

Aquesta citoquina promou la IR interferint en la cascada de senyalització del receptor d'insulina [21, 69]. A més, inhibeix l'activitat LPL a l'AT, activa l'expressió d'HSL i disminueix la del transportador de glucosa (GLUT) 4, a banda d'inhibir la diferenciació adipocitària. Per tot això s'ha proposat que el TNF α podria ser un regulador de la mida dels adipòcits [68, 70].

1.2.5.5 Interleuquina 6

La IL6 és una citoquina que igual que TNF α es produïda per diversos tipus cel·lulars. S'ha descrit que el 30% de l'IL6 plasmàtica prové de l'AT, amb una major aportació del visceral. Tanmateix, dins d'aquest teixit només el 10% de la producció d'IL6 la fan els adipòcits [21], la resta és produïda per cèl·lules de la fracció estromal: monòcits i macròfags, cèl·lules endotelials i fibroblasts [66, 70].

Es tracta d'una proteïna pleiotròpica. Una de les seves funcions principals és l'estimulació de la síntesi hepàtica de proteïna C reactiva (CRP). Alhora, també augmenta la secreció hepàtica de VLDL, promovent la hipertrigliceridèmia que sovint s'observa en els obesos i promou la IR disminuint la senyalització del receptor d'insulina [69, 71]. A més, inhibeix l'activitat LPL a l'AT induint una major captació de lípids per part dels macròfags, de manera que augmenta el nombre de cèl·lules escumoses. Per tot això, s'ha proposat la IL6 com a nexa d'unió entre l'obesitat, la inflamació i un major risc de malaltia cardiovascular [21, 68]. S'han observat concentracions plasmàtiques d'IL6 elevades en individus obesos i aquest paràmetre presenta una bona correlació amb el percentatge de greix corporal [21, 68].

1.2.5.6 Visfatina

La visfatina és una proteïna sintetitzada principalment a l'AT visceral [72], tot i que hi ha autors que no han detectat diferències d'expressió entre l'AT subcutani i el visceral [73]. També s'ha descrit expressió a fetsge, múscul esquelètic i medul·la espinal [59].

Introducció

Inicialment, es va considerar insulínomimètica [72], però actualment hi ha molta controvèrsia pel que fa al paper que juga aquesta adipocina en la regulació de la IR i l'obesitat. Existeixen estudis que descriuen un augment dels nivells d'expressió de visfatina a l'AT visceral durant el desenvolupament de la IR i l'obesitat [72], mentre que d'altres no detecten cap alteració [73] o fins i tot detecten un descens [74].

Per altra banda, s'ha descrit que la visfatina pot estimular la síntesi d'altres citocines proinflamatòries com ara TNF α , IL1 β i IL6, pel que podria estar relacionada amb la inflamació crònica de baix grau que sovint acompanya l'obesitat [59].

1.2.5.7 Activador de l'inhibidor del plasminogen de tipus I

L'activador de l'inhibidor del plasminogen de tipus I (PAI1) és una proteïna de fase aguda sintetitzada a l'AT, majoritàriament al visceral; tot i que també se'n sintetitza a hepatòcits, cèl·lules endotelials i plaquetes [68, 75]. Es tracta d'un factor clau en la regulació de la fibrinòlisi, ja que inhibeix la degradació de la fibrina impedit la dissolució dels coàguls [76].

S'ha descrit que PAI1 es troba augmentat en els obesos i els nivells plasmàtics correlacionen amb el BMI i el greix visceral [76, 77]. Per això, es creu que PAI1 contribueix al desenvolupament de complicacions tromboembòliques i a l'augment del risc cardiovascular que acompanya l'obesitat i el sobrepès [68].

1.2.6 Diferències entre teixit adipós subcutani i adipós visceral

Les conseqüències de l'obesitat per a la salut depenen en gran part del lloc del cos on estigui dipositat el greix. El greix que es troba localitzat a la zona visceral és diferent del que es troba a les zones subcutànies, tant pel que fa al tipus de cèl·lules, com pel que fa a la funció endocrina, a la capacitat lipolítica i a la capacitat de resposta a insulina i a altres hormones; de manera que l'AT visceral està associat amb un risc de comorbiditat més elevat en comparació amb l'AT subcutani [23, 78].

A **nivell anatòmic**, l'AT visceral té limitada la seva expansió per la presència dels òrgans interns, representa una font d'energia de ràpid accés i aboca els seus metabòlits (principalment NEFA i adipocines) directament al fetge a través de la vena porta. Aquest fet contrasta amb l'AT subcutani, el qual està drenat per les venes sistèmiques i no té cap limitació física per a la seva expansió. S'ha suggerit que evolutivament, l'AT subcutani es va desenvolupar més en les dones per poder disposar d'una bona reserva energètica durant l'embaràs, mentre que en homes va predominar més el desenvolupament de l'AT visceral per permetre un accés ràpid a l'energia durant la caça [18].

A **nivell cel·lular** hi ha discrepàncies pel que fa a la mida dels adipòcits. Hi ha autors que han descrit que en dones, els adipòcits de l'AT subcutani són més grans que els del visceral, però que a mesura que augmenta el grau d'obesitat (BMI) aquesta diferència tendeix a desaparèixer [79]. Altres autors en canvi, han descrit que en homes els adipòcits de l'AT visceral tenen un diàmetre major que els del subcutani; tot i això

Introducció

també observen una convergència a mesura que augmenta el perímetre de cintura [80]. El que sí que es troba generalment acceptat és que en l'obesitat els adipòcits de tots dos dipòsits grassos augmenten de mida [21, 68].

Per altra banda, s'ha descrit que l'AT subcutani té una capacitat de diferenciació major que el visceral [81] i això fa que disposi d'un major percentatge de cèl·lules petites, les quals capten els NEFA i els TAG amb més avidesa i són més sensibles a la insulina [82]. En l'AT visceral, com que té una menor capacitat de diferenciació, el percentatge de cèl·lules grans és major. Aquest tipus d'adipòcits tenen tendència a ser resistents a la insulina i en conseqüència, resistents als efectes antilipolítics d'aquesta [83].

A banda d'això, l'AT visceral es caracteritza per estar més vascularitzat i innervat [69] i presentar un major nombre de cèl·lules de l'estroma (macròfags, limfòcits, neutròfils, cèl·lules T) [84].

A **nivell molecular**, els adipòcits tenen receptors que s'activen ja sigui per via endocrina (hormones), paracrina (adipoquines) o a través d'estímuls provinents del sistema nerviós central (receptors adrenèrgics). Existeix una variació regional en la distribució dels receptors de glucocorticoides, sent més abundants a l'AT visceral [85]. El glucocorticoides, a mitjà i llarg termini, provoquen un augment de la ingesta i del pes corporal, indueixen IR i hiperinsulinèmia, i estimulen la lipogènesi. L'enzim 11 β hidroxisteroid deshidrogenasa de tipus 1 (11 β HSD1), que transforma la cortisona inactiva a cortisol, presenta una activitat augmentada a l'AT [86]. En cultiu primari, s'ha descrit una major activitat de l'enzim en cèl·lules provinents de l'AT visceral en comparació amb les de l'AT subcutani [87].

Les catecolamines, els activadors de la lipòlisi més potents en humans, modulen l'activitat lipolítica ja sigui activant-la via els receptors adrenèrgics β_1 , β_2 i β_3 , o bé inhibint-la a través de receptors adrenèrgics α_2 . Així, pel que fa als receptors adrenèrgics, els de tipus β , en general són més abundants al visceral que al subcutani; i en el cas d'individus amb obesitat el receptor adrenèrgic β_3 (propi del visceral) es troba especialment activat. Tot plegat fa que l'AT visceral en general i en l'obesitat en particular sigui més sensible a l'activació de la lipòlisi per catecolamines [88]. Pel que fa als receptors de tipus α_2 , els individus amb normopès no presenten diferències entre els dipòsits grassos en els nivells d'activitat; en canvi, en els pacients obesos, l'activitat d'aquest receptor al visceral es troba disminuïda de manera que el teixit és menys sensible als efectes antilipolítics a través d'aquesta via [68].

Respecte a l'acció de la insulina, en individus amb normopès el greix subcutani és més sensible a l'acció antilipolítica d'aquesta hormona [78]. En canvi, en l'individu obès aquesta sensibilitat es perd (i de forma més notable al visceral) degut, segons han descrit alguns autors, a una pèrdua de la transducció del senyal a través del substrat del receptor d'insulina 1 (IRS1), i això es tradueix en una menor inhibició de l'HSL [21]. Per altra banda, hi ha autors que han descrit que l'AT visceral presenta una taxa de captació de glucosa superior a la de l'AT subcutani, fet que es podria explicar per una major expressió de GLUT 4 [89].

Introducció

Pel que fa a la secreció d'adipoquines, també existeixen diferències en la capacitat secretora d'ambdós AT. Mentre que l'AT subcutani és la principal font de leptina [19] i adiponectina [90]; l'AT visceral, comparativament, secreta més citoquines proinflamatòries com ara TNF α , CRP, IL6 o PAI1. La leptina estimula la lipòlisi a l'AT tant *in vitro* com *in vivo*. L'AT subcutani és més sensible als efectes lipolítics de la leptina que l'AT visceral [21].

Finalment, hi ha moltes discrepàncies pel que fa a l'activitat de les lipases. Part de les diferències que s'observen entre estudis es deu a la manera en com s'expressen els resultats, segons sigui per número de cèl·lules, per àrea cel·lular o per contingut de TAG. En general, s'accepta que a mesura que els adipòcits augmenten de mida també augmenta la seva activitat lipàsica [53, 68, 91]. S'ha descrit que en dones obesas l'activitat LPL per cèl·lula és més baixa a l'AT visceral en comparació amb el subcutani, en un rang ampli d'adipositat i tenint en compte diferents distribucions del greix [79]. Per contra, en homes l'activitat LPL per cèl·lula és superior a l'AT visceral, tot i que les diferències entre els dos dipòsits grassos es van reduint fins desaparèixer en individus amb obesitat mòrbida [80]. Així doncs, aquest perfil reflectiria el fet que les dones acumulen greix preferentment a la zona subcutània, mentre que els homes ho fan a la zona visceral. Pel que fa a l'HSL, s'ha descrit un patró d'activitat (tant basal com activada) similar al descrit per a l'LPL [79, 80, 91]. Tot i això, cal tenir present que altres autors han descrit que en individus amb normopès no existeixen diferències en l'expressió ni de l'LPL, ni de l'HSL entre l'AT subcutani i visceral [92]; i d'altres han fet les mateixes observacions en individus obesos [91, 93]. L'ATGL no es creu que estigui implicada en el desenvolupament i/o resolució de l'obesitat en humans [45, 94].

A **nivell funcional**, els individus amb obesitat central tenen tendència a presentar un conjunt d'alteracions metabòliques com ara: IR, hiperinsulinèmia, hipertrigliceridèmia, concentracions baixes de colesterol d'HDL (HDLc) i, tot i que els valors de colesterol d'LDL (LDLc) acostumen a ser normals, presenten un augment en la proporció d'LDL petites i denses (sdLDL), així com un augment de l'apoB per inhibició de la seva degradació [95]. Per altra banda, els individus amb obesitat central en el període postabsortiu presenten un augment de la lipòlisi als adipòcits, perquè l'efecte supressor que hauria d'exercir la insulina sobre l'HSL està disminuït [68].

Darrerament s'especula amb la idea que el resultat net de l'augment de la lipòlisi i de la disminució de l'esterificació dels NEFA a l'AT és el desviament de NEFA cap a teixits no adiposos com ara el fetge, el múscul, el cor o el pàncrees. L'acumulació d'àcids grassos en teixits que no estan metabòlicament preparats per a tal finalitat pot provocar lipotoxicitat [95]. L'augment de TAG a múscul pot produir IR si el múscul no està preparat per consumir tota aquesta energia. En el cas dels obesos, s'ha descrit que la capacitat oxidativa muscular tant en dejuni com durant l'exercici físic està disminuïda [96]. A fetge, l'augment del flux de NEFA procedent dels adipòcits viscerals afavoreix l'augment de la producció i secreció de VLDL [95]. Per altra banda, els NEFA secretats pels adipòcits viscerals impedeixen les accions de la insulina a fetge (inhibició de la GNG i glicogenòlisi i estimulació de la glicogènesi) i inhibeixen l'extracció hepàtica

Introducció

d'insulina, de manera que els individus que presenten una obesitat abdominal, tenen tendència a patir hiperglucèmia, hiperinsulinèmia i IR (deguda a una major producció de glucosa per part del fetge i una disminució de la captació perifèrica de glucosa) [69, 95]. A més, s'ha descrit que l'obesitat central actua de forma sinèrgica amb altres factors diabetògens com ara els antecedents familiars de DM [97].

1.3 Comorbilitats

Com ja s'ha comentat anteriorment, l'obesitat és el resultat d'un desequilibri entre la ingesta calòrica i la despesa energètica, de manera que l'excés de combustible que circula per l'organisme no només s'emmagatzema a l'AT sinó que també es diposita de forma ectòpica a altres teixits com el fetge, el múscul, el pàncrees i els ronyons. L'emmagatzematge ectòpic de TAG està clarament associat amb IR, dislipèmia, hipertensió arterial i esteatosi hepàtica, entre d'altres comorbilitats.

1.3.1 Alteracions del metabolisme glucídic

Els sucres presents a la dieta es poden dividir en mono-, di- o polisacàrids. Les amilases salival i pancreàtica i les glucosidases de l'intestí degraden els sucres complexos fins a monosacàrids (glucosa principalment, galactosa i fructosa). El transport de glucosa a través de l'epiteli intestinal es duu a terme mitjançant transportadors de glucosa. N'existeixen dos tipus: els de la família dels SGLT o cotransportadors de sodi-glucosa i els de la família de transportadors per difusió facilitada o GLUT. Un cop a l'interior de les cèl·lules els sucres les travessen, i gràcies al transportador GLUT2 situat a la cara basal dels enteròcits, passen als capil·lars sanguinis de les vellositats intestinals i d'aquests cap al fetge, a través de la vena porta.

La concentració de glucosa en sang està estretament regulada per tres hormones: la insulina, el glucagó i l'adrenalina. En un individu sa, després d'una ingesta, les concentracions de glucosa plasmàtiques augmenten i això fa que les cèl·lules β -pancreàtiques secretin insulina. Si l'aportació de glucosa és important, el fetge la captarà a través del receptor GLUT2 i l'emmagatzemarà en forma de reserva de glicogen a través del procés conegut com glicogènesi. Tanmateix, el fetge capta principalment el lactat produït a les cèl·lules intestinals per a la síntesi de glicogen i deixa que la glucosa arribi a la resta de teixits extrahepàtics. A múscul, la captació de glucosa té lloc a través de GLUT1, 3 i 4. Un cop a dins, la glucosa o s'oxida per obtenir energia o s'emmagatzema en forma de glicogen. Finalment, a l'AT la insulina estimula la migració del receptor GLUT4 cap a la membrana plasmàtica, de manera que s'afavoreix la captació de glucosa per emmagatzemar-la en forma de TAG, gràcies al procés de la lipogènesi.

Quan l'organisme detecta que els nivells de glucosa en sang són baixos, com per exemple en un període postabsortiu o davant d'una demanda important d'energia (exercici), els nivells d'insulina baixen i els de glucagó i adrenalina augmenten, això activa la mobilització de les reserves de glicogen (glicogenòlisi), que passarà a glucosa. El múscul consumirà la glucosa que n'obtingui, mentre que el fetge l'exportarà per a que l'utilitzin la resta de teixits.

Introducció

Finalment, a fetge té lloc el procés anabòlic de la gluconeogènesi (GNG) en el que en situacions de dejuni o exercici intens, es produeix glucosa a partir d'àcid làctic, pirúvic i glicerol. Si la glucosa no es necessita immediatament s'emmagatzemarà en forma de glicogen. La GNG està regulada pel glucagó i sovint està associada amb la cetosi.

1.3.1.1 Resistència a insulina i *diabetes mellitus* tipus II

Estudis epidemiològics han demostrat que l'obesitat es troba associada amb la IR, i que la prevalença de la DM augmenta a mesura que augmenta el BMI, fins i tot quan només hi ha un lleuger sobrepès, tal i com es mostra a la Figura 5 [98].

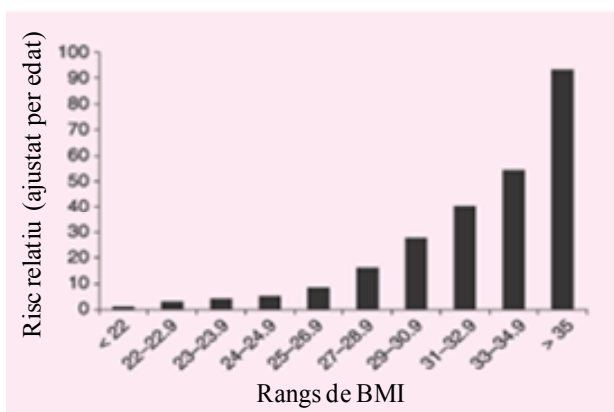


Figura 5. Risc relatiu de patir DM en funció del BMI en dones entre 30 i 55 anys. Dades recollides del *Nurses' Health Study* [98].

Hi ha nombrosos estudis que demostren que la IR precedeix al desenvolupament de la hiperglicèmia i a l'aparició de la DM en aquells individus en els que les cèl·lules β -pancreàtiques no són capaces de compensar la IR [99]. Tot i que la patogènesi de la DM és molt complexa, es creu que està provocada principalment per dos factors: la IR i la disfunció de les cèl·lules β [100]. A mesura que augmenta la IR, les cèl·lules β -pancreàtiques han d'incrementar la seva activitat (secretar més insulina) per mantenir estable la glucèmia (estat d'hiperinsulinèmia). Així doncs, es podria definir la IR com aquell estat en el que es requereix més insulina per obtenir els efectes biològics que s'aconsegueixen amb menys insulina en un individu sa. Així doncs, qualsevol defecte en la cascada de senyalització de la insulina pot provocar IR.

La DM es caracteritza per la reducció, amb el pas del temps, tant de la massa com de la capacitat secretora de les cèl·lules β . Aquesta reducció progressiva en la secreció d'insulina dóna lloc a un augment dels nivells de glucosa en sang (hiperglucèmia). Hi ha evidències que demostren que el deteriorament de la funció β -pancreàtica precedeix la hiperglucèmia; així doncs, s'ha descrit que la funció dels illots β -pancreàtics en el moment del diagnòstic es troba reduïda en un 50%, independentment del grau d'IR [100]. En un estudi en el que es comparava el volum de les cèl·lules β , es va veure que aquest estava reduït en individus obesos amb una tolerància aberrant a la glucosa en comparació amb individus sans, i encara més reduït en obesos amb DM; fet que atribueixen a una major apoptosi [101].

Introducció

A nivell molecular, quan la insulina interacciona amb el receptor d'insulina s'inicia una cascada de senyalització que comença per la fosforilació d'aquest en els residus tirosina, el que provoca l'activació de les proteïnes IRS. Si els IRS es fosforilen en residus de tirosina s'activen i la cascada de senyalització continua, si es fosforilen en residus de serina s'inhibeixen.

La IR a múscul redueix la capacitat de captació de glucosa estimulada per insulina i evita l'emmagatzematge dels carbohidrats en forma de glicogen, que són redirigits cap al fetge per fer lipogènesi, mentre que a fetge comporta un augment de la GNG i inhibeix la síntesi de glicogen [102].

Per establir quan hi ha IR o DM existeixen una sèrie de mesures i/o observacions que es poden realitzar:

- **Clamp euglicèmic-hiperinsulinèmic:** considerada la prova de referència per al diagnòstic de la IR, va ser descrita per DeFronzo i col·laboradors el 1979 [103]. Consisteix en la infusió de glucosa per via venosa per tal de mantenir la concentració plasmàtica d'insulina per sobre de la normal. Alhora, es mesura la concentració de glucosa cada 2-5 minuts, per infundir glucosa a un ritme tal que permeti mantenir la glucèmia al voltant de 5 mM. El resultat per a una persona sana de 35 anys normopès és d'1 mg/Kg/min, valors superiors indicarien IR.
- **Test de tolerància oral de glucosa:** els valors normals per una prova amb 75 g de glucosa són inferiors a 7,8 mmol/L (<140mg/dL). Els valors de glucosa que indiquen DM són iguals o superiors a 11,1 mmol/L (≥200 mg/dL).
- **Determinació de l'hemoglobina glicosilada:** el fet que les persones amb DM tinguin nivells de glucosa superiors als normals fa que l'excés de glucosa penetri dins dels glòbuls vermells i s'uneixi a les molècules d'hemoglobina. Aquest paràmetre dóna idea dels nivells promitjos de glucosa en sang dels darrers 2-3 mesos. Així, s'estableix que hi ha IR quan els nivells d'hemoglobina glicosilada es troben entre el 5.7 i el 6.4% i DM quan es troben per sobre del 6.5%.
- **Determinació del HOMA-IR** (de l'anglès *Homeostasis Model Assesment of Insulin Resitance*): es tracta d'un mètode simple i econòmic que va ser proposat el 1985 per Mathews i col·laboradors [104]. Consisteix en una estimació de la sensibilitat a la insulina a partir d'un model matemàtic que té en compte les concentracions plasmàtiques de glucosa i insulina en dejuni. L'algoritme assumeix que un individu normopès amb una edat inferior a 35 anys, té una funció de les cèl·lules β -pancreàtiques del 100% i una IR d'1. D'aquesta manera valors majors o iguals a 3.8 de HOMA implicaran una sensibilitat a la insulina baixa, és a dir, IR [105]. Si comparem aquest mètode amb el clamp euglicèmic-hiperinsulinèmic trobem que presenta una correlació de 0.88 [104].

Introducció

- **Índex QUICKI:** utilitza un càlcul matemàtic a partir de les concentracions de glucosa i insulina ($1/[\log \text{insulina (mU/L)} \times \log \text{glucosa (mg/dL)}]$) per calcular la sensibilitat a la insulina [106].

1.3.1.2 Possibles mecanismes implicats en la resistència a la insulina

Els factors o els mecanismes que porten a la compensació de la IR per part de les cèl·lules β -pancreàtiques, i/o els mecanismes que porten a la disfunció d'aquestes cèl·lules en els obesos encara no es comprenen del tot, és per això que s'han elaborat diverses hipòtesis:

- **Glucotoxicitat**

La glucotoxicitat es podria definir com el dany irreversible causat per una exposició crònica a nivells de glucosa superiors als fisiològics, acompanyada d'una disminució de la síntesi i secreció d'insulina provocada per una expressió gènica disminuïda [107]. Per una banda, la hiperglucèmia induïx la generació d'espècies reactives de l'oxigen (ROS), les quals provoquen estrès oxidatiu als illots β -pancreàtics, ja que aquests expressen nivells molt baixos d'enzims antioxidants [100]. Per altra banda, els nivells alts de glucosa també provoquen un augment de la glicosilació d'algunes proteïnes que acaben per alterar la cascada de senyalització de la insulina [108].

- **Lipotoxicitat**

Al 1963, en Randle i col·laboradors van postular que la disponibilitat de lípids com a font d'energia, generava uns senyals metabòlics que disminuïen la utilització de glucosa mitjançant la inhibició d'enzims clau implicats en el procés de glucòlisi [109]. Tanmateix, en els individus obesos, a mesura que l'AT es va expandint es va tornant insulinoresistent i el resultat és una reducció en la captació dels lípids i la glucosa procedents de la dieta i una manca d'inhibició de la lipòlisi [102]. La manca de resposta a la insulina es troba incrementada en l'AT visceral [69].

L'endarreriment en la captació de NEFA per part de l'AT i l'augment de la lipòlisi porta a un augment crònic dels nivells de NEFA circulants que es poden acabar dipositant de forma ectòpica en teixits com ara el múscul i el fetge, induint i/o agreujant la IR (Figura 6) [110].

Introducció

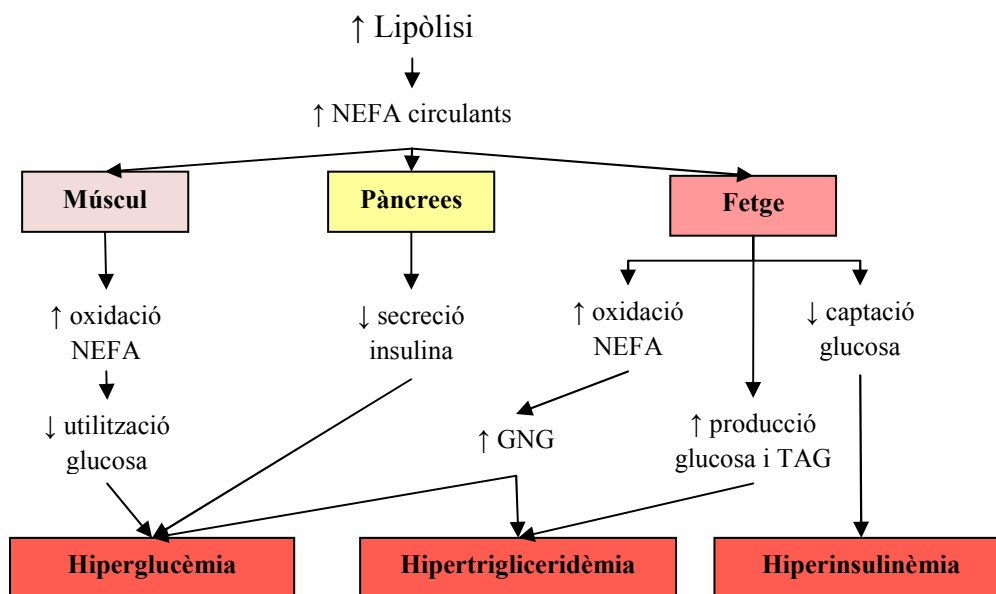


Figura 6 Efectes adversos d'una lipòlisi i una concentració de NEFA circulants augmentada. NEFA, àcids grassos no esterificats; TAG, triacilglicerols; GNG gluconeogènesi. Adaptat de Ibrahim, M. M. [69].

Fins i tot hi ha autors que suggereixen que no és tant important la quantitat de lípids dipositada de forma ectòpica sinó el tipus de lípids que s'hi acumulen. La captació de NEFA, via mecanismes de *flip-flop* o mitjançant proteïnes transportadores, té com a resultat l'aparició de diferents espècies de lípids a l'interior de la cèl·lula. Entre totes aquestes espècies, aquelles que es creu podrien estar implicades en el desenvolupament de la lipotoxicitat són els acils CoA, els DAG i les ceramides. Tots ells són capaços d'interferir a diferents nivells de la cascada de senyalització de la insulina a través de les proteïnes quinasa C [110, 111]. A més, es creu que les ceramides per una banda són capaces d'afavorir la producció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS), i per altra banda activen les vies de senyalització inflamatòries [102].

• Inflamació

Hi ha nombroses evidències de que l'obesitat es troba lligada a un estat proinflamatori lleu i crònic. Aquesta resposta inflamatòria sembla que es troba especialment activada a l'AT [66, 112], tot i que altres òrgans (com el fetge) també poden jugar un paper important [113].

Un fet destacable del procés inflamatori que s'ha observat en individus obesos és la infiltració de cèl·lules del sistema immune a l'AT com ara neutròfils, eosinòfils i principalment macròfags [114, 115]. S'ha suggerit que un AT hipertròfic, a banda de tenir una taxa de lipòlisi incrementada, també presenta una major vascularització. Tot i això, no aconsegueix evitar uns majors índex d'hipòxia, una taxa d'apoptosi incrementada i un augment en la secreció d'adipoquines, algunes de les quals funcionen com a senyals de reclutament de macròfags i altres cèl·lules del sistema immune [116]. L'examen de mostres d'AT procedents d'individus obesos, tant murins com humans, han demostrat un augment de la infiltració de macròfags, els quals tendeixen a tenir una

Introducció

disposició en corona al voltant d'adipòcits que es creu són necròtics i/o apoptòtics [117, 118].

Aquests macròfags infiltrats són els responsables de gran part de la producció local de $\text{TNF}\alpha$, i d'una part important de la producció d'IL6 i de l'augment d'activitat de l'òxid nítric sintasa induïble (iNOS) [115]. Aquestes citocines modifiquen la senyalització de la insulina a través de serin/treonin fosfatases que actuen sobre l'IRS1 [66].

Altres adipoquines que també s'ha vist que modifiquen la senyalització de la insulina són: la leptina, els nivells plasmàtics de la qual, així com els nivells d'expressió a l'AT es troben fortament associats amb el BMI i la massa grassa en l'obesitat [119]; i l'adiponectina, que afavoreix la sensibilització a la insulina disminuint la lipogènesi i promovent la β -oxidació, alhora que redueix l'expressió de $\text{TNF}\alpha$ [66]. A part d'aquestes adipoquines, existeixen d'altres que estan implicades en el procés inflamatori que acompanya l'obesitat com ara la CRP, el PAI1 o la visfatina [59, 67].

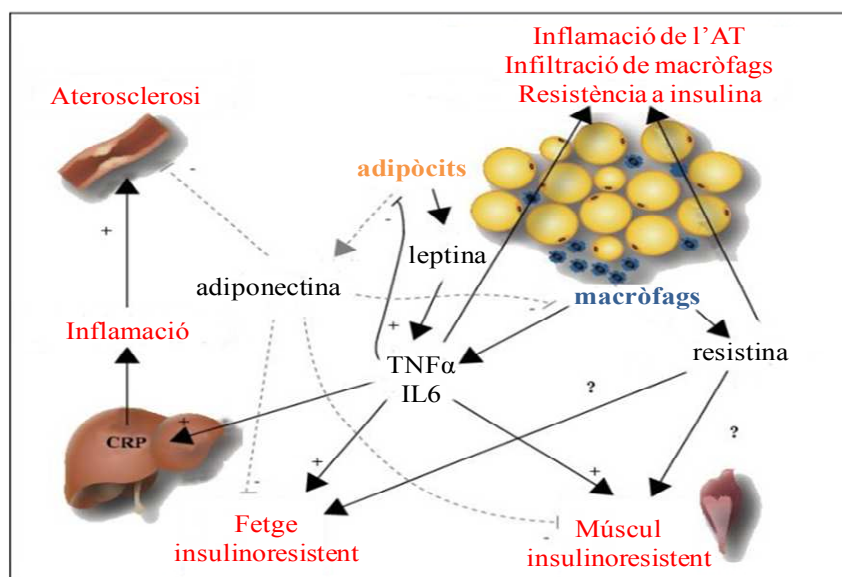


Figura 7. Secreció d'adipoquines a l'AT d'individus obesos amb IR. Adaptat de Bastard J. P. i col·laboradors [66].

- **Incretines**

Les incretines s'han definit com les hormones gastrointestinals que estimulen l'alliberament d'insulina després d'una ingesta, i la connexió entre l'intestí i els illots β -pancreàtics es coneix amb el nom d'eix enteroinsular [120]. En l'actualitat es coneixen dues incretines: el pèptid similar al glucagó 1 (GLP1) i el pèptid insulinoatròpic dependent de glucosa (GIP). GLP1 es secreta a les cèl·lules L de l'íleum distal i activa la secreció d'insulina alhora que inhibeix la de glucagó; a més, retarda el buidament gàstric, actua al sistema nerviós central induint sacietat i disminuint la ingesta, augmenta la glicogènesi a hepatòcits i múscul i augmenta la lipogènesi a l'AT [120]. Els nivells de GLP1 es troben disminuïts en l'obesitat i més reduïts encara en la DM [121]. GIP es secreta a les cèl·lules K de l'intestí proximal en resposta a una ingesta rica en lípids i

Introducció

carbohidrats, actua sobre els illots β -pancreàtics de forma similar a com ho fa GLP1 però amb menys intensitat; per contra, no actua sobre el buidament gàstric [121].

Es va observar que en individus sotmesos a cirurgia bariàtrica la millora de la IR es donava abans que la pèrdua de pes fos significativa i a rel d'aquestes observacions es van desenvolupar dues hipòtesis: la de l'intestí distal (o hindgut hypothesis) [122] postula que el fet de que l'aliment arribi semidigerit al jejú distal promou la secreció de les incretines. En canvi, la hipòtesi de l'intestí proximal (o foregut hypothesis) [123] postula que amb la cirurgia s'exclou la zona responsable de la producció de la hormona/proteïna responsable de causar la DM [124]. A partir d'aquesta hipòtesi s'ha desenvolupat la teoria de les antiincretines (Figura 8), segons la qual en condicions normals, els nutrients provocarien l'estimulació de la secreció d'incretines a l'intestí proximal, que alhora estimularien la secreció d'insulina; al mateix temps es produiria un senyal contraregulatori per part de les antiincretines, per tal de prevenir situacions d'hipoglucèmia. L'aparició de la DM esdevindria del trencament de l'equilibri entre incretines i antiincretines amb una prevalença del senyal de les segones [125].

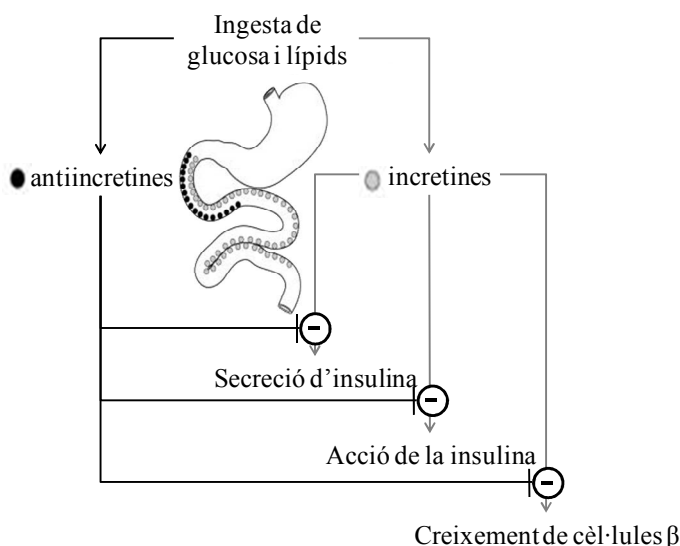


Figura 8. Representació de la hipòtesi de les antiincretines. Explica les alteracions del metabolisme de la glucosa en pacients amb DM. Modificat de Rubino F. i Gagner M. [126].

- **Hipòtesi de l'expandibilitat del teixit adipós**

Segons aquesta hipòtesi, la manca de capacitat de l'AT per expandir-se un cop assolit un cert nivell, més que no pas l'obesitat per se, ñes el factor clau que lliga un balanç energètic positiu amb la DM. Vidal-Puig i col·laboradors postulen que cada individu té una capacitat limitada d'emmagatzematge d'energia a l'AT, que està determinada tant per factors genètics com ambientals. Un cop l'AT assoleix el seu límit, deixa d'emmagatzemar energia de forma eficient de manera que els lípids s'acumulen en altres teixits. L'acumulació ectòpica de lípids a cèl·lules no adiposes provoca lipotoxicitat i comporta IR, apoptosi i inflamació [127], englobant així diversos dels factors descrits anteriorment (Figura 9).

Introducció

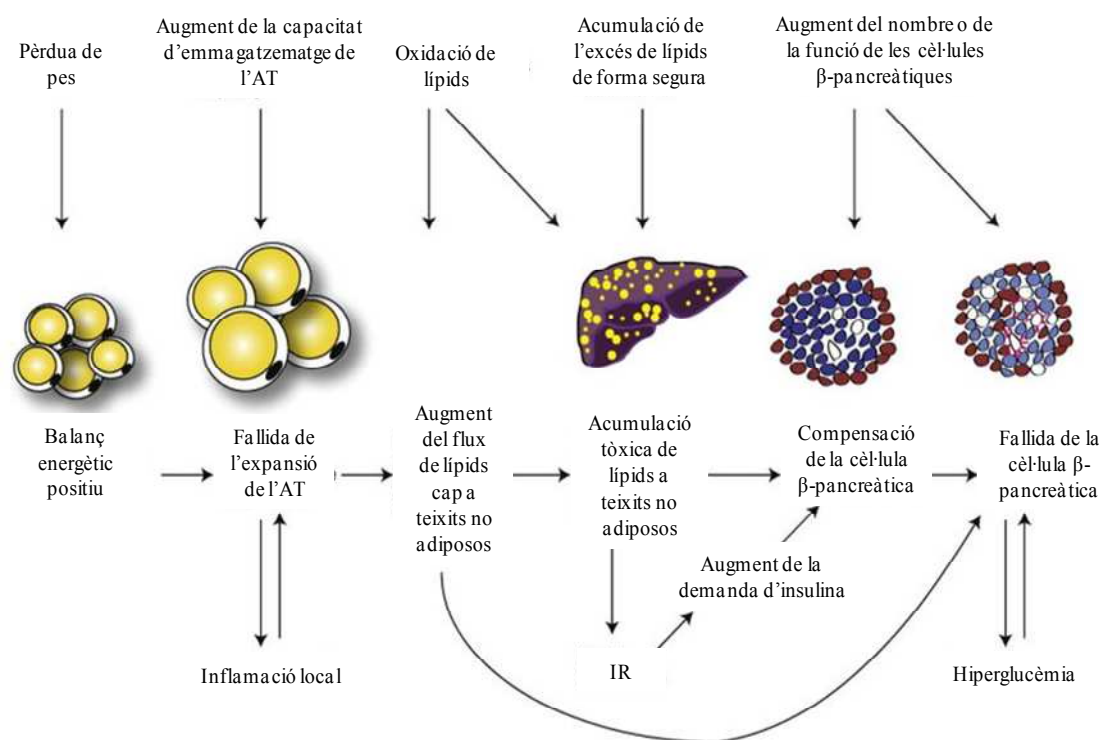


Figura 9. Diagrama que resumeix com un balanç energètic positiu pot portar a la DM. Adaptat de Virtue S. i Vidal-Puig A. [127].

1.3.2 Alteracions del metabolisme lipídic

Després d'una ingesta, els lípids presents a la dieta s'hidrolitzen per acció de les lipases lingual i pancreàtica i s'emulsionen amb les sals biliars. D'aquesta manera, els TAG, mitjançant diverses hidròlisi, passen en primer terme a DAG, després a monoacilglicerols (MAG) i finalment a glicerol i NEFA; una acumulació excessiva d'aquest darrer compost (per sobre de 500 μM) pot resultar tòxica per a l'organisme degut a les seves propietats detergents [128]. Els NEFA de cadena curta difonen per les cèl·lules epitelials de les vellositats intestinals, passen als capil·lars sanguinis i arriben al fetge per la vena porta [129] per ser empaquetats a les VLDL. Els NEFA de cadena llarga (C12-C20), en canvi, es transporten en micel·les cap a les cèl·lules epitelials de les vellositats intestinals on es reconverteixen a TAG. Els TAG, juntament amb el colesterol i els EC surten de les cèl·lules intestinals cap a la limfa i posteriorment, cap al torrent sanguini empaquetats dins dels QM.

Els QM madurs tenen apoB48, apoAI, apoE, apoCII i apoCIII. Els QM són reconeguts per l'LPL gràcies a l'apoCII, que actua com a cofactor [130]. Per acció de la insulina, l'LPL de l'AT hidrolitza els TAG dels QM i, amb l'acció conjunta de la 2-monoacilglicerol hidrolasa i l'albumina plasmàtica, els NEFA poden ser captats. Els NEFA juntament amb el glicerol-3-fosfat, es poden reesterificar per ser emmagatzemats com a TAG.

Tradicionalment s'ha considerat que els NEFA de cadena llarga travessen la membrana plasmàtica de les cèl·lules per difusió passiva/simple, mitjançant el procés de *flip-flop* [131]. Tanmateix, s'ha observat que el procés de captació de NEFA per part

Introducció

dels adipòcits està facilitat per proteïnes transportadores, amb més del 90% del transport realitzant-se per vies saturables [132]. Pel que fa als teixits muscular i hepàtic també s'han descrit resultats que apunten en la mateixa direcció [133]. Recentment, s'ha suggerit l'existència de diverses proteïnes de membrana que actuen com a transportadores de NEFA com ara caveolina 1, la família de proteïnes FATP (proteïnes transportadores d'àcid grassos), FABPpm (proteïna de membrana plasmàtica d'unió a àcids grassos) o FAT/CD36 (translocasa d'àcids grassos). De totes elles, la que ha estat considerada l'enzim clau del transport de NEFA de cadena llarga és FAT/CD36. L'expressió de FAT/CD36 està regulada per PPAR γ [134]. S'ha descrit que en ratolins deficients per aquesta proteïna, la captació de NEFA a múscul es redueix de l'ordre del 40-75% i a l'AT de l'ordre del 60-70% [135]; i en el cas de l'AT, el transport saturable de NEFA es perd [136]. També s'ha descrit una reducció de l'expressió de FAT/CD36 en casos de lipòlisi crònica [137]. Per altra banda, s'ha vist que aquesta proteïna està implicada en inflamació, aterosclerosi i angiogènesi [138].

A mesura que l'LPL exerceix la seva funció, els QM van disminuint de mida ja que es redueix el seu contingut de TAG i EC, alhora que l'excés de material de superfície que se'n deriva se separa per donar lloc a HDL naixents [139]. Per altra banda, a mesura que els QM van circulant pel torrent sanguini, la CETP (proteïna de transferència d'èsters de colesterol) intercanvia TAG dels QM amb els EC de les HDL. Finalment, els QM es transformen en romanents de QM (QMr) rics en apoE, la qual permet que siguin captats pel fetge mitjançant el receptor d'LDL, el receptor LRP i la lipasa hepàtica (HL) (Figura 10) [140].

L'HL, una glicoproteïna d'uns 65 KDa [141], se sintetitza principalment a fetge i es localitza a les cèl·lules parenquimàtiques dels sinusoids hepàtics, tot i que també es troba expressada a macròfags [142]. Exerceix les seves funcions tant a fetge com a ovaris i glàndules adrenals, on hi arriba a través del torrent sanguini i s'acumula gràcies a la seva capacitat per unir-se a HSPG [141, 143].

L'enzim presenta activitat TAG hidrolasa així com fosfolipasa AI i es troba involucrat en diferents estadis del metabolisme de les lipoproteïnes. L'impacte de l'HL en el metabolisme de les lipoproteïnes variarà en funció de la quantitat i naturalesa dels substrats potencials de l'enzim i de la seva activitat relativa envers proteïnes de transferència com ara el receptor escombriaire de tipus 1 (SRB1) o la CETP.

La principal funció de l'HL és la de mantenir l'homeòstasi intracel·lular del colesterol modulant la composició dels QMr, les IDL (lipoproteïnes de densitat intermitja), les LDL i les HDL. Una altra funció de l'HL és la de promoure, juntament amb els HSPG, l'LDLr i l'LRP, la captació de romanents de lipoproteïnes amb apoB i les HDL, independentment de la presència d'apoE [142].

A nivell transcripcional l'enzim es troba inhibït per factors de transcripció del tipus SREBP [143]. A nivell hormonal, l'HL està inhibida pels glucocorticoides (a excepció de les glàndules adrenals), per les catecolamines (adrenalina), per la leptina i pel colesterol. La seva resposta a insulina encara roman controvertida [141]. A més, l'activitat de l'enzim està modulada per diverses lipoproteïnes com ara l'apoAI que

Introducció

l'inhibiria i l'apoE que l'activaria; la implicació d'altres lipoproteïnes encara no està del tot clara.

Els individus deficientes en HL presenten nivells de TAG i CHOL elevats així com un perfil lipoproteic caracteritzat per VLDL grans, i LDL i HDL grans, enriquides en TAG i fosfolípids (PL), i pobres en apoE [144].

Quan l'organisme necessita mobilitzar les reserves energètiques, per acció del glucagó i/o l'adrenalina, s'activa l'adenilat ciclasa, això provoca un augment de l'AMP cíclic (cAMP), que alhora provocarà l'activació a l'AT d'una sèrie de lipases: l'HSL i l'ATGL. Aquestes catalitzen la hidròlisi dels TAG emmagatzemats a les gotes lipídiques del citosol dels adipòcits, a NEFA i glicerol (lipòlisi). Es creu que la perilipina, proteïna localitzada a la superfície de la gota lipídica, juga un paper clau en aquest procés [145], tant com a supressora de la lipòlisi basal com a component indispensable per a que l'estimulació de la lipòlisi sigui complerta [146]. Existeixen vies de senyalització alternatives que també són capaces de produir un augment del cAMP com ara la senyalització a través de citoquines [43].

El glicerol produït en la lipòlisi travessa la membrana cel·lular de l'adipòcit per difusió facilitada a través l'aquaporina 7 (AQP7) i és captat pel fetge a través de l'aquaporina 9 (AQP9) on s'utilitza per GNG o es fosforil·la per sintetitzar TAG [147]. Els NEFA difonen i/o són transportats a través de la membrana de l'adipòcit i entren al torrent sanguini. Viatgen en sang, units en gran part a albúmina, cap a altres teixits on seran captats: en el cas del múscul principalment s'oxidaran per obtenir energia (β -oxidació) i en el cas del fetge, s'acilaran per acció de la tiocinasa acil coenzim A sintetasa (ACS), i juntament amb el glicerol es reesterificaran a TAG i es reempaquetaran en forma de VLDL per ser distribuïts a la resta de teixits.

Les VLDL madures tenen apoB100, apoE, apoCII i apoCIII. El fet de tenir l'apoCII, igual que en el cas dels QM, permet que aquestes lipoproteïnes siguin un bon substrat per l'LPL. A mesura que els TAG es van hidrolitzant, les VLDL disminueixen la seva mida i es converteixen en IDL, captades generalment pel fetge mitjançant l'LDLr hepàtic i en menor mesura pels receptors de VLDL extrahepàtics. Les IDL són un bon substrat per l'HL la qual hidrolitza els PL i TAG d'aquestes partícules transformant-les en LDL.

Les LDL només tenen apoB100 i estan formades principalment per EC i PL. Gràcies a que l'LDLr està present a la pràctica totalitat de les cèl·lules de l'organisme, les LDL són la principal font de colesterol (Figura 10).

Introducció

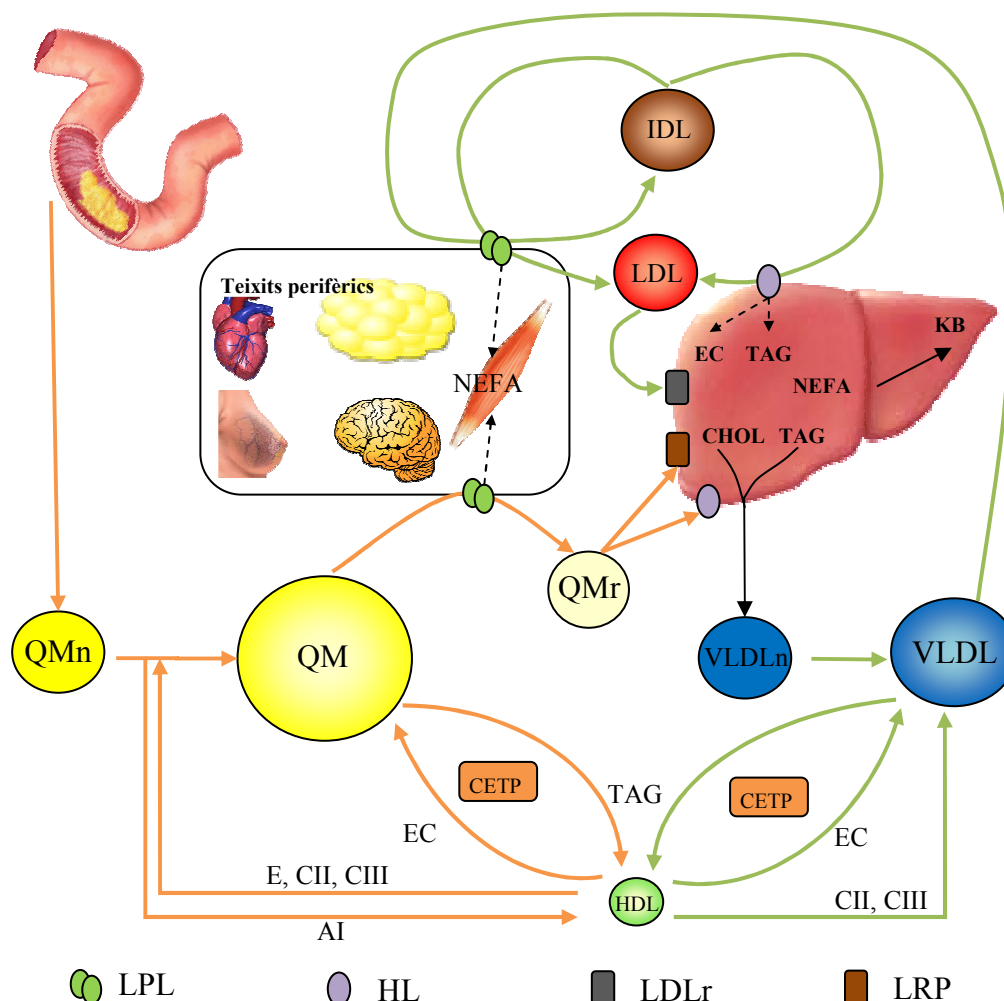


Figura 10. Representació esquemàtica del transport de lípids exògens (en taronja) i endògens (en verd). QMn, quilomicro naixent; QM, quilomicro; QMr, romanent de quilomicro; VLDLn, lipoproteïna de molt baixa densitat naixent; VLDL, lipoproteïna de molt baixa densitat; IDL, lipoproteïna de densitat intermitja; LDL, lipoproteïna d'alta densitat; HDL, lipoproteïna d'alta densitat; TAG, triacilglicerol; NEFA, àcids grassos no esterificats; CHOL, colesterol; TAG, triacilglicerol; EC, èsters de colesterol; KB, cossos cetònics; CETP, proteïna transferidora d'èsters de colesterol; LPL, lipoproteïna lipasa; HL, lipasa hepàtica; LDLr, receptor d'LDL; LRP, receptor d'apolipoproteïna E/ proteïna similar al receptor d'LDL.

Per altra banda, a mesura que les VLDL perden components del nucli, el material de superfície que sobra se separa per donar lloc a les HDL naixents. La maduració d'aquestes lipoproteïnes comporta tant l'adquisició de TAG i apolipoproteïnes provinents de les lipoproteïnes riques en TAG, com l'adquisició de colesterol lliure (FC) i, en menor mesura, de PL provinents de les membranes cel·lulars dels teixits. Quan el colesterol lliure de la superfície de les HDL s'esterifica per acció de l'enzim L-carnitin acil transferasa, passa al nucli i d'aquesta manera les HDL maduren (HDL₃) [144]. Les HDL madures, les quals tenen apoA1, apoC i apoE, continuen interaccionant amb les membranes dels teixits i adquireixen més FC, bé per difusió o bé mitjançant l'SRB1. A mesura que les HDL₃ adquireixen més lípids es transformen en partícules menys denses anomenades HDL₂, el destí metabòlic de les quals és el fetge. En la captació de les HDL₂ estan implicats tant el receptor SRB1 que capta de forma selectiva

Introducció

els EC, com l'HL que hidrolitza els TAG i els PL. Aquest procés es coneix amb el nom de **transport revers del colesterol** i permet que l'EC de l'organisme arribi al fetge per ser eliminat en forma de sals biliars (Figura 11).

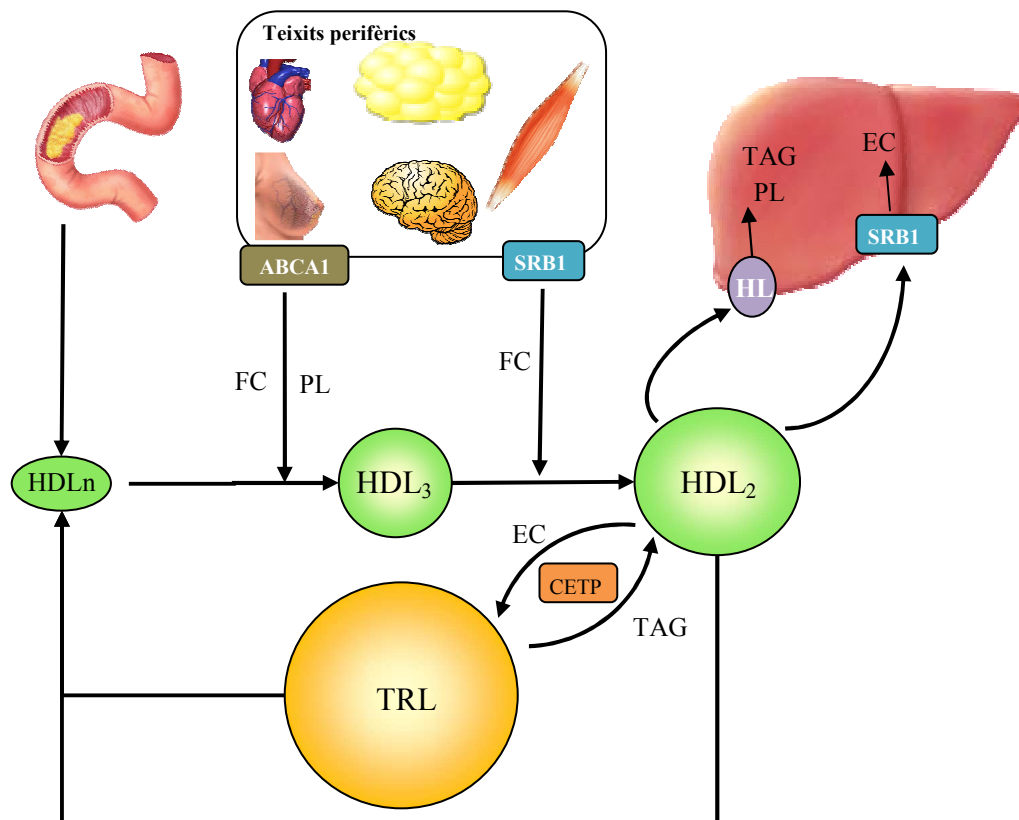


Figura 11. Representació esquemàtica del transport revers de colesterol. HDL_n, lipoproteïna d'alta densitat naixent; HDL, lipoproteïna d'alta densitat; TRL, lipoproteïnes riques en TAG; TAG, triacilglicerol; FC, colesterol lliure; PL, fosfolípids; EC, èsters de colesterol; ABCA1, proteïna transportadora d'unió a ATP de tipus 1; SRB1, receptor escumbriaire de tipus B1; CETP, proteïna transferidora d'èsters de colesterol; HL, lipasa hepàtica.

A fetge, quan els nivells de glicogen són elevats i la taxa de β -oxidació es manté elevada (com seria el cas d'un període postabsortiu relativament llarg), la producció d'acil CoA augmenta. Si aquest increment no pot ser assumit pel cycle dels àcids tricarbòxics, degut a que el consum d'hidrats de carboni és baix i per tant l'aportació d'oxalacetat també, llavors s'activa la producció de cossos cetònics, els quals podran ser utilitzats pels teixits extrahepàtics com a font d'energia.

1.3.2.1 Dislipèmia

La dislipèmia que s'observa en l'obesitat i en la síndrome metabòlica (que es descriurà més endavant) té, a banda d'una lipèmia postprandial elevada, tres trets característics que donen a l'individu que les presenta un major risc cardiometabòlic [23]:

- Nivells elevats de TAG a plasma (hipertrigliceridèmia) deguts a un augment de lipoproteïnes riques en TAG (VLDL, IDL i remanents).

Introducció

- Nivells baixos de colesterol d'HDL (HDLc).
- Aparició d'sdLDL amb nivells de colesterol normals o lleugerament elevats.

Dues anomalies que també acostumen a acompanyar aquest tipus d'alteracions metabòliques són l'acumulació de lípids a fetge (que es tractarà en el següent apartat) i la IR. Es creu que el mecanisme principal pel qual s'expliquen bona part d'aquestes alteracions és la IR [148].

La hipertrigliceridèmia observada està associada a un augment de VLDL que pot ser degut: a un augment de la taxa de secreció de VLDL a fetge, que alhora està condicionat per la taxa de síntesi d'apoB; a una disminució de la taxa de lipòlisi per part de l'LPL; i/o a una disminució de la taxa d'eliminació dels romanents.

La insulina regula la formació de VLDL controlant la concentració de NEFA en plasma, disminuint l'expressió de la proteïna microsomal de transferència de TAG (MTP) que catalitza la transferència de lípids neutres cap a les VLDL naixents, i promovent la degradació de part de l'apoB100 que es sintetitza. Com ja s'ha esmentat anteriorment, la IR és freqüent en individus amb obesitat, de manera que la taxa de lipòlisi incrementada a l'AT afavoreix un major flux de NEFA cap a fetge, i aquests NEFA incrementen la secreció de VLDL. Per altra banda, la manca de resposta hepàtica a la insulina fa que la proteïna MTP es sobreexpressi i augmenta la quantitat d'apoB100 disponible, promovent així l'ensamblatge de lipoproteïnes [149, 150]. En estats d'hiperinsulinèmia, la insulina pot inhibir la producció d'LPL a l'AT [151] i augmentar els nivells d'apoCIII, fet que s'ha observat en individus obesos [152]. Tot plegat contribuiria a una disminució de la captació de TAG de les lipoproteïnes portadores d'apoB. Per altra banda, l'apoCIII també pot inhibir la captació de romanents per l'LDLr allargant el temps de permanència d'aquests en sang [153].

Els nivells baixos d'HDLc es consideren secundaris a l'augment de TAG. Els mecanismes que porten a aquest augment encara són poc coneguts. Hi ha autors que han suggerit la implicació de la CETP, ja que els seus nivells (tant de massa com d'activitat) es troben incrementats en individus amb obesitat i IR [154]. La CETP promou l'intercanvi de TAG i EC entre les VLDL i les HDL. Les HDL resultants, riques en TAG i pobres en colesterol, són més propenses a ser metabolitzades per l'HL [155]. Aquesta teoria es veu recolzada pel fet que en individus obesos i amb IR s'ha descrit una activitat LPL postheparínica disminuïda, que proporcionaria un major nombre de substrats per a la CETP [154].

Un altre mecanisme que ha estat proposat és la disminució de la producció hepàtica d'apoAI deguda bé als elevats nivells de NEFA que inhibirien la seva producció [156], o bé a una elevada taxa de degradació [148]. Per altra banda, també s'ha proposat que la hiperinsulinèmia pot produir una desestabilització de la proteïna transportadora d'unió a ATP de tipus 1 (ABCA1), la qual és necessària per a la formació d'HDL madures i funcionals [156].

L'aparició d'sdLDL també és secundària a l'elevació dels nivells plasmàtics de TAG. El mecanisme implicat en la formació d'aquestes LDL comporta la participació de la CETP i l'HL. La CETP facilita la transferència de TAG des de VLDL altament

Introducció

carregades de TAG cap a les LDL, les quals s'enriqueixen en TAG i es converteixen en molt bon substrat per a l'HL, que n'augmenta la lipòlisi formant les sdLDL [149]. En aquets procés també hi pot participar l'LPL [148]. L'LDLr no pot captar les sdLDL de forma eficient, de manera que el seu temps de residència a la circulació augmenta. Això, juntament amb el fet de que són més susceptibles a les modificacions per oxidació fa que els seus nivells comportin un major risc cardiovascular [156].

1.3.2.2 Fetge gras no alcohòlic

La malaltia del fetge gras no alcohòlic (NAFLD, de l'anglès *non-alcoholic fatty liver disease*) representa un ampli espectre de malalties que van des de l'esteatosi benigna, passant per l'esteatohepatitis (NASH, de l'anglès *non-alcoholic steatohepatitis*), fins a la cirrosi i el càncer hepatocel·lular, en els casos més greus.

Tot i que el NAFLD té similituds amb el dany hepàtic provocat pel consum excessiu d'alcohol, aquesta malaltia es desenvolupa en pacients que consumeixen quantitats d'alcohol molt petites o nul·les. El NAFLD es caracteritza histològicament per una acumulació de greix al fetge superior al 5-10 % del seu pes, l'aparició de focus d'inflamació, cossos de Mallory, fibrosi i fins i tot cirrosi [157].

Per establir el diagnòstic de NAFLD es disposa de diversos mecanismes:

- **Enzims hepàtics:** nombrosos estudis han descrit concentracions elevades d'aspartat aminotransferasa (AST) i d'alanina aminotransferasa (ALT) en els pacients obesos mòrbids amb NAFLD i NASH, tot i que no troben relació entre NASH i la relació AST/ALT [158]. Altres autors en canvi, no han vist valors de transaminases fora del rang de normalitat en persones no obeses amb NAFLD [159].
- **Ecografia:** aquesta tècnica té una sensibilitat limitada quan el grau d'esteatosi es troba per sota del 30% i es considera que té una gran variabilitat entre operadors [160].
- **Ressonància magnètica espectroscòpica de protons:** és el millor mètode no invasiu per determinar la quantitat de lípids hepàtics, però és car i no pot distingir entre l'esteatosi simple i la fibrosi.
- **Mètodes predictius:** es disposa de dos, el HAIR [161] que es basa en la presència d'hipertensió arterial, nivells d'ALT per sobre de 40 UI/L i IR; i el de Campos i col·laboradors [162] que es basa en la presència d'hipertensió arterial, DM, apnea del son, nivells d'ALT i AST per sobre de 27 UI/L i no pertànyer a l'ètnia afroamericana.
- **Biòpsia hepàtica:** és el millor mètode per determinar el grau i l'estadi de la malaltia, però és invasiu i comporta un risc de morbiditat del 0.06-0.35 % i de mortalitat del 0.1-0.01 % [160]. A partir de la biòpsia es determinen el grau

Introducció

(dany provocat per la necroinflamació) i l'estadi (la presència de fibrosi i de remodelació del parènquima) de la malaltia segons el sistema de classificació de Brunt (Taula 2 i Figura 12) [163, 164].

| | | Característiques |
|----------------------|-------------------|--|
| Grau d'esteatosi | Grau 1 (lleu) | Esteatosi, principalment macrovesicular, fins en el 33% de la biòpsia, aparició ocasional de balonització a la zona perivenular (zona 3), no es detecta inflamació, cossos de Mallory dispersos. |
| | Grau 2 (moderada) | Esteatosi entre el 33% i el 66% de la biòpsia, balonització òbvia en la zona 3, inflamació portal i intraacinar de lleugera a moderada, cossos de Mallory abundants. |
| | Grau 3 (severa) | Esteatosi en més del 66% de la biòpsia, balonització, inflamació portal crònica de lleugera a moderada, cossos de Mallory abundants i associats a hepatòcits balonitzats. |
| Estadi de la fibrosi | Estadi 1 | Fibrosi perisinusoidal i pericel·lular focal o extensiva a la zona 3. |
| | Estadi 2 | Fibrosi perisinusoidal i pericel·lular a la zona 3 amb fibrosi periportal focal o extensiva. |
| | Estadi 3 | Fibrosi perisinusoidal i pericel·lular a la zona 3 amb fibrosi portal i fibrosi en pont focal o extensiva . |
| | Estadi 4 | Cirrosi. |

Taula 2. Sistema de classificació del grau i l'estadi del NAFLD. L'esteatosi és l'acumulació de TAG dins dels hepatòcits en forma de grans gotes lipídiques que desplacen el contingut intracel·lular (esteatosi macrovesicular) i en forma de gotetes petites (esteatosi microvesicular). La balonització és la presència d'hepatòcits de mida més gran amb el citoplasma amb aspecte de floculs. Els cossos de Mallory són agregats citoplasmàtics. La fibrosi és una acumulació de matriu extracel·lular [160].

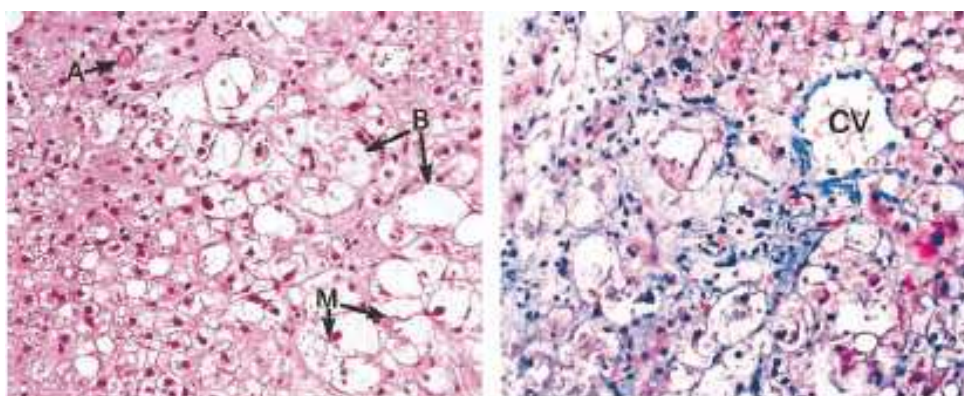


Figura 12. Imatges histològiques d'una biòpsia hepàtica (augment original x400). Imatge de l'esquerra tenyida amb hematoxilina-eosina: l'esteatosi macro- i microvesicular està barrejada. A, cossos acidòfils; B, balonització (cèl·lules grans amb el citoplasma tenyit d'un color més pàl·lid); M, cossos de Mallory. Imatge de la dreta tenyida amb tinció tricròmica de Masson: es pot veure la fibrosi al voltant de la vena central (CV) tenyida de blau. Fotografies extretes de Neuschwander-Tetri B.A. i Caldwell S.H. [157].

Introducció

Per diagnosticar NASH cal com a mínim tenir grau 1- estadi 1 [157]. Existeixen altres sistemes de classificació com ara el NIDDK NASH CRN que permet la seva aplicació en mostres tant adultes com pediàtriques [160].

Un dels mecanismes més estesos per descriure la progressió del NAFLD a NASH és la teoria del doble o del múltiple impacte (Figura 13). Segons aquesta teoria el **primer impacte** consistiria en l'acumulació de TAG i NEFA als hepatòcits deguda com a mínim a un dels processos següents: **1.** Un excés de NEFA provinents de la dieta; **2.** Un augment del flux de NEFA a fetge per augment de la lipòlisi a l'AT (observat tant en l'obesitat com en la IR); **3.** Un augment de la lipogènesi *de novo* al fetge (també observada en els obesos i en individus amb IR); **4.** Una deficiència en la β -oxidació dels NEFA; i/o **5.** Una síntesi o secreció insuficient de VLDL [165-168].

Tradicionalment s'ha considerat que el primer impacte faria augmentar la susceptibilitat del fetge pel segon impacte; però actualment es creu que l'acumulació de TAG a fetge és un mecanisme de defensa envers els efectes lipotòxics dels NEFA. Si els àcids grassos s'acumulesin en aquesta forma, promourien l'estrès oxidatiu i la inflamació [169]. No es té clar si la IR causa l'esteatosi hepàtica o si l'acumulació de greix al fetge provoca una IR primària al fetge i després apareix la IR perifèrica [166].

El **segon impacte** es caracteritzaria per l'aparició d'inflamació i fibrosi, és a dir, per l'evolució de la malaltia cap a NASH. Tot i que els mecanismes que hi intervenen encara no estan del tot clars, s'ha suggerit que hi podrien estar implicats diversos factors. Per una banda, un cop s'ha establert l'esteatosi, la IR s'agreuja arribant a ser una DM establerta. Per altra banda, augmenta l'estrès oxidatiu hepàtic degut a que es satura la capacitat de β -oxidació de NEFA i això fa augmentar la generació de ROS [170]. L'exposició prolongada dels hepatòcits als ROS genera un estat d'estrès oxidatiu tal que provoca la disfunció mitocondrial i la peroxidació de lípids, que alhora potencia els efectes nocius de l'estrès oxidatiu [171, 172]. A més, l'excés de NEFA també provoca inflamació hepàtica [169]. Aquesta inflamació i l'augment de ROS estimulen l'expressió de citoquines proinflamatòries com ara $\text{TNF}\alpha$, els nivells del qual correlacionen amb la severitat histològica del NASH; IL6, que correlaciona positivament amb els nivells d'inflamació i fibrosi; i $\text{IL1}\beta$ així com l'activació de les cèl·lules de Kupffer [169]. IL6 i $\text{TNF}\alpha$, les quals estan elevades tant en obesitat com en IR, també ho estan en individus amb NAFLD i NASH [166]. La inflamació també provoca l'activació de les cèl·lules estrellades, les quals produeixen angiotensina II, leptina i adiponectina, que participen en el desenvolupament i agreujament de la fibrosi hepàtica [171]. Tant la leptina com l'adiponectina poden influenciar la resposta immune. L'adiponectina inhibeix la producció de $\text{TNF}\alpha$ i estimula la producció de citoquines antiinflamatòries com ara la IL10. A més, estimula la utilització de glucosa, l'oxidació hepàtica dels àcids grassos i la cetogènesi al fetge, alhora que inhibeix la síntesi de colesterol i TAG. Com que els nivells detectats en individus amb NASH estan per sota dels nivells normals, aquests efectes beneficiosos es perdrien [64, 173]. Els nivells elevats de leptina detectats en pacients obesos i en pacients amb NASH podrien contribuir a l'esteatosi empitjorant la IR, augmentant per tant els nivells circulants

Introducció

d'insulina, i/o alterant la senyalització de la insulina de manera que es promogui l'acumulació de greixos intrahepàtica [165].

A banda de tot el descrit anteriorment, alguns autors han suggerit que les bacteries derivades de l'intestí prim també podrien afectar a un fetge esteatòtic. Aquest és més susceptible a la resposta inflamatòria que pot produir l'exposició a lipopolisacàrid o endotoxina provinents de bacteries de l'intestí (que activen l'expressió de $TNF\alpha$ a les cèl·lules de Kupffer) [174], i aquesta resposta promouria l'evolució cap a estadis més avançats de la malaltia. Aquest aspecte és especialment important en els malalts que es sotmeten a operacions d'escurçament d'intestí, com és el cas d'alguns pacients amb obesitat mòrbida [175].

L'augment d'estrès oxidatiu, de citocines proinflamatòries i de l'endotoxina derivada de l'intestí, juntament amb el desequilibri en les adipoquines, acaben provocant dany cel·lular i un desequilibri en la proliferació de les cèl·lules hepàtiques progenitores que condueix cap a la cirrosi (a aquest procés alguns autors l'anomenen el tercer impacte) [169].

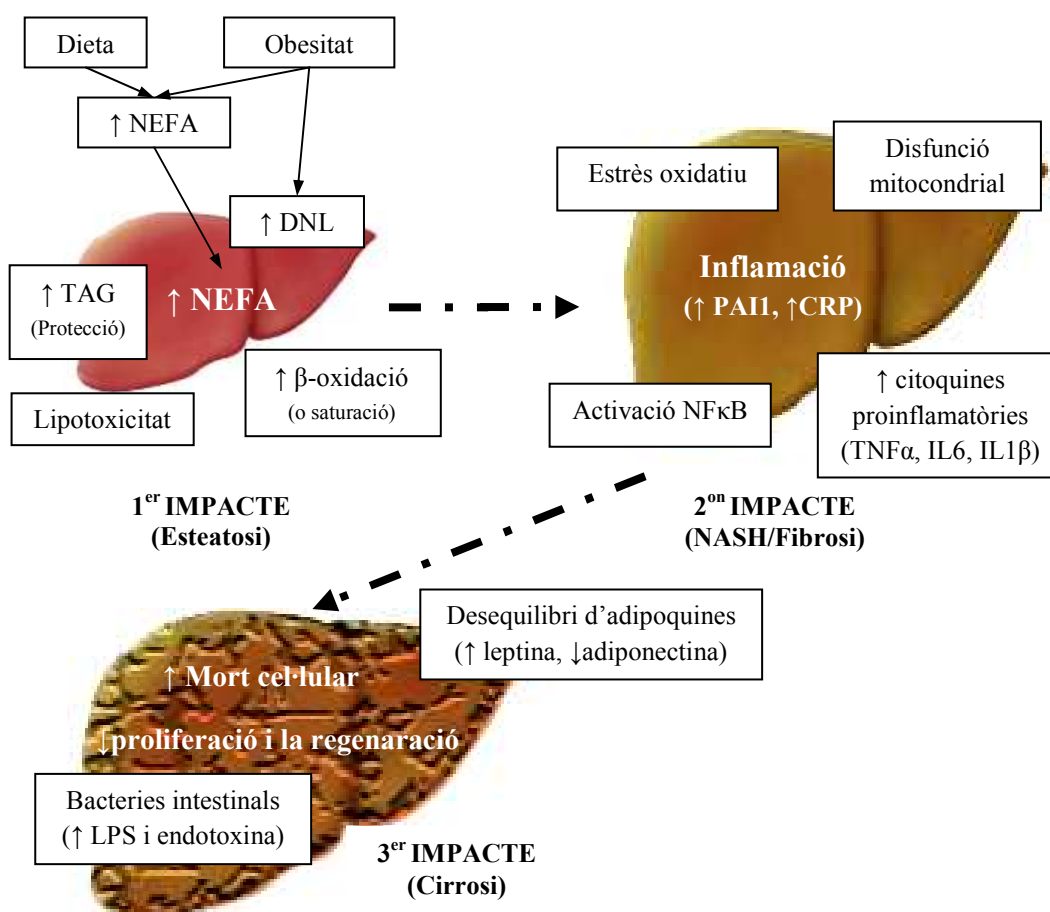


Figura 13. Esquema representatiu de la hipòtesi del múltiple impacte. L'estrès oxidatiu que genera l'acumulació de NEFA al fetge indueix un estat proinflamatori que dificulta la regeneració hepàtica. DNL, lipogènesi *de novo*; NEFA, àcids grassos no esterificats; TAG, triacilglicerols; TNF, factor de necrosi tumoral; IL, interleucina; NF, factor nuclear; LPS, lipopolisacàrid. Adaptat de Dowman J.K. i col·laboradors i Kotronen A. [169, 176].

Introducció

La prevalença del NAFLD ha augmentat en paral·lel amb l'increment de casos d'obesitat i DM, i està esdevenint la causa més freqüent de malaltia hepàtica en el món occidental [169]. La prevalença del NAFLD és del 15% al 30% en la població general [158, 159], mentre que la del NASH és d'aproximadament del 3% al 5%. En la població obesa, l'esteatosi té una prevalença del 75% al 91% i el NASH del 25% al 70% [158, 166]. Aproximadament el 10% dels pacients amb NAFLD desenvolupen NASH i el 8-26% dels pacients amb NASH evolucionen cap a cirrosi [177, 178]; finalment, entre del 4 al 27% dels casos amb NASH desenvolupen càncer hepatocel·lular [179].

El NAFLD està associat amb l'obesitat, la DM, la hiperlipèmia, la hiperuricèmia i els ovaris poliquístics, així com amb l'apnea del son i les lipodistrofies [157, 180]. També es troba associat a un major risc de patir malaltia cardiovascular, hipertensió arterial (tot i que no s'ha demostrat una associació significativa) i dislipèmies [158]. En el cas concret de l'obesitat, persones amb NAFLD tenen perímetres de cintura i BMI superiors als de les persones sense NAFLD. Tanmateix, la distribució del greix, en concret l'AT visceral, sembla tenir una importància més marcada en la patogènesi de la malaltia, tant per la seva associació amb la IR com per ser una possible font de NEFA; fins al punt que l'acumulació de greix en aquesta zona correlaciona positivament amb el greix hepàtic i la IR hepàtica [166]. La severitat de l'esteatosi està millor correlacionada amb la quantitat d'AT visceral, en comparació amb el BMI o el greix total, i correlaciona lleument amb l'AT subcutani [174]. Tot i això, hi ha estudis que no han trobat cap relació entre aquest dipòsit gras i el NAFLD [181].

Finalment, existeixen factors genètics que predisposen a l'acumulació de greixos al fetge. Variants del gen que codifica per a la adiponutrina estan associades a una major acumulació de lípids a fetge [182], variants del gen de l'apoCIII estan associades a una major prevalença del NAFLD [183] i variants de l'apoE a la de NASH [184].

1.3.3 Malalties cardiovasculars

1.3.3.1 Hipertensió arterial

Nombrosos estudis en humans i en animals confirmen que existeix una forta relació entre l'obesitat i la hipertensió arterial [185, 186], i que un factor de risc molt important és l'obesitat visceral [187]. Entre els homes, la prevalença de la hipertensió arterial és del 15% per aquells amb un BMI < 25 kg/m², i del 42% per a un BMI > 30 kg/m²; a les dones aquests percentatges són del 15% i del 38%, respectivament [188].

La pressió sanguínia depèn del volum de sang que el cor és capaç de bombejar per minut, el qual es troba augmentat en els individus obesos [189]; i de la resistència sistèmica vascular, la qual podria estar afectada per nombrosos factors que es troben alterats en els obesos (Figura 14):

- Inflamació de baix grau causada per NEFA i adipoquines/citoquines (leptina, adiponectina, resistina, IL6, TNF α , PAII, entre d'altres) [190, 191].
- Efectes antinatriurètics de la insulina deguts a la hiperinsulinèmia i la IR [191].
- Augment de l'activitat del sistema nerviós simpàtic degut a la hiperinsulinèmia [192] i a la hiperleptinèmia [193].

Introducció

- Disfunció endotelial deguda, entre d'altres, a que en l'obesitat existeix una bioactivitat de l'òxid nítric (NO) reduïda que provoca vasoconstricció [194, 195].
- Sobreactivació del sistema renina-angiotensina: els nivells d'angiotensinogen i aldosterona es troben elevats en l'obesitat, especialment en l'obesitat visceral [196].

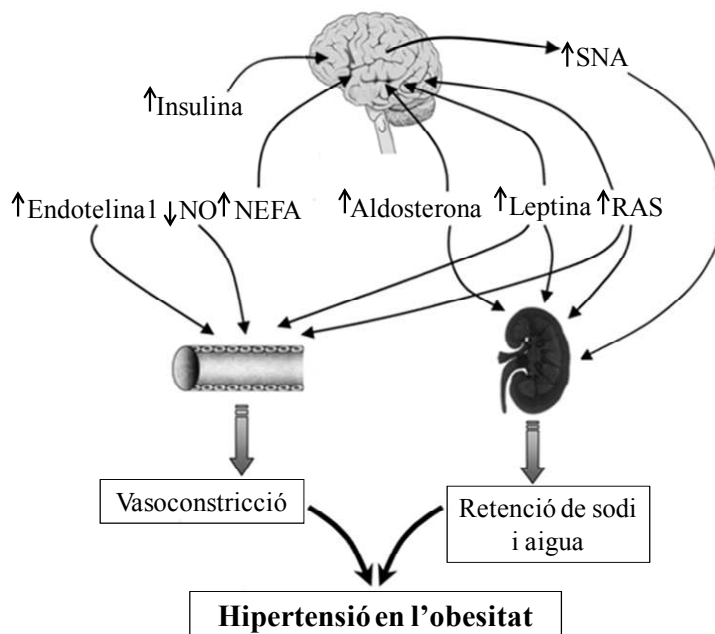


Figura 14. Mecanismes implicats en la hipertensió associada a obesitat. NO, òxid nítric; NEFA, àcids grassos no esterificats; SNS, sistema nerviós simpàtic; RAS, sistema renina-angiotensina. Adaptat de Rahmouni K. i col·laboradors [193].

La pèrdua de pes s'associa amb un descens dels nivells de pressió arterial, de manera que per cada Kg de pes perdut la pressió arterial sistòlica i diastòlica disminueixen aproximadament 1 mm Hg [197].

1.3.3.2 Arteriosclerosi

Tradicionalment s'ha associat l'arteriosclerosi amb la dislipèmia. Els nivells elevats de TAG, NEFA i sdLDL, juntament amb la hipertensió arterial i la IR que sovint s'observen en els pacients obesos, comporten un major risc de patir una malaltia cardiovascular.

Actualment es defensa la teoria de que l'arteriosclerosi també podria ser una malaltia inflamatòria. La disfunció endotelial provoca danys a l'endoteli que afavoreixen l'adhesió de leucòcits (cèl·lules T i macròfags), els quals secreten factors de creixement i citocines proinflamatòries (IL1 i TNF α). Aquestes, juntament amb les secretades per l'AT (leptina) [190], afavoreixen la proliferació de nous macròfags i cèl·lules de l'estroma vascular. L'augment d'activitat que es dona a les lesions vasculars provoca un augment de ROS que afavoreix la formació d'LDL oxidades. Els macròfags activats són capaços de captar-les i acaben convertint-se en les cèl·lules escumoses que formen les plaques d'ateroma [198].

Introducció

A banda dels factors de risc convencionals ja esmentats, existeixen altres factors, alterats en els obesos, que augmenten el risc de patir arteriosclerosi i accidents trombòtics. A continuació es destaquen alguns:

- **Fibrinogen:** proteïna hepàtica que determina la viscositat del plasma. Els seus nivells es troben incrementats en individus obesos i amb sobrepès; presenta una correlació positiva amb el BMI i és un potent factor de risc per a malalties cardiovasculars [199]. L'augment de la producció de fibrinogen en aquest tipus de pacients s'associa amb la IR i amb l'AT visceral, ja que la IL6 que aquest secreta n'estimula la síntesi [200]. Una pèrdua del 10% d'excés de pes produeix una reducció significativa dels nivells de fibrinogen [201].
- **CRP:** proteïna sintetitzada principalment als hepatòcits, en resposta a la inflamació. Està involucrada en processos arterioscleròtics a través de mecanismes com l'amplificació del senyal inflamatori per activació del complement, dany tissular i activació de les cèl·lules endotelials. Els seus nivells plasmàtics correlacionen positivament amb el BMI i el perímetre de cintura [202].
- **PAI1:** factor procoagulant sintetitzat a l'AT (majoritàriament al visceral [75]). És el principal inhibidor de l'activador tissular del plasminogen i de la uroquinasa, i per tant inhibeix la fibrinòlisi. En els obesos els seus nivells es troben elevats i estan correlacionats amb el BMI i l'AT visceral [77]. La CRP augmenta l'expressió de PAI1 [203].

L'estat protrombòtic que hi ha en el procés arterioscleròtic comporta hiperagregabilitat plaquetària, hipercoagulabilitat i hipofibrinòlisi [190].

1.3.4 Síndrome metabòlica

Cap als anys 1923, Kylin va descriure per primera vegada que existia un conjunt de desordres metabòlics (hipertensió arterial, hiperglicèmia i gota) que conferien un major risc per patir malaltia cardiovascular. Més endavant, al 1947, en Vague va destacar que l'adipositat de tipus androide es trobava freqüentment associada amb desordres metabòlics que comportaven major risc de patir DM i malalties cardiovasculars [15]. Tot i això, no va ser fins al 1988 que en Reaven va descriure a la confluència d'hipertensió arterial, DM i dislipèmia com a Síndrome X [204]. Amb els anys, a aquesta síndrome també se l'ha coneguda amb el nom de síndrome de resistència a la insulina [205] o el quartet de la mort (aquesta darrera denominació també incloïa l'obesitat androide com a característica) [17]. No va ser fins al 1998 que l'OMS va fixar uns criteris per definir el que van anomenar la síndrome metabòlica. En aquesta primera descripció es considerava la IR com a factor desencadenant de la síndrome, i per tant la contemplaven com a condició indispensable per al diagnòstic. A banda, s'havien de tenir dos dels següents factors de risc: obesitat, hipertensió arterial, hipertrigliceridèmia

Introducció

o microalbuminúria [206]. En la descripció del 2001 que va fer l'NCEP-ATPIII, es van modificar els requisits per establir la síndrome metabòlica: la IR ja no era un factor indispensable per al diagnòstic de la síndrome, hi havia prou amb tenir 3 dels 5 primers citats anteriorment, IR inclosa [23]. A l'any 2005, la IDF juntament amb la *American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute* (AHA/NHLBI) van intentar consensuar una descripció de la síndrome. Van establir que l'obesitat visceral, amb el perímetre de cintura com a indicador, era una condició indispensable per al diagnòstic de la síndrome, tot i que no van establir uns perímetres de circumferència fixos sinó que els van fixar en funció del grup ètnic [24]. D'aquesta manera es donava una importància clau en el desenvolupament de la síndrome metabòlica a l'obesitat. Finalment, l'any 2009, l'agrupació de diverses entitats internacionals van aconseguir consensuar una definició de síndrome metabòlica que van recollir en el document "*Harmonizing the Metabolic Syndrome*" [31]. A la Taula 3 es pot veure l'evolució dels criteris que defineixen aquesta síndrome.

| | OMS, 1998 ^a [206] | ATPIII, 2001 ^b [23] | IDF, 2005 ^d [24] | Consens 2009 ^e [31] |
|-------------------------------------|--|---|---|---|
| Glucosa plasmàtica en dejuni | ≥ 110mg/dL (6.1mM) | ≥ 110mg/dL ^c | ≥ 100mg/dL | ≥ 100mg/dL |
| Obesitat abdominal | B ≥30Kg/m ² o bé WHR>0.9 en homes i a 0.85 en dones | Perímetre de cintura > 102 cm en homes i a 88 cm en dones | Segons grup ètnic ^f | Segons grup ètnic ^f |
| TAG | >150 mg/dL (1.7 mM) | >150 mg/dL | >150 mg/dL o en tractament | >150 mg/dL o en tractament |
| HDLc | <35 mg/dL (0.9mM) en homes i 39 mg/dL (1mM en dones) | <40 mg/dL (1.03mM) en homes i 50 mg/dL (1.3 mM) en dones | <40 mg/dL en homes i 50 mg/dL en dones, o en tractament | <40 mg/dL en homes i 50 mg/dL en dones, o en tractament |
| Tensió arterial | ≥140/90 mmHg | ≥130/85 mmHg o en tractament | ≥130/85 mmHg o en tractament | ≥130/85 mmHg o en tractament |
| Albuminúria | ≥20µg/min | - | - | - |

Taula 3. Evolució del criteris clínics pel diagnòstic de la Síndrome Metabòlica. BMI, índex de massa corporal; WHR, índex cintura/maluc; TAG, triacilglicèrids. ^a En aquesta classificació la IR era una condició indispensable pel diagnòstic de síndrome metabòlica, a més calia tenir dos dels 5 paràmetres restants. ^b Pel diagnòstic de la síndrome era necessari tenir 3 dels 5 paràmetres descrits. ^c En el 2003 la *American Diabetes Association* va modificar aquest criteri i el va baixar a 100 mg/dL. ^d Pel diagnòstic de la síndrome l'obesitat abdominal es una condició indispensable, a més cal tenir 2 dels 4 paràmetres restants. ^e Per diagnosticar la síndrome cal tenir al menys 3 dels 5 paràmetres especificats. ^f Per poblacions caucàsiques es poden agafar tant els criteris de la IDF (on perímetre de cintura en homes ha de ser ≥ 94 cm i en dones de 80 cm) o el de la AHA/NHLBI (on el perímetre de cintura ha de ser ≥ 102 per homes i 88 per dones), aquest últim criteri coincideix amb les directrius sobre obesitat del *National Institute of Health* (NIH).

La prevalença de la síndrome metabòlica està augmentant a tot el món [207]. S'ha descrit que factors com el sexe, l'edat i l'ètnia, a més de l'estil de vida i l'estatus

Introducció

socioeconòmic, influencien en la prevalença de la malaltia. A banda d'això, també hem vist que és important el criteri de diagnòstic que es segueixi (

Taula 3). Tot plegat fa que donar dades de prevalença sigui una tasca complicada. Per exemple, si busquem casos extrems, hi ha estudis que descriuen que en una població urbana la prevalença de la síndrome metabòlica va des del 8% a la Índia al 24% als EEUU en el cas dels homes; i del 7% a França al 43% a Iran, en el cas de les dones [208]. Pel que fa a Espanya, Lorenzo i col·laboradors van descriure unes prevalences del 22% en homes i del 28.8% en dones si es diagnosticaven els pacients segons el criteri NCEP-ATPIII; i del 27.3% en homes i del 31.7% en dones si se seguia el criteri de l'IDF [209].

La síndrome metabòlica és un factor predictiu de malaltia cardiovascular. Les persones amb aquesta síndrome tenen al menys dues vegades més risc de desenvolupar un succés cardiovascular, en comparació amb les persones que no la tenen [8, 210]. Per altra banda, entre els individus que pateixen síndrome metabòlica el risc de patir DM és 5 vegades més elevat que en persones que no la pateixen [207]. A més del ja esmentat risc cardiovascular i el de desenvolupar DM, els individus amb síndrome metabòlica també són més susceptibles a desenvolupar altres malalties com ara síndrome d'ovaris poliquístics, síndrome d'apnea de la son, algunes formes de càncer i NAFLD [207]. En aquest últim cas, el contingut de greixos del fetge es troba significativament augmentat, fins a 4 vegades, en pacients amb la síndrome metabòlica comparat amb aquells que no pateixen la síndrome; independentment de l'edat, el sexe i el BMI [207, 211].

1.3.5 Altres comorbiditats

Hi ha altres malalties que també troben incrementada la seva prevalença com a conseqüència d'un excés de greix corporal. A continuació es descriuran algunes d'elles en funció de l'aparell al que afecten:

1.3.5.1 Aparell digestiu

- **Reflux gastroesofàgic**

En la població general aquesta patologia té una prevalença del 8-26%. Estudis com el NANHES van indicar que per cada increment de 5 punts de BMI el risc de desenvolupar reflux augmentava 1.2 vegades [8]. Així doncs, tot i que les dades de prevalença són controvertides, estudis realitzats en la població en general descriuen que el 39% dels individus amb un BMI superior a 30 Kg/m² presenten la simptomatologia; i si el BMI augmenta fins a 35-40 Kg/m² els símptomes apareixen en el 53-61% dels casos [212]. Existeixen estudis on es proposa que l'obesitat central (mesurada com a WHR) pot arribar a ser més importat com a factor predictiu que el mateix BMI, ja que en aquest tipus d'obesitat augmentaria la pressió intragàstrica, predisposant l'individu al reflux. Al mateix temps, en l'obesitat central se secreten nombroses citoquines que podrien afectar la motilitat esofagogastrica. A més, patologies que sovint es presenten en l'individu obès com ara l'hernia de hiat, un buidat gàstric irregular o una major relaxació de l'esfínter

Introducció

esofàgic, que propiciaria el reflux d'àcid cap a l'esòfag, també contribuirien al desenvolupament de la malaltia [213].

- **Colelitiasi**

Els obesos pateixen un excés de producció hepàtica de colesterol, de manera que per cada Kg extra de greix corporal se sintetitzen uns 20 mg de colesterol. Això fa que la proporció de colesterol respecte la de fosfolípids i àcids biliars sigui major i que per tant, les sals biliars siguin més litogèniques [8]. A més, la mida de la vesícula biliar es troba augmentada i la contractibilitat disminuïda. L'obesitat presenta una forta associació amb la formació de pedres a la vesícula biliar, així doncs, mentre que a la població general la prevalença de la malaltia oscil·la entre el 2% i el 15%, en els obesos augmenta fins al 21-41% (mesurat per ultrasonografia) [214].

1.3.5.2 Aparell respiratori

L'excés de pes pot arribar a alterar la mecànica ventilatòria, l'intercanvi de gasos i la respiració a nivell central i perifèric. En els individus obesos el volum respiratori de reserva disminueix com a conseqüència de la pressió que exerceix sobre el diafragma el greix acumulat a la regió abdominal. En casos d'obesitat extrema, també es poden veure disminuïdes la capacitat vital i la capacitat pulmonar total. Les capacitats i volums inspiratoris són normals. Els obesos dediquen al treball respiratori un percentatge de consum d'oxigen molt elevat (ineficiència respiratòria) que els confereix una predisposició a la fallida respiratòria davant de qualsevol problema pulmonar afegit. A més, el patró respiratori es troba alterat, augmentant la freqüència respiratòria fins al 40% en el cas dels individus amb obesitat i fins al 60% en el cas de pacients amb obesitat mòrbida [215].

- **Síndrome d'apnea obstructiva de la son**

Aquesta síndrome es caracteritza per una obstrucció de les vies respiratòries deguda a una hipotonia de la musculatura palatina en la fase de la son REM. A aquesta, es suma l'estretament de les vies aèries superiors deguda a l'acumulació de greix cervical. Provoca roncs nocturns, son superficial i hipersòmnia diürna compensatòria. L'obesitat és el factor de risc més important per desenvolupar aquesta malaltia i, tot i que la prevalença depèn del grau d'obesitat, s'ha descrit que per un BMI superior a 30 Kg/m² la prevalença en els homes és del 50% i en les dones del 8%; i en l'obesitat mòrbida del 80% en homes i del 50% en dones [215]. El tractament d'elecció és l'aplicació de pressió contínua positiva per via nasal. S'ha vist que amb el tractament es produeix una disminució dels nivells de leptina circulants, tot i que encara no s'ha establert quina és la relació directa [215]. La síndrome està associada a hipertensió arterial i malaltia cardiovascular. Una pèrdua de pes del 10% comporta una disminució de l'índex d'apnees/hipopnees del 26%. Aquest índex es calcula dividint el número d'apnees/hipopnees durant la son entre el nombre d'hores dormides [216].

Introducció

- **Síndrome d'hipoventilació-obesitat**

També conegut amb el nom de síndrome de Pickwick, es caracteritza per hipoventilació alveolar greu associada a hipoxèmia (disminució de la pressió parcial d'oxigen en sang arterial) i/o hipercàpnia (augment de la pressió parcial de CO₂ en sang arterial) i somnolència diürna en pacients amb un BMI superior a 30 Kg/m². Com a causa de la malaltia es descriu una acció conjunta de la sobrecàrrega mecànica que comporta l'obesitat sobre la musculatura inspiratòria, una disminució de la resposta ventilatòria a la hipoxèmia o la hipercàpnia i les possibles apnees durant la nit (si existeixen) [215]. La prevalença en individus amb obesitat es troba al voltant del 30%.

1.3.5.3 Aparell reproductor

Per terme mig, les dones obeses tenen la menarquia abans que les dones amb normopès i la menopausa més tard. A més, pateixen més freqüentment infertilitat per alteracions menstruals o anovulació (el risc relatiu de patir-la en les dones amb un BMI superior a 27 kg/m² és de 3.1 comparat amb el de les dones amb normopès). Per altra banda, presenten una producció ovàrica d'andrògens elevada, com a conseqüència de la hiperinsulinèmia que n'estimularia la producció. Aproximadament el 50% de les dones amb ovaris poliquístics presenta sobrepès o obesitat [8].

En el cas dels homes, existeix una major prevalença d'oligospèrmia, impotència, nivells baixos de testosterona i disminució de la líbido [217].

1.3.5.4 Aparell locomotor

L'obesitat està associada amb un nombre elevat de patologies músculo-esquelètiques (osteoartritis de genoll, maluc i mà, osteoporosi, túnel carpià, fascitis plantar, lumbàlgies, hèrnies discals, etc.) [218]. Afecta principalment les articulacions de càrrega (regions intervertebrals, genolls, turmells, etc.) per una sobrecàrrega mecànica; tot i que també apareix en altres articulacions, cosa que fa pensar que existeix algun component de l'obesitat que afecta directament al cartílag i al metabolisme ossi [217]. La malaltia es pot manifestar de forma inflamatòria aguda (artritis) o en forma crònica (artrosi) [218]. Sovint, la gravetat de la malaltia es correlaciona amb el nivell d'obesitat [219]. Recentment, el Centre de Control de Malalties dels E.E.U.U. va publicar un estudi en el que el 31% dels obesos adults havien estat diagnosticats d'artritis en comparació amb el 16% dels individus amb normopès [220].

1.3.5.5 Malalties neoplàsiques

Nombrosos estudis han demostrat l'associació entre l'adipositat i un augment del risc de càncer d'endometri, ronyó, vesícula biliar (en dones), mama (en dones postmenopàusiques) i colon (en homes) [221]. Els mecanismes potencials implicats en la carcinogènesi de l'obesitat inclouen un augment dels nivells d'hormones endògenes (esteroides, insulina, etc.) així com l'alteració d'algunes adipoquines (leptina, adiponectina) [8].

Introducció

1.4 Tractament de l'obesitat i pèrdua de pes

L'obesitat es considera una malaltia crònica, de manera que els tractaments que es proposin per prevenir-la o tractar-la cal que es puguin aplicar de per vida. El tractament integral de l'obesitat consisteix en la millora dels hàbits alimentaris, l'increment de l'activitat física, el suport conductual, l'administració de fàrmacs en els casos en els que sigui necessari i en el cas de l'obesitat mòrbida, la cirurgia bariàtrica.

Per dur a terme aquests tractaments calen equips mèdics multidisciplinaris que inclouen dietistes, psicòlegs, psiquiatres endocrinòlegs, infermeres, cirurgians i anestesistes. A més, també són importants la família i els grups de suport.

La finalitat dels tractaments es basa en fixar-se fites realitzables i crear expectatives reals en el pacient per millorar l'obesitat existent i les comorbilitats associades, disminuir el risc de desenvolupar noves comorbilitats i millorar la qualitat de vida en general. Entre les fites més destacables es troben: evitar guanyar més pes, reducció del pes corporal minimitzant la pèrdua de massa magra, manteniment del pes a llarg termini un cop s'ha assolit la pèrdua de pes desitjada i finalment, aconseguir una reeducació alimentària i conductual. Una pèrdua de pes inicial del 10% en un període de 6 mesos es considera adequada, ja que s'ha vist que millora l'hipertensió arterial, l'HDLc i el control de la DM, a més de millorar els aspectes psicosocials del pacient [222].

Dels diferents tractaments en destaquem els següents:

1.4.1 Dieta

És important conèixer les alteracions dels hàbits alimentaris dels pacients amb obesitat o obesitat mòrbida. En funció del tipus d'alteració se'ls pot classificar segons la Taula 4.

| Tipus de menjador | Descripció |
|---|---|
| <i>Bigs</i> o "grans menjadors" | fan grans menjars de plats tradicionals |
| <i>Sweets</i> o "llaminers" | ingereixen grans quantitats de dolços i hidrats de carboni |
| <i>Fast foods</i> o "mals menjadors" | ingereixen grans quantitats de menjar ràpid |
| <i>Snakers</i> o "picadors" | piquen durant tot el dia |
| <i>Bingers</i> o "reiteratius" | ingereixen menjars d'un mateix grup de forma constatat i repetida |
| Bulímics | pacients amb bulímia nerviosa |

Taula 4. Classificació del tipus de menjadors en funció del tipus d'alteració en l'hàbit alimentari que presenten.

En l'actualitat existeixen diversos tipus de dietes per aconseguir perdre pes. La majoria es basen en les dietes convencionals, caracteritzades per una disminució en l'aportació d'energia i greixos i un augment de fibra; a banda d'aquestes també trobem les dietes molt baixes en calories (VLCD, de l'anglès *very low calorie diet*) i les basades en l'índex glicèmic dels aliments.

Introducció

Les **dietes convencionals** es caracteritzen per mantenir una proporció de nutrients equilibrada tot i ser baixes en calories. En general s'aconsella una reducció de 500-600 Kcal/dia respecte a la ingesta habitual de l'individu, el que acostuma a representar dietes que aporten unes 1200-1500 Kcal/dia. Pel que fa a la composició, acostumen a tenir un 45-55% de carbohidrats (la majoria complexos), un 15-25% de proteïna, menys d'un 30% de lípids (menys del 7% saturats, 15-20% de monoinsaturats i la resta poliinsaturats), menys de 30 g de colesterol i uns 20-40 g de fibra [4]. Pel que fa a les vitamines i els minerals, cal mantenir les necessitats diàries recomanades i en cas de no ser possible, aportar-les a través de suplementos. Per terme mig es perden 8.5 Kg en 20-24 setmanes [222].

Les **dietes VLCD** es caracteritzen per contenir menys de 800 Kcal/dia i 70-100 g de proteïna/dia; proporcionen una pèrdua de pes a curt termini entre dues o tres vegades superior si es comparen amb les dietes convencionals [223], preservant la massa grassa i evitant els problemes d'un dejuni total. Per terme mig es perden uns 12 Kg en 12 setmanes. Aquestes dietes són útils sobretot en el cas de pacients amb obesitat mòrbida que necessiten perdre pes ràpidament per preparar-se pels procediments quirúrgics [224]. Redueixen de forma aguda la hipertensió arterial i milloren el perfil lipídic, també s'ha documentat una millora de la IR i del control del metabolisme de la glucosa. Tanmateix, aquest tipus de dieta presenta certes contraindicacions, així doncs no és convenient utilitzar-les en pacients amb problemes cardíacs, amb colelitiasi o amb insuficiència renal. A més, indueix una reducció en la massa òssia, hiperuricèmia i gota. Sempre s'han d'aplicar sota una estricta supervisió mèdica [222].

Les **dietes basades en l'índex glicèmic** es caracteritzen per promoure la ingesta d'aliments amb un índex glicèmic baix. L'índex glicèmic és una propietat dels aliments rics en carbohidrats que descriu l'increment dels nivells plasmàtics de glucosa que es dona després de la ingesta d'un tipus d'aliment en concret. Els aliments amb un índex glicèmic baix tenen taxes de digestió i absorció lentes, de manera que prolonguen la sensació de sacietat en el temps i provoquen una menor resposta insulínica, ajudant així a controlar la insulínemia [225].

1.4.2 Activitat física

Per que l'activitat física sigui eficaç en el tractament de la pèrdua/manteniment del pes cal que sigui d'una intensitat de 3.5-7 Kcal/min, i s'ha d'adaptar a l'edat de l'individu [4]. La recomanació més freqüent en el cas dels obesos és caminar durant 30-60 minuts 5 o més dies a la setmana. Una metanàlisi sobre programes de pèrdua de pes mitjançant l'exercici va revelar que l'exercici sol aconseguia una pèrdua de pes de 3 Kg, mentre que si es combinava amb dieta la pèrdua era d'11 Kg [226].

L'activitat física, juntament amb una dieta adequada, afavoreix la pèrdua de pes, millora la tolerància i la sensibilitat a la glucosa ja que millora la captació de glucosa no dependent d'insulina. A més, millora la relació HDLc/LDLc perquè augmenta l'activitat de l'LPL i disminueix els TAG plasmàtics. Per altra banda, també prevé les malalties cardiovasculars ja que augmenta la fibrinòlisi, disminueix l'agregació plaquetària,

Introducció

millora la captació d'oxigen al cor i als teixits perifèrics, disminueix la taxa cardíaca basal augmentant el to vagal i disminueix la pressió sanguínia [4, 227].

1.4.3 Fàrmacs

Els tractaments farmacològics dels que es disposa en l'actualitat són per tractaments a llarg termini, ja que s'ha vist que si s'interromp el tractament es recupera el pes perdut [228]. És per això que es recomana que no s'utilitzi com a teràpia aïllada, sinó acompanyada de canvis en l'estil de vida (dieta i exercici). Alguns dels fàrmacs més utilitzats es descriuen a continuació:

- **Rimonabant:** antagonista del receptor de cannabinoides I que inhibeix la ingesta i millora la glicèmia i el perfil lipídic. Va ser retirat del mercat el 2008 per provocar efectes secundaris psiquiàtrics (ansietat i depressió) [224].
- **Sibutramina (Meridia):** inhibeix selectivament la recaptació de noradrenalina, serotonina i en menor extensió de dopamina, de manera que redueix la ingesta i augmenta la termogènesi; també redueix els TAG, el colesterol total (CHOL_T) i l'LDLc, alhora que augmenta l'HDLc. Va ser retirat del mercat el 2010 per provocar efectes secundaris cardiovasculars [4].
- **Orlistat (Xenical o Allí):** inhibeix la lipasa pancreàtica de manera que impedeix la hidròlisi i absorció dels greixos sense interferir en el metabolisme dels hidrats de carboni, proteïnes i fosfolípids. És efectiu en el manteniment de la pèrdua de pes, però té uns efectes mínims si el pacient segueix una dieta baixa en greixos [224].

Altres fàrmacs que no s'utilitzen per a la pèrdua de pes, però que són freqüents de trobar en el tractament farmacològic de l'individu obès són:

- **Tiazolidinediones:** augmenten l'acció de la insulina, estimulen la captació de glucosa, inhibeixen la GNG hepàtica, estimulen l'adipogènesi i disminueixen els NEFA, el TNF α i la leptina. S'utilitzen pel tractament de la DM, però provoquen un lleuger augment de pes.
- **Metformina:** redueix la producció hepàtica de glucosa i frena la progressió de la intolerància a la glucosa cap a DM. S'utilitza pel tractament de la IR.
- **Fibrats:** exerceixen el seu efecte hipolipemiant mitjançant la modulació dels PPAR. Serveixen pel tractament de la dislipèmia.
- **Estatines:** són inhibidors de l'HMG-CoA reductasa (3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa), enzim limitant en la síntesi intracel·lular del colesterol. Serveixen pel tractament de la dislipèmia.

Introducció

1.4.4 Cirurgia bariàtrica

Malauradament, en el cas dels obesos mòrbids les mesures terapèutiques no quirúrgiques tenen un índex d'èxit molt reduït, havent-se descrit fins a un 95% de fracàs terapèutic pel que fa a la reducció de la morbiditat o a la millora de la supervivència [8].

L'objectiu principal de la cirurgia bariàtrica és el de forçar la reeducació dels hàbits alimentaris de manera que s'aconsegueixi una reducció de l'excés de pes màxima, en relativament poc temps i de forma mantinguda [229]. No obstant això, el criteris d'inclusió dins dels programes d'aquest tipus de cirurgia són estrictes [4, 229]:

- BMI superior a 40 Kg/m² o entre 35-40 Kg/m² i patir una o més comorbilitats associades a l'obesitat. Els obesos amb BMI superior a 50 Kg/m² són candidats per a la cirurgia encara que no compleixin algun dels altres requisits.
- Fracàs en dos o més intents de pèrdua de pes mitjançant modificacions de l'estil de vida, duts a terme durant 6 o més mesos sota la supervisió d'un especialista.
- Edat entre 18 i 60 anys.
- Coneixement i acceptació per part del pacient del risc quirúrgic (que ha de ser inferior al del manteniment de la pròpia obesitat), dels canvis alimentaris que comporta l'operació i de l'adhesió a un seguiment postoperatori adient.
- Valoració psiquiàtrica favorable (absència d'abús de drogues o alcohol, de retard mental, psicosi, etc.).
- Haver demostrat que l'individu pot perdre pes amb una dieta hipocalòrica.
- Acceptació i implicació de la família en el procediment terapèutic (no és imprescindible).

1.4.4.1 Tipus de cirurgia bariàtrica

El concepte de cirurgia per la pèrdua de pes va començar cap als anys 50 amb el bypass jejunoileal, que estava dissenyat per induir la malabsorció dels nutrients. Tot i que inicialment la tècnica va tenir força èxit, aviat es va abandonar per la gravetat dels efectes secundaris (problemes electrolítics, deficiències nutricionals severes, nefrolitiasi, fallada hepàtica i/o complicacions autoimmunes). Cap als anys 60, gràcies a Mason, va emergir el concepte de bypass gàstric a partir de l'observació que pacients amb úlcera sotmesos a gastrectomies perdien pes després de la cirurgia. A partir d'aquí, es van desenvolupar diverses tècniques com ara la banda gàstrica ajustable (GB), la gastroplàstia vertical anellada (VBG), la gastrectomia tubular o *sleeve* (SG), la derivació biliopancreàtica (BPD) i el bypass gàstric en Y-de-Roux (RYGB) [230, 231].

Segons el seu mecanisme d'acció, la cirurgia bariàtrica es pot classificar en: malabsortiva, restrictiva o mixta (si barreja característiques de les dues anteriors).

Introducció

- **Tècniques malabsortives**

Aquest tipus de tècniques indueixen una disminució de l'absorció de nutrients mitjançant la reducció de la part funcional de l'intestí prim. Inclou la derivació jejunoileal. Actualment, aquests procediments estan en desús degut a l'elevada taxa de complicacions metabòliques que presenten (malnutrició, cirrosi hepàtica, litiasi renal, etc.), la majoria d'elles provocades per la nansa cega (Figura 15).

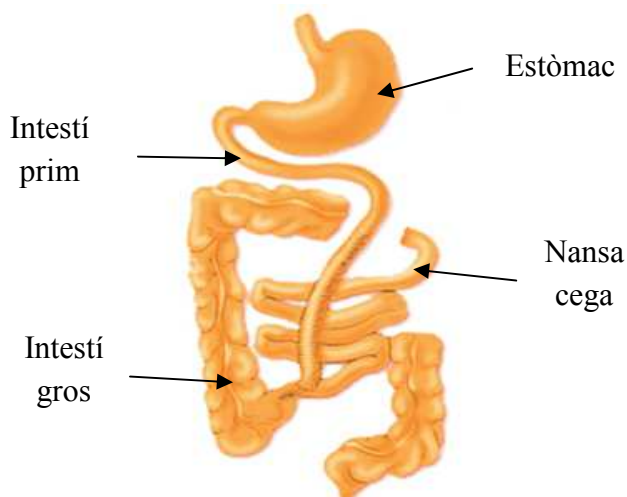


Figura 15. Esquema d'un bypass jejunoileal. Font: www.cirurgiabariatrica.com

- **Tècniques restrictives**

Aquest tipus de tècniques redueixen la capacitat de l'estómac a uns 50 mL, de manera que provoquen sensació de sacietat més ràpidament, i aquesta comporta una disminució de la ingesta calòrica. Inclou la GB, la VBG i l'SG (Figura 16).

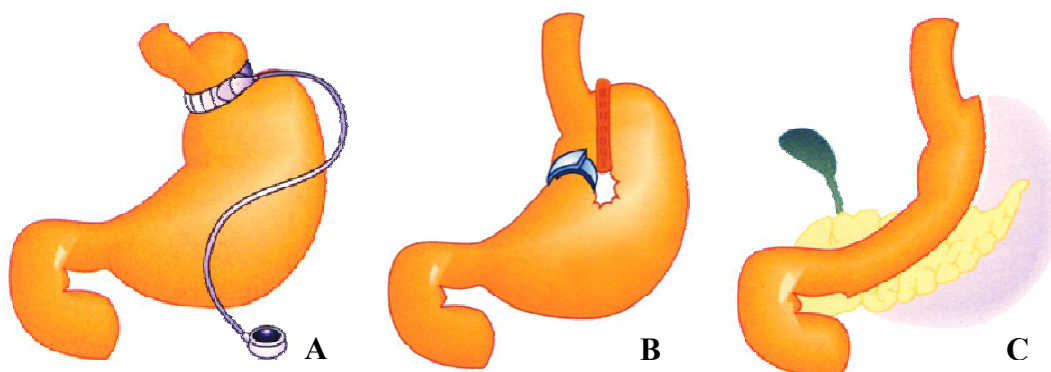


Figura 16. Esquema de les diferents tècniques restrictives. A. Banda gàstrica ajustable (GB). B. Gastroplàstia vertical anellada (VBG). C. Gastrectomia tubular (SG). Extret de Montes de Oca D.M. [232].

- **Tècniques mixtes**

En aquestes tècniques es crea un petit reservori gàstric, alhora que es realitza un bypass del duodè i una petita part del jejú proximal. L'extrem distal del jejú es connecta directament al reservori gàstric, mentre que el proximal s'anastomosa al jejú distal. D'aquesta manera queda una nansa alimentària, una biliopancreàtica i finalment un

Introducció

segment de conducte comú. Dins d'aquest tipus de cirurgia s'inclou la BPD ideada per Scopinaro i la BPD amb una desviació duodenal (modificació de Marceau i Hess). En tots dos procediments es fa una gastrectomia parcial deixant un reservori gàstric de 100-150 mL, de manera que es consideren tècniques parcialment restrictives i preferentment malabsortives (Figura 17).

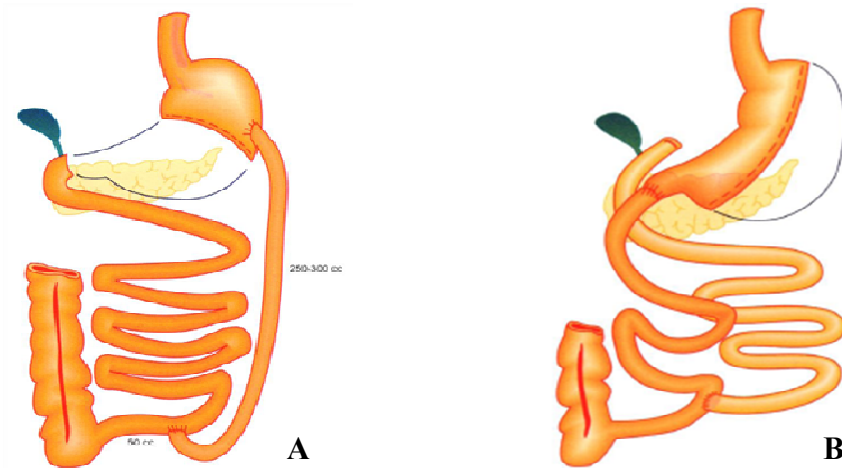


Figura 17. Esquema de les diferents tècniques malabsortives. A. Derivació biliopancreàtica d'Scopinaro. B. Derivació biliopancreàtica amb desviació duodenal. Extret de Montes de Oca D.M.[232]

Dintre d'aquesta categoria també trobem l'RYGB (Figura 18), que es caracteritza per deixar un reservori gàstric encara més petit (d'uns 20-30 mL), al qual s'anastomosa la nansa alimentària. Aquesta tècnica es considera preferentment restrictiva i parcialment malabsortiva i és la que s'ha emprat per dur a terme l'estudi que es presenta en aquest treball.

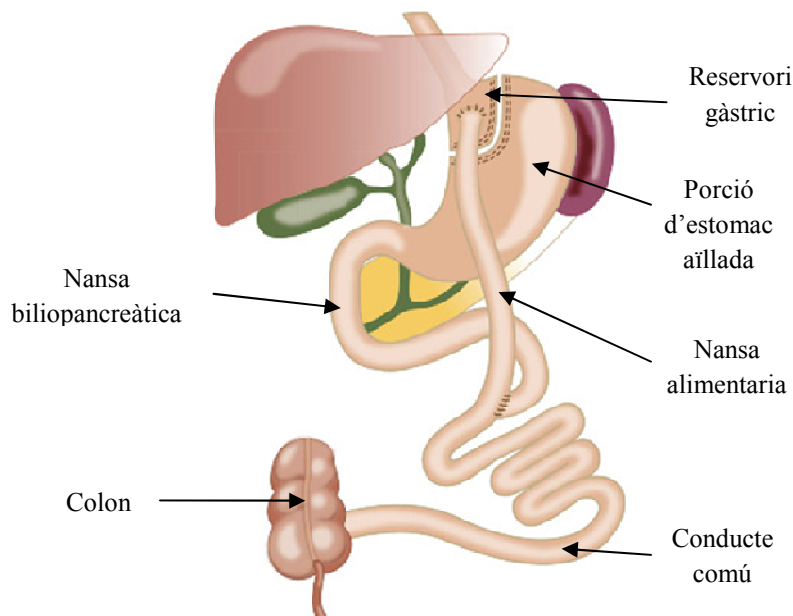


Figura 18. Esquema d'un bypass gàstric en Y-de-Roux. La longitud de les nanses biliopancreàtica i alimentària poden variar segons les necessitats del pacient. Font: www.sandiegomis.com.

Introducció

La BDP i el RYGBP es diferencien en el volum de romanent gàstric que deixen i en la longitud d'intestí que queda exposat al bolus alimentari i als sucus digestius, però tenen en comú l'exclusió del duodè i el jejú proximal. D'aquesta manera, aquests dos trams de l'intestí prim queden exclosos del contacte amb l'aliment i el bolus alimentari semidigerit arriba abans al jejú distal [126].

1.4.4.2 Mortalitat i complicacions de la cirurgia bariàtrica

La taxa de mortalitat varia entre el 0.1-0.2% per als primers 30 dies després de l'operació i del 0.1 al 4.6% després d'aquest període inicial, en funció de la tècnica emprada. Alguns factors determinants de la mortalitat són l'experiència del cirurgià i l'estat cardiorespiratori del pacient. Uns altres factors que també resulten importants són l'edat i el sexe, els homes tenen un risc major de morir que les dones durant els 30 primers dies (3.7% vs. 1.5%), diferència que es manté passat aquest període (7.5% vs. 3.75%) [224, 233].

Generalment, les complicacions de la cirurgia bariàtrica es presenten de forma inespecífica durant el període postoperatori si estan relacionades amb la cirurgia, o a llarg termini si estan relacionades amb problemes nutricionals i metabòlics.

D'entre els problemes que apareixen a curt termini (primer mes) amb més freqüència destaquen: el sagnat (es dona en el 4% dels casos), la infecció de les ferides (es dona en el 6.6% dels casos de cirurgia oberta i en el 2.9% dels casos de cirurgia per laparoscòpia), la dehiscència de sutures (es dona entre el 0.5 i el 3% dels casos), el tromboembolisme pulmonar (es dona entre el 0.4 i el 3.1% dels casos, però es pot evitar amb un tractament d'anticoagulants injectables), l'obstrucció intestinal (es dona en un 3% dels casos) i l'estenosi de l'anastomosi (es dona en menys del 6% dels casos) [228]. Els vòmits i les nàusees també apareixen durant aquest període, entre el 20% i el 33% dels casos, com a conseqüència de la reducció de la capacitat de l'estómac o com a senyal d'avís d'estenosi.

Finalment, també s'observa l'augment de la freqüència de la síndrome de *dumping* (es dona en el 50% dels casos). Es tracta d'una hipoglucèmia provocada per la hiperinsulinèmia induïda pel buidament ràpid, cap a l'intestí prim, del contingut gàstric hiperosmòtic i a mig digerir. Es pot minimitzar la seva incidència evitant aliments rics en greixos o carbohidrats [233].

A més llarg termini, a banda dels vòmits i les nàusees, apareixen problemes com ara la colelitiasi, que es dona entre el 22 i el 71% dels casos. La majoria dels càlculs són de colesterol i estan produïts per la retenció biliar [233]. Hi ha centres mèdics en els que es realitza una colecistectomia durant la cirurgia bariàtrica com a mesura profilàctica. També són freqüents els dèficits nutricionals de ferro (6-33% dels casos), vitamina B12 (30% dels casos), folats (60% dels casos) i vitamina D (10-51% dels casos) [224, 233, 234]. Aquests dèficits poden produir un hiperparatiroidisme secundari que incrementaria el recanvi ossi i disminuiria la massa òssia als 3-9 mesos de la cirurgia [235].

Introducció

1.4.4.3 Efectes de la cirurgia bariàtrica i la pèrdua de pes

La cirurgia bariàtrica està associada a la millora i/o resolució de moltes de les comorbilitats associades amb l'obesitat, incloent-hi hipertensió arterial, IR, DM, NAFLD, síndrome d'apnea obstructiva de la son, malalties cardiovasculars, artritis, la síndrome de l'ovari poliquístic, dislipèmia, hiperuricèmia i infertilitat [207].

En termes generals la cirurgia bariàtrica redueix la mortalitat dels obesos mòrbids en un 40%, si es compara amb obesos que no es sotmeten a cap tractament [224].

A nivell antropomètric, es considera que la cirurgia bariàtrica ha estat un èxit quan s'assoleixen pèrdues de l'excés de pes del 50% [236]. En l'estudi SOS (Swedish Obese Subjects Study) [237, 238], en el que es va fer el seguiment a 4047 individus obesos a 10 i 15 anys, dels quals 2010 es van sotmetre a cirurgia bariàtrica i 2037 van fer de grup control (no van seguir cap tractament per a la pèrdua de pes), al grup d'operats s'ha descrit una pèrdua de pes d'entre 20- 40 Kg i una reducció de 10 - 15 Kg/m² en el BMI als 15 anys. La tècnica quirúrgica que mostrava un percentatge de pèrdua de pes més important era el RYGB (Figura 19), fet que també s'ha observat en altres estudis [233]. En canvi, en la metanàlisi de Buchwald i col·laboradors, la tècnica que produeix un major canvi en el pes i en el percentatge d'excés de pes perdut és la BPD (-39% i -70%, respectivament) [239].

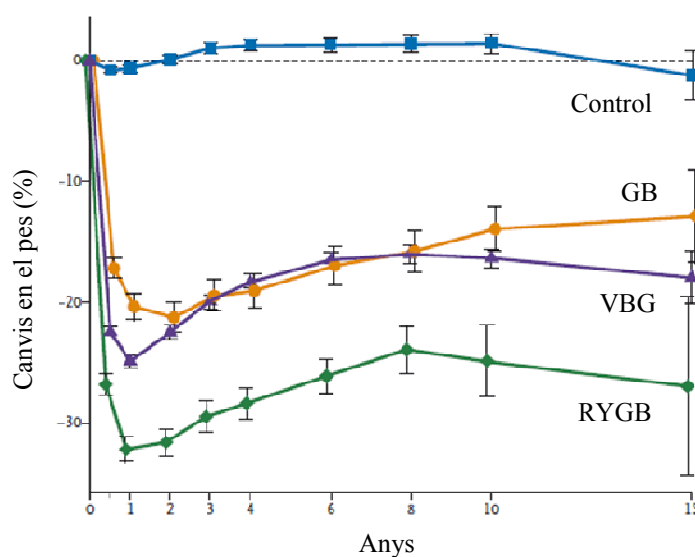


Figura 19. Mitjanes del percentatge de canvi de pes durant un seguiment de 15 anys en funció de la tècnica de cirurgia bariàtrica aplicada. El grup control no ha rebut cap tractament. GB, banda gàstrica ajustable; VBG, gastroplàstia vertical anellada; RYGB, bypass gàstric en Y-de-Roux [238].

Des del punt de vista de les diferents comorbilitats:

Pel que fa a la IR i a la DM, s'ha descrit que el 77% dels pacients aconseguixen la remissió de la malaltia fins al punt de no necessitar medicació, i un 9% més presenta millores. En funció de la tècnica quirúrgica emprada el percentatge de resolució varia, així doncs amb la BPD és del 99%, amb el RYGB del 84%, amb la VBG del 72% i amb la GB del 48% [239]. La disminució de la ingesta calòrica, la pèrdua de pes, la malabsorció de greixos i carbohidrats o l'alteració en la secreció d'hormones intestinals han estat proposats com a possibles mecanismes pels quals es produeix la millora en la

Introducció

sensibilitat a la insulina. Tanmateix, amb aquests tipus de tractament el retorn a la euglucèmia i als nivells normals d'insulina s'observen molt abans de que hagi tingut lloc una pèrdua significativa de pes [121, 239], i això fa pensar que el control de la DM després d'una cirurgia de bypass gastrointestinal és el resultat directe del redireccionament dels nutrients a través de l'intestí [124].

De la mateixa manera, les dislipèmies detectades en els pacients obesos milloren després de la cirurgia bariàtrica en més del 70% dels pacients [236], en el cas del RYGB el percentatge de recuperació és del 97% i en el de la BPD arriba fins al 99% [239]. S'observen disminucions significatives tant en TAG com en CHOL_T i LDLc, mentre que no s'observen canvis en l'HDLc [239].

En el cas del NAFLD, el bypass jejunoileal que s'utilitzava inicialment pel tractament quirúrgic de l'obesitat resultava en un augment de l'esteatosi, cirrosi i fallida hepàtica [240]. Pel que fa a les altres tècniques bariàtriques, hi ha estudis que descriuen una major millora de la malaltia en pacients als que se'ls ha fet un bypass gàstric [241], mentre que en pacients operats per BPD, els resultats beneficiosos no estan tant clars, ja que en una part dels pacients la fibrosi s'agreuja [242]. En general, s'ha descrit que pèrdues brusques de pes poden arribar a empitjorar el NAFLD, degut potser a la massiva mobilització de NEFA des de l'AT visceral, mentre que pèrdues progressives el milloren [243].

Si ens fixem en la hipertensió arterial, segons la metanàlisi de Buchwald i col·laboradors, entre el 52% i el 74% dels pacients afectats es recuperen després de la cirurgia bariàtrica, independentment del tipus de cirurgia emprat, i s'ha observat que la remissió de la malaltia es dona més freqüentment en aquells individus en el que la pèrdua d'excés de pes és major [240]. En l'estudi SOS es van obtenir resultats similars [238].

També s'observen millores en altres comorbilitats com és el cas de la síndrome d'apnea obstructiva de la son, en la que la patologia es resol en el 85.7% dels casos [239].

2. OBJECTIUS

Objectius

Donat que en el moment en el que es va començar l'estudi (2004) gairebé no hi havia estudis a Espanya que realitzessin un seguiment a llarg termini a obesos mòrbids sotmesos a cirurgia bariàtrica i que estudiessin el comportament de les comorbiditats després de la cirurgia bariàtrica ens vam plantejar el següent objectiu principal:

Realitzar un estudi en pacients sotmesos a cirurgia bariàtrica a nivell antropomètric, bioquímic i, sempre que fos possible, genètic per aprofundir en el coneixement bioquímic i molecular de l'obesitat mòrbida i de les comorbiditats (dislipèmia, DM i fetge gras) que l'acompanyen; posant especial interès en:

1. L'estudi del patró lipídic dels obesos i la seva evolució després de la cirurgia bariàtrica.
2. La possible implicació de l'LPL i l'HL en el desenvolupament de l'esteatosi hepàtica associada a l'obesitat.
3. La interrelació que existeix entre l'AT i el fetge a nivell metabòlic en aquest tipus de pacient.

3. PACIENTS, MATERIALS I MÈTODES

Pacients, Materials i Mètodes

En aquest apartat es descriu la metodologia emprada en la realització d'aquesta tesi. En primer lloc es descriu el disseny experimental (punt 3.1), els criteris de selecció de pacients (punt 3.2), el procediment quirúrgic realitzat pels cirurgians de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron (punt 3.3), el procediment per a l'obtenció de les mostres (tant de plasma com de teixits) (punt 3.4), la metodologia emprada en l'obtenció de les mesures antropomètriques i els índex i paràmetres que d'elles se'n deriven (punt 3.5), i les tècniques emprades per a la preparació d'algunes de les mostres (extracció de lípids, homogenat de teixits i aïllament de lipoproteïnes) (punt 3.6).

Pel que fa a la determinació de metabòlits i proteïnes s'ha decidit descriure dins d'aquest apartat aquelles metodologies que per la seva peculiaritat (tipus de mostra o procediment) no es realitzaven de forma rutinària a l'Hospital.

Així, en aquest apartat trobem la determinació de metabòlits plasmàtics i/o tissulars que ens permeten tenir una idea de l'estat del metabolisme en general, així com paràmetres específics del metabolisme glucídic i lipídic: TAG, NEFA, glicerol, CHOL_T, FC i EC, PL, KB, NO, apolipoproteïnes (apoAI, apoAIV i apoB), proteïnes implicades en el control de la ingesta (adiponectina, grelina i leptina), proteïnes implicades en la coagulació sanguínia (PAI1), marcadors d'inflamació (CRP), enzims (HL, HSL, LPL), etc.

Per altra banda en aquest apartat també es descriu el procediment utilitzat per a l'estudi de l'expressió gènica i la determinació de DNA total en teixit.

Aquella metodologia que forma part de la rutina hospitalària es descriu breument a l'Annex I. En aquest s'inclou: la descripció de les analítiques d'hematologia (comptatge cel·lular i hemostàsia), la descripció de les analítiques de bioquímica molt general (glucèmia, insulina, transaminases, etc.) i la descripció de les tincions histològiques emprades per a la determinació del grau d'esteatosi.

3.1 Disseny experimental

L'estudi s'ha dut a terme en un grup de 34 pacients (24 dones i 10 homes) amb obesitat mòrbida que complien amb els criteris de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron per ser sotmesos a cirurgia bariàtrica.

L'estudi consisteix en el seguiment d'aquests pacients des d'un mes abans de l'operació fins a un any després d'aquesta. Es van prendre mostres de plasma així com mesures antropomètriques 1 més abans de l'operació. Durant l'operació es van obtenir diversos teixits (AT subcutani i visceral, fetge) per dur a terme les posteriors valoracions. En aquest treball ens referirem a aquestes mostres com a punt "obès" o "Ob".

Durant l'any posterior a l'operació es van obtenir mostres de plasma i mesures antropomètriques a 1, 3, 6, 9 i 12 mesos postoperació, mostres d'AT subcutani a 6 i 12 mesos i mostres de fetge a 12 mesos (només en aquells casos en que estava justificat). En aquest treball ens referirem a aquestes mostres utilitzant el número de mes que correspongui i una "M" (1M, 3M, 6M, 9M i 12M, respectivament).

Pacients, Materials i Mètodes

Tot el procés d'obtenció de mostres queda resumit a la Figura 20.

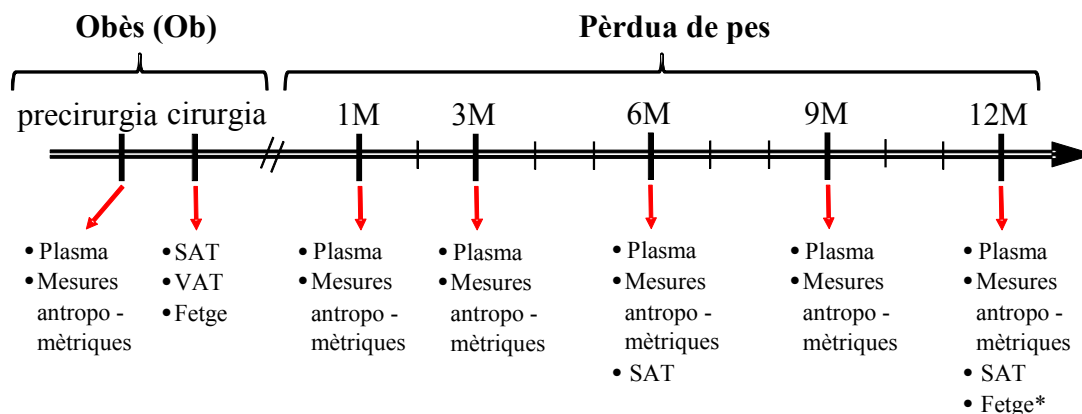


Figura 20. Línia de temps per l'obtenció de les mostres. SAT, teixit adipós blanc subcutani; VAT, teixit adipós blanc visceral. *Les mostres de fetge als 12 mesos només es van obtenir en aquells casos en els que l'hepatòleg considerava necessària la realització d'una biòpsia.

3.2 Selecció de pacients

Els pacients havien de tenir una edat compresa entre els 20 i els 65 anys, un BMI superior a 40 kg/m^2 , obesitat mòrbida establerta durant els 5 anys anteriors a l'operació i un pes estable durant els 3 mesos previs a l'inici de l'estudi. A més a més, havien hagut de patir fracassos continuats amb tractaments de pèrdua de pes més conservadors (dieta, modificacions en l'estil de vida, etc.).

A tots els pacients, prèviament a entrar a formar part de l'estudi, se'ls realitzava una ecografia i un trànsit gastroduodenal per descartar litiasi biliar o hèrnia de hiat, es realitzava un electroencefalograma, una radiografia de tòrax i proves funcionals respiratòries. També es duia a terme un estudi psiquiàtric i psicològic (nivell d'intel·ligència, afectivitat, autoestima, etc.).

En cas que els pacients seguissin algun tipus de tractament hipoglucemiant o hipolipemiant, aquest es va interrompre com a mínim 72 hores abans de la intervenció.

Els criteris d'exclusió dels pacients han estat:

- Indicis d'abús d'alcohol o drogues.
- Patir alguna alteració psiquiàtrica major (esquizofrènia, psicosi, etc.), retràs mental o trastorns del comportament alimentari tipus bulímia nerviosa.
- Patir malaltia neoplàsica.
- Patir algun trastorn endocrí (hiper- o hipotiroïdisme, síndrome de Cushing, etc.), tret dels derivats de la mateixa obesitat.
- Patir alguna malaltia renal, cardíaca o hepàtica (tret de les derivades de la mateixa obesitat).
- Patir alguna malaltia sistèmica (hepatitis vírica, SIDA, etc.).
- Valoració anestèsica desfavorable.

Els pacients havien de tenir la capacitat per comprendre els mecanismes pels quals es perd pes mitjançant una operació d'aquest tipus, i havien d'entendre que no sempre

Pacients, Materials i Mètodes

s'obtenen els resultats esperats. Finalment, s'havien de comprometre a adherir-se a les normes de seguiment postoperatòries.

Es van seleccionar 20 individus del Banc de Sang (10 homes i 10 dones) d'edats similars als obesos com a grup control per a les valoracions plasmàtiques. Posteriorment, es van prendre mostres de 10 pacients amb normopès sotmesos a una colecistectomia o una intervenció d'hèrnia de hiatal, i sense cap altra tipus de malaltia com a grup control per a les valoracions tissulars.

L'estudi va ser acceptat pel comitè ètic de l'Hospital de la Vall d'Hebron i tots els pacients van donar el seu consentiment informat per participar-hi.

3.3 Procediment quirúrgic

3.3.1 Bypass gàstric

La intervenció que es va dur a terme va ser un RYGBP (Figura 21), també coneguda amb el nom d'intervenció Fobi-Capella [244, 245]. Es tracta d'una tècnica mixta que barreja la gastroplàstia vertical descrita per Mason i Ito [246], amb el bypass gàstric vertical descrit per Torres i Oca [247]. Avui en dia, aquesta tècnica es realitza per laparoscòpia, però en el moment en el que es va dur a terme aquest estudi es realitzava per laparotomia (cirurgia oberta).

La tècnica, principalment restrictiva però també malabsortiva, consisteix en la creació d'un petit **reservori gàstric** a partir de la curvatura menor gàstrica, que deixa aïllada la resta de l'estómac. La reconstrucció del trànsit es realitza mitjançant una nansa de jejú en Y-de-Roux, és a dir, primer es talla l'intestí prim a uns 30-50 cm del lligament de Treitz, la part proximal d'aquest es tanca mentre que la part distal s'anastomosa al reservori gàstric formant el **conducte alimentari**. Finalment, per connectar el **conducte biliopancreàtic**, es realitza una incisió a la part proximal de l'intestí prim i una altra al peu del conducte alimentari, a una distància entre 50 i 150 cm de l'intestí gruixut, i s'uneixen. A partir d'aquest punt es forma el **conducte comú** per on passaran tant les secrecions biliopancreàtiques com el contingut gàstric.

Un dels segments superiors de la Y, el conducte alimentari, és pel que passen els aliments i la saliva des del reservori gàstric fins a l'inici del conducte comú. El segon segment superior de la Y correspon al conducte biliopancreàtic, format pel segment "derivat" en el que els aliments no entren en contacte amb la mucosa digestiva ni amb les secrecions biliopancreàtiques, de manera que es provoca malabsorció, sobretot dels greixos.

Pacients, Materials i Mètodes

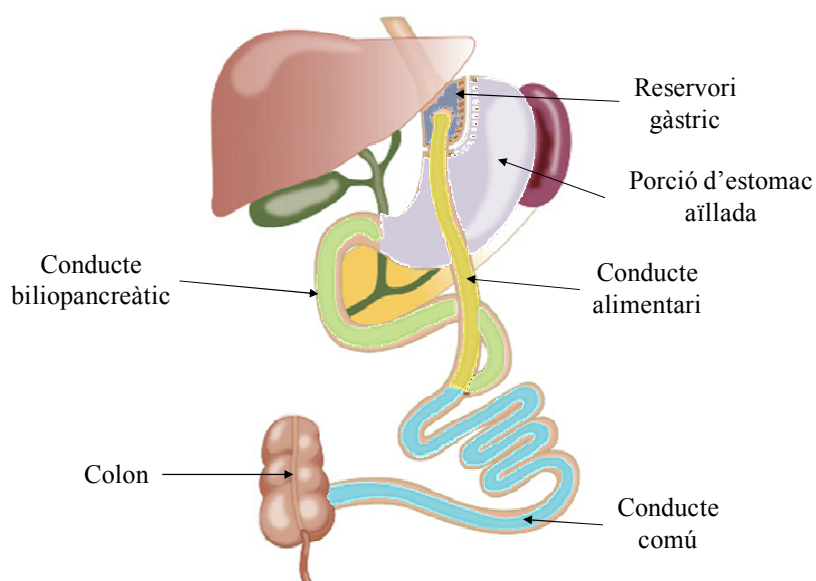


Figura 21. Representació esquemàtica d'un RYGBP. Cada color correspon a un segment diferent del tracte digestiu.

No existeix una tècnica estàndard pel bypass però en general s'accepten els següents punts:

- El reservori gàstric ha de tenir entre 15 i 30 mL de capacitat, per afavorir la sacietat precoç, reduir la producció local d'àcid i minimitzar la possibilitat de dilatació amb el temps.
- La formació de l'Y-de-Roux ha de prevenir el reflux biliar.
- La distància a la que es realitza la unió del conducte biliopancreàtic amb l'íleon s'ha d'adaptar al grau d'obesitat. En el cas dels nostres individus, es va fer a uns 100-150 cm de l'angle de Treitz.

El procediment anestèsic utilitzat està estandarditzat per aquest tipus de cirurgia (escandicaina a l'1%).

Un cop acabada l'operació es va realitzar una profilaxis amb antibiòtic (cefexitina) per evitar infeccions, 40 mg d'enoxaparina (heparina de baix pes molecular) per evitar tromboembolismes i ranitidina (antiàcid) per evitar úlceres.

En el cas de l'heparina, el tractament es va continuar cada 12 hores durant els primers quinze dies després de la intervenció i posteriorment una sola dosi de 60 mg durant quinze dies més.

3.3.2 Dieta

Entre una setmana i un mes abans de la cirurgia (en funció de l'individu i sempre sota criteris mèdics), els pacients van ser sotmesos a una **dieta isocalòrica** calculada en base als requeriments individuals. La dieta estava formada per un 50% d'hidrats de carboni, un 20% de proteïnes i un 30% de lípids.

Pacients, Materials i Mètodes

Un cop duta a terme l'operació, els pacients es van sotmetre a una dieta estricta. Durant el primer mes postintervenció, els pacients van haver de prendre una **dieta líquida**, ja que el reservori gàstric encara està edematós i és necessari donar-li temps per que cicatritzi i es desinflami. La dieta líquida consta bàsicament d'aigua, suc, infusions, brou, etc., complementada amb uns preparats nutritius. Aquesta dieta consta de 810 Kcal de les quals aproximadament el 45% prové d'hidrats de carboni, el 33% de les proteïnes i el 22% dels lípids. Passat un mes de l'operació els pacients passen a ingerir una **dieta tova** en la que s'afegeixen a la dieta líquida aliments sòlids bullits en petites quantitats i ben mastegats. Aquesta dieta aporta 839 Kcal de les quals el 44% prové dels hidrats de carboni, el 38% de les proteïnes i el 18% dels lípids. Passats dos mesos, passen a ingerir una **dieta triturada** amb 844.5 Kcal de les quals el 41% prové dels hidrats de carboni, el 31% de les proteïnes i el 28% dels lípids. Finalment, després de 3 mesos de la intervenció els pacients passen a una **dieta estàndard de manteniment** de 825 Kcal, de les quals el 44% prové dels hidrats de carboni, el 34% de les proteïnes i el 22% dels lípids.

3.4 Obtenció de mostres

3.4.1 Plasmes:

Les mostres de sang es van obtenir en dejuni, entre les 8 i les 10 hores del matí. Es van extraure de la vena antecubital en dos tipus de tubs diferents: uns heparinitzats per a la realització d'estudis enzimàtics i uns altres amb citrat 3.8% en una proporció 9:1 per estudis d'hemostàsia. Es va separar el plasma immediatament per centrifugació a 450 xg, durant 30 minuts a 4°C, es van fraccionar les mostres i es van congelar a -80°C fins al seu processament.

En el cas dels controls només es va obtenir una mostra en tubs heparinitzats.

3.4.2 Teixits

Es van recollir mostres de teixits el dia de l'operació, i 6 i 12 mesos després d'aquesta (Figura 20).

Durant l'operació es van recollir les següents mostres de teixit:

- Dues biòpsies de fetge, l'una es va congelar immediatament en nitrogen líquid i l'altra, que es va processar a l'Hospital, es va fixar en formaldehid al 10% (v/v), per a l'estudi histològic que determinaria l'esteatosi hepàtica.
- Una biòpsia d'AT visceral.
- Una biòpsia d'AT subcutani.

Totes les biòpsies van ser congelades immediatament en nitrogen líquid.

Als 6 i 12 mesos de l'operació es va recollir una nova biòpsia d'AT subcutani de la zona abdominal, que es congelava immediatament en nitrogen líquid. Per obtenir la biòpsia es va administrar anestèsia local subcutània (escandicaïna a l'1%).

A l'any de la intervenció es va recollir dues noves biòpsies hepàtiques mitjançant una punció percutània amb una agulla Hepafix. Totes les biòpsies eren d'almenys 2 cm

Pacients, Materials i Mètodes

de llargada i tenien com a mínim 8 tractes portals. Una de les biòpsies es congelava immediatament en nitrogen líquid i l'altra es fixava en formaldehid al 10% (v/v) per a la posterior anàlisi histològica.

Les mostres que es van congelar en nitrogen líquid es van conservar a -80°C fins a la seva utilització.

En el cas dels individus del grup control, es van obtenir biòpsies d'AT durant una intervenció de colecistectomia o d'hèrnia de hiat. També es va obtenir una mostra de fetge control a partir de biòpsies hepàtiques per estudi d'hepatitis que resultaren falsos positius.

3.5 Obtenció de mesures antropomètriques

La realització de mesures antropomètriques en pacients amb obesitat mòrbida és imprescindible per poder establir el seu grau d'obesitat.

3.5.1 Pes, alçada, índex de massa corporal i excés de pes

La determinació del **pes** es va realitzar amb una balança. Els pacients es van pesar amb roba interior i descalços.

La determinació de l'**alçada** es va realitzar amb un estadiòmetre. El pacient es col·locava sobre una superfície plana, descalços, amb els talons junts i el cap en el pla horitzontal de Frankfort (posició anatòmica estàndard del crani humà).

Un cop es tenen aquests dos paràmetres es pot calcular el **BMI** amb la fórmula de Quetelet [3], que permet classificar el grau d'obesitat dels pacients (Taula 1):

$$BMI = \text{pes} / \text{alçada}^2 \text{ (Kg/m}^2\text{)}$$

Pel que fa a la determinació de l'**excés de pes**, es va calcular a partir de la diferència entre el pes de l'individu i el pes teòric que hauria de tenir segons les taules de la Metropolitan Life Insurance Company [248]. Les dades d'aquestes taules han estat obtingudes a partir d'uns 4 milions d'individus dels E.E.U.U. i Canadà. Les taules proporcionen el pes "ideal" per a una alçada determinada en funció del sexe i de tres morfologies de cos establertes en funció de l'amplada del colze [249].

3.5.2 Perímetre de cintura, de maluc i índex cintura-maluc

El **perímetre de la cintura** és un indicador d'adipositat visceral (fonamentalment greix mesentèric i dels epiplons). Es va mesurar amb una cinta mètrica col·locada a l'alçada del punt mig entre l'última costella i la cresta ilíaca, al final d'una exhalació normal, amb el pacient de peu.

El **perímetre del maluc** reflecteix la quantitat de greix dipositada en aquesta regió, la major part del qual és subcutani. Es va mesurar amb una cinta mètrica col·locada a la circumferència més ampla del maluc, a l'alçada del trocànter major del fèmur [250].

Pacients, Materials i Mètodes

El **WHR** és un indicador del patró de distribució del greix subcutani i es mesura dividint el perímetre de la cintura entre el perímetre del maluc. Es considera que per les dones un índex inferior a 0.9 és saludable, mentre que pels homes ha de ser inferior a 1 [22].

3.5.3 Estimació del percentatge de greix

Per estimar el **percentatge de greix corporal** s'ha utilitzat la fórmula proposada per Deuremberg i col·laboradors [32], que utilitza els paràmetres de l'edat, el sexe i el BMI.

$$\% \text{ greix corporal} = (1.2 \times \text{BMI}) + (0.23 \times \text{edat}) - (10.8 \times \text{sexe}) - 5.4$$

En la fórmula, on posa *sexe* s'ha de substituir per 1 en el cas dels homes o per 0 en el cas de les dones; el BMI s'ha de posar en Kg/m² i l'edat en anys.

3.5.4 Estimació de l'àrea de greix

Per obtenir les àrees estimades de greix subcutani (AT subcutani), greix visceral (AT visceral) i greix total (AT total) s'ha utilitzat les equacions proposades per Bonora i col·laboradors [34], que utilitzen el BMI, l'edat i els perímetres de cintura i maluc.

$$\text{àrea AT subcutani homes} = -621 + (9.37 \times \text{BMI}) + (5.51 \times \text{maluc}) \text{ (cm}^2\text{)}$$

$$\text{àrea AT subcutani dones} = -332.9 + (24.5 \times \text{BMI}) + (2.26 \times \text{edat}) \text{ (cm}^2\text{)}$$

$$\text{àrea AT visceral homes} = -453.7 + (6.37 \times \text{cintura}) \text{ (cm}^2\text{)}$$

$$\text{àrea AT visceral dones} = -370.5 + (4.04 \times \text{cintura}) + (2.26 \times \text{edat}) \text{ (cm}^2\text{)}$$

$$\text{àrea AT total} = \text{àrea AT subcutani} + \text{àrea AT visceral}$$

A les fórmules, el BMI s'ha de posar en Kg/m², l'edat en anys i les mesures de cintura i maluc en cm.

3.5.5 Estimació dels kilograms de greix

Per fer l'estimació dels kilograms de greix total, subcutani i visceral es van utilitzar les dades obtingudes als apartats 3.5.3 i 3.5.4:

$$\text{greix total} = (\% \text{ greix total} \times \text{Kg pes})/100 \text{ (Kg)}$$

$$\text{greix subcutani} = \text{Kg greix total} \times (\text{cm}^2 \text{ greix subcutani} / \text{cm}^2 \text{ greix total}) \text{ (Kg)}$$

$$\text{greix visceral} = \text{Kg greix total} + \text{Kg greix subcutani} \text{ (Kg)}$$

On el % de greix total s'ha obtingut a partir de l'equació de Deurenberg i col·laboradors [32] i les àrees de greix subcutani i total a partir de les equacions de Bonora i col·laboradors [34].

3.6 Tractaments previs de les mostres

3.6.1 Extracció de lípids

Fonament

Per dur a terme l'extracció de lípids es va fer servir una modificació [251] del mètode descrit per Hara i Radin [252]. Els lípids presents a la mostra (tros de teixit), mitjançant una barreja de dissolvents orgànics de baixa toxicitat (hexà i isopropanol) s'extrauen de les mostres de teixit. Tot seguit, se separen de la resta de components hidrosolubles mitjançant l'ús d'una solució aquosa de sulfat de sodi. Un cop s'evaporen els dissolvents orgànics, s'obté un extracte de lípids sec.

Reactius

- Barreja d'extracció
 - Hexà:Isopropanol (3:2; v/v) (tots dos de Panreac)
- Sulfat de sodi 0.47 M (Merck)
- Tampó d'emulsió, pH 7.5
 - PIPES 28.88 mM (Sigma)
 - $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 57.76 mM (Sigma)
 - Albúmina lliure d'àcids grassos 0.6 mg/mL (Sigma)
 - Dodecil sulfat sòdic (SDS) 10% (p/v) (Sigma)

Procediment

En el cas dels AT es van pesar uns 40 mg de teixit i en el cas dels fetges es van pesar uns 30 mg de teixit, es van posar en tubs de vidre Pyrex amb tap de tefló i es va afegir 1 mL de la barreja d'extracció. Després d'una incubació durant tota la nit en un agitador orbital vertical, es van afegir 300 μL de sulfat de sodi i es va vortejar enèrgicament. Tot seguit, es va centrifugar a 400 xg durant 10 minuts a 15°C. Es van pesar els tubs (buits) destinats a recollir la fase superior de l'extracció (pes inicial) i s'hi va pipetejar la totalitat de la fase superior de l'extracció, on es troben els lípids dissolts en hexà. A continuació, es va assecar l'extracte amb N_2 gas i es van tornar a pesar els tubs (pes final).

Per poder dur a terme les valoracions, es van resuspendre les extraccions de lípids d'AT en 40 mL de tampó d'emulsió i les de fetge en 2 mL de tampó d'emulsió. Per aconseguir una emulsió ben feta, immediatament després de resuspendre les extraccions, es van sonicar una vegada durant 30 segons i es va deixar agitant-se durant tota la nit en un agitador orbital vertical. A l'endemà, es va fer una nova sonicació d'un minut. Abans de procedir a l'anàlisi de les mostres cal comprovar que l'emulsió s'ha fet correctament, és a dir, que no hi ha gotes refringents.

Càlculs

Per obtenir el % de lípids al teixit cal tenir en compte el pes del tub abans i després d'assecar l'extracte de lípids i el pes del teixit. Per calcular-ho cal aplicar la següent fórmula:

Pacients, Materials i Mètodes

$$\% \text{ lípids} = \frac{\text{pes final (g)} - \text{pes inicial(g)}}{\text{pes teixit (g)}} \times 100$$

Un cop valorats els diferents metabòlits cal aplicar la següent fórmula per expressar els resultats en mmol/g teixit:

$$\text{AT: } \frac{\text{mmol}}{\text{g teixit}} = \frac{\text{mmol}}{\text{L resuspès}} \times \frac{0.04 \text{ L resuspès}}{\text{g teixit}}$$

$$\text{fetge: } \frac{\text{mmol}}{\text{g teixit}} = \frac{\text{mmol}}{\text{L resuspès}} \times \frac{0.002 \text{ L resuspès}}{\text{g teixit}}$$

3.6.2 Homogenat de teixits

Fonament del mètode

Per a l'homogeneïtzació dels teixits s'ha utilitzat un disruptor de tipus politró (Ultra-Turrax T25, IKA-labortechnik; Staufen, Alemanya), el qual disgrega els teixits de forma mecànica gràcies a les ganivetes de les que disposa i trenca les cèl·lules gràcies a que és capaç d'emetre ultrasons.

Reactius

- Tampó EDH amb heparina, pH 7.5
 - Ditiotretol (DTT) 1 mM (Sigma)
 - Àcid etilen-diamino-tetraacètic (EDTA) 1 mM (Panreac)
 - HEPES 10 mM (Roche Diagnostics)
 - Heparina 5U/mL (USB)
- Tampó EDH sense heparina, pH 7.5
 - DTT 1 mM (Sigma)
 - EDTA 1 mM (Panreac)
 - HEPES 10 mM (Roche Diagnostics)

Procediment

Els homogenats es van preparar en tampó EDH amb heparina o EDH sense heparina segons la valoració que es volgués dur a terme:

- **EDH amb heparina** en els homogenats d'AT per a la valoració d'activitat LPL i la determinació de la resta de metabòlits, i en els homogenats de fetge per a la valoració d'activitat LPL i HL i la determinació de la resta de metabòlits.
- **EDH sense heparina:** en els homogenats d'AT per a la valoració d'activitat HSL.

La relació entre el pes del teixit (expressat en grams) i el volum de tampó (expressat en mL) va variar en funció del teixit:

Pacients, Materials i Mètodes

- En el cas de les mostres d'AT, tant subcutani com visceral, es van pesar uns 50 mg de teixit i es van homogeneïtzar en 1 mL de tampó EDH amb o sense heparina (dilució 1/20), segons el que convingués.
- En el cas de les mostres de fetge, les que pertanyien al moment de l'operació es van pesar uns 50 mg i es van homogeneïtzar en 500 µL de tampó EDH amb heparina (dilució 1/10). Les mostres d'un any es van pesar uns 10 mg i es van homogeneïtzar en 200 µL de tampó EDH amb heparina (dilució 1/20).

Després de pesar les mostres en tubs de 3 mL, es va procedir a l'homogeneïtzació amb el polítró a la màxima potència (24000 min⁻¹). Es va fer en tres tandes de 5 segons, fent una pausa de 15 segons entre cadascuna d'elles i sempre mantenint el tub en gel. Tot seguit, es va transferir el contingut d'aquests tubs a tubs nous i es va centrifugar a 16000 *xg*, durant 4 minuts a 4°C. A continuació es van recollir els sobrenedants en alíquotes i es van congelar per la seva posterior anàlisi.

NOTA: en el cas de les mostres d'AT, i en algunes de fetge abans de poder recollir el sobrenedant va ser necessari retirar la capa de greix que es formava per sobre, amb l'ajut d'un bastonet amb cotons als extrems.

Càlculs

Un cop valorats els diferents metabòlits cal aplicar la següent fórmula per expressar els resultats en mmol/g teixit:

$$AT \text{ i fetge: } \frac{\text{mmol}}{\text{g teixit}} = \frac{\text{mmol}}{\text{L homogenat}} \times \frac{1\text{L}}{10^3\text{mL}} \times \frac{\text{mL homogenat} + \text{g teixit}}{\text{g teixit}}$$

3.6.3 Aïllament de lipoproteïnes

Fonament del mètode

Els lípids són molècules apolars (hidrofòbiques) i per això el seu transport per l'organisme, un medi aquós, requereix d'un mecanisme de transport especial: les lipoproteïnes. Les lipoproteïnes són unes estructures amb un interior hidrofòbic format per TAG i EC, i una superfície hidrofílica formada per molècules amfipàtiques com colesterol (CHOL), PL i proteïnes.

El mètode emprat per a l'aïllament de les lipoproteïnes circulants, posat al punt en el nostre grup per a mostres de mida reduïda [253], es basa en l'aprofitament de les seves propietats diferencials de densitat per ultracentrifugació seqüencial. Les lipoproteïnes es classifiquen en cinc tipus segons la seva densitat relativa (Taula 5):

Pacients, Materials i Mètodes

| | QM | VLDL | IDL | LDL | HDL |
|--|-------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| Pes molecular $\times 10^{-6}$ | >400 | 10 - 80 | 5 - 10 | 2.3 | 0.18 - 0.36 |
| Densitat (g/cm^{-3}) | <0.95 | 0.95 - 1.006 | 1.006 - 1.019 | 1.019 - 1.063 | 1.063 - 1.210 |
| Composició química (%) | | | | | |
| Proteïnes | 2 | 8 | 15 | 22 | 40 - 55 |
| Triacilglicerols | 86 | 55 | 31 | 6 | 4 |
| Colesterol lliure | 2 | 7 | 7 | 8 | 4 |
| Èsters de colesterol | 3 | 12 | 23 | 42 | 12 - 20 |
| Fosfolípids | 7 | 18 | 22 | 22 | 25 - 30 |

Taula 5. Característiques de les lipoproteïnes humanes. Adaptat del llibre Bioquímica de Van Holde M. [254]).

Mitjançant l'addició de KBr a la mostra s'incrementa la densitat d'aquesta, de manera que al centrifugar a una velocitat elevada durant períodes de temps llargs, els elements amb menor densitat floten i es poden recollir amb relativa facilitat. Amb passos successius de centrifugació i una densitat del medi creixent es poden aïllar les diferents fraccions de lipoproteïnes.

Reactius

- 25 mL de les solucions de NaBr, segons la Taula 6. En tots els casos es va afegir EDTA a una concentració final de 0.05% (p/v).

| Densitat (g/mL) | g NaBr |
|-----------------------------------|--------|
| 1.006 | 0.225 |
| 1.040 | 1.431 |
| 1.063 | 1.463 |
| 2,210 | 7.085 |
| 1.400 | 13.573 |

Taula 6. Taula de densitats de NaBr per l'aïllament de lipoproteïnes humanes.

Donat que el NaBr és una sal molt higroscòpica, la densitat es va verificar i corregir en cas de ser necessari afegint aigua destil·lada o la sal sòlida.

Procediment

- **Preparació de les VLDL:** es van pipetejar 400 μL de plasma en un tub de policarbonat de 3 mL i s'hi van afegir 1100 μL de la solució de NaBr de densitat 1.006 g/mL . Es van centrifugar les mostres durant 2 hores a 4°C a 33600 xg utilitzant una acceleració "9-brake" i el programa 5 de la ultracentrífuga RC-M120EX, amb el rotor d'angle fix RP100-AT4 (ambdós de Sorvall Instruments, Buckinghamshire, Anglaterra). Un cop acabada la centrifugació es van recollir els 800 μL de la fracció superior corresponents a les VLDL, i es va mesurar el seu volum (VLDL).
- **Preparació de les LDL:** la fracció inferior obtinguda en el pas anterior es va transferir a un nou tub i es va calcular el volum per pes. Tot seguit es va ajustar

Pacients, Materials i Mètodes

la densitat a 1.04 g/mL amb la solució de NaBr de 1.4 g/mL segons la següent fórmula:

$$V_{NaBr\ 1.4} = V_{bf}(d - d_{bf})/(1.4 - d)$$

On $V_{NaBr\ 1.4}$ és el volum que s'ha d'afegir de la solució de NaBr 1.4 g/mL per augmentar la densitat inicial de la fracció inferior (d_{bf}) fins a la densitat del següent pas de centrifugació (d), que en aquest cas és 1.04 g/mL. V_{bf} és el volum de la fracció inferior mesurat.

A continuació, es va enrasar el volum fins a 1.5 mL amb la solució de NaBr de 1.04 g/mL i es va fer una nova centrifugació durant 2.5 h a 4°C a 336000 xg. Un cop acabada la centrifugació es van recollir els 300 µL superiors de sobrenedant corresponents a la fracció d'LDL. Es va recollir la fase superior corresponent a la fracció d'LDL i es va mesurar el seu volum (V_{LDL}).

- **Preparació de les HDL:** es van agafar 700 µL de la fracció inferior obtinguda en el pas anterior i es van transferir a un nou tub. Es va ajustar la densitat a 1.21 g/mL tal i com s'ha descrit anteriorment i es va acabar ajustant el volum a 1.5 mL amb la solució de NaBr d'1.21 g/mL. Es va fer una darrera centrifugació durant 3 h a 4°C a 336000 xg. Un cop acabada la centrifugació es van recollir 400 µL la fracció superior corresponents a la fracció d'HDL i es va mesurar el seu volum (V_{HDL}). Finalment, el volum restant corresponent a la fracció sense lipoproteïnes també es va passar a un nou tub.
- Totes les fraccions es van guardar a -20°C fins a la seva anàlisi.

Càlculs

A l'hora de mesurar els diferents paràmetres s'obté la concentració en cada fracció. La dada que ens interessa és la quantitat de metabòlit corresponent a cada fracció lipoproteica en relació al plasma. Així doncs, els càlculs que s'han d'aplicar són els següents:

$$\frac{mmol}{mL\ plasma} V_{LDL} = \frac{mmol\ x}{L\ fracció\ V_{LDL}} \times \frac{1L}{10^3ml} \times \frac{V_{V_{LDL}}(mL)}{0.4\ mL\ plasma}$$

$$\frac{mmol}{mL\ plasma} LDL = \frac{mmol\ x}{L\ fracció\ LDL} \times \frac{1L}{10^3ml} \times \frac{V_{LDL}}{0.4\ mL\ plasma}$$

$$\frac{mmol}{mL\ plasma} HDL = \frac{mmol\ x}{L\ fracció\ HDL} \times \frac{1L}{10^3ml} \times \frac{V_{HDL}}{0.7\ mL} \times \frac{1.5 - V_{LDL}}{0.4\ mL\ plasma}$$

3.6.4 Observació de lipoproteïnes per microscopia electrònica

Fonament del mètode

Per a l'observació de les lipoproteïnes per microscopia electrònica s'ha emprat el mètode de la tinció negativa segons els procediment de la gota [255].

Pacients, Materials i Mètodes

Aquest mètode es basa en aplicar una capa homogènia d'un metall pesat per sobre de la mostra de manera que després d'un assecament l'estructura a observar apareix en negatiu (clar sobre fons) en la imatge del microscopi.

Les observacions es van dur a terme a la Unitat de Crio-Microscòpia dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona.

Reactius

- Reixetes de coure recobertes amb membranes de carbó
- Aigua bidestil·lada
- Acetat d'uranil 1%

Procediment

Es va posar una gota (5-20 μL) de la mostra obtinguda a l'apartat 3.6.3 a una concentració entre 0.1 i 1 mg/mL de proteïna sobre un tros de parafilm. Després de carregar la reixeta durant 5 minuts amb llum ultraviolada, es va col·locar sobre la superfície de la gota una reixeta de coure d'entre 200 i 400 *mesh* recoberta amb carbó (el carbó ha de quedar en contacte amb la mostra) i es va deixar adsorbir la mostra durant 1 minut. Amb l'activació de la reixeta s'aconsegueix que la mostra es reparteixi millor per la reixeta.

A continuació, es van fer 3 rentats de les reixetes durant 1 minut amb aigua bidestil·lada. S'ha d'evitar que la reixeta s'assequi. Un cop finalitzats els rentats es van posar 50 μL d'acetat d'uranil a l'1% i es va incubar entre 30 i 90 segons.

Després d'assecar l'excés d'agent de tinció amb un paper de filtre des del lateral de la reixeta, es deixa que s'assequi completament la preparació durant un mínim de 2 hores.

Finalment les mostres es van observar al microscopi electrònic de transmissió Jeol JEM 1010 dels Centres Científics i Tecnològics de la UB.

3.7 Determinació de metabòlits

3.7.1 Àcids grassos no esterificats

Fonament

Per a la determinació dels NEFA s'ha utilitzat un mètode enzimàtic colorimètric basat en el mètode descrit per Shimizu i col·laboradors [256]. Els NEFA presents a la mostra, per acció de l'acil-CoA sintetasa, es transformen en els seus respectius acil-CoA en una reacció dependent d'ATP. Els acil-CoA produïts, per acció de l'acil-CoA oxidasa, s'oxiden als seus respectius enoil-CoA, generant en la mateixa reacció peròxid d'hidrogen. Aquest peròxid, gràcies a l'acció de la peroxidasa, reacciona amb el reactiu de Trinder i es genera un producte (quinonaimina) amb un màxim d'absorbància 550 nm. La concentració d'aquest producte és proporcional al contingut de NEFA de la mostra.

Els **valors de referència** de l'Hospital per a aquest paràmetre són de 2.8 a 12.7 mg/dL en dones i de 2.8 a 16.9 mg/dL en homes.

Pacients, Materials i Mètodes

Reactius

- Kit NEFA F.S. (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim; Alemanya). Components del kit:
 - Reactiu R1: conté tampó de Good a pH 7, coenzim A, ATP, l'enzim acil-CoA sintetasa, MgCl₂ i component d'acoblament de Trinder.
 - Reactiu R2: conté tampó de Good a pH 7, els enzims acil-CoA oxidasa i peroxidasa i component d'acoblament de Trinder.
- Solució mare de NEFA 1 mM (DiaSys Diagnostic Systems GmbH; Holzheim, Alemanya).
- Control intern: TrulabL (DiaSys Diagnostic Systems GmbH; Holzheim, Alemanya).
- Kit NEFA C (Wako Chemicals; Neuss, Alemanya). Components del kit:
 - Reactiu A: conté MgCl₂, ATP, coenzim A, 4-aminoantipirina i l'enzim acil-CoA sintetasa.
 - Reactiu B: conté anilina i els enzims acil-CoA oxidasa i peroxidasa.
- Solució mare d'àcid oleic 1mM.

Procediment

Preparació de mostres

Plasma: les mostres es poden fer servir directament sense diluir.

Teixits: tant pels AT com pel fetge, després de fer una extracció de lípids tal i com s'indica a l'apartat 3.6.1, es van carregar sense diluir.

Anàlisi de mostres

Plasma: es van processar amb el kit de DiaSys en l'autoanalitzador Metrolab 2300 (RAL, Sant Joan Despí, Espanya; d'ara endavant Metrolab 2300). L'aparell utilitza 5 µL de mostra, als que afegeix 250 µL de Reactiu 1 i, passats 3 minuts, afegeix 60 µL de Reactiu 2. Després d'una incubació de 10 minuts realitza una lectura de punt-final bicromàtica a 546/600 nm.

Teixits: es van processar amb el kit de Wako en plaques de 96 pouets.

- Es va preparar la patró a partir de la solució mare d'àcid oleic 1 mM fent un banc de dilucions en aigua destil·lada a les següents concentracions: 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 i 1 mM.
- Es van resuspendre els reactius A i B amb les solucions A i B, segons les instruccions del kit.
- Es van aplicar 5 µL de patró per triplicat, 5 µL del control intern diluït 1/3 per duplicat o 5 µL de mostra per duplicat. Seguidament, es van afegir 75 µL de reactiu A a cada pou i es va incubar la placa, protegida de la llum, durant 10 minuts a 37°C amb agitació suau. Després, es van afegir 150 µL de reactiu B i es va incubar la placa de nou, protegida de la llum, durant 10 minuts a 37°C amb agitació suau. Transcorregut aquest temps, es va llegir l'absorbància de la

Pacients, Materials i Mètodes

placa a 550 nm mitjançant el lector espectrofotomètric de plaques (Sunrise, Tecan; Salzburg, Àustria), d'ara en endavant lector Tecan Sunrise.

Càlculs

En el cas del plasma, l'aparell dona els resultats directament en mM. Per expressar-los en mg/dL cal dividir-los entre 0.0354.

En el cas dels teixits, es va determinar la concentració de NEFA de les mostres interpolant el valor d'absorbància de cada mostra a la recta patró. Finalment, per expressar els resultats en mmol NEFA/g teixit, cal aplicar la fórmula descrita a l'apartat 3.6.1.

NOTA: un mol de NEFA equival a 274 g de NEFA.

3.7.2 Colesterol total

Fonament del mètode

Per a la determinació del colesterol total (CHOL_T) s'ha utilitzat un mètode enzimàtic colorimètric basat en el descrit per Allain i col·laboradors [257]. L'EC present a la mostra, per acció de la colesterol esterasa, es transforma en àcids grassos i FC, el qual passa a colesterol-3-ona per acció de la colesterol oxidasa, reacció en la que té lloc la formació de peròxid d'hidrogen. Aquest peròxid, gràcies a l'acció de la peroxidasa, reacciona amb el fenol i la 4-aminoantipirina presents als reactius i genera un producte (quinonaimina) amb un màxim d'absorbància 500 nm. La concentració d'aquest producte és proporcional al contingut de CHOL_T de la mostra.

Els **valors de referència** de l'Hospital per a aquest paràmetre són de 125 a 220 mg/dL.

Reactius

- Kit Colesterol S.P. (Gernon, RAL; Sant Joan Despí, Espanya), que conté també de Good pH 7, fenol, 4-aminoantipirina i els enzims colesterol esterasa, colesterol oxidasa i peroxidasa.
- Calibrador: Biocal (Gernon, RAL; Sant Joan Despí, Espanya).
- Controls interns: Gernorm i Gerpath (Gernon, RAL; Sant Joan Despí, Espanya).
- Solució mare de colesterol 2.6 mM.

Procediment

Preparació de mostres

Plasma i fraccions de lipoproteïnes: les mostres es poden fer servir directament sense diluir.

Teixits: tant pels AT com pel fetge, després de fer una extracció de lípids tal i com s'indica a l'apartat 3.6.1, es van carregar sense diluir.

Pacients, Materials i Mètodes

Anàlisi de mostres

Plasma i fraccions de lipoproteïnes: es van processar amb el kit de Gernon en l'autoanalitzador Metrolab 2300. L'aparell utilitza 4 μL de mostra, als que afegeix 300 μL de reactiu. Després d'una incubació de 5 minuts realitza una lectura de punt-final bicromàtica a 505/700 nm.

Teixits: es van processar amb el kit de Gernon en placa de 96 pouets.

- Es va preparar la patró a partir de la solució mare de colesterol 2.6 mM fent un banc de dilucions en aigua destil·lada a les següents concentracions: 0, 0.08, 0.16, 0.325, 0.65, 1.3 i 2.6 mM.
- Es van aplicar 5 μL de patró per triplicat, 5 μL dels controls interns diluïts 1/3 per duplicat o 5 μL de mostra per duplicat. Seguidament, es van afegir 200 μL de reactiu a cada pou i es va incubar la placa, protegida de la llum, durant 10 minuts a 37°C amb agitació suau. Transcorregut aquest temps, es va llegir l'absorbància de la placa a 500 nm mitjançant el lector Tecan Sunrise.

Càlculs

En el cas del plasma, l'aparell dona els resultats directament en mM. En el cas de les fraccions de lipoproteïnes cal aplicar les fórmules descrites a l'apartat 3.6.3 per poder expressar els resultats en mmol CHOL_T a lipoproteïna/mL plasma

En el cas dels teixits, es va determinar la concentració de CHOL_T de les mostres interpolant el valor de densitat òptica de cada mostra a la recta patró. Finalment, per expressar els resultats en mmol CHOL_T /g teixit, cal aplicar les fórmules descrites a l'apartat 3.6.1.

NOTA: un mol de CHOL equival a 387 g de CHOL.

3.7.3 Colesterol lliure i esterificat

Fonament del mètode

Per a la determinació del colesterol lliure (FC) s'ha utilitzat un mètode enzimàtic colorimètric basat en el mètode descrit per Stähler i col·laboradors [258]. L'FC a la mostra es transforma en colesterol-3-ona per acció de la colesterol oxidasa, reacció en la que té lloc la formació de peròxid d'hidrogen. Aquest peròxid, gràcies a l'acció de la peroxidasa, reacciona amb el fenol i la 4-aminoantipirina presents als reactius i genera un producte (quinonaimina) amb un màxim d'absorbància a 500 nm. La concentració d'aquest producte és proporcional al contingut d'FC de la mostra. La concentració de colesterol esterificat (EC) s'obté de restar el FC al CHOL_T .

Els **valors de referència** de l'Hospital per a aquests paràmetres són de 44 a 60 mg/dL per l'FC (entre el 22 i el 30% de la concentració de CHOL_T) i de 140 a 156 mg/dL per l'EC.

Pacients, Materials i Mètodes

Reactius

- Kit Colesterol libre F.S. (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim; Alemanya), que conté tampó de Good pH 7, fenol, 4-aminoantipirina i els enzims colesterol oxidasa i peroxidasa.
- Calibrador: Biocal (Gernon, RAL; Sant Joan Despí, Espanya).
- Control intern: TrulabL (Gernon, RAL; Sant Joan Despí, Espanya).
- Kit Colesterol libre (Wako Chemicals; Neuss, Alemanya). Components del kit:
 - Ampolla R1: 0.1% fenol i surfactants en tampó fosfat pH 7, 4-aminifenazona, i els enzims colesterol oxidasa i peroxidasa.
 - Ampolla CAL: solució mare de colesterol 2.6 mM en isopropanol.

Procediment

Preparació de mostres

Plasma i fraccions de lipoproteïnes: les mostres es poden fer servir directament sense diluir.

Teixits: tant pels AT com pel fetge, després de fer una extracció de lípids tal i com s'indica a l'apartat 3.6.1 tant els AT com els fetge es van carregar sense diluir.

Anàlisi de mostres

Plasma i fraccions de lipoproteïnes: es van processar amb el kit de Gernon en l'autoanalitzador Metrolab 2300. L'aparell utilitza 4 µL de mostra, als que afegeix 300 µL de reactiu. Després d'una incubació de 5 minuts realitza una lectura de punt-final bicromàtica a 546/700 nm.

Teixits: es van processar amb el kit de Wako en placa de 96 pouets.

- Es va preparar la patró a partir de la solució mare de colesterol 2.6 mM fent un banc de dilucions en aigua destil·lada a les següents concentracions: 0, 0.08, 0.16, 0.325, 0.65, 1.3 i 2.6 mM.
- Es van aplicar 10 µL de patró per triplicat, 10 µL dels controls interns diluïts 1/3 per duplicat o 10 µL de mostra per duplicat. Seguidament es van afegir 200 µL de reactiu de l'ampolla R1 a cada pou i es va incubar la placa, protegida de la llum, durant 15 minuts a 37°C amb agitació suau. Transcorregut aquest temps, es va llegir l'absorbància de la placa a 500 nm mitjançant el lector de plaques Tecan Sunrise.

Càlculs

En el cas del plasma, l'aparell dona els resultats directament en mM. En el cas de les fraccions de lipoproteïnes cal aplicar les fórmules descrites a l'apartat 3.6.3 per poder expressar els resultats en mmol FC a lipoproteïna/mL plasma.

En el cas dels teixits, es va determinar la concentració de FC de les mostres interpolant el valor de densitat òptica de cada mostra a la recta patró. Finalment, per expressar els resultats en mmol FC/g teixit, cal aplicar les fórmules descrites a l'apartat 3.6.1.

Pacients, Materials i Mètodes

Per obtenir la concentració d'EC cal aplicar la següent fórmula:

$$EC = CHOL_T - FC$$

3.7.4 Cossos cetònics

Fonament del mètode

La determinació dels cossos cetònics (KB) es fa de forma indirecta mitjançant la quantificació de β -hidroxibutirat. Aquesta determinació està basada en el mètode enzimàtic descrit per Kientsch-Engel i col·laboradors [259]. El β -hidroxibutirat present a la mostra es transforma en aceto-acetat per acció de la β -hidroxibutirat-deshidrogenasa. En la reacció es forma $NADH+H^+$ que reacciona amb un compost oxidat (*nitroblue tetrazolium* o NTB), gràcies a l'acció de la diaforasa. L'NTB reduït té un màxim d'absorbància a 550 nm. La concentració d'aquest compost reduït és proporcional al contingut de KB de la mostra.

Els **valors de referència** per a aquest paràmetre són de 0.21 a 2.81 mg/dL.

Reactius

- Kit β -hidroxibutíric F.S. (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim; Alemanya). Components del kit:
 - Reactiu R1: tampó a pH 8.4 i els enzims β -hidroxibutirat-deshidrogenasa i diaforasa.
 - Reactiu R2: NAD, àcid oxàlic i NTB
 - Calibrador: β -hidroxibutirat 1 mM
- Controls interns: Gernorm i Gerpath (Gernon, RAL; Sant Joan Despí, Espanya).

Procediment

Preparació de mostres

Plasma: les mostres es poden fer servir directament sense diluir.

Anàlisi de mostres

Plasma: es van processar amb el kit de DiaSys en l'autoanalitzador Metrolab 2300.

L'aparell utilitza 8 μ L de mostra als que afegeix 300 μ L de Reactiu 1 i, passats 3 minuts, afegeix 75 μ L de Reactiu 2. Després d'una incubació de 5 minuts realitza una lectura de punt-final a 550 nm.

Càlculs

L'aparell dona els resultats directament en mM.

NOTA: un mol de KB equival a 104,2 g de KB.

3.7.5 Fosfolípids

Fonament del mètode

Per a la determinació dels PL s'ha utilitzat un mètode enzimàtic colorimètric basat en el descrit per Takayama i col·laboradors [260]. Els PL presents a la mostra (dels quals la fosfatidil-colina, la lisofosfatidil-colina i l'esfingomielina en representen el 95%) es trenquen per acció de la fosfolipasa-D, alliberant colina que, per acció de la colina oxidasa, es transforma en betaïna i peròxid d'hidrogen. Aquest peròxid, reacciona amb la 4-aminoantipirina i l'àcid tribromo hidroxibenzoic, per acció de la peroxidasa, i dóna un producte amb un màxim d'absorbància a 570 nm. La concentració d'aquest producte és proporcional al contingut de PL de la mostra.

Els **valors de referència** per a aquest paràmetre són de 125 a 275 mg/dL.

Reactius

- Kit Fosfolípidos F.S. (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim; Alemanya). Components del kit:
 - Reactiu R1: tampó Tris pH 8, TBHBA i l'enzim colina oxidasa.
 - Reactiu R2: tampó Tris pH 8, 4-aminoantipirina i els enzims fosfolipasa-D i peroxidasa.
 - Calibrador de fosfolípids 4 mM.
- Control intern: TrulabL (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim; Alemanya).
- Kit Fosfolípids PL MPR2 (Roche Diagnostics, Mannheim; Alemanya). Components del kit:
 - Reactiu 1: tampó amb fenol.
 - Reactiu 2: enzims fosfolipasa-D, colina oxidasa i peroxidasa liofilitzats.
 - Solució mare de clorur de colina 3.88 mM.

Procediment

Preparació de mostres

Fracions de lipoproteïnes: les mostres es poden fer servir directament sense diluir.

Teixits: tant pels AT com pel fetge, després de fer una extracció de lípids tal i com s'indica a l'apartat 3.6.1, es van carregar sense diluir.

Anàlisi de mostres

Fracions de lipoproteïnes: es van processar amb el kit de DiaSys en l'autoanaltzador Metrolab 2300. L'aparell utilitza 20 µL de mostra, als que afegeix 240 µL de Reactiu 1 i, passats 5 minuts, afegeix 60 µL de Reactiu 2. Després d'una incubació de 5 minuts realitza una lectura de punt-final 550 nm.

Pacients, Materials i Mètodes

Teixits: es van processar amb el kit de Roche en placa de 96 pouets.

- Es va preparar la patró a partir de la solució mare de clorur de colina 3.8 mM fent un banc de dilucions en aigua destil·lada a les següents concentracions: 0, 0.0061, 0.121, 0.485, 0.97, 1.94 i 3.88 mM.
- Es va preparar la barreja de reacció dissolent una pastilla d'enzims liofilitzats en 40 mL de Reactiu 1.
- Es van aplicar 10 µL de patró per triplicat, 10 µL del control intern diluït 1/3 per duplicat o 10 µL de mostra per duplicat. Seguidament es van afegir 200 µL de barreja de reacció a cada pou i es va incubar la placa, protegida de la llum, durant 15 minuts a 25°C, amb agitació suau. Transcorregut aquest temps, es va llegir l'absorbància de la placa a 492 nm mitjançant el lector Tecan Sunrise.

Càlculs

En el cas de les fraccions de lipoproteïnes cal aplicar les fórmules descrites a l'apartat 3.6.3 per poder expressar els resultats en mmol PL a fracció lipoproteica/mL plasma

En el cas dels teixits, es va determinar la concentració de PL de les mostres interpolant el valor d'absorbància de cada mostra a la recta patró. Finalment, per expressar els resultats en mmol PL/g teixit, cal aplicar les fórmules descrites a l'apartat 3.6.1.

NOTA: un mol de PL equival a 776 g de PL.

3.7.6 Glicerol

Fonament del mètode

Per a la determinació del glicerol s'ha utilitzat un mètode enzimàtic espectrofotomètric en el rang ultraviolat basat en el mètode descrit per Garland i col·laboradors [261]. El glicerol present a la mostra, en presència d'ATP, es transforma en glicerol-3-fosfat per acció de la glicerol-quinasa. En el següent pas, el glicerol-3-fosfat es transforma en dihidroxiacetona gràcies a la glicerol-3-fosfat deshidrogenasa. Aquesta darrera reacció porta acoblada la reducció del NAD^+ a NADH, el qual té absorbància a 340 nm. L'increment d'absorbància a 340 nm, com a conseqüència de la formació d'NADH, és proporcional al contingut de glicerol de la mostra.

Els **valors de referència** per a aquest paràmetre són de 0.092 a 0.92 mg/dL.

Reactius

- HClO_4 60% p/v (Panreac)
- Tampó glicina-hidracina (GHB)
 - Glicina 0.2M (Roche)
 - Hidròxid d'hidracina 1-hidrat 1M (Merk)
 - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 mM (Panreac)

Pacients, Materials i Mètodes

- ATP 50 mM (Sigma-Aldrich)
- NAD^+ 20 mM (Sigma-Aldrich)
- Glicerol (Panreac)
- Glicerol-quinasa (GK) 500 u/mL (Sigma)
- Glicerol deshidrogenasa (GDH) 1700U (Roche)
- Controls interns: Gernorm i Gerpath (Gernon, RAL; Sant Joan Despí, Espanya).

Procediment

Preparació de mostres

Plasma: per poder dur a terme aquesta tècnica és necessària la prèvia desproteïnitació de les mostres. Per fer-ho es va afegir HClO_4 60% (v/v) a la mostra en una proporció 70:3 (mostra:àcid v/v, tenint en compte que es recuperaran 2/3 del volum de mostra inicial).

Tot seguit es van vortejar les mostres durant uns segons i es van centrifugar a 16000 $\times g$ durant 30 minuts a 4°C. Finalment, es van recollir els sobrenedants i es van diluir entre 1/4 i 1/6 en tampó GHB.

Anàlisi de mostres

Plasmes: es van processar en placa de 96 pouets.

- Es va preparar la patró a partir de la solució mare de glicerol 2.26 mM fent un banc de dilucions en tampó GHB a les següents concentracions: 0, 5, 10, 25, 50, 150 i 300 μM .
- Es van aplicar 50 μL de patró per triplicat, 50 μL dels controls interns diluïts 1/3 per duplicat o 50 μL de mostra diluïda per duplicat. Seguidament es van afegir 160 μL de barreja de reacció a cada pou i es va incubar la placa, protegida de la llum, durant 5 minuts a 25°C amb agitació suau. Transcorregut aquest temps, es va llegir l'absorbància de la placa a 340 nm mitjançant el lector Tecan Sunrise per saber la quantitat basal d' NADH ($\text{Abs}_{\text{inicial}}$).

A continuació, es va diluir la GK 1/10 en aigua destil·lada i ràpidament es van afegir 6 μL a cada pouet i es va incubar de nou la placa, protegida de la llum, durant 5 minuts a 25°C en agitació. Tot seguit es va deixar la placa 30 minuts més, protegida de la llum i sense agitació.

Finalment, després d'una nova agitació de 5 minuts, es va llegir l'absorbància de la placa a 340 nm ($\text{Abs}_{\text{final}}$) mitjançant el lector Tecan Sunrise.

Càlculs

La diferència d'absorbància entre l' $\text{Abs}_{\text{final}}$ i l' $\text{Abs}_{\text{inicial}}$ es correspon a la reducció de l' NAD^+ a NADH .

Es va determinar la concentració de glicerol de les mostres interpolant l'increment d'absorbància de cada mostra ($\text{Abs}_{\text{final}} - \text{Abs}_{\text{inicial}}$) a la recta patró. A les mostres diluïdes es va corregir la concentració obtinguda pel factor de dilució.

NOTA: un mol de glicerol equival a 92,1 g de glicerol.

3.7.7 Òxid nítric

Fonament del mètode

Per a la determinació de l'NO s'ha utilitzat una adaptació de Ricart-Jané i col·laboradors [262] del mètode descrit per Griess [263], sent aquest un mètode indirecte que quantifica la concentració de nitrit en solució. L'NO del plasma, passa ràpidament a nitrat per acció de l'oxihemoglobina i altres factors oxidants. Tenint en compte que el mètode mesura nitrits, és necessari un pas previ de reducció dels nitrats dut a terme per la nitrat reductasa. El mètode de Griess es basa en la reacció dels nitrits amb la sulfanilamida en medi àcid, generant un catió diazoni que reacciona amb l'N-(1-naftil) etilendiamina per donar un compost azo amb un màxim d'absorbància a 540 nm. L'absorbància a 540 nm és proporcional al contingut de nitrits de la mostra.

Reactius

- Tampó fosfats 50 mM pH, 7.4
- Tampó fosfats 20 mM pH, 7.4 (per resuspendre l'enzim i el cofactor)
- Reactius de Griess:
 - Reactiu de Griess A: N-(1-naftil) etilendiamina 0.2% (p/v)
 - Reactiu de Griess B: sulfanilamida 2% (p/v) en H₃PO₄ al 5% (v/v)
- Nitrat reductasa (Cayman Chemicals)
- Cofactor de la nitrat reductasa (Cayman Chemicals)
- Solució mare de NaNO₃ 0.2 M

Procediment

Preparació de mostres

Tant el citrat com l'heparina poden portar a subestimar o sobreestimar la mesura de nitrat present a la mostra [262]. Com que nosaltres no disposàvem de mostres recollides en cap altre anticoagulant, per a totes les mostres es va fer un blanc (pou amb tots els reactius excepte l'enzim i el cofactor) per obtenir les lectures inicials de cada mostra; i una recuperació (pou que a més de la mostra i tots els reactius conté una quantitat addicional i coneguda de nitrat de sodi) per poder determinar si existeix qualsevol tipus d'interferència en cada mostra en concret. Les mostres es poden aplicar sense diluir.

Anàlisi de mostres

Plasma: es van processar en placa de 96 pouets.

- Es va preparar la patró a partir de la solució mare de nitrat de sodi 0.2 M fent un banc de dilucions en aigua bidestil·lada a les següents concentracions: 0, 5, 10, 40 i 200 µM.
- Es van aplicar 50 µL de tampó fosfats 50 mM (pH 7.4) a tots els pouets de la placa. Tot seguit, es van aplicar 50 µL de la patró per triplicat o de la mostra per quadruplicat. Als pouets destinats a determinar la recuperació es van afegir 50 µL d'una solució de concentració coneguda de nitrat de sodi (10 µM en el nostre cas), i a la resta de pouets es van afegir 50 µL d'aigua bidestil·lada per corregir la diferència de volum.

Pacients, Materials i Mètodes

Després de reconstituir la nitrat reductasa i el cofactor seguint les indicacions del fabricant, es van afegir 20 µL de l'enzim i 20 µL del cofactor a tots els pous, excepte als destinats a l'obtenció del blanc de cada mostra. De nou, per corregir el volum es van afegir 40 µL, en aquest cas de tampó fosfats 20 mM, als pous destinats als blancs. Es va incubar la placa, protegida de la llum, durant 3 hores a 25°C. Transcorregut aquest temps, es va preparar el reactiu de Griess complet necessari, barrejant els dos reactius (A i B) en una proporció 1:1 v/v, i es van afegir 100 µL a cada pouet. Finalment, es va incubar la placa, protegida de la llum, durant 10 minuts a 25°C i es va llegir l'absorbància de la placa a 540 nm mitjançant el lector Tecan Sunrise.

Càlculs

Es va determinar la concentració de nitris de les mostres interpolant el valor d'absorbància de cada mostra a la recta patró. Tot seguit es va restar la interpolació del blanc a la mostra. Per calcular la recuperació, es va restar la interpolació del blanc a la recuperació i es va aplicar la següent fórmula:

$$\% \text{ recuperació} = \frac{\text{recuperació} - \text{mostra}}{\text{valor interpolat de } 10 \mu\text{M}} \times 100$$

Es van acceptar aquelles mostres amb recuperacions superiors a $\pm 20\%$.

3.7.8 Proteïna

Fonament del mètode

Per a la determinació de proteïna s'ha utilitzat un mètode colorimètric basat en el descrit per Bradford [264]. Les càrregues positives de les proteïnes s'uneixen als grup HSO_3^- del colorant de Coomassie G-250; aquesta reacció es veu afavorida pel pH àcid del reactiu. El complex format presenta un màxim d'absorbància a 595 nm. La concentració d'aquest complex és proporcional al contingut de proteïna de la mostra.

Reactius

- Reactiu Coomassie (Pierce; Rockford, IL, EUA).
- Solució mare d'albumina sèrica bovina (BSA) 2 mg/mL (Pierce; Rockford, IL, EUA).
- Controls interns: Gernorm i Gerpath (Gernon, RAL; Sant Joan Despí, Espanya).

Procediment

Preparació de mostres

Fracions de lipoproteïnes: en el cas de les VLDL i les LDL es poden fer servir directament sense diluir i les HDL es van diluir 1/4.

Pacients, Materials i Mètodes

Anàlisi de mostres

Totes les mostres es van processar en placa de 96 pouets.

- Es va preparar la patró a partir de la solució mare de BSA 2 mg/mL fent un banc de dilucions en aigua destil·lada a les següents concentracions: 0, 0.065, 0.125, 0.25, 0.5, 0.6, 0.75 i 1 mg/mL.
- Es van aplicar 5 µL de patró per triplicat, 5 µL dels controls interns diluïts 1/100 per duplicat o 5 µL de mostra diluïda o no per duplicat. Seguidament, es van afegir 300 µL de reactiu de Coomassie a cada pouet i es va incubar la placa, protegida de la llum, durant 15 minuts a 25°C, amb agitació suau. Transcorregut aquest temps, es va llegir l'absorbància de la placa a 595 nm mitjançant el lector Tecan Sunrise.

Càlculs

En tots els casos es va determinar la concentració de proteïna de les mostres interpolant el valor de densitat òptica de cada mostra a la recta patró. A les mostres diluïdes es va corregir la concentració obtinguda pel factor de dilució. En el cas de les fraccions de lipoproteïnes cal aplicar les fórmules descrites a l'apartat 3.6.3 per poder expressar els resultats en mg proteïna a fracció lipoproteica/mL plasma (allà on posa mmol serà mg de proteïna).

3.7.9 Triacilglicèrids

Fonament del mètode

Per a la determinació dels TAG s'ha utilitzat un mètode enzimàtic colorimètric basat en el descrit per Fossati i col·laboradors [265]. Els TAG presents a la mostra s'hidrolitzen, per acció de la lipoproteïna lipasa, i donen NEFA i glicerol. Aquest glicerol és fosforilat per la glicerol-quinasa a glicerol-3-fosfat, el qual reacciona amb la glicerol-3-fosfat oxidasa generant-se dihidroxiacetona fosfat i peròxid d'hidrogen. Aquest peròxid, gràcies a l'acció de la peroxidasa, reacciona amb el 4-clorofenol i la 4-aminoantipirina presents al reactiu i genera un producte (quinonaimina) amb un màxim d'absorbància a 500 nm. La concentració d'aquest producte és proporcional al contingut de TAG de la mostra.

Els **valors de referència** de l'Hospital per a aquest paràmetre són de 37 a 200 mg/dL.

Reactius

- Kit Triglicéridos S.P. (Gernon, RAL; Sant Joan Despí, Espanya), que conté: tampó de Good pH 7.2, 4-clorofenol, ATP, Mg²⁺, 4-aminoantipirina i els enzims lipoproteïna lipasa, glicerol-quinasa, glicerol-3-fosfat oxidasa i peroxidasa.
- Calibrador Biocal (Gernon, RAL; Sant Joan Despí, Espanya)
- Controls interns: Gernorm i Gerpath (Gernon, RAL; Sant Joan Despí, Espanya).

Pacients, Materials i Mètodes

- Solució mare de glicerol 2.26 mM.

Procediment

Preparació de mostres

Plasma i fraccions de lipoproteïnes: les mostres es poden fer servir directament sense diluir.

Teixits: tant pels AT com pel fetge, després de fer una extracció de lípids tal i com s'indica a l'apartat 3.6.1, es van carregar sense diluir.

Anàlisi de mostres

Plasma i fraccions de lipoproteïnes: es van processar amb el kit de Gernon en l'autoanalitzador Metrolab 2300. L'aparell utilitza 4 µL de mostra, als que afegeix 300 µL de reactiu. Després d'una incubació de 5 minuts realitza una lectura de punt-final bicromàtica a 550/750 nm.

Teixits: es van processar amb el kit de Gernon en plaques de 96 pouets.

- Es va preparar la patró a partir de la solució mare de glicerol 2.26 mM fent un banc de dilucions en aigua destil·lada a les següents concentracions: 0, 0.035, 0.071, 0.141, 0.282, 0.565, 1.13 i 2.26 mM.
- Es van aplicar 5 µL de patró per triplicat, 5 µL del control intern diluït 1/3 per duplicat o 5 µL de mostra per duplicat. Seguidament es van afegir 200 µL de reactiu a cada pou i es va incubar la placa, protegida de la llum, durant 15 minuts a 37°C, amb agitació suau. Transcorregut aquest temps, es va llegir l'absorbància de la placa a 500 nm mitjançant el lector Tecan Sunrise.

Càlculs

En el cas del plasma i les fraccions de lipoproteïnes, l'aparell dona els resultats directament en mM. En el cas de les fraccions de lipoproteïnes cal aplicar les fórmules descrites a l'apartat 3.6.3 per poder expressar els resultats en mmol TAG a fracció lipoproteica/mL plasma.

En el cas dels teixits, es va determinar la concentració de TAG de les mostres interpolant el valor d'absorbància de cada mostra a la recta patró. Finalment, per expressar els resultats en mmol TAG/g teixit, cal aplicar les fórmules descrites a l'apartat 3.6.1.

NOTA: un mol de TAG equival a 885 g de TAG.

3.8 Determinació d'altres proteïnes

3.8.1 Activador de l'inhibidor del plasminogen de tipus 1

Fonament del mètode

Per a la determinació de la concentració de PAI-1 s'ha utilitzat un mètode tipus ELISA sandvitx directe basat en el descrit per Declerck i col·laboradors [266]. Els pouets de la placa estan recoberts amb un anticòs monoclonal contra PAI-1. En una primera incubació s'exposa el PAI-1 de la mostra a aquests anticòssos. Tot seguit es duu

Pacients, Materials i Mètodes

a terme una segona incubació amb un anticòs policlonal (secundari) contra PAI-1 marcat amb peroxidasa. Després d'eliminar tots els elements no units, s'afegeix el substrat de la peroxidasa, la ortofenilendiamina (OPD), que al reaccionar amb la peroxidasa donarà un reactiu de color groc. Mitjançant l'acidificació del medi s'aconsegueix que l'OPD viri a taronja, amb un màxim d'absorbància a 490 nm. L'absorbància a 490 nm és proporcional a la concentració de PAI-1 present a les mostres.

Els **valors de referència** per a aquest paràmetre són de 2 a 47 ng/mL.

Reactius

- IMUBIND Plasma PAI-1 ELISA (American diagnostica inc.; Pfungstadt, Alemanya), que conté: placa de 96 pouets recoberts amb anticòs primari, tampó PET (PBS-EDTA-Tween 20), PAI-1 liofilitzat, plasma sense PAI-1 liofilitzat, anticòs conjugat concentrat i OPD.
- Aigua estèril bidestil·lada
- Solució d'aturada, H₂SO₄ 4.5 M (Panreac)
- H₂O₂ 30% (v/v) (Panreac)

Procediment

Preparació de les mostres

Plasma: les mostres es van diluir entre 1/5 i 1/10 en aigua estèril bidestil·lada.

Anàlisi de mostres

Plasma: es van processar amb el kit d'ELISA d'American diagnostica inc. en plaques de 96 pouets.

- Es va preparar el tampó de rentat PET diluint el contingut de l'ampolleta en 1 litre d'aigua estèril bidestil·lada; l'anticòs conjugat es va diluir en tampó PET en una proporció 1/100 i la solució de substrat es va preparar just abans de necessitar-la barrejant 24 mL d'aigua estèril bidestil·lada, dos comprimits d'OPD i 30 µL d'H₂O₂.
- Un cop resuspès el PAI-1 liofilitzat (solució mare a 50 ng/mL) es va preparar la patró fent un banc de dilucions en aigua estèril bidestil·lada a les següents concentracions: 0, 6.25, 12.5, 25 i 50 ng/mL.
- Un cop atemperats tots els reactius, es va afegir 50 µL de tampó PET a tots els pouets. Tot seguit, es van aplicar 20 µL de patró per duplicat, 20 µL del control intern per duplicat o 20 µL de mostra diluïda per duplicat. Després d'incubar la placa durant una hora a 25°C, en la foscor i en agitació horitzontal suau, i sense buidar els pouets, es va afegir 50 µL d'anticòs conjugat i es va fer una nova incubació igual que l'anterior. A continuació, es van fer quatre rentats amb 300 µL de tampó PET i es va afegir 200 µL de solució de substrat. Es va deixar desenvolupar el color entre 10 i 20 minuts (els temps necessari per veure diferències entre els pous de concentració zero i la següent concentració) i es

Pacients, Materials i Mètodes

va aturar la reacció afegint 50 µL de la solució d'aturada. Finalment, després d'una breu agitació en horitzontal, es va llegir l'absorbància de la placa a 490 nm mitjançant el lector espectrofotomètric de plaques Triturus System (Grifols International S.A.; Barcelona, Spain, d'ara en davant Triturus System).

Càlculs

En tots els casos es va determinar la concentració de PAI-1 a les mostres aplicant el model de regressió no lineal de 4 paràmetres logístics o 4PL. Per poder utilitzar aquest model, primer de tot cal transformar les concentracions de la patró a concentracions logarítmiques, tot seguit s'interpola el valor d'absorbància de cada mostra a la patró. Finalment, es fa l'antilogaritme dels valors interpolats per obtenir ng PAI-1/mL. En el cas de les mostres diluïdes es va corregir la concentració obtinguda pel factor de dilució.

3.8.2 Adiponectina

Fonament del mètode

Per a la determinació de la concentració d'adiponectina s'ha utilitzat un mètode tipus ELISA competitiu directe basat en els descobriments de Nakano i col·laboradors [267]. Els pouets de la placa estan recoberts amb adiponectina recombinant humana. Primer de tot s'afegeixen la mostra i un anticòs policlonal marcat amb peroxidasa contra adiponectina humana, de manera que l'adiponectina present a la mostra competirà per la unió a l'anticòs amb l'adiponectina adsorbida als pouets de la placa. Després d'un rentat per eliminar l'anticòs no unit i el que s'ha unit a l'adiponectina de la mostra, s'afegeix tetrametil-bencidina (TMB) que reaccionarà amb la peroxidasa de l'anticòs unit a la placa per donar un producte de color blau. Mitjançant l'acidificació del medi s'aconsegueix que el TMB viri a groc amb un màxim d'absorbància a 450 nm. L'absorbància a aquesta longitud d'ona és inversament proporcional a la concentració d'adiponectina present a les mostres.

Els **valors de referència** per a aquest paràmetre en individus amb un BMI entre 25 i 30 són de 4.8 a 12.8 µg/mL en els homes i de 5.3 a 22.5 µg/mL en les dones.

Reactius

- Human adiponectin ELISA (BioVendor GmbH; Heidelberg, Alemanya), que conté: placa de 96 pouets recoberts amb adiponectina recombinant humana, anticòs conjugat en solució, tampó de dilució, tampó de rentat concentrat 10x, TMB en solució i solució d'aturada. El kit també conté una patró d'adiponectina humana a les següents concentracions: 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 i 10 µg/mL, un control intern baix i un d'elevat.
- Aigua estèril bidestil·lada

Procediment

Preparació de les mostres

Plasma: les mostres es van diluir 1/10 en tampó de dilució.

Pacients, Materials i Mètodes

Anàlisi de mostres

Plasma: es van processar amb el kit d'ELISA de BioVendor en plaques de 96 pouets.

- Es va preparar el tampó de rentat diluint el contingut de l'ampolleta en 1 litre d'aigua bidestil·lada estèril.
- Un cop atemperats tots els reactius, es van aplicar 50 µL de patró per duplicat, 50 µL dels controls interns per duplicat o 50 µL de mostra diluïda per duplicat. Tot seguit, es van afegir 50 µL de la solució d'anticòs conjugat a cada pouet. Després d'incubar la placa durant dues hores a 25°C en la foscor i en agitació horitzontal suau es van fer tres rentats amb 300 µL de solució de rentat diluïda i es van afegir 200 µL de solució de substrat. Es va deixar desenvolupar el color entre 10 i 20 minuts (els temps necessari per veure diferències entre els pous de concentració zero i la següent concentració) i es va aturar la reacció afegint 50 µL de la solució d'aturada. Finalment, després d'una breu agitació de la placa en horitzontal, es va llegir l'absorbància de la placa a 450 nm mitjançant el lector de plaques Triturus System.

Càlculs

En tots els casos es va determinar la concentració de PAI-1 aplicant el model de regressió no lineal 4PL. Per poder utilitzar aquest model, primer de tot cal transformar les concentracions de la patró a concentracions logarítmiques, tot seguit s'interpolava el valor d'absorbància de cada mostra a la patró. Finalment, es fa l'antilogaritme dels valors interpolats per obtenir µg PAI-1/mL. A les mostres diluïdes es va corregir la concentració obtinguda pel factor de dilució.

3.8.3 Apolipoproteïna AI

Fonament del mètode

Per a la determinació de la concentració d'apoAI en plasma s'ha utilitzat un mètode turbidimètric basat en el descrit per Marcovina i Alberts [268]. L'apoAI present a la mostra s'uneix a l'anticòs anti-apoAI que conté el kit, els complexos antígen-anticòs formen partícules molt petites que queden suspeses en el líquid de reacció augmentant la turbidesa de la mostra, que és detectada a 600 nm. L'absorbància de la mostra a aquesta longitud d'ona és proporcional a la quantitat de apoAI present a la mostra.

Els **valors de referència** per a aquest paràmetre són de 90 a 200 mg/dL.

Reactius

- Apolipoproteïna A1 mètode turbidimètric (Gernon, RAL; Sant Joan Despí, Espanya), que conté:
 - Reactiu 1: tampó Tris, polietilen-glicol 6000, NaCl.
 - Reactiu 2: antisèrum anti-ApoAI humana en tampó HEPES pH 7.4.
- Apolipoproteïns A1 & B calibradors KIT (DIAgAM; Ghislengheim, Bèlgica).
- Apolipoproteïns A1 & B control (DIAgAM; Ghislengheim, Bèlgica).

Pacients, Materials i Mètodes

Procediment

Preparació de mostres

Plasma: les mostres es poden fer servir directament sense diluir.

Anàlisi de mostres

Plasma: les mostres es van processar amb el kit de Gernon en l'autoanalitzador Metrolab 2300. L'aparell utilitza 16 µL de mostra, als que afegeix 200 µL de Reactiu 1 i, passats 20 segons, afegeix 40 µL de Reactiu 2. Després d'una incubació de 5 minuts realitza una lectura de punt-final a 600 nm.

Càlculs

L'aparell dona els resultats directament en mg/dL plasma.

3.8.4 Apolipoproteïna B

Fonament del mètode

Per a la determinació de la concentració d'apoB en plasma s'ha utilitzat un mètode turbidimètric basat en el descrit per Marcovina i Alberts [268]. L'apoB present a la mostra s'uneix a l'anticòs anti-apoB que conté el kit, els complexos antigen-anticòs formen partícules molt petites que queden suspeses en el líquid de reacció augmentant la turbidesa de la mostra, que és detectada a 340 nm. L'absorbància de la mostra a aquesta longitud d'ona és proporcional a la quantitat de apoB present a la mostra.

Els **valors de referència** per a aquest paràmetre són de 60 a 133 mg/dL.

Reactius

- Apolipoproteïna B método turbidimétrico (Gernon, RAL; Sant Joan Despí, Espanya), que conté:
 - Reactiu 1: tampó Tris, polietilen-glicol 6000, polietilen-glicol 3500, NaCl.
 - Reactiu 2: antisèrum anti-ApoB humana en tampó HEPES pH 7.4.
- Apolipoproteïns A1 & B calibrators KIT (DIAgAM; Ghislengheim, Bèlgica).
- Apolipoproteïns A1 & B control (DIAgAM; Ghislengheim, Bèlgica).

Procediment

Preparació de mostres

Plasma: les mostres es poden fer servir directament sense diluir.

Anàlisi de mostres

Plasma: les mostres es van processar amb el kit de Gernon en l'autoanalitzador Metrolab 2300. L'aparell utilitza 20 µL de mostra, als que afegeix 200 µL de Reactiu 1 i, passats 30 segons, afegeix 40 µL de Reactiu 2. Després d'una incubació de 6.6 minuts realitza una lectura de punt-final a 340 nm.

Pacients, Materials i Mètodes

Càlculs

L'aparell dona els resultats directament en mg/dL plasma.

3.8.5 Grelina

Fonament del mètode

Per a la determinació de la grelina total en plasma (acilada i desacilada) s'ha utilitzat un mètode de radioimmunoassaig (RIA) competitiu, amb ^{125}I com a radioisòtop, basat en el descrit per Hosoda i col·laboradors [269]. Primer de tot, és necessària l'extracció de la grelina mitjançant una columna cromatogràfica amb C18. A l'assaig, s'incuben una concentració fixa de grelina marcada amb una dilució constant d'anticòs primari anti-grelina obtingut en conill, de manera que la quantitat de llocs d'unió de l'antigen sigui un factor limitant. Quan s'afegeix la mostra al sistema, la grelina present en aquesta competirà amb la grelina marcada pels llocs d'unió a l'anticòs. Tot seguit, mitjançant l'addició d'un segon anticòs anti-IgG de conill, s'aconsegueix precipitar per centrifugació els complexos antígen-anticòs formats en el primer pas. Finalment, es quantifica la radioactivitat present al pellet, que tindrà una intensitat proporcional a les desintegracions dels isòtops de la mostra analitzada.

Els **valors de referència** per aquest assaig són de 50 a 250 pg/mL.

Reactius

- Columnes Sep-Pak C18 (Water's; Massachusetts, USA).
- Tampó A: 1% d'acid trifluoroacètic (TFA).
- Tampó B: 60% (v/v) acetonitril, 1% TFA i 39% aigua destil·lada.
- Rabbit anti-ghrelin (Human) serum kit (Peninsula Laboratories Inc, Division of Bachem; California, USA), que conté: tampó d'assaig 4x, anticòs primari anti-grelina humana obtingut en conill, pèptid de grelina humana (Gly-Ser-Ser(octanoil)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Gln-Pro-Arg) per la patró i marcat amb ^{125}I , anticòs secundari anti-IgG de conill obtingut en cabra.

Procediment

Preparació de mostres

Plasma: primer de tot es van equilibrar les columnes Sep-Pak C18 fent un rentat amb 1mL de tampó B, seguit de tres rentats d'1 mL amb el tampó A. Tot seguit, 1 mL de les mostres recollides en tubs amb citrat es va acidificar amb 1 mL de tampó A per precipitar les proteïnes majoritàries com ara l'albumina, i es va centrifugar a 450 *xg* en la centrífuga Z513K (Hermle Labortechnik GmbH; Wehingen, Alemanya) durant 25 minuts a 4°C. Es van recollir els sobrenedants. A continuació es van passar els sobrenedants per a les columnes deixant entrar la mostra per gravetat. Un cop havia entrat tota la mostra dins la columna es van fer dos rentats de 3 mL amb el tampó A i es va eluir la grelina

Pacients, Materials i Mètodes

unida al C18 amb 3 mL del tampó B. A continuació es va assecar l'eluent amb nitrogen gas i es va guardar el pelet a -20°C.

Anàlisi de mostres

Plasma: es van processar amb el kit de RIA de Peninsula Laboratories Inc. en tubs de borosilicat.

- Es va preparar la solució mare del pèptid de la grelina (no marcat) amb 1 mL de tampó d'assaig 1x i es va preparar la patró amb les següents concentracions: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 i 128 pg/tub (100 µL per tub).
- Es va resuspendre l'anticòs primari amb 13 mL de tampó d'assaig 1x.
- Es van resuspendre els pelets de les mostres amb 250 µL de tampó d'assaig 1x.
- Es van pipetejar 200 µL de tampó d'assaig als tubs de comptes totals (CT) i als d'unió no específica (NSB) i 100 µL als tubs d'unió total (B_T). Alhora, es van pipetejar 100 µL de mostra o patró als tubs pertinents. Tots els tubs es van processar sempre per duplicat. Tot seguit es van pipetejar 100 µL de l'anticòs primari a tots els tubs excepte als CT i als NSB, es van tapar els tubs i es van deixar a 4°C durant tota la nit. A l'endemà, un cop resuspès el pèptid marcat amb ¹²⁵I es van afegir 100 µL del pèptid a cada tub, es van vortejar, es van tapar i es van incubar de nou durant tota la nit a 4°C. Al dia següent, un cop resuspès l'anticòs secundari, es van afegir 100 µL a tots els tubs i es van incubar durant 90 minuts a 25°C. A continuació es van afegir 500 µL de tampó d'assaig 1x a tots els tubs, es va vortejar i es van centrifugar tots els tubs a 450 xg durant 20 minuts a 4°C.

Finalment, es van retirar tots els sobrenedants, excepte els dels tubs CT i es va realitzar el comptatge de les mostres en un comptador de radiació γ (Precisely (Wizard TM) 1470 Automatic Gamma Counter; PerkinElmer; Waltham, Massachusetts), utilitzant un protocol predefinit per a la quantificació de ¹²⁵I en el que cada tub es compta durant 2 minuts.

Càlculs

En tots els casos, excepte en els CT, es va restar als valors de dpm de les mostres la mitjana de les dpm dels NSB. Tot seguit, prenent com a B₀ el valor obtingut de restar les dpm de les mostres B_T menys les dpm de les mostres NSB, es va calcular el percentatge d'unió màxima per a cada punt de la patró i cada mostra aplicant la següent fórmula:

$$\frac{\% \text{ binding}}{B_0} = \frac{\text{dpm de patró o mostra}}{\text{dpm } B_0} \times 100$$

Amb els percentatges d'unió màxima de la patró es va poder representar una corba patró sobre la que es van interpolar els valors de percentatge d'unió màxima de cada mostra. Els resultats que s'obtenen d'aquesta interpolació estan en pg/tub. Finalment, s'han de corregir els valors obtinguts en la interpolació multiplicant-los per 2.5 per

Pacients, Materials i Mètodes

obtenir les dades en pg/mL plasma (cada mostra, a les extraccions en columnes de C18, es va resuspendre en 250 µL i després es van valorar 100 µL per duplicat).

3.8.6 Leptina

Fonament del mètode

Per a la determinació de la leptina en plasma s'ha utilitzat un RIA competitiu, amb ^{125}I com a radioisòtop, basat en el descrit per Ma i col·laboradors [270]. A l'assaig, s'incuba durant 24 hores una concentració fixa de leptina marcada amb una dilució constant d'anticòs primari anti-leptina obtingut en conill, de manera que la quantitat de llocs d'unió de l'antigen sigui un factor limitant. Quan s'afegeix la mostra al sistema, la leptina present en aquesta competirà amb la leptina marcada pels llocs d'unió a l'anticòs. Tot seguit, mitjançant l'addició d'un segon anticòs anti-IgG de conill, s'aconsegueix precipitar per centrifugació els complexos antígen-anticòs formats en el primer pas. Finalment, es quantifica la radioactivitat present al pelet que tindrà una intensitat proporcional a les desintegracions dels isòtops de la mostra analitzada.

Els **valors de referència** per aquest assaig són d'1 a 15 ng/mL.

Reactius

- Human leptin RIA kit (DRG Instruments GmbH; Marburg, Alemanya), que conté: tampó d'assaig (0.05 M PBS, pH 7.4 amb EDTA 0.025 M, 0.08% d'àcid sòdic, 0.05% Tritó X-100 i 1% BSA), anticòs primari anti-leptina humana obtingut en conill, leptina humana marcada amb ^{125}I , tampó d'hidratació (amb IgG de conill), reactiu de precipitat (IgG anti-IgG de conill obtingut en cabra). El kit també conté una patró de leptina humana a les següents concentracions: 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 i 100 ng/mL, un control intern baix i un d'elevat.

Preparació de mostres

Plasma: les mostres es van fer servir sense diluir.

Anàlisi de mostres

Plasma: es van processar amb el kit de RIA de DRG Instruments en tubs de borosilicat.

- Es va preparar la solució de leptina marcada resuspenent el liofilitzat amb 27 mL de tampó d'hidratació.
- Un cop atemperats tots els reactius, es van pipetejar 300 µL de tampó d'assaig als tubs NSB, 200 µL als tubs B_T (tubs d'unió total) i 100 µL a la resta de tubs (els de la patró i els de les mostres). Sempre s'han processat tots els tubs per duplicat. A continuació, es van afegir 100 µL de patró, control o mostra als tubs pertinents i 100 µL de leptina marcada amb ^{125}I a tots els tubs (als CT), als NBS, als B_T i a la resta de tubs). Tot seguit, es van afegir 100 µL d'anticòs primari a tots els tubs, excepte als CT i als NBS, es va vortexar i es va incubar

Pacients, Materials i Mètodes

durant tota la nit a 4°C. A l'endemà, es va afegir 1 mL de reactiu de precipitat a tots els tubs excepte als CT, es va vortejar i es va incubar durant 20 minuts a 4°C. Transcorregut aquest temps, es van centrifugar tots els tubs excepte els CT, durant 20 minuts a 4°C i a 450 xg i es va retirar el sobrenedant (excepte en els tubs CT) per decantació parant compte de que el pelet no es desenganxés del tub.

Finalment, es va assecar el pelet i es va realitzar el comptatge de les mostres en un comptador de radiació γ (Precisely (Wizard TM) 1470 Automatic Gamma Counter; PerkinElmer; Waltham, Massachusetts), utilitzant un protocol predefinit per a la quantificació de ^{125}I en el que cada tub es compta durant 2 minuts.

Càlculs

En tots els casos, excepte en els CT, es va restar als valors de dpm de les mostres la mitjana de les dpm dels NSB. Tot seguit, prenent com a B_0 el valor obtingut de restar les dpm de les mostres menys les dpm de les mostres NSB, es va calcular el percentatge d'unió màxima per a cada punt de la patró i cada mostra aplicant la següent fórmula:

$$\frac{\% \text{ binding}}{B_0} = \frac{\text{dpm de patró o mostra}}{\text{dpm } B_0} \times 100$$

Amb els percentatges d'unió màxima de la patró es va poder representar una corba patró sobre la que es van interpolar els valors de percentatge d'unió màxima de cada mostra. Els resultats s'obtenen en ng/mL plasma.

3.8.7 Proteïna C reactiva

Fonament del mètode

Per a la determinació de la concentració de CRP en plasma s'ha utilitzat un mètode turbidimètric basat en el descrit per Price i col·laboradors[271]. La CRP present a la mostra s'uneix a l'anticòs anti-CRP que conté el kit, els complexos antígen-anticòs formen partícules molt petites que queden suspeses en el líquid de reacció augmentant la turbidesa de la mostra, que és detectada a 340 nm. L'absorbància de la mostra a aquesta longitud d'ona és proporcional a la quantitat de CRP present a la mostra.

Els **valors de referència** per a aquest paràmetre són fins a 0.8 mg/dL.

Per a la determinació de la quantitat de CRP en teixits s'ha utilitzat un mètode tipus ELISA sandvitx directe basat en el descrit per Shine i col·laboradors [272]. Els pouets de la placa estan recoberts amb un anticòs policlonal contra la CRP, en una primera incubació s'exposa la CRP de la mostra a aquests anticòs. Després d'un rentat per eliminar totes les proteïnes que no hagin quedat unides a aquests anticòs es duu a terme una segona incubació amb un segon anticòs policlonal contra la CRP marcat amb peroxidasa. Després d'eliminar l'excés d'anticòs secundari s'afegeix el substrat de la

Pacients, Materials i Mètodes

peroxidasa, el TMB, que al reaccionar amb la peroxidasa donarà un reactiu de color blau. Mitjançant l'acidificació del medi s'aconsegueix que la TMB viri a groc amb un màxim d'absorbància a 450 nm. L'absorbància a aquesta longitud d'ona és proporcional a la concentració de CRP en els homogenats de teixit.

Reactius

- PCR test immunoturbidimètric en suero (Gernon, RAL; Sant Joan Despí, Espanya), que conté:
 - Reactiu 1: tampó fosfat pH 7.4, polietilen-glicol 6000, NaCl.
 - Reactiu 2: antisèrum anti-CRP en tampó HEPES pH 7.4.
- Calibrador CRP método turbidimètric (Gernon, RAL; Sant Joan Despí, Espanya).
- Controls interns: Turbitrol 1 i Turbitrol 2 (Gernon, RAL; Sant Joan Despí, Espanya).
- CRP ELISA kit (Immundiagnostik; Bensheim, Alemanya), que conté: placa de 96 pouets recoberts amb anticòs primari, tampó de rentat concentrat 10x, anticòs secundari conjugat amb peroxidasa, patró de CRP, control intern, tampó de dilució de mostres, substrat TMB i solució d'aturada.

Procediment

Preparació de mostres

Plasma: les mostres es poden fer servir directament sense diluir.

Teixits: en el cas dels AT i el fetge, després de fer un homogenat tal i com s'indica a l'apartat 3.6.2 es van carregar els AT sense diluir i els fetges a una dilució entre 1/10 i 1/20.

Anàlisi de mostres

Plasma: les mostres es van processar amb el kit de Gernon en l'autoanalitzador Metrolab 2300. L'aparell utilitza 25 µL de mostra, als que afegeix 250 µL de Reactiu 1 i, passats 60 segons, afegeix 40 µL de Reactiu 2. Després d'una incubació de 6 minuts realitza una lectura de punt-final a 340 nm.

Teixits: es van processar amb el kit d'ELISA d'Immundiagnostik en plaques de 96 pouets.

- Es va preparar el tampó de rentat diluït 1/10 el tampó de rentat concentrat i es va diluir l'anticòs conjugat amb la peroxidasa 1/100 en tampó de rentat La patró, que ja estava preparada tenia les següents concentracions: 0, 1.9, 5.6, 16.7, 50 i 150 ng/mL.
- Un cop atemperats tots els reactius, es va rentar la placa 5 vegades amb 250 µL de tampó de rentat diluït. Tot seguit, es van aplicar 100 µL de patró per duplicat, 100 µL del control intern per duplicat o 100 µL de mostra diluïda per duplicat. Després d'incubar la placa durant 1 hora a 25°C, en la foscor i en agitació horitzontal suau, es va rentar novament la placa amb 250 µL de tampó de rentat diluït. Tot seguit es va afegir 100 µL d'anticòs conjugat i es va fer una

Pacients, Materials i Mètodes

nova incubació d'una hora a 25°C en la foscor i amb agitació horitzontal suau. A continuació, es va fer un altre rentat igual que els anteriors i es van afegir 100 µL de substrat a cada pou. Després de deixar desenvolupar el color entre 10 i 20 minuts (els temps necessari per veure diferències entre els pous de concentració zero i la següent concentració) es va aturar la reacció afegint 50 µL de la solució d'aturada.

Finalment, després d'una breu agitació en horitzontal, es va llegir l'absorbància de la placa a 450 nm mitjançant el lector de plaques Triturus System.

Càlculs

En el cas dels plasmes, l'aparell dona els resultats directament en mg/L plasma. En el cas dels teixits, es va determinar la concentració de CRP aplicant el model de regressió no lineal 4PL. Per poder utilitzar aquest model, primer de tot cal transformar les concentracions de la patró a concentracions logarítmiques, tot seguit s'interpola el valor de densitat òptica de cada mostra a la patró. Finalment, es fa l'antilogaritme dels valors interpolats per obtenir els ng CRP/ mL homogenat i en el cas de les mostres diluïdes es corregeix la concentració obtinguda pel factor de dilució.

Cal aplicar la següent fórmula per poder donar els resultats en ng CRP/mg de teixit.

$$\frac{ng\ CRP}{mg\ teixit} = \frac{ng\ CRP}{mL\ homogenat} \times \frac{mL\ homogenat + g\ teixit}{mg\ teixit}$$

3.9 Determinació d'activitats lipases

Fonament del mètode

Per a la determinació de l'activitat HL s'ha utilitzat un mètode radioquímic basat en el mètode descrit per Julve i col·laboradors [273]. Per a la determinació de l'activitat HSL s'ha utilitzat un mètode radioquímic basat en el descrit per Ramírez i col·laboradors [274]. Finalment, per a la determinació de l'activitat LPL s'ha utilitzat una modificació [275] del mètode descrit per Ramírez i col·laboradors [274].

Aquests mètodes quantifiquen de forma específica l'activitat triacilglicerol hidrolasa de les lipases presents a les mostres. Per determinar aquesta activitat s'utilitza un substrat amb trioleïna (TO) marcada amb ³H als àcids grassos (glicerol tri[9,10-(n-³H)] oleat). Així doncs, s'incuba la mostra amb el substrat i, un cop duta a terme la reacció catalítica, se separen els NEFA dels TAG no hidrolitzats mitjançant un sistema de repartició líquid-líquid. Per aturar la reacció, primer s'utilitza una barreja de dissolvents orgànics i a continuació, s'hi afegeix un tampó bàsic que afavoreix l'extracció dels NEFA. Al centrifugar aquesta barreja, s'afavoreix l'aparició de dues fases: una inferior (tèrbola) que conté cloroform i heptà que manté dissolta la trioleïna no hidrolitzada i una superior (més clara) que conté metanol, aigua, soluts iònics i els àcids grassos alliberats durant la reacció.

Pacients, Materials i Mètodes

Finalment, cal recollir un volum de la fase superior i quantificar-ne la radioactivitat mitjançant un sistema d'escintil·lació líquida que emet una radiació lumínica d'intensitat proporcional a les desintegracions dels isòtops de la mostra analitzada.

3.9.1 Activitat lipasa hepàtica

Reactius

- Tampó EDH amb heparina, pH 7.5
 - DTT 1 mM (Sigma)
 - EDTA 1 mM (Panreac)
 - HEPES 10 mM (Roche Diagnostics)
 - Heparina 5U/mL (USB)
- Tampó HL, pH 8.5
 - NaCl 1.34 M (Panreac)
 - Albúmina bovina lliure d'àcids grassos 5.4% p/v (Sigma)
 - Tris base 89.2 mM (Roche Diagnostics)

NOTA: el NaCl serveix per inhibir l'activitat lipoproteïna lipasa.

- Estoc de trioleïna (TO*)
 - Trioleïna freda 500 mg (Sigma)
 - Trioleïna radioactiva 5 mCi/mL 0.3 mL (Amersham)
Aquestes quantitats de trioleïna es dilueixen en 6 mL de Toluè (Fluka) i se'n determina l'activitat específica de l'estoc (dpm/nmol oleat).
- Homogenat de fetge de rata (control positiu)
- Homogenat de cor de rata (control negatiu)
- Solució d'aturada
 - Metanol:Cloroform:Heptà (1.45:1.21:1; v/v/v) (Panreac)
- Tampó borat-carbonat, pH 10.5
 - H₃BO₃ 0.1 M (Merk)
 - K₂CO₃ 0.1 M (Sigma)
- Líquid d'escintil·lació (EcoLite, ICN)

Procediment

Preparació de mostres

Plasma: es van diluir les mostres 1/5 en tampó EDH amb heparina barrejant 8 µL d'homogenat amb 32 µL de tampó EDH amb heparina.

Fetge: per fer els homogenats es va seguir el procediment descrit a l'apartat 3.6.2. Tot seguit es va fer una dilució 1/5 de la mostra barrejant 8 µL d'homogenat amb 32 µL de tampó EDH amb heparina.

Preparació del substrat

El volum de substrat necessari per a cada assaig es va determinar cada vegada, tenint en compte que per cada tub calen 1.7 µL d'estoc de TO* i 51 µL de tampó HL i que generalment es valoren les mostres per duplicat. Un cop calculada la quantitat de TO* necessària, aquesta es va pipetejar en un tub de vidre Pyrex, i es va evaporar el

Pacients, Materials i Mètodes

toluè gasejant amb N₂ a la campana de gasos. Un cop seca, es va resuspendre en el volum de tampó HL que fes falta i, mantenint el tub en gel, es va sonicar en 4 períodes de 30 segons, separats per intervals de descans de 15 segons. Finalment, es va verificar la correcta emulsió del substrat (ha de ser homogeni, sense gotes refringents).

A cada valoració es van determinar els CT en 4 tubs en els que s'hi van pipetejar 25 µL de TO* més 4 mL de líquid d'escintil·lació. Es van comptar igual que la resta de mostres. Aquests vials serveixen per comprovar que el substrat s'ha preparat correctament.

Anàlisi de mostres

A cada valoració es van incloure (i) 4 tubs amb 17 µL de tampó EDH amb heparina com a blancs de la valoració, (ii) 2 controls interassaig: homogenat de cor i de fetge diluïts 1/5 en tampó EDH amb heparina.

Es van pipetejar per duplicat 17 µL de les mostres o dels controls diluïts 1/5 en tubs de vidre. Tot seguit, deixant els tubs en gel, es va preparar el substrat tal i com s'ha explicat anteriorment. Un cop es va tenir enllestit, tot prenent a la vegada les dues rèpliques de cada mostra, es van afegir 50 µL de substrat a cada tub, es van agitar suaument amb el vòrtex i es van incubar durant 30 minuts exactes en un bany a 25°C. Transcorregut aquest temps, i respectant sempre l'ordre inicial, es va aturar la reacció afegint a cada tub 1.2 mL de solució d'aturada i 0.33 mL de tampó borat-carbonat. Tot seguit, es van agitar els tubs 6 minuts a 1200 rpm en un orbital-vibrador per invertir les fases i es van centrifugar a 800 xg durant 10 minuts i a 4°C per facilitar la formació de les dues fases. La fase superior té un volum calculat de 0.859 mL. A continuació, es van recollir 300 µL de la fase superior i es van afegir als 4 mL de líquid d'escintil·lació que es tenien en vials d'escintil·lació. Finalment, es va realitzar el comptatge de les mostres en un comptador de radiació β (Tri-Carb 2100TR, Packard Instrument Company, Grove, IL, EUA), utilitzant un protocol predefinit per a la quantificació de ³H en el que cada tub es compta durant 3 minuts.

Càlculs

En tots els casos es va restar als valors de dpm de les mostres la mitjana de les dpm dels blancs (produïdes per la hidròlisi espontània de la TO* i/o el soroll de fons de l'aparell), d'aquesta manera es van obtenir les dpm netes amb les que es farien els càlculs posteriors. Es defineix com a unitat enzimàtica (U) la quantitat d'enzim que allibera 1 µmol de producte per minut a 25°C.

En el cas del plasma, l'activitat s'expressa en mU/mL i es va determinar seguit el següent càlcul (FS, fase superior; AE, activitat específica):

$$\frac{mU}{mL} = \frac{dpm \text{ netes}}{0.3 \text{ mL FS}} \times \frac{0.859 \text{ mL FS}}{0.017 \text{ mL plasma dil.}} \times \frac{5 \text{ mL plasma dil.}}{1 \text{ mL plasma}} \times \frac{1}{30 \text{ min.}} \times \frac{1}{AE}$$

Pacients, Materials i Mètodes

En el cas de les mostres de teixit, l'activitat es pot expressar com a mU/g teixit i cal tenir en compte la dilució feta en homogeneïtzar. Així doncs, cal aplicar el següent càlcul:

$$\frac{mU}{g} = \frac{dpm \text{ netes}}{0.3 \text{ mL FS}} \times \frac{0.859 \text{ mL FS}}{0.017 \text{ mL mostra dil.}} \times \frac{5 \text{ mL hom. dil.}}{1 \text{ mL hom.}} \times \frac{g \text{ teixit} + x \text{ ml EDH}}{g \text{ teixit}} \times \frac{1}{30 \text{ min.}} \times \frac{1}{AE}$$

3.9.2 Activitat lipasa sensible a hormones

Reactius

- Tampó EDH, pH 7.5
 - DTT 1 mM (Sigma)
 - EDTA 1 mM (Panreac)
 - HEPES 10 mM (Roche Diagnostics)
- Tampó HSL, pH 7.5
 - PIPES 27.9 mM (Sigma)
 - MgCl₂ · 6H₂O 55.8 mM (Panreac)
 - Albúmina bovina lliure d'àcids grassos 0.6 mg/mL (Sigma)
 - Protamina sulfat 28 mg/mL (Sigma)

NOTA: la protamina sulfat serveix per inhibir l'activitat lipoproteïna lipasa.

- Estoc de trioleïna (TO*)
 - Trioleïna freda 250 mg (Sigma)
 - Trioleïna radioactiva 5 mCi/mL 0.6 mL (Amersham)

Aquestes quantitats de trioleïna es dilueixen en 8 mL de Toluè (Fluka) i se'n determina l'activitat específica de l'estoc (dpm/nmol oleat).
- Homogenat de fetge de rata (control negatiu)
- Homogenat de cor de rata (control positiu)
- Solució d'aturada
 - Metanol:Cloroform:Heptà (1.45:1.21:1; v/v/v) (Panreac)
- Tampó borat-carbonat pH 10.5
 - H₃BO₃ 0.1 M (Merk)
 - K₂CO₃ 0.1 M (Sigma)
- Líquid d'escintil·lació (EcoLite, ICN)

Procediment

Preparació de mostres

AT: per fer els homogenats es va seguir el procediment descrit a l'apartat 3.6.2.

Preparació del substrat

El substrat per l'HSL es prepara igual que per la valoració d'activitat HL però tenint en compte que per cada tub calen 1.2 µL d'estoc de TO* i 60 µL de tampó HSL i que generalment es valoren les mostres per duplicat.

A cada valoració es van determinar els CT en 4 tubs en els que s'hi van pipetejar 25 µL de TO* més 4 mL de líquid d'escintil·lació. Es van comptar igual que la resta de

Pacients, Materials i Mètodes

mostres. Aquests vials serveixen per comprovar que el substrat s'ha preparat correctament.

Anàlisi de mostres

A cada valoració es van incloure (i) 4 tubs amb 7 µL de tampó EDH sense heparina com a blancs de la valoració, (ii) 2 controls interassaig: homogenat de cor i de fetge diluïts 1/4 en tampó EDH sense heparina.

El procediment d'anàlisi de les mostres és el mateix que l'utilitzat per valorar l'activitat HL amb la diferència de que es van pipetejar per duplicat 7 µL de les mostres o dels controls diluïts 1/4 en tubs de vidre i es van afegir 60 µL de substrat a cada tub.

Càlculs

En tots els casos es va restar als valors de dpm de les mostres la mitjana de les dpm dels blancs (produïdes per la hidròlisi espontània de la TO* i/o el soroll de fons de l'aparell, d'aquesta manera es van obtenir les dpm netes amb les que es farien els càlculs posteriors. Es defineix com a unitat enzimàtica (U) la quantitat d'enzim que allibera 1 µmol de producte per minut a 25°C.

En el cas de les mostres de teixit, l'activitat es pot expressar com mU/g teixit i cal tenir en compte la dilució feta en homogeneïtzar. Així doncs cal aplicar el següent càlcul:

$$\frac{mU}{g} = \frac{dpm \text{ netes}}{0.3 \text{ mL FS}} \times \frac{0.859 \text{ mL FS}}{0.007 \text{ mL homogenat.}} \times \frac{g \text{ teixit} + 1 \text{ ml EDH}}{g \text{ teixit}} \times \frac{1}{30 \text{ min.}} \times \frac{1}{AE}$$

3.9.3 Activitat lipoproteïna lipasa

Reactius

- Tampó EDH amb heparina, pH 7.5
 - DTT 1 mM (Sigma)
 - EDTA 1 mM (Panreac)
 - HEPES 10 mM (Roche Diagnostics)
 - Heparina 5 U/mL (USB)
- Tampó LPL, pH 7.5
 - PIPES 28.8 mM (Sigma)
 - MgCl₂ · 6H₂O 57.8 mM (Panreac)
 - Albúmina bovina lliure d'àcids grassos 0.6 mg/mL (Sigma)
- Tampó LPL, pH 7.5 *especial fetge*
 - PIPES 28.8 mM (Sigma)
 - MgCl₂ · 6H₂O 57.8 mM (Panreac)
 - Albúmina bovina lliure d'àcids grassos 0.6 mg/mL (Sigma)
 - NaCl 1.34 M (Panreac)
 - Protamina sulfat 28 mg/mL (Sigma)

NOTA: el NaCl i la protamina sulfat serveixen per inhibir l'activitat LPL.

- Estoc de trioleïna (TO*)
 - Trioleïna freda 245.5 mg (Sigma)

Pacients, Materials i Mètodes

- Trioleïna radioactiva 5 mCi/mL 0.6 mL (Amersham)
Aquestes quantitats de trioleïna es dilueixen en 8 mL de Toluè (Fluka) i se'n determina l'activitat específica de l'estoc (dpm/nmol oleat).
- Homogenat de fetge de rata (control negatiu)
- Homogenat de cor de rata (control positiu)
- Sèrum de rata preescalfat a 55°C, com a font d'apoCII
- Antisèrum de conill anti-lipasa hepàtica de rata (R21), cedit per la Dra. Monique Robert, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.
- Solució d'aturada
 - Metanol:Cloroform:Heptà (1.45:1.21:1; v/v/v) (Panreac)
- Tampó borat-carbonat pH 10.5
 - H₃BO₃ 0.1 M (Merk)
 - K₂CO₃ 0.1 M (Sigma)
- Líquid d'escintil·lació (EcoLite, ICN)

Procediment

Preparació de mostres

Plasma: com que es tracta de mostres que tenen activitat HL, és necessari inhibir-la abans de poder començar la valoració d'activitat LPL pròpiament dita. Per fer-ho, i intuïnt que les activitats serien relativament baixes, es van barrejar 18 µL de plasma amb 2 µL d'antisèrum R21. Tot seguit, es van incubar les mostres durant 2 hores a 4°C.

Per fer els blancs d'aquest tipus de mostres es van diluir 2 µL d'antisèrum R21 en 18 µL de tampó EDH amb heparina i també es van incubar durant 2 hores a 4°C. D'aquí es van agafar els 7 µL per continuar amb la valoració.

Fetge: per fer els homogenats es va seguir el procediment descrit a l'apartat 3.6.2. Les mostres es van fer servir sense diluir. Per fer els blancs d'aquest tipus de mostres es van fer servir 7 µL de tampó EDH amb heparina.

AT: per fer els homogenats es va seguir el procediment descrit a l'apartat 3.6.2. Tot seguit, com es tracta de mostres sense activitat HL es va fer una dilució 1/4 de la mostra barrejant 5 µL d'homogenat amb 15 µL de tampó EDH amb heparina.

Per fer els blancs d'aquest tipus de mostres es van fer servir 7 µL de tampó EDH amb heparina.

Preparació del substrat

El substrat per l'LPL es prepara igual que per la valoració d'activitat HL però tenint en compte que per cada tub calen 1.2 µL d'estoc de TO* i 58 µL de tampó LPL i 2 µL de sèrum preescalfat; i que generalment es valoren les mostres per duplicat.

En el cas de les mostres de fetge, es van fer dues valoracions, una en la que el substrat es va resuspendre en tampó LPL i en la que es mesurava l'activitat lipasa total i una segona valoració en la que el substrat es va resuspendre en tampó LPL *especial*

Pacients, Materials i Mètodes

fetge, tampó amb el que s'inhibeix l'activitat LPL de forma química (es valora l'activitat lipasa que no prové de l'LPL).

A cada valoració es van determinar els CT en 4 tubs en els que s'hi van pipetejar 25 µL de TO* més 4 mL de líquid d'escintil·lació. Es van comptar igual que la resta de mostres. Aquests vials serveixen per comprovar que el substrat s'ha preparat correctament.

Anàlisi de mostres

A cada valoració es van incloure (i) 4 tubs amb 7 µL de tampó EDH amb heparina com a blancs de la valoració (o en el cas de mostres amb activitat HL, 7 µL de tampó amb antisèrum, tal i com s'ha descrit anteriorment (exceptuant el fetge)) (ii) 2 controls interassaig: homogenats de cor i fetge diluïts 1/4 en tampó EDH amb heparina.

El procediment d'anàlisi de les mostres és el mateix que l'utilitzat per valorar l'activitat HL amb la diferència de que es van pipetejar per duplicat 7 µL de les mostres o dels controls diluïts 1/4 en tubs de vidre i es van afegir 60 µL de substrat a cada tub.

Càlculs

En tots els casos es va restar als valors de dpm de les mostres la mitjana de les dpm dels blancs (produïdes per la hidròlisi espontània de la TO* i/o el soroll de fons de l'aparell, d'aquesta manera es van obtenir les dpm netes amb les que es farien els càlculs posteriors. Es defineix com a unitat enzimàtica (U) la quantitat d'enzim que allibera 1 µmol de producte per minut a 25°C.

En el cas del plasma l'activitat s'expressa en mU/mL i es va determinar seguit el següent càlcul (FS, fase superior; AE, activitat específica):

$$\frac{mU}{mL} = \frac{dpm \text{ netes}}{0.3 \text{ mL FS}} \times \frac{0.859 \text{ mL FS}}{0.007 \text{ mL plasma dil.}} \times \frac{20 \text{ mL plasma dil.}}{18 \text{ mL plasma}} \times \frac{1}{30 \text{ min.}} \times \frac{1}{AE}$$

En el cas de les mostres de teixit, l'activitat es pot expressar en mU/g teixit i cal tenir en compte la dilució feta en homogeneïtzar. Així doncs cal aplicar el següent càlcul:

$$\frac{mU}{g} = \frac{dpm \text{ netes}}{0.3 \text{ mL FS}} \times \frac{0.859 \text{ mL FS}}{0.007 \text{ mL mostra dil.}} \times \frac{4 \text{ mL hom. dil.}}{1 \text{ mL hom.}} \times \frac{g \text{ teixit} + ml \text{ EDH}}{g \text{ teixit}} \times \frac{1}{30 \text{ min.}} \times \frac{1}{AE}$$

En el cas dels fetges, un cop aplicada la fórmula anterior a les dues valoracions, cal restar l'activitat lipasa total menys l'activitat lipasa valorada inhibint l'LPL per aconseguir l'activitat LPL.

3.10 Immunodetecció d'apoAIV

Per dur a terme la immunodetecció d'apoAIV, és necessària la combinació de dues tècniques: l'electroforesi en condicions desnaturalitzants en gels d'acrilamida (SDS-PAGE) i el *Western blot*.

Pacients, Materials i Mètodes

Fonament de l'SDS-PAGE

L'electroforesi en condicions desnaturalitzants és una tècnica que permet separar les proteïnes segons el seu pes molecular. La tècnica es basa en l'ús d'un detergent aniónic, l'SDS, que desnaturalitza les proteïnes i se'ls hi uneix conferint-los una càrrega neta negativa proporcional a la seva massa. Per garantir que les proteïnes en solució es mantenen en la seva estructura primària és necessària l'addició d'un agent reductor com el β -mercaptoetanol o el DTT, que trenquen els ponts disulfur i eviten que la conformació de la proteïna interfereixi en la seva migració a través del gel. D'aquesta manera, es pot assumir que la distància que recorre una proteïna en el gel està directament relacionada amb el seu pes molecular.

Fonament del *Western blot*

El *Western blot* és una tècnica que permet detectar proteïnes de forma específica basant-se en l'especificitat de la unió d'un anticòs al seu antigen. La detecció es fa sobre una membrana en la que s'han transferit les proteïnes després d'haver estat separades per electroforesi. Habitualment, en aquest tipus de tècniques es combinen dos anticossos, el primari que detecta de forma específica la proteïna d'interès i el secundari, que detecta de forma específica l'anticòs primari i que porta unida una peroxidasa. Aquesta peroxidasa reacciona amb un compost luminescent i permet la detecció indirecta de la proteïna d'interès.

Aquesta tècnica es pot emprar tant per a la determinació del pes molecular d'una proteïna com per a comparar l'abundància relativa d'una proteïna entre diferents mostres.

Reactius

- Tampó fosfat salí 1x (PBS), pH 7.4
 - NaCl 137 mM (Panreac)
 - KCl 2.7 mM (Panreac)
 - Na₂HPO₄ 8.1 mM (Panreac)
 - KH₂PO₄ 1.5 mM (Panreac)
- Tampó de mostra
 - Tris-HCl 250 mM, pH 6.8
 - Glicerol 40% (v/v) (Panreac)
 - SDS 8% (p/v) (Merck)
 - Traces de blau de bromofenol (Sigma)

Un cop feta aquesta barreja, es va diluir amb Tris-HCl pH 6.8 en una proporció 3:1 (Tampó de mostra: Tris:HCl) i, just abans de fer-ho servir, es va afegir DTT 150 mM (GE Healthcare).

- Tampó d'electroforesi 1x
 - Glicina 192 mM (Panreac)
 - Tris-Base 25 mM (Roche)
 - SDS 0.1% (p/v) (Merck)
- Tampó de transferència 1x

Pacients, Materials i Mètodes

- Glicina 380 mM (Panreac)
- Tris-base 50 mM (Roche)
- Metanol 20% (v/v) (Merck)
- Tampó de bloqueig
 - BSA Fracció V de Cohn 2% (p/v) (Sigma) en PBS 1x
- Tampó de rentat
 - Tween-20 0.25% (v/v) (Sigma) en PBS 1x.
- Gel concentrador
 - Acrilamida/bisacrilamida (37.5:1 p/v) 4% (p/v) (BioRad)
 - Tris-HCl 125 mM, pH 6.8
 - SDS 0.1% (Merck)
 - N,N,N',N'-tetrametil-etilen-diamina (TEMED) 0.2% (v/v) (BioRad)
 - (NH₄)₂S₂O₈ 0.2% (p/v) (BioRad)
- Gel separador
 - Acrilamida/bisacrilamida (37.5:1 p/v) 10% (p/v)
 - Tris-HCl 375 mM pH 8.8
 - SDS 0.1%
 - TEMED 0.1% (v/v) (BioRad)
 - (NH₄)₂S₂O₈ 0.1% (p/v) (BioRad)
- Anticòs primari: anticòs anti-ApoAIV humana obtingut en conill (desenvolupat en el nostre laboratori).
- Anticòs secundari: anticòs anti-IgG de conill obtingut en porc (Dako)
- Substrat de la peroxidasa SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Pierce)
- Marcador de pes molecular *Precision Plus Protein Dual color Standards* (BioRad)
- Metanol (Merck)
- Aigua destil·lada

Procediment

Preparació de mostres

Plasma: es va fer una dilució 1/50 en tampó PBS.

Anàlisi de les mostres

- **Elaboració dels gels:** es va muntar el sistema de vidres en el suport per a la polimerització i es va comprovar la seva estanquitat. A continuació, es va preparar el gel separador segons la composició indicada anteriorment i es va abocar entre els dos vidres, evitant la formació de bombolles, fins a 3/4 parts del vidre petit. Tot seguit es va afegir lentament 1 mL d'aigua destil·lada i es va deixar polimeritzar el gel durant una hora. Transcorregut aquest temps, es va preparar el gel concentrador segons la composició indicada anteriorment, es va eixugar l'aigua de sobre del gel separador amb paper de filtre i es va abocar la solució del gel concentrador entre els dos vidres. Immediatament es va col·locar

Pacients, Materials i Mètodes

la pinta evitant la formació de bombolles i es va deixar polimeritzar durant una hora.

- **Desnaturalització de les mostres:** la mostra diluïda es va barrejar amb el tampó de mostra en una proporció 1:1 (v:v). Tot seguit es van bullir les mostres a 100°C en un bany humit durant 5 minuts.
- **Electroforesi:** per dur a terme l'electroforesi es va utilitzar el sistema Mini-Protean II (BioRad; Califòrnia, EUA). Un cop carregades les mostres i el marcador de pes molecular al gel, es va dur a terme la separació electroforètica aplicant un amperatge constant de 35 mA per gel el temps necessari per que el marcador de talla dels 25 kDa arribés a la part inferior del gel (aproximadament 90 minuts).
- **Western blot:** per realitzar el *Western blot* es va utilitzar el sistema Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad; Califòrnia, EUA). Un cop acabada l'electroforesi es van equilibrar la membrana de fluorur de polivinil (Immobilon-P, Millipore) activada amb metanol, el gel, les esponges i els papers Whatman en tampó d'electroforesi durant 15 minuts. Tot seguit, es va muntar el sandvitx de transferència col·locant els diferents components en el següent ordre, començant per l'extrem catòdic (negre): esponja, paper Whatman, gel, membrana activada, paper Whatman i esponja; evitant la formació de bombolles entre els diferents elements del muntatge. Es va col·locar el sandvitx de transferència dins de la cubeta plena amb tampó de transferència i es va transferir durant 1 hora a un amperatge constant de 200 mA/gel. La transferència es fa a 4°C.

Un cop finalitzada, es va bloquejar la membrana amb 100 mL de tampó de bloqueig durant 50 minuts en un bany a 37°C i agitació suau. A continuació, es va incubar la membrana amb l'anticòs primari a una dilució 1/1000 en tampó de bloqueig, en agitació orbital a 4°C durant tota la nit.

A l'endemà, es van fer cinc rentats de cinc minuts amb 100 mL de tampó de rentat, en agitació forta. A continuació es va incubar la membrana amb l'anticòs secundari a una dilució 1/10000 en tampó de bloqueig durant dues hores a temperatura ambient i en agitació orbital, i es va tornar a rentar la membrana igual que abans.

Finalment, es va incubar la membrana amb el substrat de la peroxidasa (barrejant els dos components del substrat en una proporció 1:1 v/v). La luminescència resultant es va detectar mitjançant una pel·lícula fotogràfica revelada en un revelador automàtic (FPM-100A Fujifilm; Tokyo, Japó).

Càlculs

Càlcul de l'abundància relativa de la proteïna

Primer de tot es van escanejar els films amb una resolució de 300 dpi, es van guardar en format .TIFF i, si era necessari, s'ajustava el contrast i la brillantor amb el Photoshop®. Tot seguit, amb l'ajut del programa MultiGauge v.3, es van seleccionar aquelles bandes que es volien quantificar. El programa, per densitometria, calcula l'àrea

Pacients, Materials i Mètodes

sota la corba (AUC) que ocupa cada banda (en unitats arbitràries), que serà directament proporcional a l'abundància de la proteïna a la mostra. Per obtenir l'abundància relativa només faltaria dividir l'AUC de la mostra problema entre l'AUC de la mostra de referència.

3.11 Determinació de l'expressió gènica:

3.11.1 Extracció d'RNA

Fonament del mètode

Per a l'extracció de l'RNA dels teixits (tant d'AT com de fetge) s'ha utilitzat un mètode de separació en fase líquida descrit per Chomczynski i Sacchi [276]. Durant l'homogeneïtzació del teixit, el reactiu d'aïllament Tripure (amb fenol) trenca les cèl·lules i desnatura les endonucleases gràcies a l'acció del isotiocianat de guanidina, que inhibeix les RNAases i preserva la integritat de l'RNA. Un cop s'afegeix el cloroform, es formen tres fases: una superior aquosa que conté l'RNA, una intermèdia blanca i una inferior vermella i orgànica on es troben les proteïnes i el DNA. L'RNA es recupera mitjançant la precipitació amb isopropanol.

Reactius

- *Tripure Isolation Reagent* (Roche Diagnostics)
- Cloroform (Merck)
- Aigua bidestil·lada estèril
- Isopropanol (Merck)
- Etanol al 75% (v/v) en aigua bidestil·lada estèril (Panreac)

NOTA: tot el material que es fa servir ha de ser estèril i lliure d'RNAases.

Procediment

Anàlisi de mostres

Es va pesar un tros de teixit (uns 80 mg en el cas dels AT i uns 20 mg en el cas dels fetges), evitant en tot moment que la mostra es descongelés. Tot seguit, utilitzant tubs de polipropilè de 3 mL es van homogeneïtzar les mostres en 1 mL de Tripure utilitzant un polítró a la màxima potència. Després d'incubar les mostres a 25°C durant 5 minuts per permetre al Tripure trencar els complexos de nucleoproteïnes, es va fer una centrifugació de 3 minuts a 400 xg, per poder eliminar tot el greix present a les mostres. Tot seguit, es van afegir 0.2 mL de cloroform i, després d'agitar vigorosament amb el vòrtex durant 15 segons, es van centrifugar les mostres a 12000 xg, a 4°C, durant 15 minuts. Amb això s'aconsegueixen les tres fases.

Es va traspasar tota la fase superior a un nou tub eppendorf i s'hi van afegir 0.5 mL d'isopropanol per precipitar l'RNA. Després d'agitar per inversió i incubar durant 10 minuts a 25°C, es va fer una nova centrifugació igual que l'anterior. A continuació, es va descartar el sobrenedant amb l'ajut d'una pipeta i es van fer dos rentats amb 0.5 mL d'etanol al 75%, per eliminar totes les restes de fenol i isopropanol que poguessin

Pacients, Materials i Mètodes

quedar a les mostres; entre rentat i rentat es va fer una centrifugació de 5 minuts a 4°C i a 12000 *xg*.

Un cop descartat el sobrenedant, es van assecar els pellets en un bany sec a 30°C i es van resuspendre en aigua bidestil·lada estèril: en 20 µL en el cas dels AT i en 70 µL en el cas dels fetges.

Finalment, es va quantificar el contingut d'RNA de les mostres i es va obtenir una primera indicació del seu grau de puresa en un NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer; Thermo Fischer Scientific, USA). Aquest aparell dona la concentració directament en ng/mL, a més, també proporciona informació sobre el grau de contaminació per DNA i/o proteïnes, en el cas que la relació d'absorbàncies 260 nm/280 nm no estigui entre 1.8 i 2.0; o bé sobre el grau de contaminació per algun reactiu del procés (fenol, isopropanol, etc.) en el cas que la relació d'absorbàncies 260 nm/230 nm no es trobi entre 1.8 i 2.0.

Les mostres es van congelar a -20°C fins a la seva posterior utilització.

Càlculs

Un cop obtingudes les quantificacions de la concentració d'RNA a les mostres, es va aplicar la següent fórmula per conèixer els µg d'RNA que s'havien extret per g de teixit.

$$\frac{\mu g \text{ RNA}}{g \text{ teixit}} = \frac{\mu g \text{ RNA}}{\mu L \text{ resuspès}} \times \frac{\mu L \text{ en els que es resuspenia}}{g \text{ teixit}}$$

D'aquesta manera es podia veure si l'eficiència de l'extracció havia estat homogènia en totes les mostres. S'obtenien uns 46 µg RNA/g teixit en el cas del teixit adipós subcutani, uns 72 µg/ g teixit en el cas del visceral i uns 2.7 mg RNA/g de teixit en el cas dels fetges.

3.11.2 Estudi de la qualitat de l'RNA

Donat que l'RNA és una mol·lècula extremadament sensible a la degradació per les RNAases, proteases presents en el medi que ens envolta, es va creure convenient la comprovació de la qualitat de l'RNA obtingut. Per això es va analitzar la qualitat de l'RNA al Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Madrid, Espanya). Els perfils que es generen en aquest aparell aporten informació sobre la concentració de la mostra i permeten una inspecció visual de la integritat de l'RNA.

Aquest aparell, mitjançant una separació electroforètica de la mostra d'RNA genera electropherogrames i una imatge de tipus gel a partir de la qual es pot calcular el número d'integritat de l'RNA o RIN. El RIN va de l'1 al 10. Un RIN proper a 10 implica que el grau de degradació és baix, per a la realització de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) en temps real es recomana utilitzar mostres amb un RIN per sobre de 7. A més, el sistema també proporciona la relació entre els dos RNA ribosòmics, un altre paràmetre utilitzat per conèixer la qualitat de l'RNA, la qual ha de ser propera a 2 [277].

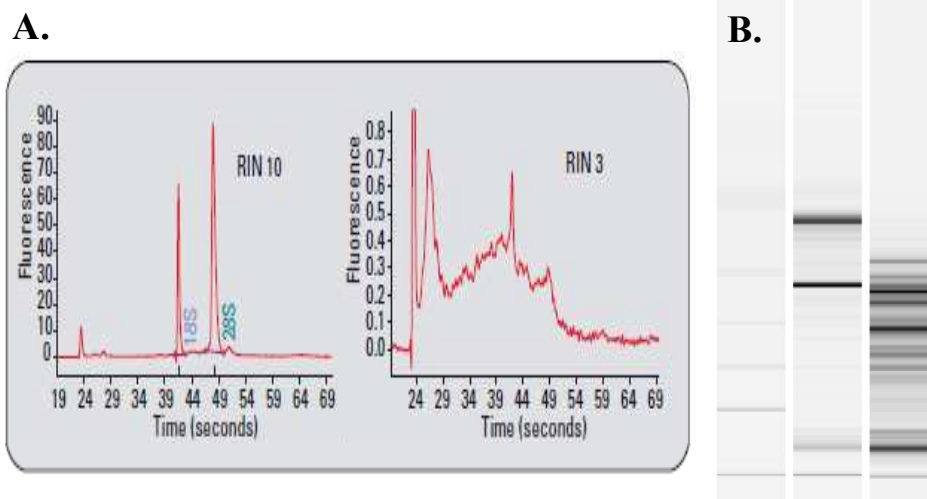


Figura 22. Exemple de resultats obtinguts amb el Bioanalyzer 2100. **A.** Imatge corresponent als electropherogrames d'una mostra intacta (RIN 10) i una mostra amb un grau de degradació considerable (RIN 3). **B.** Imatge corresponent al gel d'aquestes dues mostres. Adaptat de Mueller i col·laboradors [277].

En el nostre cas, per a les mostres d'AT el RIN promig va ser de 7.3 i la relació 28s/18s rRNA va ser d'1.2. Per a les mostres de fetge el RIN promig va ser de 8.1 i la relació 28s/18s rRNA va ser d'1.3.

3.11.3 Retrotranscripció

Fonament del mètode

Per dur a terme la retrotranscripció de les mostres d'RNA s'ha utilitzat la modificació de D'Alessio i col·laboradors [278] d'un mètode descrit per Gubler i col·laboradors [279]. Aquesta tècnica permet passar l'RNA de les mostres a cDNA. Per fer-ho s'utilitza la retrotranscriptasa reversa MultiScribe, un enzim recombinant del virus de la leucèmia murina de Moloney (rMoMuLV). Aquest enzim és una DNA polimerasa dependent d'RNA que utilitza les cadenes senzilles d'RNA com a motllo per sintetitzar una cadena complementària de DNA (cDNA) a partir d'uns encebadors. Aquest enzim té la peculiaritat de que no disposa de l'activitat 3'→5' exonucleasa,

En aquest tipus de reaccions es considera que l'eficiència és del 100%, per tant, cada molècula d'RNA serà retrotranscrita a una molècula de cDNA.

Reactius

- High-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems; USA).
Components del kit:
 - Tampó de retrotranscripció 10x
 - Barreja de desoxiribonucleòtids tri-fosfat (dNTP) 25x
 - Encebadors aleatoris (*Random primers*) 10x
 - Retrotranscriptasa reversa MultiScribe
 - Inhibidors d'RNAases (RNAsin)
 - Aigua bidestil·lada estèril

Pacients, Materials i Mètodes

La barreja de tots aquests components en les proporcions adequades s'anomena *RT Master Mix*.

NOTA: tot el material que es fa servir ha de ser estèril i lliure d'RNAases.

Procediment

Preparació de mostres

Per dur a terme aquesta tècnica és important tenir present que és altament recomanable retrotranscriure alhora totes aquelles mostres que posteriorment s'hagin d'analitzar juntes per PCR en temps real, ja que d'aquesta manera s'eviten possibles variacions provocades per diferències en l'eficiència de retrotranscripció.

Tant en el cas de la retrotranscripció de mostres d'AT com en el de mostres de fetge, es van retrotranscriure un total de 400 ng d'RNA per mostra. Per tant, es va haver d'ajustar la concentració de totes les mostres a 40 ng/ μ L amb aigua bidestil·lada estèril. Un cop es van tenir diluïdes, es va comprovar que la concentració fos la correcta al Nanodrop, acceptant una concentració de 40 ng/ μ L \pm 5% (és a dir, entre 38 i 42 ng/ μ L).

Processament de mostres

- Preparació de l'*RT Master Mix*:

La retrotranscripció es va fer en un volum de 20 μ L, dels quals 10 μ L serien de la mostra diluïda en el pas anterior i 10 μ L serien de l'*RT Master Mix*. Per una sola mostra, l'*RT Master Mix* ha de tenir: 2 μ L de tampó de retrotranscripció, 0.8 μ L de barreja de dNTP, 2 μ L de *Random primers*, 1 μ L de transcriptasa reserva MultiScribe, 1 μ L d'RNAsin i 3.2 μ L d'aigua bidestil·lada estèril.

Es va preparar la barreja d'*RT Master Mix* en funció del nombre de mostres que es volien retrotranscriure i es van fer les barreges en tubs eppendorf de 0.2 mL, aptes per termociclador.

- Retrotranscripció:

Just abans de col·locar els tubs a l'aparell se'ls va fer un spin amb la centrifuga Epp8510R (Eppendorf, Hanburg, Alemanya) per assegurar que no quedava líquid per les parets del tub. La restrotranscripció pròpiament dita es va dur a terme en al Termociclador (GeneAmp® System 2700; AppliedBiosystems, USA). Les condicions de retrotranscripció eren les que es descriuen a laTaula 7:

| | Pas 1 | Pas 2 | Pas 3 | Pas 4 |
|-------------|---------|----------|--------|----------|
| Temperatura | 25°C | 37°C | 85°C | 4°C |
| Temps | 10 min. | 120 min. | 5 min. | ∞ |

Taula 7. Condicions del termociclador per dur a terme la retrotranscripció de l'RNA a cDNA en les mostres d'AT i fetge.

Un cop finalitzada la retrotranscripció es van fer dues alíquotes de cada mostra i es van congelar a -80°C fins a la seva posterior utilització.

3.11.4 PCR en temps real

Fonament del mètode

Per dur a terme la PCR en temps real s'ha utilitzat la modificació que van fer Higuchi i col·laboradors [280] del mètode descrit per Saiki i col·laboradors [281]. Aquesta tècnica permet quantificar de forma relativa els nivells d'expressió dels gens estudiats. La tècnica ideada als anys 80 per Kary Mullis consisteix en realitzar còpies d'un determinat fragment de DNA d'entre 70 i 600 parells de bases, gràcies a l'acció de les DNA polimerases termoresistents (en el nostre cas la *Thermus aquaticus* o Taq), aquest procés també es coneix amb el nom d'amplificació del DNA.

L'amplificació del material genètic consta de 3 fases: inicialització, desnaturalització i hibridació i elongació. En la primera fase té lloc un augment de la temperatura fins a 95°C que permet activar l'enzim polimerasa. En la segona fase, que es realitza a 95-97°C, es separen les dues cadenes de material genòmic, ja siguin les d'RNA-cDNA obtingudes a la retrotranscripció o bé els complexos cDNA-cDNA obtinguts als successius passos de la PCR. En la tercera fase s'utilitzen uns encebadors específics (el directe o 5'→3' i el revers 3'→5') del gen que es vol estudiar. Aquests tenen una seqüència complementària del gen d'interès i s'uneixen a la cadena motllo de cDNA mitjançant unions estables de ponts d'hidrogen; per que aquest pas tingui lloc és necessari que la temperatura estigui entre 56 i 60°C.

Un cop formats els complexos de doble cadena, aquests són reconeguts per la polimerasa i l'enzim pot començar a sintetitzar DNA. Els encebadors actuen com a límit de la regió a amplificar, de manera que durant l'elongació, la polimerasa sintetitza el fragment de DNA que es troba entre els dos encebadors.

Les fases dos i tres es repeteixen un total de 40 vegades o cicles (Ct); d'aquesta manera s'obté una amplificació exponencial del material genètic en qüestió.

L'avantatge de la PCR en temps real és que permet monitorar l'amplificació del cDNA a mesura que aquesta té lloc. En el nostre cas, això és possible gràcies a la tecnologia de les sondes TaqMan. Aquestes sondes són fragments de 18 a 22 parells de bases complementaries al gen d'interès que hibriden entre els dos encebadors. Les sondes porten unit a l'extrem 5' un fluoròfor (fluoresceïna o FAM, en el nostre cas) i a l'extrem 3' un silenciador (rodamina o TAMRA, en el nostre cas), de manera que mentre la sonda romangui intacta, la transferència d'energia de ressonància Forster (FRET) del fluoròfor és captada pel silenciador i no s'emet senyal fluorescent. Durant la PCR, la Taq polimerasa replica la cadena a la que s'ha unit la sonda i, gràcies a l'activitat 5'→3' exonucleasa de la Taq, la sonda és degradada, el silenciador s'allunya del fluoròfor i la fluorescència d'aquest pot ser detectada per l'aparell. Aquesta tècnica es realitza en termocicladors adaptats per poder captar fluorescència.

La fluorescència augmenta en cada cicle de forma proporcional a la taxa de degradació de les sondes, que alhora és equivalent a la quantitat de cDNA específic del gen estudiat present a la mostra.

Pacients, Materials i Mètodes

Reactius/ Material específic

- Aigua bidestil·lada estèril
- Gene Expression Master Mix 2x (Applied Biosystems; USA). Components del kit:
 - AmpliTaq Gold DNA polimerasa ultrapura
 - dNTP (10 mM de cadascun)
 - Referència passiva ROX

NOTA: tot el material que es fa servir ha de ser estèril i lliure d'RNAases.

- Targetes TLDA (Applied BioSystems; USA) amb encebadors liofilitzats (Taula 8 i Taula 9)

| Nom de la proteïna | Nom del gen | Referència | Longitud |
|---|--------------|---------------|----------|
| Leptina | Ob | Hs00174877_m1 | 74 |
| Adiponectina | AdipoQ | Hs00605917_m1 | 71 |
| Lipoproteïna lipasa (LPL) | LPL | Hs00173425_m1 | 103 |
| Triacilglicerol lipasa de l'adipós (ATGL) | PNPLA2 | Hs00386101_m1 | 116 |
| Lipasa sensible a hormones (HSL) | LIPE | Hs00943410_m1 | 71 |
| 11 β hidroxid esteroid deshidrogenasa 1 | HSD11B1 | Hs00194153_m1 | 77 |
| Receptor de glucosa 4 | GLUT4 | Hs00168966_m1 | 89 |
| Aquaporina 7 | AQP7 | Hs00357359_m1 | 103 |
| Proteïna d'unió a àcids grassos 4 | FABP4 | Hs01086177_m1 | 96 |
| Receptor d'insulina | IR | Hs00961560_m1 | 91 |
| Sintasa d'òxid nítric 3 (endotelial) (eNOS) | NOS3 | Hs01574659_m1 | 107 |
| Sintasa d'òxid nítric 2 (induïble) (iNOS) | NOS2 | Hs01075529_m1 | 67 |
| Cluster de diferenciació 36 o Translocasa d'àcids grassos | CD36/FAT | Hs00354519_m1 | 83 |
| Interleuquina 6 | IL6 | Hs00174131_m1 | 95 |
| Factor de necrosi tumoral α (TNF α) | TNF α | Hs00174128_m1 | 80 |
| Activador de l'inhibidor del plasminogen tipus 1 (PAI1) | SERPINE1 | Hs01126606_m1 | 79 |
| Hypoxantina fosforibosiltransferasa 1 | HPRT1 | Hs99999909_m1 | 100 |
| Gliceraldehid 3 fosfat deshidrogenasa | GAPDH | Hs99999905_m1 | 122 |
| Importina 8 | IPO8 | Hs00183533_m1 | 71 |

Taula 8. Gens analitzats a l'AT. En la primera columna apareix el nom del gen, en la segona l'acrònim daquest, en la tercera la referència dels encebadors i en la quarta la longitud del fragment amplificat. Els tres darrers gens es van proposar com a controls.

Pacients, Materials i Mètodes

| Nom de la proteïna | Nom del gen | Referència | Longitud |
|---|--------------|---------------|----------|
| Lipoproteïna lipasa (LPL) | LPL | Hs00173425_m1 | 103 |
| Lipasa hepàtica (HL) | LIPC | Hs00165106_m1 | 78 |
| Triacilglicerol lipasa de l'adipós (ATGL) | PNPLA2 | Hs00386101_m1 | 116 |
| Receptor de lipoproteïnes de baixa densitat | LDLR | Hs01092525_m1 | 116 |
| Apolipoproteïna B | APOB | Hs01071205_m1 | 100 |
| 3-hidroxi3-metilglutaryl-Coenzim A reductasa | HMGCR | Hs00168352_m1 | 67 |
| Citocrom P450, família 7, subfamília A, polipèptid 1 | CYP7A1 | Hs00167982_m1 | 66 |
| Receptor escombriaire de classe B, membre 1 | SCARB1 | Hs00969818_m1 | 104 |
| Sintasa d'òxid nítric 3 (endotelial) (eNOS) | NOS3 | Hs00167166_m1 | 80 |
| Sintasa d'òxid nítric 2A (induïble) (iNOS) | NOS2A | Hs00167248_m1 | 74 |
| Cluster de diferenciació 36 o Translocasa d'àcids grassos | CD36/FAT | Hs01567186_m1 | 126 |
| Factor de necrosi tumoral α | TNF α | Hs00174128_m1 | 80 |
| Carnitina palmitoil transferasa 1A | CPT1A | Hs00157079_m1 | 85 |
| Activador de l'inhibidor del plasminogen tipus 1 (PAI1) | SERPINE1 | Hs01126606_m1 | 79 |
| 11 β hidroxi esteroïd deshidrogenasa 1 | HSD11B1 | Hs00194153_m1 | 77 |
| Interleucina 6 | IL6 | Hs00174131_m1 | 95 |
| 60S Proteïna ribosomal àcida P0 | RPLP0 | Hs99999902_m1 | 105 |
| Gliceraldehid 3 fosfat deshidrogenasa | GAPDH | Hs99999905_m1 | 122 |
| Ciclofilina A | PPIA | Hs99999904_m1 | 98 |

Taula 9. Gens analitzats al fetge. En la primera columna apareix el nom del gen, en la segona l'acrònim daquest, en la tercera la referència dels encebadors i en la quarta la longitud del fragment amplificat. Els tres darrers gens es van proposar com a controls.

En aquestes targetes s'han triat aquells gens que ens permetien estudiar les vies metabòliques (lipídiques i glucídiques) dels teixits, així com alguns dels gens que hem considerat importants en el desenvolupament de les comorbilitats associades a l'obesitat.

NOTA: Taqman disposa de diversos tipus d'encebadors, en el nostre cas s'han fet servir el de tipus m (els encebadors pertanyen a exons diferents i les sondes estan formades per material genètic dels dos exons, de manera que s'evita l'amplificació de DNA genòmic).

Pacients, Materials i Mètodes

Procediment

Per dur a terme l'anàlisi de l'expressió gènica en els diferents teixits (AT i fetge) mitjançant la PCR en temps real, es van fer servir les TLDA (Taqman Low Density Array).

- Les mostres es van diluir en aigua bidestil·lada estèril fins a una concentració de 20 ng/μL.
- Es van barrejar 55 μL de la mostra diluïda amb 55 μL de la Gene Expression *Master Mix* i es van carregar 100 μL de la barreja a cada canal de la TLDA. Tot seguit, es van centrifugar les plaques durant 1 minut a 330 xg (multifuga 3L Heraeus) dues vegades, per que es distribuís la barreja de mostra i Màster Mix per tots els pouets de la TLDA. Es van segellar les TLDA amb l'ajut del segellador de plaques TLDA d'Applied BioSystems. Finalment, es van col·locar les plaques al termociclador AbiPrism 7900 Sequence Detector System (Applied BioSystems, USA) i es va seguir el programa descrit a la Taula 10:

| | Fase 1 | Fase 2 | Fase 3 | Fase 4 |
|--------------------|--------|---------|-----------|--------|
| | | | 40 cicles | |
| Temperatura | 50°C | 95°C | 97°C | 59.7°C |
| Temps | 2 min. | 10 min. | 30 segons | 1 min. |

Taula 10. Condicions per dur a terme la PCR en temps real en les mostres d'AT i fetge.

Càlculs

$$2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-[(C_{T\ GP} - C_{T\ GH})_{tractat} - (C_{T\ GP} - C_{T\ GH})_{control}]}$$

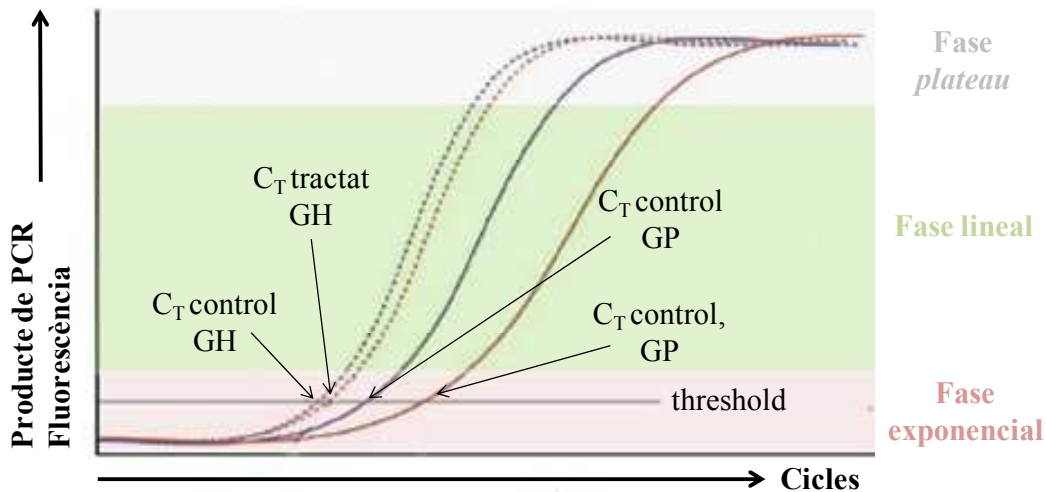


Figura 23. Bases matemàtiques del mètode $2^{-\Delta\Delta CT}$. Aquest mètode permet la quantificació relativa (la mostra "tractament" és X vegades la mostra "control") mitjançant la mesura dels cicles que creuen la línia de llindar o threshold. Les diferències comparatives entre el gen d'interès i el gen control o *housekeeping* per cada mostra permeten la comparació entre mostres. A destacar que els gens control (línies puntejades) no varien de C_T de forma significativa amb el tractament. GH, gen *housekeeping* o control; GP gen problema. Adaptat de Vanguilder H. D. i col·laboradors [282].

Pacients, Materials i Mètodes

Amb aquesta tècnica s'obtenen, per a cada mostra, gràfiques similars a la de la Figura 23. A partir d'aquestes gràfiques s'estableix un llindar de fluorescència (*threshold*); és a dir, a partir d'on es considera que la fluorescència detectada és superior al soroll de fons. El cicle en el que la fluorescència detectada a les mostres creui aquest llindar és el que anomenem Ct.

El mètode més utilitzat a l'hora de realitzar l'anàlisi de les dades obtingudes en una PCR en temps real és l'anomenat $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [283]. Aquest mètode requereix que es compleixin dues condicions: per una banda assumeix que l'eficiència de la reacció és del 100% per a tots els gens, és a dir, que a cada cicle la quantitat de cDNA es duplica. Aquesta circumstància es compleix, en el cas del gens TaqMan, per a fragments d'amplificació menors de 150 parells de bases. Per altra banda, és necessària l'existència d'un gen control endogen, també conegut com a gen *housekeeping*. El tret diferencial d'aquest gen és que els seus nivells d'expressió s'han de mantenir constants, independentment de les condicions experimentals (tractaments a comparar, teixits entre els que comparar, etc.).

Inicialment es partia de tres gens candidats a gens control per teixit, en el cas del fetge eren GAPDH, RPLP0 i PPIA i en el cas de l'AT eren GAPDH, HPRT i IPO8. Per establir quins gens s'utilitzarien com a controls es van mirar les seves C_T en les diferents situacions estudiades i la desviació estàndard que aquestes presentaven.

Els resultats obtinguts van ser els que es mostren a la Taula 11:

| | C_T Fetge | | | | C_T AT | | |
|----------------|-------------|-------|-------|----------------|----------|-------|-------|
| | RPLP0 | GAPDH | PPIA | | HPRT1 | GAPDH | IPO8 |
| Ob | 24,36 | 24,47 | 23,57 | SAT Ob | 28,50 | 23,86 | 27,88 |
| | | | | SAT 6M | 28,60 | 24,19 | 28,15 |
| 12M | 25,05 | 25,44 | 24,09 | SAT 12M | 28,67 | 24,26 | 28,12 |
| | | | | VAT Ob | 28,75 | 24,04 | 27,89 |
| C | 24,97 | 25,37 | 24,36 | SAT C | 29,08 | 24,55 | 28,37 |
| | | | | VAT C | 29,18 | 24,58 | 28,30 |
| Mitjana | 24,79 | 25,09 | 24,01 | Mitjana | 28,80 | 24,25 | 28,12 |
| SD | 0,38 | 0,54 | 0,40 | SD | 0,27 | 0,28 | 0,20 |

Taula 11. Relació de Ct obtingudes per als tres gens control, en cada teixit i per a cada situació. AT, teixit adipós; Ob, mostres pertanyents al grup d'obesos a l'inici de l'estudi; 12M, mostres pertanyents al grup d'obesos 12 mesos després de la intervenció; C mostres pertanyents al grup control; SAT, teixit adipós subcutani; VAT, teixit adipós visceral.

Es van donar per vàlids aquells gens que presentaven una desviació estàndard inferior al 0.5%. Així doncs, per realitzar l'estudi d'expressió es van triar els següents gens control per a cada teixit:

- **Fetge:** RPLP0 i PPIA
- **AT:** HPRT, GAPDH i IPO8

Pacients, Materials i Mètodes

En el cas del gen GAPDH, els fabricants de les TLDA l'afegeixen com a control positiu de les plaques, per tant s'havia d'incloure obligatòriament en el disseny d'aquest tipus de plaques.

Com que les mostres es van processar per duplicat, el primer que es va fer va ser calcular les mitjanes de les C_T per a cada gen. Un cop es tenen les mitjanes, es resten les C_T del gen problema menys les C_T del gen control endogen, per obtenir l'increment de C_T respecte el gen control (ΔC_T). Tot seguit, es calcula l'antilogaritme, per convertir les dades exponencials en lineals, és a dir que es calcula el $2^{-\Delta C_T}$ per a cada mostra i a continuació, es calcula la mitjana del $2^{-\Delta C_T}$ per a cada grup. Finalment, es divideixen les mitjanes del $2^{-\Delta C_T}$ de cada grup entre la del grup control (aquell que es tria com a 100% de l'expressió). Si volem expressar els resultats en percentatge, cal multiplicar per 100 els valors obtinguts en el darrer càlcul.

3.12 Quantificació de DNA (mètode DABA)

Fonament del mètode

Per a la determinació del DNA total en teixit s'ha utilitzat un mètode fluorimètric basat en el descrit per Vytasek i col·laboradors [284]. Un cop homogeneïtzades les mostres, es realitza una hidròlisi en medi àcid per alliberar les riboses i les desoxiriboses dels àcids nuclèics. Amb un canvi de pH, les desoxiriboses presents a la mostra reaccionen de forma específica amb l'àcid 3-5-diaminobenzoic (DABA) per formar un compost fluorescent que absorbeix a una longitud d'ona de 410 nm i emet a 520 nm. La concentració del compost fluorescent és proporcional al contingut de DNA de la mostra.

Reactius

- NaOH 1 M (Panreac)
- NaOH 0.2 M (Panreac)
- NaOH 5 mM (Panreac)
- Na_2CO_3 10 mM (Panreac) en NaOH 1M
- DABA 20% en aigua destil·lada (ICN Biomedicals)
- DNA de tim de vedella 1 mg/mL en Tris-HCl pH 7.6 (Sigma)
- HClO_4 60 % (v/v) 1 M (Panreac)
- HCl 1M (Panreac)

Procediment

Preparació de mostres

Teixits: tant en el cas dels AT com en el cas dels fetges es va fer un homogenat tal i com s'indica a l'apartat 2.5.

Anàlisi de mostres

- Es va preparar la patró a partir de la solució mare de DNA de tim de vedella 1 mg/mL, fent un banc de dilucions en NaOH 0.2 M a les següents concentracions: 0, 10, 20, 30, 40, 50 i 60 μg DNA/mL.

Pacients, Materials i Mètodes

- Com a mínim una hora abans d'utilitzar-la, es va preparar la barreja de reacció barrejant 1 volum de DABA 20% amb 3 volums de Na₂CO₃ 10 mM en NaOH 1M, tenint en compte que calen 200 µL per a cada tub de mostra.
- En el cas de la patró es van pipetejar 100 µL de cada punt per duplicat en tubs eppendorf. En el cas de les mostres, 20 µL de l'homogenat més 80 µL de NaOH 0.2 M per duplicat. Tot seguit, es van afegir 100 µL d'HClO₄ 1 M a cada tub i es van incubar durant 20 minuts a 70°C en agitació moderada. Un cop transcorregut aquest temps, es van refredar els tubs en gel i es van afegir 200 µL de la barreja de reacció a cada tub. Es va incubar durant una hora, a 37°C en agitació moderada i es van centrifugar els tubs durant 4 minuts a 1200 xg a 25°C. Finalment, en tubs Corning de vidre en els que prèviament s'havia afegit 2.5 mL d'HCl 1M, es van passar 300 µL del sobrenedant i es va llegir la fluorescència emesa per l'estàndard i les mostres a 520 nm, utilitzant una longitud d'ona d'excitació de 410 nm al fluorímetre Shimadzu RF-5001 PC Spectrofluorophotometer (Shimadzu Europa GmbH; Duisburg, Alemanya).

Càlculs

Per poder donar els resultats en µg DNA/gram teixit cal aplicar la següent fórmula:

$$\frac{\mu g \text{ DNA}}{g \text{ teixit}} = \frac{\mu g \text{ DNA}}{mL \text{ homogenat}} \times \frac{mL \text{ homogenat} + g \text{ teixit}}{g \text{ teixit}}$$

Aquesta mesura dona una idea de la mida de les cèl·lules al teixit (assumint que el contingut de DNA per cèl·lula és constant).

El fet de tenir la quantitat de DNA per gram de teixit, també ens permet expressar els resultats del metabòlits i proteïnes obtinguts en teixit per µg de DNA, el que ve a ser una equivalència d'expressar els resultats per cèl·lula.

3.13 Determinació del HOMA-IR

Per a la determinació de la resistència a la insulina s'ha utilitzat el model matemàtic del HOMA-IR proposat per Matthews i col·laboradors [104]. Per poder aplicar aquest model s'utilitzen els valors de glucèmia (mg/dL) i insulinèmia (mUI/L) obtinguts després d'una nit en dejuni (s'han de fer tres determinacions consecutives a intervals de 5 minuts). Tot seguit s'aplica la següent fórmula:

$$HOMA - IR = \frac{\frac{mg}{dl} \text{ glucosa} \times \frac{mUI}{L} \text{ insulina}}{405}$$

Es considera que un HOMA-IR superior a 3.8 indica resistència a la insulina [105]. Per poder establir de forma clara una resistència a la insulina, aquest criteri s'ha de complementar amb altres paràmetres com són: glucosa en dejuni superior a 110 mg/dL i dos o més dels següents paràmetres; pressió arterial sistòlica (PAS)>140 mm Hg i diastòlica (DAS)>90 mm Hg; IMC>30 kg/m² i/o TAG > 150 mg/dL.

Pacients, Materials i Mètodes

3.14 Mètodes estadístics i suport informàtic

Els resultats de cada grup experimental s'expressen com a mitjana i error estàndard. Per estudiar l'existència de diferències significatives entre els diferents punts de presa de mostres primer de tot es va aplicar el test de normalitat de Shapiro-Wills per les dades de cada temps. En el cas de no complir normalitat es va fer una transformació logarítmica de les dades i es va repetir el test de normalitat.

En el cas de complir normalitat, per estudiar l'existència de diferències entre les mostres preses a diferents temps i les diferències entre aquests i el grup control es va realitzar una anàlisi de la variància (ANOVA) d'un factor (temps) amb un posttest de Tukey. En cas que les dades no s'ajustessin a una distribució normal es va realitzar una anàlisi no paramètrica de les dades aplicant el test de Kluskall-Wallis i un posttest de Dunns.

En el cas d'existir només dos temps a analitzar (com per exemple en el cas de les dades referents a l'AT visceral, diferències entre l'AT visceral i el subcutani o les dades hepàtiques), per determinar l'existència de diferències significatives entre els diferents grups es va realitzar un T d'Student en el cas que les dades s'ajustessin a una distribució normal i un test de Mann-Whitney si aquestes no s'ajustaven a una distribució normal. En ambdós casos, la comparació es feia de dades aparellades si es comparaven dos dipòsits grassos del mateix individu o de dades no aparellades en la resta dels casos.

El grau de significació s'indica amb una "o" si les diferències són respecte al grup obès; amb "1", "3", "6" i "9" si les diferències són respecte 1, 3, 6 o 9 mesos respectivament (taules de l'Annex II); amb una "c" si les diferències són respecte al control i amb una "x" si les diferències es troben entre l'AT subcutani i el visceral de l'obès. Finalment, el grau de significació s'indica amb un símbol si $p < 0.05$, dos símbols si $p < 0.01$ i tres símbols si $p < 0.001$.

Les correlacions (r) entre els diferents paràmetres s'han estudiat amb el test Pearson per a variables contínues.

Per a l'anàlisi de les dades estadístiques es va utilitzar el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software; California, EUA).

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Resultats i Discussió

Els resultats que es presenten a continuació corresponen a l'estudi realitzat en pacients amb obesitat mòrbida sotmesos a una operació de cirurgia bariàtrica per laparatomia del tipus bypass gàstric en Y-de-Roux a l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron. A aquests pacients se'ls va fer un seguiment des d'un mes abans de l'operació fins a 12 mesos després. Es van estudiar diversos paràmetres antropomètrics, així com aquells paràmetres relacionats amb el metabolisme glucídic i lipídic, i els paràmetres inflamatoris que es van considerar clau per fer el seguiment de les diferents comorbilitats associades a l'obesitat.

El grup estudiat està format per 34 individus amb obesitat mòrbida (24 dones i 10 homes) amb una mitjana d'edat de 45 ± 2 anys (de 21 a 61 anys). El 65% (22 individus) presentaven IR, dels quals el 46% tenien DM; el 65% (22 individus) patien algun tipus de dislipèmia, el 85% (29 individus) patien hipertensió arterial i el 97% (33 individus) patien NAFLD. Dels 34 pacients, el 82% (28 individus) tenien síndrome metabòlica (segons criteris del Consens 2009 [31], tant si es té en compte el perímetre de cintura proposat per l'IDF com el de l'NIH).

Sempre que ha estat possible, s'han comparat les dades obtingudes en els obesos amb les d'un grup d'individus control, en cas de no disposar d'aquestes dades, s'han comparat amb els límits de referència considerats normals per a cada paràmetre segons els mètodes emprats.

4.1 Paràmetres antropomètrics i greixos corporals

Per classificar els individus que participaven en l'estudi en funció del seu grau d'obesitat es van avaluar les següents mesures antropomètriques: pes corporal, BMI, percentatge d'excés de pes, perímetres de cintura i maluc i WHR.

4.1.1 Pes corporal

La primera mesura que tractarem és el **pes corporal** (Figura 24). A l'inici de l'estudi els pacients obesos tenien un pes mitjà de 130 ± 3.4 Kg. Després de la intervenció, el pes va anar disminuint de forma progressiva fins als 12 mesos de l'operació on la mitjana de Kg perduts va ser de 47.6 ± 2.1 Kg, fins assolir un pes corporal mitjà de 82.1 ± 2.9 Kg.

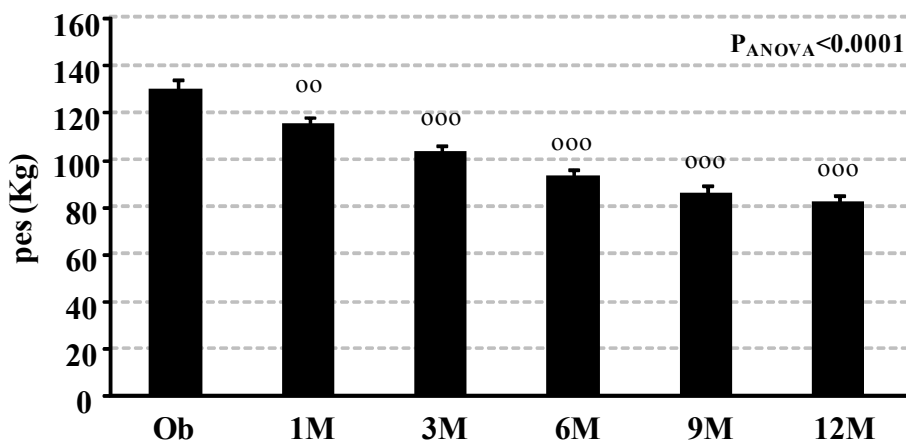


Figura 24. Evolució del pes en la població estudiada. Comparacions respecte a l'obès mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Un símbol $p < 0.01$ i tres símbols $p < 0.001$.

Resultats i Discussió

4.1.2 Índex de massa corporal

A partir de les mesures del pes, i tenint en compte l'alçada de cada individu, vam calcular el **BMI** (Figura 25). A l'inici de l'estudi la mitjana de BMI dels pacients es situava en $48.8 \pm 0.9 \text{ kg/m}^2$: el 44% tenien un BMI per sobre de 50 kg/m^2 ; el 50% el tenien entre 50 i 40 Kg/m^2 i només dos individus (6%) presentaven un BMI inferior a 40 Kg/m^2 .

Al primer mes, només dos pacients continuaven tenint un BMI per sobre de 50 Kg/m^2 . Als 12 mesos de l'operació hi va haver una disminució mitjana del BMI del 36%. En aquest punt, el 50% dels individus presentaven una obesitat moderada (tipus I i II), el 21% només patien sobrepès i el 12% havien aconseguit normalitzar el pes.

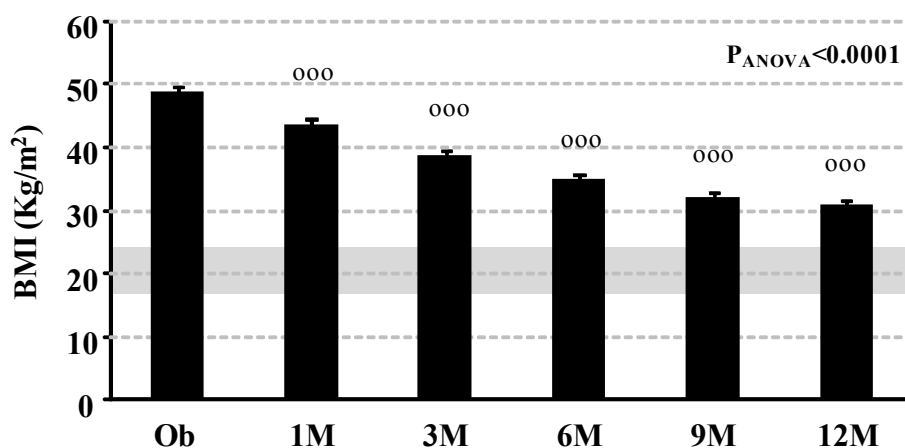


Figura 25. Evolució del BMI en la població estudiada. La zona ombrejada en gris correspon a un BMI de normopès. Comparacions respecte a l'obès mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Tres símbols $p < 0.001$.

Només hi va haver dos individus que a l'any de l'operació encara tenien el BMI per sobre de 40 Kg/m^2 , tot i així aquests havien aconseguit una reducció de BMI del 24% y del 30%, respectivament.

4.1.3 Percentatge d'excés de pes

Quan s'analitza el **percentatge d'excés de pes** (Figura 26) que presentaven els individus, es pot veure com a partir del sisè mes ja es va aconseguir reduir el percentatge d'excés de pes per sota del 50%. Aquesta dada és important perquè en l'àmbit clínic es considera que la cirurgia ha estat un èxit quan s'assoleixen valors d'excés de pes inferiors al 50% [236].

Els dos individus que als 12 mesos encara tenien un BMI per sobre de 40 Kg/m^2 no van aconseguir la reducció del percentatge d'excés de pes òptima, quedant-se en valors del 70 i del 79%, respectivament.

Resultats i Discussió

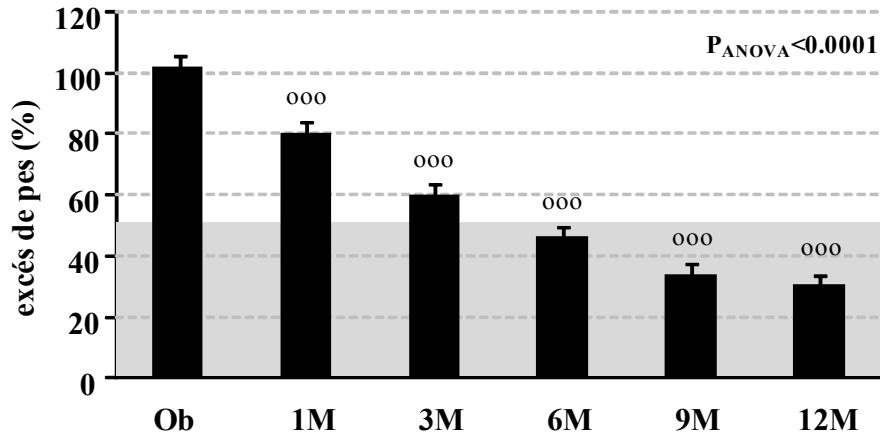


Figura 26. Percentatge d'excés de pes en la població estudiada. La zona ombrejada en gris correspon al percentatge a partir del qual es considera que una intervenció de pèrdua de pes per cirurgia bariàtrica ha estat un èxit. Comparacions respecte a l'obès mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Tres símbols $p < 0.001$.

4.1.4 Perímetre de cintura

Pel que fa al **perímetre de cintura** (Figura 27), a l'inici de l'estudi els individus presentaven un valor mitjà de 136.1 ± 2.3 cm, molt per sobre del que l'NIH considera com a líndar per establir obesitat central (102 cm en homes i 88 cm en dones). Al final de l'estudi es va aconseguir una disminució significativa de gairebé 38 cm, on el 35% dels individus (tenint en compte el gènere) havia aconseguir valors inferiors al líndar d'obesitat central.

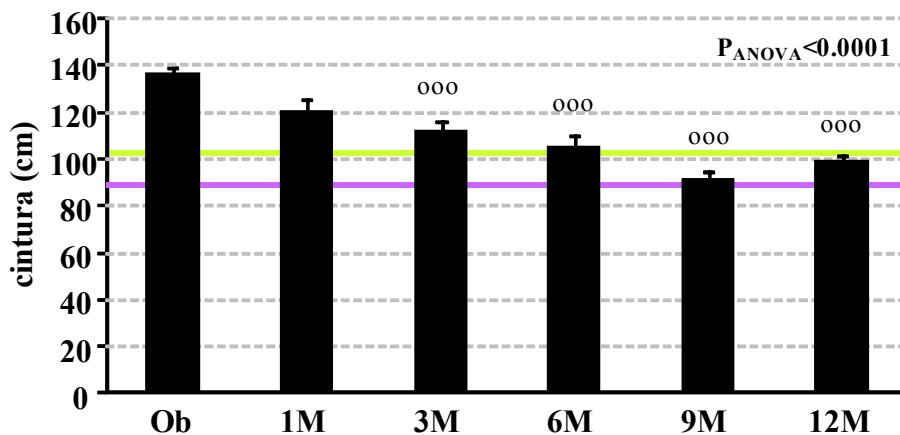


Figura 27. Evolució del perímetre de cintura en la població estudiada. Les línies verda i porpra corresponen al perímetre de cintura que l'NIH considera com a límit per definir obesitat central en homes i dones, respectivament. Comparacions respecte a l'obès mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Tres símbols $p < 0.001$.

4.1.5 Perímetre de maluc

El **perímetre de maluc** (Figura 28), que en un inici presentava un valor mitjà de 145.0 ± 2.3 cm, també va disminuir de forma significativa amb la cirurgia. Als 12 mesos el valor mitjà era de 117.8 ± 3.1 cm.

Resultats i Discussió

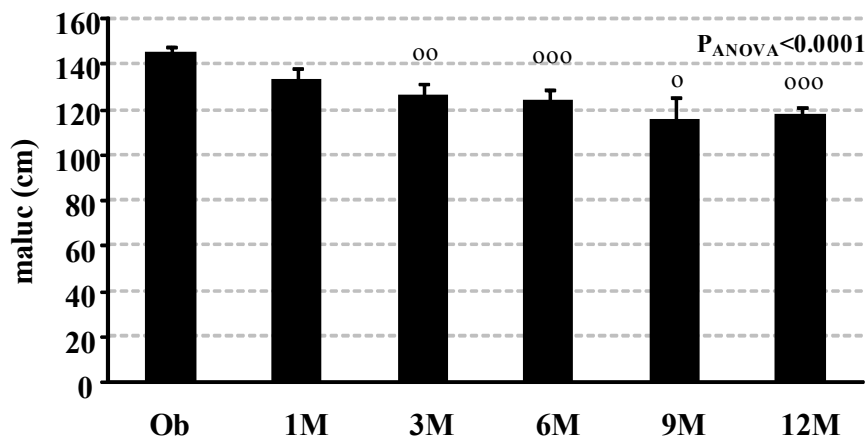


Figura 28. Evolució del perímetre de maluc en la població estudiada. Comparacions respecte a l'obès mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Un símbol $p < 0.05$, dos símbols $p < 0.01$ i tres símbols $p < 0.001$.

4.1.6 Índex cintura-maluc

A partir de tots dos perímetres vam calcular el **WHR** (Figura 29), paràmetre que ens permet establir el tipus d'obesitat (androide o ginoide). A l'inici de l'estudi els homes presentaven de mitjana un WHR de 1.01 ± 0.03 cm, mentre que el de les dones era de 0.93 ± 0.01 cm mostrant així una lleu tendència cap a l'obesitat de tipus androide en ambdós sexes [285]. Tot i que hi ha una disminució del WHR del 5% durant el període estudiat, i en conjunt l'ANOVA resulta significativa; no existeixen diferències significatives entre el WHR a l'inici i al final de tractament.

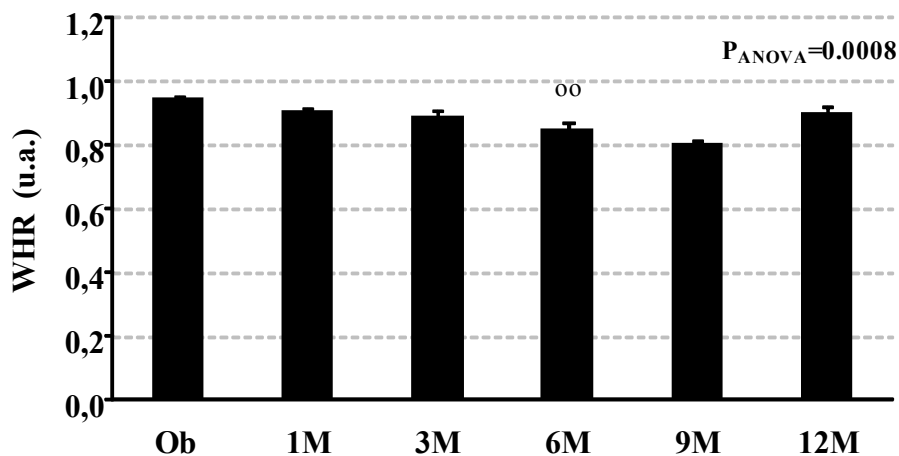


Figura 29. Índex cintura-maluc (WHR) de la població estudiada. Comparacions respecte a l'obès mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Dos símbols $p < 0.01$.

El BMI presenta una correlació positiva molt elevada ($p < 0.001$) tant amb el perímetre de cintura com amb el de maluc ($r = 0.88$ i 0.92 , respectivament); alhora també presenta una correlació positiva ($p < 0.05$) amb el WHR ($r = 0.25$).

4.1.7 Percentatge de greix corporal

Tot i que el BMI és el paràmetre més àmpliament acceptat per a la classificació i diagnòstic de l'obesitat, la seva precisió a l'hora de detectar un excés d'adipositat en la població general adulta és limitada. Per a un mateix BMI existeix una variabilitat

Resultats i Discussió

interpersonal significativa en el percentatge de greix corporal, sobretot en els casos de BMI per sobre de 30 Kg/m² [286]. A més, el BMI no pot reflectir les diferències en l'adipositat regional o tenir en compte l'efecte d'un augment de la massa muscular [98]. És per això que també s'estudien els greixos corporals.

Diversos autors [32, 33, 287, 288] han proposat fórmules per estimar el percentatge de greix corporal a partir de mesures antropomètriques com ara l'alçada, el pes, el BMI, els perímetres de cintura, maluc o canell, i dels plecs cutanis de bíceps, tríceps, el suprailíac i el subescapular. Per a les estimacions del greix corporal, en aquest treball s'ha triat la fórmula de Deurenberg [32], que utilitza el BMI i té en compte l'edat i el sexe de l'individu.

En el cas dels nostres pacients, el **percentatge de greix corporal** mitjà (Figura 30) a l'inici de l'estudi era del 60.3%±0.6, i va anar disminuint progressivament fins que als 12 mesos era del 39.1%±1.6. Si tenim en compte el sexe, a l'inici de l'estudi els homes presentaven un percentatge de greix corporal del 49.7%±2.0, mentre que per a les dones era del 64.8%±1.3. En tots dos sexes aquest paràmetre va anar disminuint fins arribar a valors del 31.1%±2.1 en els homes i 42.5%±1.5 en les dones; és a dir, que va haver una reducció del 37% en els homes i del 34% en les dones.

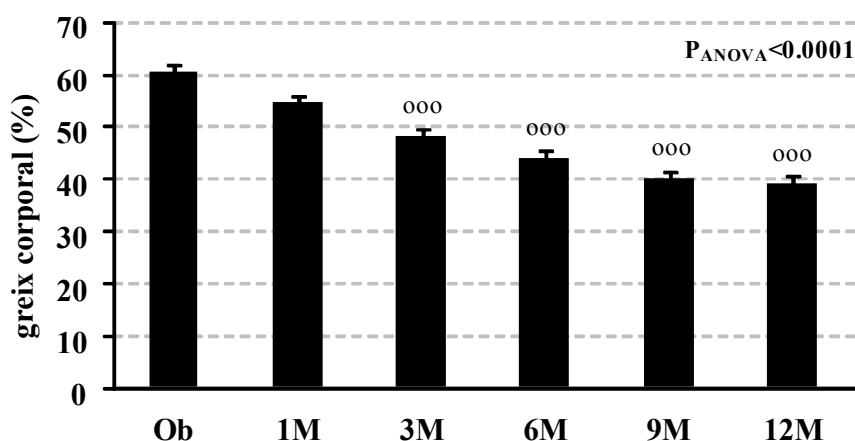


Figura 30. Percentatge de greix corporal segons la fórmula de Deurenberg. Comparacions respecte a l'obès mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Tres símbols p<0.001.

El percentatge de greix corporal correlaciona de forma positiva ($p < 0.001$) amb el pes ($r = 0.45$), el BMI ($r = 0.74$) i amb els perímetres de cintura ($r = 0.68$) i maluc ($r = 0.80$); en canvi no presenta cap correlació amb el WHR.

4.1.8 Distribució dels greixos corporals

De la mateixa manera que amb el percentatge de greix corporal, també s'han descrit fórmules que permeten estimar la quantitat de greix que correspon al compartiment subcutani i al visceral a partir de paràmetres antropomètrics [34, 289-291]. En aquest treball s'han utilitzat les proposades per Bonora i col·laboradors [34], en les que per mesurar l'AT subcutani es té en compte el BMI, el perímetre de maluc i l'edat, i per mesurar el AT visceral s'utilitza el perímetre de cintura i l'edat.

Resultats i Discussió

Els resultats obtinguts amb les fórmules de Bonora es mostren a la Figura 31.

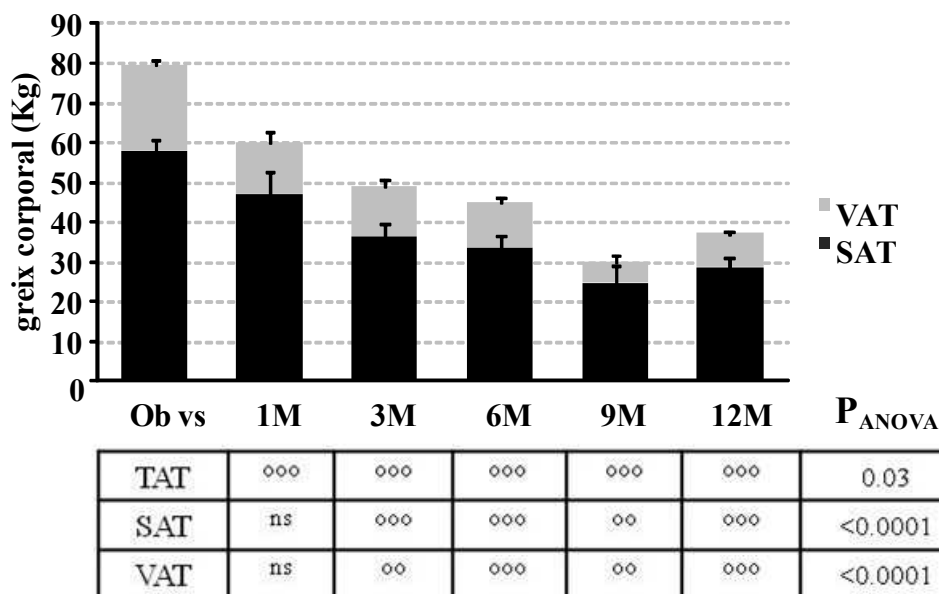


Figura 31. Pes de greix total, visceral i subcutani segons les fórmules de Bonora i col·laboradors. TAT, teixit adipós total; SAT, teixit adipós subcutani; VAT, teixit adipós visceral. En negre es mostren els Kg de greix subcutani i en gris els corresponents a greix visceral. La suma de tots dos representa els Kg de greix totals. Comparacions respecte a l'obès mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Dos símbols $p < 0.01$, tres símbols $p < 0.001$ i n.s., no significatiu.

En l'obès, l'AT subcutani representava aproximadament el 76% del greix corporal, mentre que el 24% restant correspondria al visceral. A l'inici de l'estudi, l'AT subcutani corresponia a un pes estimat de 58 ± 2.8 Kg i va anar disminuint fins als 28.4 ± 2.3 Kg al final de l'estudi (una reducció significativa del 51%). Per altra banda, l'AT visceral a l'inici del tractament tenia un pes estimat mitjà de 21.4 ± 1.3 Kg, i als 12 mesos de la intervenció de 4.4 ± 1.0 Kg (una reducció significativa del 79%).

La massa de greix subcutani es correlaciona de forma positiva ($p < 0.001$) amb el pes corporal ($r = 0.64$), el BMI ($r = 0.78$), els perímetres de cintura ($r = 0.63$) i maluc ($r = 0.71$) i amb els Kg de greix visceral ($r = 0.56$); cal destacar que el greix subcutani no correlaciona amb el WHR. Per altra banda, els Kg de greix visceral a més de correlacionar positivament ($p < 0.001$) amb el pes corporal ($r = 0.76$), els perímetres de cintura ($r = 0.72$) i maluc ($r = 0.47$), també ho fa amb el WHR ($r = 0.53$).

4.1.9 Discussió sobre paràmetres antropomètrics i greixos corporals

Hem pogut veure com després del RYGB el nostre grup de pacients ha perdut pes de forma progressiva, com a conseqüència de la disminució de la ingesta (deguda a la reducció del número de calories que ingereixen i la menor capacitat de l'estómac) i la reducció en l'absorció dels aliments ingerits (per l'escurçament de l'intestí). Aquesta pèrdua es dona tant als dipòsits de greix subcutani (reducció del perímetre de maluc i dels Kg d'AT subcutani) com als de greix visceral (reducció dels perímetre de cintura i dels Kg d'AT visceral).

Resultats i Discussió

Actualment el RYGB es considera la tècnica d'elecció per al tractament de l'obesitat mòrbida, ja que aconsegueix una pèrdua de pes de forma relativament ràpida i permanent. En estudis com el SOS [237] s'ha descrit que la màxima pèrdua de pes s'aconsegueix entre el primer i el segon any després de la intervenció, essent la pèrdua més alta del $32\pm 8\%$ aconseguida per RYGB, seguida d'un $25\pm 9\%$ obtinguda mitjançant VBG i d'un $20\pm 10\%$ l'aconseguida per GB [237]. Pel que fa a la durada de la pèrdua de pes, hi ha pocs estudis que hagin documentat els efectes de la cirurgia bariàtrica a llarg termini. De nou, a l'estudi SOS es mostra que la pèrdua de pes es va mantenir en el 74% dels individus transcorreguts 10 anys de la intervenció, sempre que els individus controlessin la dieta. Altres estudis on es realitzava un seguiment fins a 5 anys postoperació observen una recuperació de pes d'aproximadament el 8% en el 50% dels individus 2 anys després d'una operació de RYGB, independentment del sexe, l'edat i del BMI inicial; a partir d'aquell moment el pes s'estabilitza fins al final de l'estudi [292]. El percentatge de disminució del BMI que observem en els nostres individus és similar al descrit a la bibliografia per aquest tipus d'operació [65, 239, 293]. Passa el mateix amb el WHR, on es descriuen reduccions d'entre el 7 i el 9% [294, 295].

Donat que la classificació actual de l'obesitat basada en paràmetres antropomètrics no acaba d'avaluar correctament el risc per a la salut que comporta l'excés de pes, recentment Sharma i Kusher han proposat un nou sistema per classificar l'obesitat en 5 estadis diferents, l'*Edmonton Obesity Staging System* (EOSS) [296], que es basa en la morbiditat i en el perfil de risc per a la salut de cada individu per establir el risc de mortalitat provocat per l'excés d'adipositat. Actualment s'estan duent a terme estudis poblacionals per determinar la robustesa i eficiència del mètode, però sembla que la classificació que estableix encaixa millor amb el tipus de tractament que necessiten els pacients (a mesura que augmenta l'estadi cal un tractament més agressiu) [297, 298].

Inicialment es creia que la pèrdua de pes provocada pel RYGB es devia a que els aliments no entraven en contacte amb les secrecions biliopancreàtiques fins que no arribaven a la nansa comuna, i aquest fet provocava una malnutrició que portava associada la pèrdua de pes [230]. Tanmateix, s'ha vist que marcadors sèrics nutricionals com l'albumina o l'anàlisi de greixos fecals en aquest tipus de pacients són normals, de manera que, tot i que la intervenció inicialment provoca un cert grau de malabsorció (sobretot de ferro, vitamina D i B12) [224, 299], l'intestí s'adapta ràpidament a la nova disposició [300]. A més, en l'actualitat s'administren suplementos nutricionals que complementen la dieta i aporten tots aquells elements que podrien ser deficitaris en els obesos [236].

Així doncs, en la pèrdua de pes, a més de la malabsorció hi intervenen altres factors que actuen sinèrgicament. Un d'aquests factors és la restricció gàstrica que afavoreix l'aparició d'una sensació de sacietat primerenca, promovent d'aquesta manera ingestes més petites [230, 293]. D'altra banda, també s'ha observat que en els pacients sotmesos a aquest tipus de cirurgia es dona un canvi en les preferències alimentàries que contribuiria a la pèrdua de pes. Per exemple, l'aparició de la síndrome de *dumping* amb la ingesta d'aliments rics en sucres, desenvoluparia certa aversió per aquest tipus

Resultats i Discussió

d'aliments. A més, també hi ha estudis que descriuen que els individus sotmesos a RYGB experimenten canvis en la palatabilitat dels aliments [293].

Un darrer apunt sobre la pèrdua de pes mitjançant el RYGB és que en el cas dels nostres individus l'operació es realitzava per cirurgia oberta, mentre que actualment és molt més freqüent realitzar-la per laparoscòpia. Hi ha estudis que han demostrat que pel que fa a la pèrdua de pes, no hi ha diferències entre els dos tipus d'intervencions [301].

Pel que fa als greixos corporals, la fórmula emprada per al càlcul del percentatge de greix corporal té un valor de predicció del 79%; tot i que per BMI superiors a 30 kg/m² la fórmula sobreestima el percentatge de greix corporal, i la sobreestimació es fa estadísticament significativa a partir de BMI superiors a 33 Kg/m² [32], que serien la majoria de les nostres dades. Estudis posteriors al de Deurenberg han demostrat que altres fórmules com les de Lean i col·laboradors [33] presenten una major robustesa tot i tenir un valor predictiu inferior (78% en els homes i 70% en les dones). Tanmateix, les diferències entre els percentatges de greix corporal observats i els estimats en l'estudi de Deurenberg eren inferiors al 2% i els valors de predicció sempre es trobaven dins de l'interval de confiança del 95% [32]. A més, en el nostre cas, aquesta fórmula era la que ens permetia realitzar un major nombre d'estimacions. Segons un estudi dut a terme per Martin-Moreno i col·laboradors en el que es comparava el valor predictiu de diverses fórmules per estimar el percentatge de greix corporal en comparació amb la bioimpedància elèctrica, la fórmula emprada en aquesta tesi sobreestima el percentatge de greix corporal en un 1.8% [302].

A l'any 2000, en Gallagher i col·laboradors van establir uns rangs de normalitat pel percentatge de greix corporal fent concordar les estimacions de greix corporal obtingudes per DEXA amb la classificació d'obesitat a partir del BMI [303]. D'aquesta manera van establir que en el cas del homes el percentatge de greix saludable es troba entre el 8% i el 25%. A l'inici del tractament els nostres pacients es troben gairebé un 50% per sobre del que es consideraria saludable; al final de l'estudi, tot i que continuen presentant un excés de massa grassa es troben només un 20% per sobre. En el cas de les dones, el rang de percentatges que es considera saludable va de 21% a 38%. Així doncs, a l'inici del tractament es troben un 44% per sobre del valor desitjable i aquest excés es redueix fins al 15% a l'any de la intervenció. En resum, cap dels dos sexes aconsegueix reduir l'excés de massa grassa fins a nivells considerats saludables, però després d'un any de la intervenció aconsegueixen una reducció mitjana del 36% ($P_{ANOVA} < 0.0001$).

A la bibliografia, per a intervencions de bypass gàstric s'han descrit pèrdues del percentatge de massa grassa d'entre el 26% i el 60% (mesurades per bioimpedància i DEXA) [304, 305], de manera que la pèrdua que observem en els nostres pacients està dintre del rang descrit.

La fórmula emprada per al càlcul dels Kg de greix té un valor de predicció per l'AT subcutani del 87% tant en homes com en dones; mentre que pel visceral en homes és del 56% i en dones del 68% de manera que les fórmules tendeixen a sobreestimar les quantitats de visceral. Les fórmules han estat testades per BMI superiors i inferiors a 30 kg/m² sense que es veiés afectada la seva capacitat de predicció [34]. Altres autors, com

Resultats i Discussió

Bouza i col·laboradors [291] han descrit fórmules amb un valor de predicció superior pel que fa a l'AT visceral (62% en ambdós sexes), però al utilitzar-les es redueix el nombre d'estimacions que podem dur a terme en aquest treball. Tanmateix, les diferències entre els percentatges de greix al visceral obtinguts utilitzant les fórmules de tots dos autors no difereixen de forma significativa.

La relació entre l'AT subcutani i visceral es manté constatat al llarg de tot l'estudi, fet que també han descrit altres autors [306, 307]. Són nombrosos els autors que han descrit una major pèrdua d'AT visceral que de subcutani després de la intervenció, independentment del tipus d'intervenció que s'hagi fet per induir la pèrdua de pes (dieta, dieta i exercici, GB o RYGB) i de la tècnica que s'hagi emprat per obtenir les estimacions dels dipòsits grassos (tomografia computeritzada, ultrasonografia, ressonància magnètica, etc.) [306-309]. En el cas del RYGB, s'han descrit pèrdues a l'any de la intervenció al voltant del 70% per l'AT visceral i del 40% pel subcutani [306, 307, 309], valors similars als observats en el nostre grup de pacients. Matsuzawa i col·laboradors van proposar l'índex Kg d'AT visceral/Kg d'AT subcutani com a indicador d'obesitat abdominal en cas de ser superior a 0.4 [289]. En els nostres pacients és de 0.37 a l'inici de l'estudi i de 0.15 als 12 mesos de la intervenció, indicant una reducció de l'obesitat visceral dels individus.

4.2 Hormones reguladores de la ingesta

La ingesta (és a dir, l'entrada d'energia) i la seva regulació també són factors importants alhora d'estudiar la pèrdua de pes en una població d'obesos mòrbids. Així doncs, vam estudiar els nivells de les principals hormones/pèptids reguladores de la ingesta (leptina, grelina i adiponectina).

4.2.1 Leptina

En el nostre cas, els nivells de **leptina** (Figura 32) a l'inici de l'estudi eren de 36.9 ± 4.0 ng/mL, molt per sobre del que es consideren valors de referència per a aquest paràmetre ($1-15$ ng/mL). Només un mes després de la intervenció, els nivells de leptina es van reduir un 36% (23.8 ± 2.9 ng/mL); als 6 mesos la disminució respecte l'obès era significativa i als 9 mesos ja es trobaven dins del rang de normalitat (12.0 ± 1.7 ng/mL). Als 12 mesos de la intervenció, els nivells de leptina eren de 8.0 ± 1.4 ng/mL, un 78% més baixos en comparació a l'inici de l'estudi. En conjunt la reducció resulta estadísticament significativa.

La leptina en l'obès correlaciona positivament amb el percentatge de greix corporal ($p < 0.001$, $r = 0.61$), amb el BMI i el percentatge d'excés de pes ($p < 0.01$, $r = 0.47$ i $r = 0.45$, respectivament) i amb els Kg de greix total i subcutani ($p < 0.05$, $r = 0.37$ i $r = 0.46$, respectivament). Mentre que si tenim en compte tot el període estudiat, correlaciona de forma positiva ($p < 0.001$) amb el BMI ($r = 0.70$), els perímetres de cintura ($r = 0.55$) i maluc ($r = 0.64$), el percentatge d'excés de pes ($r = 0.61$), els Kg de greix corporal ($r = 0.61$), greix subcutani ($r = 0.66$) i greix visceral ($r = 0.38$) i tots els paràmetres relacionats amb el metabolisme glucídic: glucosa ($p < 0.05$, $r = 0.17$), insulina ($p < 0.01$, $r = 0.19$) i HOMA-IR ($p < 0.05$, $r = 0.18$). A més, la concentració plasmàtica de leptina

Resultats i Discussió

correlaciona de forma molt marcada amb la quantitat de lípid total a l'AT subcutani ($p < 0.001$, $r = 0.48$), però no amb la de l'AT visceral.

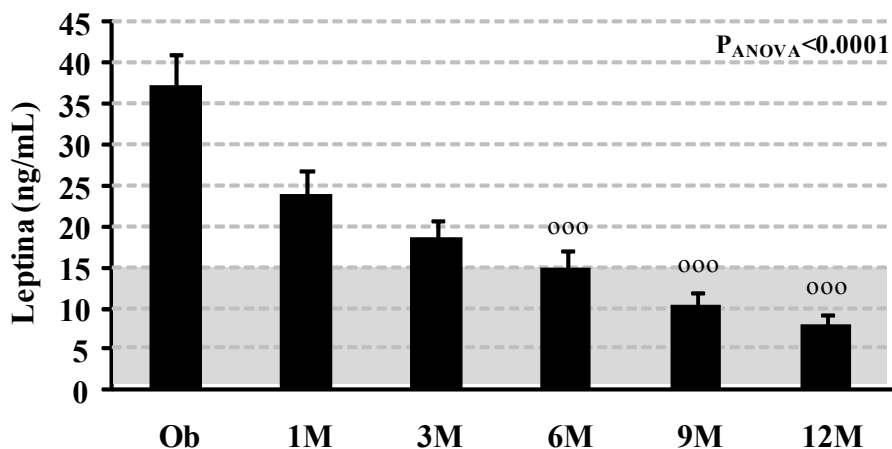


Figura 32. Concentració plasmàtica de leptina en la població estudiada. La zona ombrejada en gris indica el rang de normalitat. Comparacions respecte a l'obès mitjançant Kruskal-Wallis i posttest de Dunn. Tres símbols $p < 0.001$.

Si ens fixem en l'expressió gènica d'aquesta adipocitoquina a l'AT (Figura 33), veiem que en el cas del subcutani els nivells en l'obès es troben un 42% per sobre dels valors dels control. Passats 6 mesos de la intervenció, els valors a l'AT subcutani disminueixen un 46% i passen a ser similars als del grup control. En conjunt el descens es significatiu. Pel que fa al l'AT visceral, no s'observen diferències significatives respecte el grup control. Si comparem l'expressió de leptina entre els dos dipòsits grassos en l'obès veiem que aquesta és gairebé el doble a l'AT subcutani que a l'AT visceral ($p < 0.001$), mentre que no hi ha diferències en el grup control. L'expressió de leptina correlaciona amb la quantitat de lípid total per cèl·lula tant a l'AT subcutani com al visceral ($p < 0.05$, $r = 0.29$ i $r = 0.41$, respectivament).

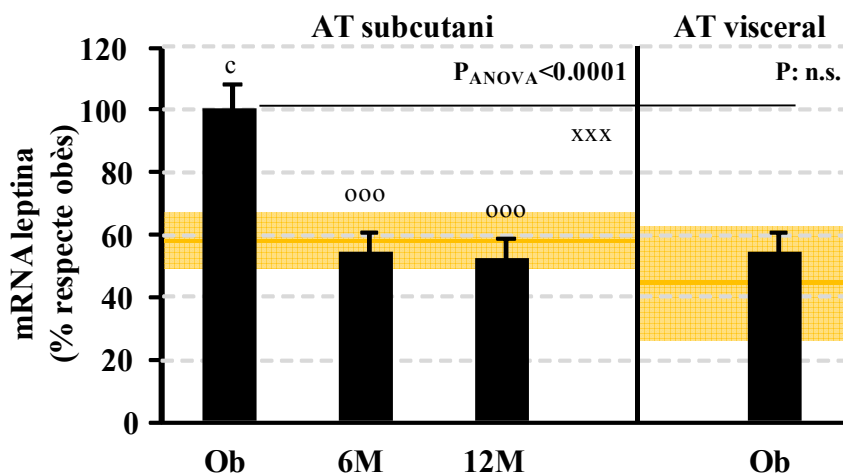


Figura 33. Expressió de leptina a l'AT subcutani i visceral de la població estudiada. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey; comparacions entre AT subcutani i visceral de l'obès (x) mitjançant t d'Student. Un símbol $p < 0.05$, tres símbols $p < 0.001$ i n.s., no significatiu.

Resultats i Discussió

Curiosament, en l'obès la leptina plasmàtica no correlaciona amb l'expressió del gen ni a AT subcutani ni a visceral. Si tenim en compte tot el període estudiat, la leptina plasmàtica es correlaciona amb l'expressió de la leptina a l'AT subcutani ($p < 0.01$, $r = 0.39$). Per altra banda, l'expressió de leptina a l'AT subcutani correlaciona millor que la leptina plasmàtica amb els nivells d'insulina ($p < 0.001$, $r = 0.42$) i amb el HOMA-IR ($p < 0.01$, $r = 0.37$).

4.2.2 Grelina

La grelina és un pèptid que se secreta principalment al fundus de l'estómac, tot i que també se n'ha vist expressió a glàndula pituïtària, hipotàlem, pàncrees, pulmó, cèl·lules immunitàries i ronyons. Sent un pèptid orexigènic, la seva funció principal a curt termini és la d'augmentar la ingesta i el pes corporal a través de l'estimulació del NPY i de l'AgRP (antagonitzant d'aquesta manera l'acció de la leptina). A llarg termini, la grelina regula el metabolisme energètic. A més, la grelina estimula l'alliberament d'hormona de creixement i indueix un augment de les concentracions sèriques d'hormona adrenocorticotropa (ACTH), cortisol, aldosterona i catecolamines [60].

Els valors mitjans de **grelina** a plasma (Figura 34) a l'inici de l'estudi eren de 70.7 ± 7.0 pg/mL, valors que es troben en la part baixa del rang de normalitat (50-250 pg/mL). Després de la intervenció, la concentració plasmàtica de grelina presentava una tendència a augmentar, sense arribar a ser significativa fins al dotzè mes, en el que els valors de grelina eren de 125.5 ± 13.0 pg/mL (un 77% més alts en comparació amb l'inici de l'estudi). En conjunt, l'augment resulta estadísticament significatiu.

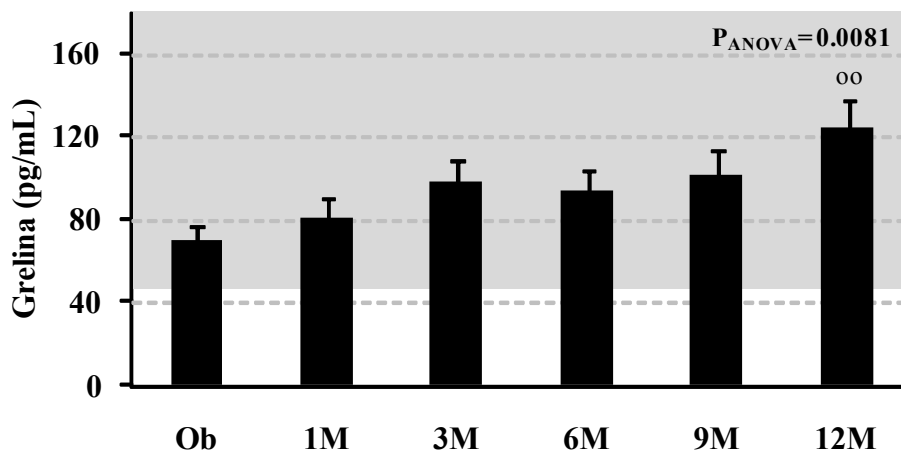


Figura 34. Concentració de grelina plasmàtica en la població estudiada. La zona ombrejada en gris indica el rang de normalitat. Comparacions respecte a l'obès mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Dos símbols $p < 0.01$.

La grelina, en el nostre cas, correlaciona ($p < 0.01$) negativament amb el BMI ($r = -0.21$) i els Kg de greix total ($r = -0.25$) i els de visceral ($r = -0.31$). També ho fa de forma menys significativa ($p < 0.05$) amb el pes corporal ($r = -0.18$), el percentatge d'excés de pes ($r = -0.19$), els Kg de greix subcutani ($r = -0.29$), la insulina ($r = -0.19$) i el HOMA-IR ($r = -0.17$). En canvi no presenta correlació amb la glucosa.

Resultats i Discussió

4.2.3 Adiponectina

Pel que fa als nivells d'**adiponectina** a plasma (Figura 35), a l'inici de l'estudi eren d' $11.2 \pm 1.0 \mu\text{g/mL}$, que tot i estar dins del rang de normalitat ($4.8\text{-}22.5 \mu\text{g/mL}$) eren estadísticament diferents ($p < 0.05$) dels obtinguts en el grup control ($18.1 \pm 2.3 \mu\text{g/mL}$). Els nivells d'adiponectina es mantenen constants durant el primer mes després de la intervenció i als 6 mesos d'aquesta s'observa un augment significatiu ($14.8 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$) que fa que els valors siguin més propers al grup control. Finalment, als 12 mesos, amb un increment del 82%, s'assoleixen diferències estadísticament significatives en comparació amb l'obès ($20.4 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$). En conjunt l'augment resulta estadísticament significatiu.

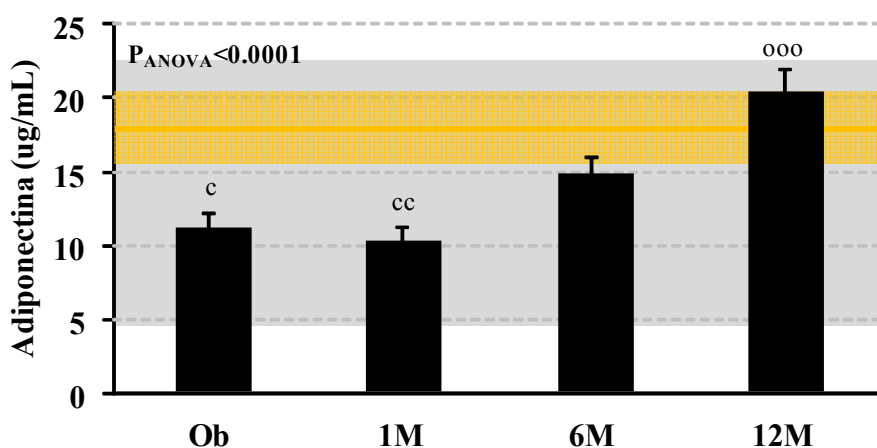


Figura 35. Concentració plasmàtica d'adiponectina en la població estudiada. La zona ombrejada en gris indica el rang de normalitat, la zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Un símbol $p < 0.05$, dos símbols $p < 0.01$ i tres símbols $p < 0.001$.

En l'obès, l'adiponectina no correlaciona amb cap dels paràmetres antropomètrics estudiats, fet que també han vist altres autors [67]. Tanmateix, tenint en compte tot el període estudiat, l'adiponectina correlaciona negativament ($p < 0.001$) amb el BMI ($r = -0.50$), el perímetre de cintura ($r = -0.53$), el percentatge d'excés de pes ($r = -0.40$) i els Kg de greix corporal ($r = -0.31$); també presenta una correlació més lleu ($p < 0.01$) amb el perímetre de maluc ($r = -0.45$) i la massa de greix visceral ($r = -0.42$); la massa de greix subcutani presenta una correlació encara més lleu ($p < 0.05$, $r = -0.29$).

Pel que fa als nivells d'expressió d'adiponectina (Figura 36), l'AT subcutani de l'obès presenta nivells d'expressió inferiors als del grup control, igual que amb l'adiponectina plasmàtica, tot i que no arriben a ser estadísticament significatius. Als 6 mesos de la intervenció, els nivells pugen fins a ser similars als controls. L'AT visceral de l'obès, expressa un 20% menys d'adiponectina ($p < 0.05$) en comparació amb el subcutani i no presenta diferències significatives en comparació amb el grup control.

Resultats i Discussió

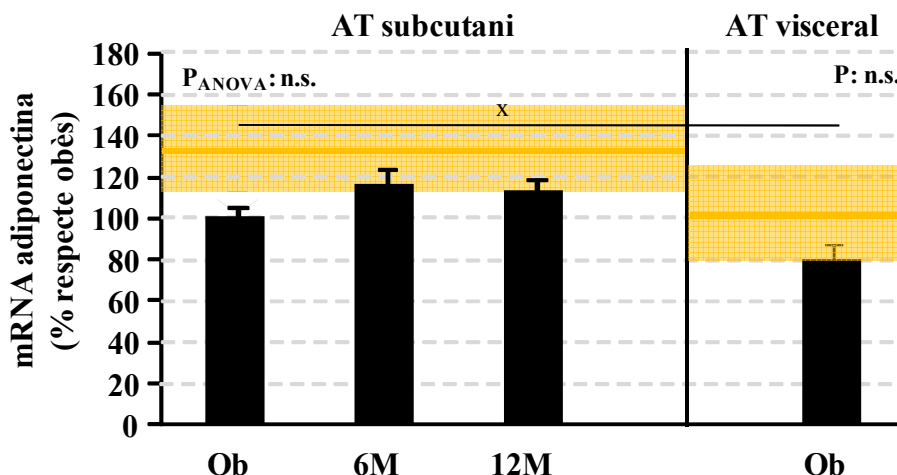


Figura 36. Expressió d'adiponectina a AT subcutani i visceral de la població estudiada. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte al control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey; comparacions entre AT subcutani i visceral de l'obès (x) mitjançant *t* d'Student. Un símbol $p < 0.05$ i n.s., no significatiu.

Tant si tenim en compte només l'obès com tot el període estudiat, l'adiponectina plasmàtica no correlaciona amb l'expressió d'aquesta adipocitoquina ni a l'AT subcutani ni al visceral. Les concentracions d'adiponectina plasmàtica correlacionen millor amb els paràmetres del metabolisme glucídic mesurats que no pas les mesures d'expressió. A diferència de la leptina, que presenta correlació amb la quantitat de lípid per cèl·lula ($p < 0.05$; $r = 0.29$ a l'AT subcutani i $r = 0.41$ a l'AT visceral), l'expressió d'adiponectina a l'AT no presenta cap correlació amb el lípid per cèl·lula en cap dels dos adiposos.

4.2.4 Discussió sobre les hormones reguladores de la ingesta

El grup d'obesos presenta els nivells de leptina, grelina i adiponectina alterats. Tot i que *a priori* la leptina és anorexigènica, els nivells en els obesos es troben incrementats, això podria estar indicant cert grau de resistència als efectes d'aquesta (de forma similar al que passa amb la insulina i la IR). Per contra, la grelina (orexigènica) presenta uns nivells en el rang baix de la normalitat fet que es podria interpretar com una resposta regulatòria de l'organisme per tal d'evitar les accions del pèptid (estimular la ingesta i reduir la utilització de lípids com a font d'energia). Pel que fa a l'adiponectina, la seva disminució podria estar reflectint una disfunció de l'AT (fenomen que observarem més endavant amb altres paràmetres), i al perdre's els seus efectes insulinosensibilitzadors, afavoreix l'aparició de la IR. Amb la pèrdua de pes, totes tres hormones normalitzen els seus valors.

S'ha descrit que una concentració de leptina elevada no evita l'obesitat, és a dir, que l'obesitat no és conseqüència d'un dèficit de leptina sinó més aviat de certa resistència a les accions d'aquesta, ja que la hiperleptinèmia no és capaç de normalitzar la massa adiposa [310, 311]. Així doncs, nombrosos autors han descrit que amb l'obesitat els nivells de leptina augmenten de forma considerable [61, 62, 67, 312]. De

Resultats i Discussió

la mateixa manera que nosaltres, hi ha autors que també han descrit un descens en els nivells d'aquesta adipocitoquina després d'una intervenció per perdre pes [62, 67], en alguns casos fins i tot per sota dels nivells de normalitat. El fet que els nivells de leptina siguin normals, tot i que els individus encara tenen una massa de greix elevada, concorda amb els efectes que té un balanç energètic negatiu sobre la producció de leptina, independentment del grau d'adipositat [313].

Els efectes que la leptina té sobre el metabolisme són controvertits ja que per una banda s'ha vist que a nivell del sistema nerviós central la leptina afavoreix o mimetitza els efectes de la insulina (l'administració de leptina en animals ob/ob o db/db reverteix la IR [314]), però a nivell perifèric la leptina contraposa els efectes lipogènics i glicogènics de la insulina, alhora que augmenta l'oxidació de NEFA [315]. A més, recentment s'ha demostrat que existeix un encreuament en les vies de senyalització de la leptina i la insulina [315].

Es creu que en el cas dels obesos s'estableix una resistència a la leptina a nivell del sistema nerviós central degut a que el transport d'aquesta adipocitoquina cap al cervell està mediat per un transportador saturable i com a conseqüència d'això n'augmenten els nivells [315]. Això fa que els efectes de la leptina a nivell central, on l'hormona és proinsulínica, es trobin atenuats, és a dir no hi ha una bona inhibició de la ingesta ni un bon control de la termogènesi, disminuint la taxa metabòlica basal. En canvi, la sensibilitat vers la leptina a nivell perifèric, on l'hormona té efectes antiinsulínics no es trobaria alterada, pel que els efectes antiinsulínics es veurien potenciats (s'inhibiria la secreció d'insulina a les cèl·lules β -pancreàtiques i s'estimularia l'oxidació d'àcids grassos a múscul) [315].

Els nivells baixos de grelina en els pacients obesos han estat àmpliament descrits en la bibliografia [60, 316]; a més aquest tipus de pacients no mostren els pics de grelina previs als àpats, i els nivells d'hormona no disminueixen després d'una ingesta [60, 316].

Hi ha autors que han descrit una disminució de la concentració plasmàtica de la grelina activa als sis mesos d'un RYGB [317]. Nosaltres en canvi, tot i que només s'ha deixat la part de l'estómac més propera a l'esòfag i pràcticament s'ha aïllat la totalitat del fundus del contacte amb els aliments, hem vist que les concentracions de grelina no només no disminueixen, sinó que augmenten de forma significativa als 12 mesos de la intervenció. Una possible explicació és que la secreció d'aquest pèptid augmenti en els teixits extragàstrics, tal i com han suggerit alguns autors [318]. Aquest augment podria estar regulat per un balanç energètic negatiu més que pel pes corporal o per la quantitat de greix; ja que s'ha observat un augment en la concentració plasmàtica de grelina tant en pacients sotmesos a dieta per perdre pes, com en aquells pacients sotmesos a bypass gàstric que presenten pèrdua de pes [62].

Pel que fa a la implicació de la grelina en el metabolisme lipídic, s'ha descrit que la grelina pot modular el metabolisme perifèric dels lípids a l'AT a través del sistema nerviós simpàtic estimulant gens lipogènics (LPL, sintasa d'àcids grassos) i inhibint l'expressió d'enzims clau de l'oxidació dels greixos com la CPT1 [319], però com

Resultats i Discussió

veurem més endavant (Figura 60), nosaltres no hem observat aquest tipus de regulació sobre l'LPL de l'AT. Pel que fa a la implicació d'aquest pèptid en l'homeòstasi de la glucosa no hi ha una postura clara. Hi ha autors que defensen que la grelina disminueix la secreció d'insulina [320], que l'augmenta [321], i fins i tot, hi ha autors que defensen que l'efecte de la grelina sobre la secreció d'insulina depèn de la concentració de l'hormona [322]. Fins i tot hi ha autors que han proposat que la proporció entre grelina acilada i desacilada seria la clau per a la regulació, així en els obesos s'observarien valors de grelina total i desacilada baixos i de grelina acilada relativament elevats, el que portaria a una situació d'IR [323], mentre que després d'una intervenció de bypass gàstric els valors de grelina acilada disminuirien [317, 324] i els de grelina total i desacilada podrien mantenir-se constants o augmentar, afavorint la sensibilització a la insulina [325, 326].

Pel que fa a l'adiponectina, se n'han descrit nivells baixos en DM, malaltia cardiovascular, hipertensió arterial, síndrome metabòlica [63] i obesitat [64, 327], tot i que el mecanisme que els regula encara es desconeix. Hi ha autors que han descrit que una pèrdua de pes d'aproximadament el 10% és suficient per començar a veure canvis en la concentració plasmàtica d'adiponectina [65]. Els nostres pacients assoleixen aquesta pèrdua de pes al mes de la intervenció, però els nivells d'adiponectina encara continuen baixos. En el nostre cas, els canvis en la concentració d'adiponectina no es fan palesos fins que la pèrdua de pes és aproximadament d'un 30% (sisè mes postintervenció).

Cal destacar que en els nostres pacients, la concentració d'adiponectina a plasma correlaciona millor amb el greix visceral que amb el subcutani, alhora que guarda una bona correlació amb el HOMA-IR. Aquest fet ha portat a alguns autors a plantejar-se que aquesta adipocitoquina pugui ser un bon indicador de síndrome metabòlica o d'alguns dels paràmetres que caracteritzen aquesta síndrome [328]. Cal destacar que tot i que el HOMA-IR presenta una bona correlació amb l'adiponectina, la concentració plasmàtica d'aquesta augmenta molt més lentament del que es dona la millora en la IR. Alguns autors han suggerit que aquest fenomen podria ser degut a que la forma més implicada en la IR és l'adiponectina d'elevat pes molecular (nosaltres hem mesurat la total) [64].

Per altra banda, s'ha descrit que tant l'obesitat com la hiperinsulinèmia inhibeixen l'expressió dels receptors d'adiponectina, de manera que en certa forma es redueix la sensibilitat envers l'adiponectina. Això, implica alhora un augment de la IR, i de forma concomitant l'empitjorament de la hiperinsulinèmia, creant d'aquesta manera un cercle viciós [64]. Amb la cirurgia bariàtrica, de forma directa (a través de les incretines) o indirecta (millorant les funcions de l'AT), s'aconseguiria trencar aquesta dinàmica.

4.3 Metabolisme glucídic: resistència a la insulina i diabetis mellitus tipus II

Com a indicadors de l'estat del metabolisme dels glúcids ens hem fixat en tres paràmetres: la glucosa i la insulina plasmàtiques i l'índex HOMA-IR.

Resultats i Discussió

4.3.1 Paràmetres plasmàtics: glucosa i insulina

En l'obès, els nivells de glucosa plasmàtica (Figura 37) eren de 125.9 ± 9.3 mg/dL, i el 44% dels pacients presentaven uns nivells per sobre dels límits de normalitat. Només un mes després de la cirurgia, els nivells de glucosa ja havien disminuït (96.3 ± 3.6 mg/dL) fins a valors dins del rang de normalitat (71-110 mg/dL), i només el 12% dels pacients presentaven valors de glucosa per sobre de 110 mg/dL. Els nivells es van mantenir estables fins un any després de la intervenció, moment en que el grup de pacients estudiat presenta uns valors de glucosa mitjans de 91.1 ± 3.0 mg/dL, que suposa una reducció significativa des de l'inici del tractament del 28%.

Després de 12 mesos de la intervenció, només hi havia dos individus que continuaven amb valors de glicèmia elevats, i coincideixen amb els dos individus que estaven tractats amb insulina a l'inici de l'estudi.

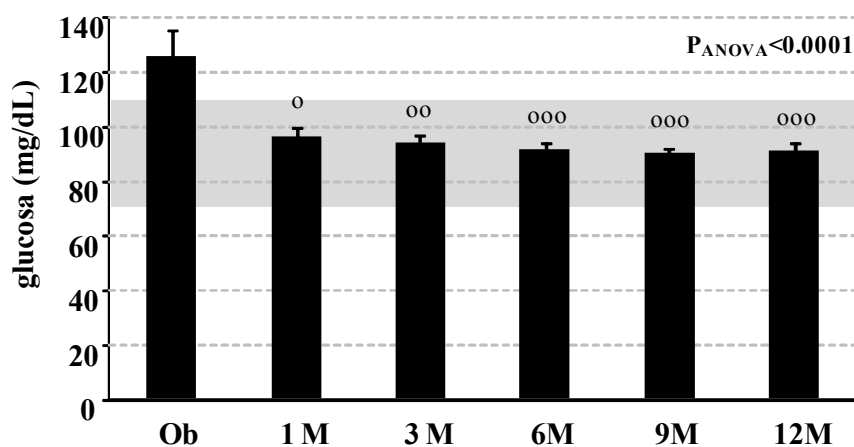


Figura 37. Concentració de glucosa plasmàtica en la població estudiada. La zona ombrejada en gris indica el rang de normalitat. Comparacions respecte a l'obès mitjançant Kruskal-Wallis i posttest de Dunn. Un símbol $p < 0.05$, dos símbols $p < 0.01$ i tres símbols $p < 0.001$.

Pel que fa a la **insulina** (Figura 38), a l'inici de l'estudi la seva concentració en plasma es situava en 24.2 ± 2.8 mUI/L; tot i que la mitjana es trobava per sota del límit considerat hiperinsulinèmia (27 mUI/mL), el 38% dels pacients la presentaven. Al mes de la cirurgia, els valors d'insulina plasmàtics van baixar a 13.9 ± 1.6 mUI/L (una reducció del 43%) i només el 10% dels pacients patien hiperinsulinèmia. Finalment, als 12 mesos els nivells d'insulina de tots els pacients s'havien normalitzat (8.2 ± 0.8 mUI/mL). La disminució del 66% observada respecte a l'inici del tractament és estadísticament significativa.

Resultats i Discussió

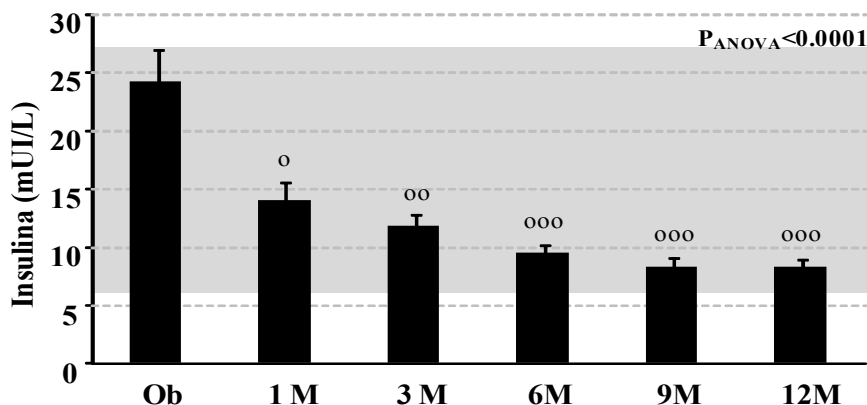


Figura 38. Concentració d'insulina plasmàtica en la població estudiada. La zona ombrada en gris indica el rang de normalitat. Comparacions respecte a l'obès mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Un símbol $p<0.05$, dos símbols $p<0.01$ i tres símbols $p<0.001$.

4.3.2 Índex HOMA-IR

A partir dels dos paràmetres anteriors es va calcular el **HOMA-IR** (Figura 39). Segons aquest índex, a l'inici de l'estudi el 65% dels individus estudiats presentaven resistència a la insulina (HOMA-IR mitjà de 7.4 ± 1.0), aquest percentatge es va reduir a menys de la meitat (26%) només un mes després de la intervenció, i al final de l'estudi (HOMA-IR mitjà de 1.8 ± 0.2) només hi havia un individu que presentava un HOMA-IR per sobre de 3.8 (coincideix que aquest mateix individu és un dels que encara patia d'hiperglucèmia), de manera que el 97% dels individus havien deixat de ser insulinoresistents i cap d'ells rebia tractament farmacològic per la IR.

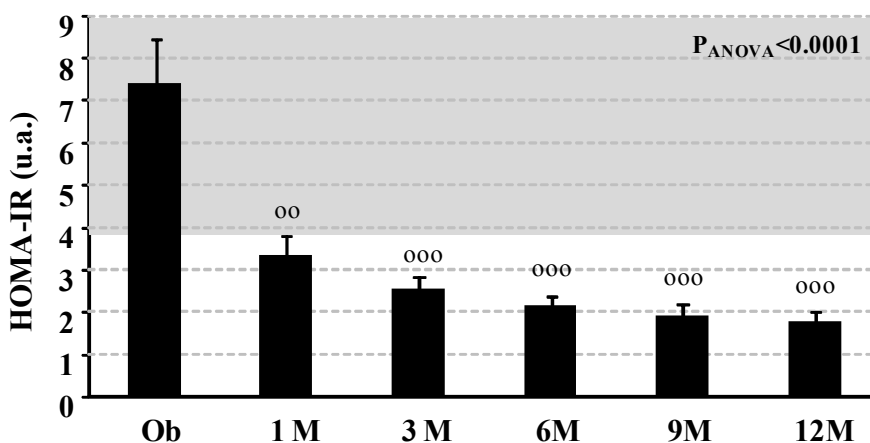


Figura 39. Índex HOMA-IR de resistència a la insulina a la població estudiada. La zona ombrada en gris indica el rang de valors que indiquen insulinoresistència. Comparacions respecte a l'obès mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Dos símbols $p<0.01$ i tres símbols $p<0.001$.

El HOMA-IR correlaciona ($p<0.001$) amb el BMI ($r=0.45$), el pes corporal ($r=0.48$), els Kg de greix total ($r=0.41$), i els de visceral ($r=0.52$); i de forma menys marcada ($p<0.05$) amb els Kg de greix subcutani ($r=0.29$). És a dir, la IR està relacionada amb l'excés de pes. Cal destacar que el HOMA-IR també presenta una correlació positiva forta ($p<0.001$, $r=0.45$) amb el perímetre de cintura, mentre que no existeix correlació amb el perímetre de maluc, relacionant d'aquesta manera la IR amb l'obesitat central.

Resultats i Discussió

Cal destacar que l'adiponectina correlaciona fortament ($p < 0.001$) amb la insulina ($r = -0.37$) i el HOMA-IR ($r = -0.34$) i més lleument ($p < 0.01$) amb la glucosa ($r = -0.28$).

4.3.3 Discussió sobre metabolisme glucídic

A partir dels resultats observats veiem com les alteracions del metabolisme glucídic que s'observaven en els obesos desapareixen després del RYGB. El resultat més sorprenent el trobem només un mes després de la cirurgia. Durant aquest lapse de temps és quan es produeix la major pèrdua de pes (11%), així com una important reducció del BMI (11%) i una gran pèrdua de Kg de greix corporal (20%). A més, tot i que el percentatge d'excés de pes dels individus continua sent elevat (80%), el nombre d'individus amb IR ha disminuït de forma notable.

El fet que el nombre d'individus amb IR continuï disminuint fins al final de l'estudi fa pensar que existeixen al menys dos mecanismes pels quals s'aconsegueix la sensibilització vers la insulina. En primera instància actuaria un mecanisme immediat, en el que creiem que hi pot estar involucrada la cirurgia. En segona instància, podrien estar implicats altres paràmetres, com ara l'adiponectina que ja hem vist que augmenta a partir del sisè més i que està altament correlacionada amb els paràmetres del metabolisme glucídic estudiats. Més endavant, veurem com hi ha altres paràmetres que es troben alterats en l'obès i que també podrien estar afectant la senyalització de la insulina.

El nexa de causabilitat que existeix entre l'obesitat i la IR és complex i controvertit. Sembla ser que l'obesitat promou la IR, i alhora la IR facilita un major augment de pes. És a dir, que el risc d'IR augmenta a mesura que augmenta l'obesitat, i per altra banda l'augment de pes com a causa de la sobrenutrició indueix IR [329].

Amb el RYGB s'aconsegueix una millora relativament ràpida de la IR. En els nostres pacients tant els valors de glicèmia, com els d'insulinèmia i HOMA-IR s'havien normalitzat en el 74% dels casos només un mes després de la intervenció. Aquest fet ha estat descrit recentment a la bibliografia [126, 240, 330], on s'observen diferents percentatges de recuperació en funció de la tècnica bariàtrica emprada: 40% en el cas de VBG, 60% en el cas de GB, 80% en el cas de RYGB o 99% en el cas de BPD [239]; tot i que el mecanisme pel qual s'aconsegueix la millora encara es desconeix.

Hi ha autors que han suggerit que la millora podria estar produïda per la pèrdua de pes, ja que una disminució del pes del 5-10% és suficient per provocar millores en les concentracions plasmàtiques de glucosa i insulina [331]. Tanmateix, estudis recents duts a terme per Rubino i col·laboradors descriuen una disminució important dels nivells d'aquests dos paràmetres abans que s'observi una pèrdua significativa de BMI [330]. Per altra banda, també s'ha suggerit que la millora de la IR podria ser deguda a la restricció calòrica a la que es sotmeten els pacients després de la intervenció, ja que s'ha vist que una disminució de la ingesta calòrica afecta profundament el metabolisme de la glucosa [331]. Tanmateix, si aquests fossin els únics mecanismes, la millora de la IR hauria de ser la mateixa independentment del tipus d'intervenció realitzada i ja hem vist

Resultats i Discussió

que no és així [239]. És per això que es proposen mecanismes alternatius, independents del pes, per explicar la millora de la IR després de la cirurgia bariàtrica.

A banda de la possible implicació del metabolisme lipídic i la inflamació, de les que parlarem més endavant, hi ha estudis clínics preliminars que observen canvis en el patró de secreció hormonal de l'intestí pocs dies després d'un RYGB que podrien afectar la senyalització de l'eix enteroinsular tant a nivell de secreció d'insulina com de sensibilitat a aquesta [120]. A partir d'aquestes observacions, s'ha postulat les hipòtesis de l'intestí distal i proximal i la teoria de les antiincretines (descrites a la introducció). Basant-se en aquestes hipòtesis de treball, s'està desenvolupant el que es coneix amb el nom de cirurgia metabòlica, un tipus d'intervenció en el que partint de la cirurgia bariàtrica, es vol resoldre la DM.

Actualment s'estan duent a terme procediments com el bypass duodeno-jejunal, en el que se simula el bypass intestinal del RYGB sense realitzar la reducció d'estómac. Utilitzant aquesta tècnica quirúrgica s'han obtingut millores importants en la glucèmia i en els nivells d'hemoglobina glicosilada, tant en models murins [124, 332] com humans [333]. Tot i això, hi ha autors que no observen millora de la IR amb aquest tipus d'intervenció [334]. Finalment, també s'ha desenvolupat una tècnica mínimament invasiva que consisteix en la col·locació per endoscòpia, d'una mànega flexible de plàstic coneguda amb les sigles ELS (de l'anglès *endoluminal sleeve*) que exclou l'intestí prim proximal (duodè i jejú) del contacte amb els aliments; de nou, experiments duts a terme en models murins [335] i humans [230, 336] aporten resultats prometedors pel que fa a la millora de la tolerància a la glucosa i la disminució de la IR.

A banda d'aquest mecanismes, també s'estudien altres hipòtesis com ara la desregulació de la secreció de grelina [337], l'adiponectina [64] o el paper de la microbiota intestinal [338, 339].

4.4 Metabolisme lipídic: dislipèmia

Per a l'estudi de l'efecte de l'operació sobre el metabolisme lipídic en els obesos hem analitzat diversos paràmetres tant a plasma com a teixits (AT i fetge). Els resultats obtinguts són els que es presenten a continuació.

4.4.1 Paràmetres plasmàtics

- **Triacilglicèrids**

La hipertrigliceridèmia és una afectació que es troba sovint en els pacients amb obesitat mòrbida [340]. En el nostre cas, els nivells de **TAG** (Figura 40) a l'inici de l'estudi eren de 143.3 ± 9.5 mg/dL; valors que es troben dins del rang de normalitat utilitzat a l'hospital de la Vall d'Hebron (40-200 mg/dL). Tanmateix, si tenim en compte els criteris de diagnòstic de la síndrome metabòlica adoptats tant per l'OMS, com per l'NCEP-ATPIII i l'IDF [31], a l'inici de l'estudi el 35% dels nostres individus presentaven hipertrigliceridèmia; a més, els valors dels obesos difereixen de forma significativa dels detectats al grup control (71.6 ± 9.6 mg/dL).

Resultats i Discussió

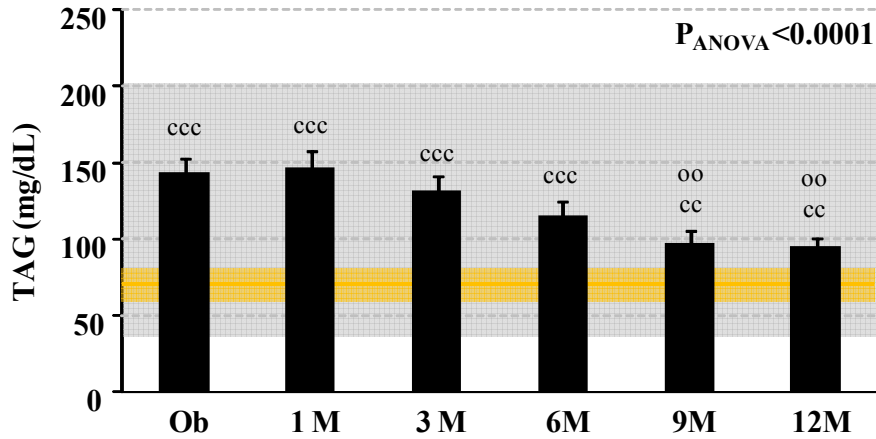


Figura 40. Concentració plasmàtica de TAG a la població estudiada. La zona ombrejada en gris indica el rang de normalitat, la zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Dos símbols $p < 0.01$ i tres símbols $p < 0.001$.

Després de la intervenció, els nivells de TAG a plasma van començar a disminuir, però la reducció respecte l'obès no va ser significativa fins al novè mes, on es va aconseguir una reducció del 32% (97.6 ± 7.3 mg/dL). Tot i tenir valors estadísticament diferents de l'obès, als 9 mesos els valors encara difereixen de forma significativa dels del grup control, i aquestes diferències es mantenen fins al final de l'estudi, on s'assoleix una reducció dels valors plasmàtics de TAG total del 34%. En general el descens és significatiu. Al finalitzar l'estudi cap dels nostres pacients patia hipertriglicèridèmia.

- **Colesterol**

Pel que fa al CHOL_T (Figura 41), a l'inici de l'estudi els nivells plasmàtics eren de 210 ± 7.3 mg/dL, dins del rang de normalitat (125 a 220 mg/dL) i similars als observats al grup control.

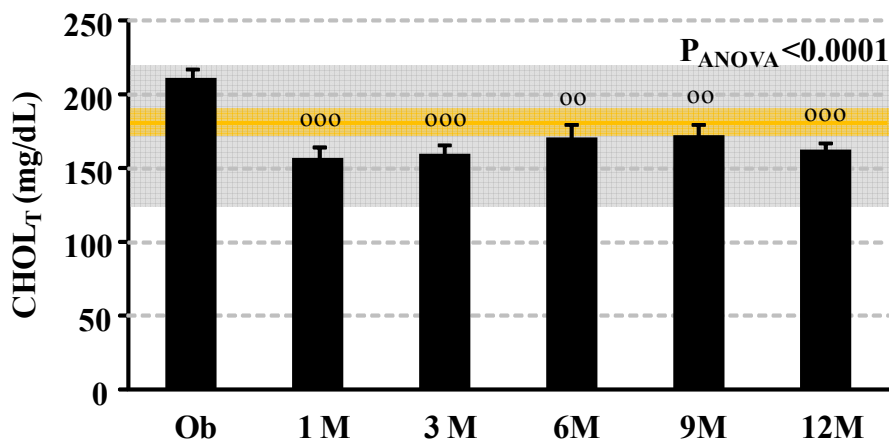


Figura 41. Concentració plasmàtica de colesterol total a la població estudiada. La zona ombrejada en gris indica el rang de normalitat, la zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Dos símbols $p < 0.01$ i tres símbols $p < 0.001$.

Resultats i Discussió

Només un mes després de la intervenció es va produir una disminució del 26% respecte als valors inicials. Posteriorment, els nivells es van mantenir estables durant la resta del període estudiat (valors als 12 mesos: 162.2 ± 4.9 mg/dL). A l'inici de l'estudi, el 63% dels individus eren hipercolesterolèmics, mentre que un any després de la intervenció, només el 10% dels individus continuaven amb nivells de CHOL_T per sobre de 200 mg/dL.

Bona part del colesterol plasmàtic es troba dins de les lipoproteïnes, concretament a les LDL i les HDL. L'LDLc és bàsicament el que prové de la dieta i viatja cap als teixits mentre que l'HDLc correspon a l'excedent de colesterol dels teixits que és transportat cap a fetge.

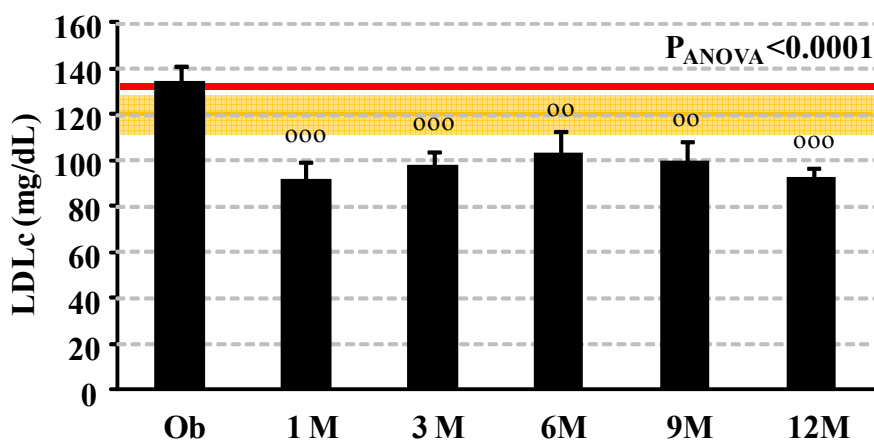


Figura 42. Concentració plasmàtica d'LDLc en la població estudiada. La línia vermella indica el límit de normalitat, la zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Dos símbols $p < 0.01$ i tres símbols $p < 0.001$.

En el cas dels nostres pacients, pel que fa a l'LDLc (Figura 42), a l'inici de l'estudi el 60% dels individus tenien els valors per sobre del límit de normalitat (< 130 mg/dL), amb un valor promig de 133.5 ± 5.2 mg/dL, tot i no diferir estadísticament del valor detectat al grup control (121.0 ± 9.7 mg/dL).

L'LDLc presenta un perfil similar al del CHOL_T , disminueix de forma significativa al primer mes postoperació i els nivells es mantenen estables fins al final del període estudiat. Als 12 mesos de la intervenció tots els individus presentaven nivells d'LDLc per sota dels 130 mg/dL.

Tot i que els valors d'LDLc siguin relativament normals, s'ha vist que en casos en que la concentració de TAG està per sobre de 130 mg/dL poden aparèixer sdLDL, partícules amb un clar caràcter aterogènic degut a la seva menor capacitat d'unió a l'LDLr, una major retenció a la paret arterial i una major susceptibilitat a la oxidació [156]. Així, grups com el de Yoshida i col·laboradors han descrit un índex que permet predir l'existència d'sdLDL utilitzant la relació CHOL_T/TAG [341]. Mitjançant aquest índex trobem que en l'obès el 53% dels individus presentaven sdLDL. Tot i que un mes

Resultats i Discussió

després de la intervenció el percentatge de pacients amb sdLDL va augmentar fins al 96%, a partir del tercer mes, el nombre d'individus afectats va anar disminuint fins a ser només del 31% als 12 mesos de l'operació.

L'**HDLc** (Figura 43) a l'inici de l'estudi presentava uns valors promig de 47.9 ± 1.8 mg/dL. De la mateixa manera que el CHOL_T , aquest paràmetre es trobava per sobre del líndar de normalitat (>40 mg/dL) i no difereixen dels valors obtinguts al grup control (45.9 ± 4.4 mg/dL).

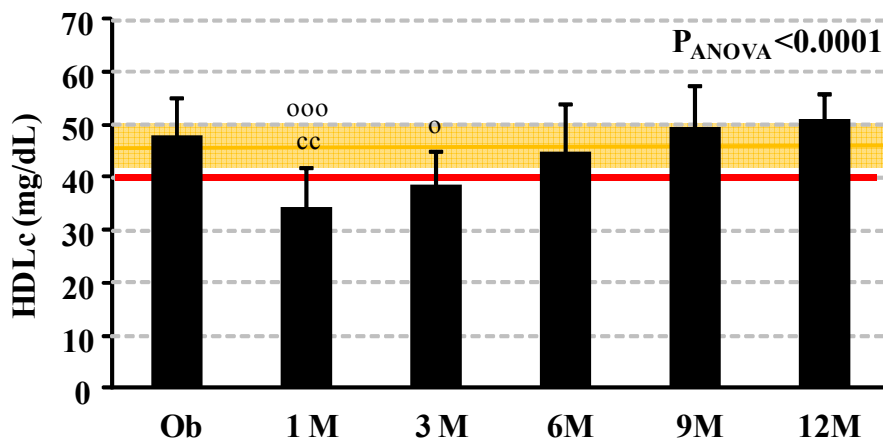


Figura 43. Concentració plasmàtica d'HDLc en la població estudiada. La línia vermella indica el límit de normalitat, la zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Un símbol $p < 0.05$, dos símbols $p < 0.01$ i tres símbols $p < 0.001$.

Inicialment, igual que passa amb el CHOL_T i l' LDLc , al primer mes de l'operació es produeix una davallada dels nivells plasmàtics, en aquest cas del 29% i els valors (34.0 ± 1.2 mg/dL) arriben a ser estadísticament diferents dels del grup control. Tanmateix, a mesura que avança el temps, els valors es recuperen fins a situar-se en nivells similars als de l'inici de l'estudi, cosa que no passa amb els altres tipus de colesterol. Al final de l'estudi, el 75% dels individus presentava uns nivells d'HDLc normals.

Cal destacar que el Consens 2009 pel diagnòstic de la síndrome metabòlica estableix líndars de risc diferents per l'HDLc en funció del sexe (40 mg/dL per homes i 50 mg/dL per dones) [31]. Així doncs, si tenim en compte el sexe, a l'inici de l'estudi el 50% dels homes i el 55% de les dones presentaven nivells d'HDLc per sota del líndar. En canvi, 12 mesos després de la intervenció tots els homes presentaven nivells d'HDLc dins de la normalitat, mentre que el 36% de les dones continuaven tenint valors d'HDLc considerats de risc.

Si les concentracions plasmàtiques de TAG són inferiors a 150 mg/dL, la concentració de colesterol plasmàtica atribuïble a les VLDL és inferior a 30 mg/dL i per tant es considera que la seva aportació al conjunt de colesterol aterogènic és molt petita. En canvi, quan les concentracions de colesterol són elevades, l'aportació de colesterol de les VLDL cal tenir-la en compte [342]. Així, una altra manera d'expressar part del

Resultats i Discussió

colesterol plasmàtic que pot resultar interessant és el colesterol no-HDL (no-HDLc), que s'obté de la diferència entre el CHOL_T i l'HDLc i representa la mesura del colesterol present a les LDL, les IDL, les VLDL i els romanents [343].

En el cas dels nostres pacients, en l'obès els valors de no-HDLc (Figura 44) eren de 162.2 ± 6.2 mg/dL, molt propers als valors límit de normalitat (<160 mg/dL) [344]. Tanmateix, només un mes després de la intervenció, de la mateixa manera que passa amb el CHOL_T i l'LDLc, es va produir una davallada de la concentració plasmàtica del 28%, assolint valors estadísticament diferents dels de l'obès (117.5 ± 9.1 mg/dL). De nou, els valors es van mantenir estables fins a la fi del període estudiat, on eren de 111.2 ± 4.2 mg/dL, un 31% més baixos que en l'obès.

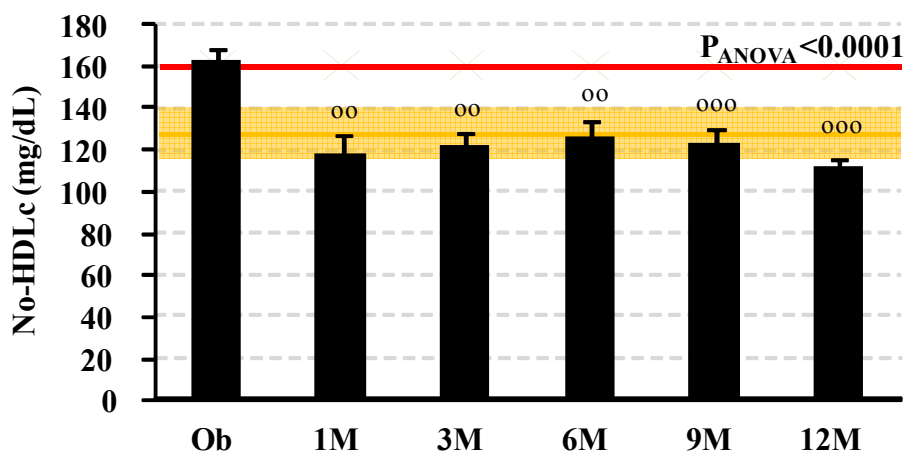


Figura 44. Concentració plasmàtica de colesterol no-HDL en la població estudiada. La línia vermella indica el límit de normalitat, la zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Dos símbols $p < 0.01$ i tres símbols $p < 0.001$.

L'estudi de determinats lípids valorats individualment com ara l'HDLc disminuït, els TAG augmentats, o l'LDLc augmentat es consideren clarament indicadors de risc cardiovascular, tal i com va quedar demostrat al *Framingham Heart Study* [345]. Tanmateix, diversos estudis epidemiològics han demostrat que les relacions entre els diferents lípids són millors predictores d'aterosclerosi i de malaltia cardiovascular [343].

Així doncs, a partir de les diferents concentracions de colesterol plasmàtiques es poden calcular diverses relacions entre el colesterol present a les lipoproteïnes considerades aterogèniques (VLDL, LDL, IDL) i les considerades antiaterogèniques (HDL). Aquestes relacions permeten establir el nivell de risc cardiovascular dels nostres pacients (Figura 45).

Resultats i Discussió

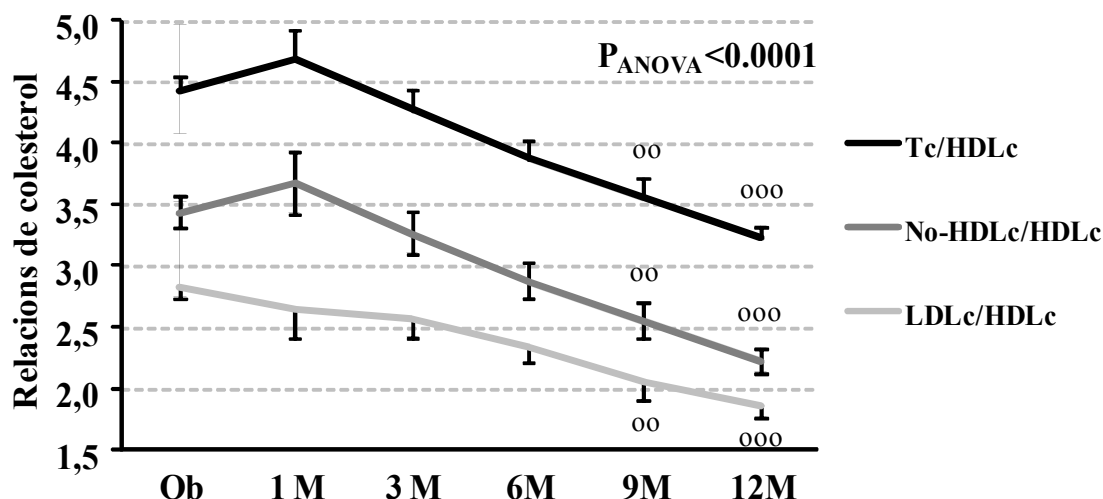


Figura 45. Relacions entre el colesterol de partícules aterogèniques i el de partícules no aterogèniques en la població estudiada. Comparacions respecte a l'obès (o) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Dos símbols $p < 0.01$ i tres símbols $p < 0.001$.

Segons aquest indicador, es pot veure clarament com el risc cardiovascular disminueix a partir del tercer més de la intervenció, independentment de la relació que es faci servir.

Observant els resultats a nivell individual, els dos individus que al finalitzar l'estudi encara tenien un BMI per sobre de 40 kg/m^2 eren els que patien una hipertrigliceridèmia i una hipercolesterolèmia més marcades a l'inici de l'estudi i continuaven patint-les 12 mesos després de la intervenció. A més, també presentaven nivells elevats d'LDLc i no-HDLc tant a l'inici com al final de l'estudi. Per contra, tot i que mitjançant l'índex de Yoshida (CHOL_T/TAG) es detectava una presència marcada d'sdLDL a l'inici de l'estudi, aquestes desapareixien amb la intervenció.

• Apolipoproteïnes AI i B

L'apoB representa la majoria del contingut proteic de les LDL, les IDL i les VLDL, mentre que l'apoAI és la principal apolipoproteïna de les HDL; de manera que ens permeten mesurar la quantitat d'aquestes lipoproteïnes de forma indirecta. Per altra banda, la relació apoB/apoAI també resulta un valuós marcador de risc aterogènic [343].

A l'inici de l'estudi, els nostres pacients presentaven uns nivells plasmàtics d'apoAI (Figura 46) de $185.6 \pm 5.0 \text{ mg/dL}$, dins del rang de normalitat ($90\text{-}200 \text{ mg/dL}$) i eren similars als del grup control ($197.5 \pm 6.4 \text{ mg/dL}$). En canvi, al més de la intervenció es va produir una davallada estadísticament significativa del 32% (valors de $126.4 \pm 3.6 \text{ mg/dL}$). Tanmateix, els valors d'aquest paràmetre es van recuperar lentament i als 12 mesos eren com a l'inici de l'estudi.

Resultats i Discussió

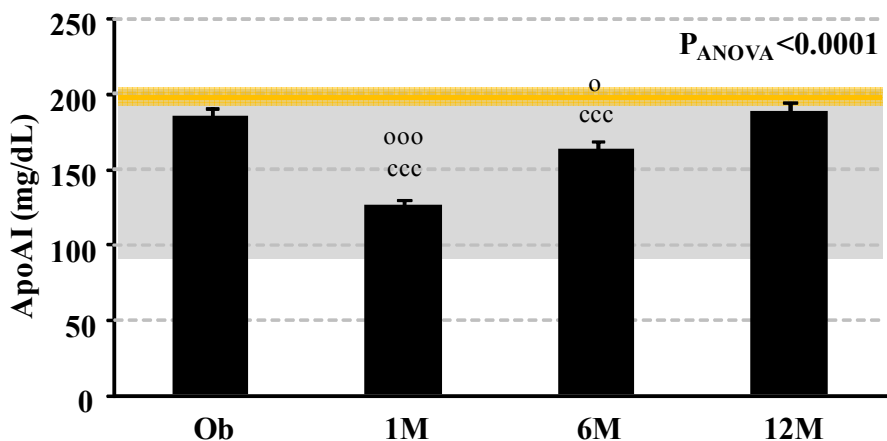


Figura 46. Concentració plasmàtica d'apoAI en la població estudiada. La zona ombrejada en gris indica el rang de normalitat, la zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Un símbol $p < 0.05$ i tres símbols $p < 0.001$.

L'apoAI correlaciona fortament amb l'HDLc ($p < 0.001$, $r = 0.90$). A més, també correlaciona de forma molt significativa en tots tres casos ($p < 0.001$) amb el CHOL_T ($r = 0.47$), l'LDLc ($r = 0.35$) i amb l'adiponectina ($r = 0.31$).

L'apoB (Figura 47), a l'inici de l'estudi presentava uns valors de 85.1 ± 3.0 mg/dL, que tot i trobar-se dins del rang de normalitat (60-133 mg/dL), són estadísticament diferents als del grup control (68.4 ± 4.9 mg/dL, $p < 0.05$). Després de la intervenció, els nivells d'apoB van anar disminuint de forma significativa i als 12 mesos, després d'una reducció del 25%, van assolir valors de 68.4 ± 49 mg/dL.

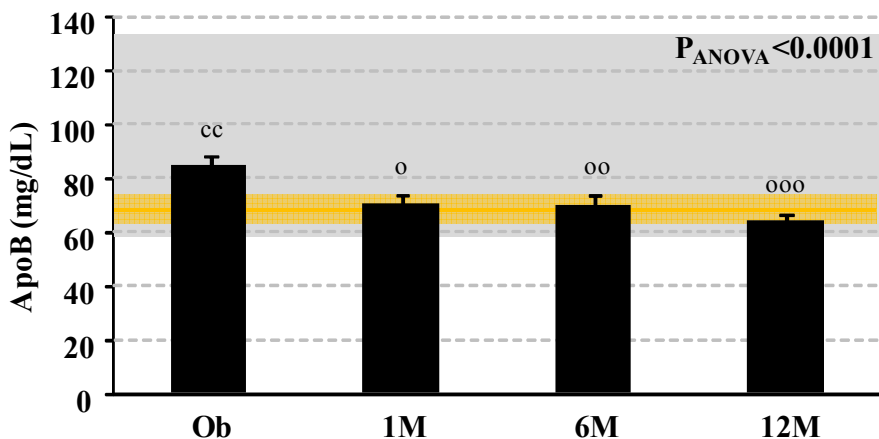


Figura 47. Concentració plasmàtica d'apoB a la població estudiada. La zona ombrejada en gris indica el rang de normalitat, la zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Un símbol $p < 0.05$, dos símbols $p < 0.01$ i tres símbols $p < 0.001$.

L'apoB presenta una correlació molt bona amb l'LDLc ($p < 0.001$, $r = 0.90$). A més, també correlaciona ($p < 0.001$) amb els nivells plasmàtics de TAG ($r = 0.39$) i els de CHOL_T ($r = 0.85$).

Resultats i Discussió

Per altra banda, l'apoB correlaciona fortament ($p < 0.001$) amb diversos paràmetres antropomètrics com ara el BMI ($r = 0.58$), el perímetre de cintura ($r = 0.55$), el percentatge d'excés de pes ($r = 0.39$), el greix total ($r = 0.37$) i el greix visceral ($r = 0.42$), i de forma menys significativa amb el greix subcutani ($p < 0.01$, $r = 0.38$); relacionant aquest paràmetre amb l'obesitat, sobretot amb la visceral.

La relació **apoB/apoAI** (Figura 48) reflecteix el balanç entre dos processos completament oposats: el transport de colesterol cap a teixits perifèrics on serà internalitzat i el transport revers de colesterol cap a fetge. Com més gran sigui aquesta relació, major serà la quantitat de colesterol que viatjarà en lipoproteïnes aterogèniques [343], de manera que aporta una informació similar a la de les relacions entre els diferents tipus de colesterol de la Figura 45.

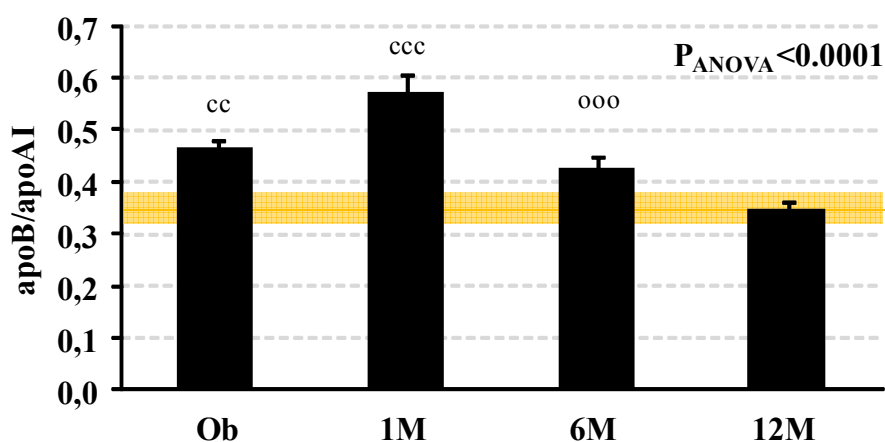


Figura 48. Relació apoB/apoAI en la població estudiada. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Dos símbols $p < 0.01$ i tres símbols $p < 0.001$.

Es pot veure com en l'obès, els valors es trobaven un 24% per sobre dels del grup control, i tot i que al mes de la intervenció es va produir un augment (fet que també queda reflectit a les relacions $CHOL_T/HDLc$ i $no-HDLc/HDLc$), al sis mesos la relació va disminuir per sota dels nivells de l'obès. Finalment, als 12 mesos, amb un descens del 24% respecte l'obès, es va situar en valors com els del grup control.

- **Apolipoproteïna AIV**

L'apoAIV forma part de les HDL i se la descriu com una apolipoproteïna antiaterogènica, a més s'expressa gairebé únicament a l'intestí [346]. És per això que vam voler estudiar el seu comportament amb la cirurgia bariàtrica.

Els nivells d'**apoAIV** a plasma (Figura 49) en l'obès són similars als del grup control. Tot i que un mes després de la cirurgia es produeix una forta davallada (del 43%), als 3 mesos els valors comencen a recuperar-se fins arribar a valors similars als de l'inici de l'estudi.

Resultats i Discussió

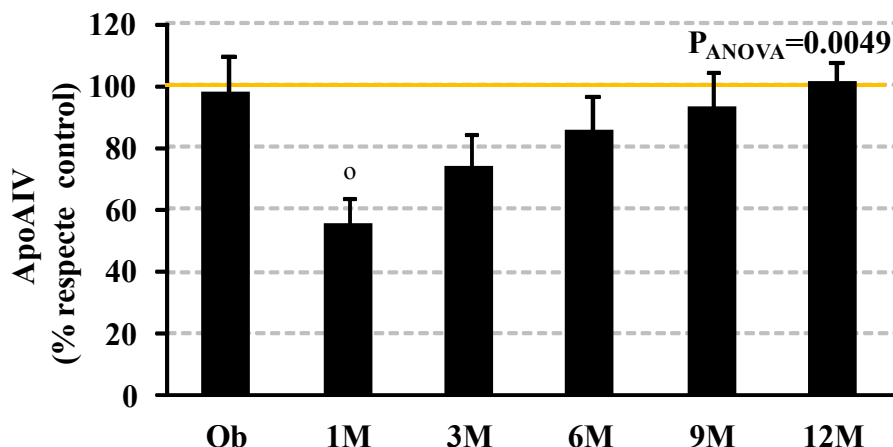


Figura 49. Percentatge d'apoAIV a plasma en la població estudiada. La línia taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Un símbol $p < 0.05$.

• Àcids grassos lliures i glicerol

Els NEFA són el producte de la hidròlisi a través del qual els TAG emmagatzemats a l'AT es transporten fins als seus llocs d'utilització. Tenint en compte que la quantitat d'AT en els obesos es troba altament incrementada, volíem saber si aquest fet tindria alguna repercussió en la concentració plasmàtica de NEFA i glicerol.

En l'obès, els nivells de NEFA plasmàtics (Figura 50) es trobaven lleugerament per sobre dels nivells de normalitat (2.8-12.7 mg/dL per dones i 2.8-16.9 mg/dL per homes). Si tenim en compte el sexe, el 73% de les dones i el 59% dels homes presentaven els nivells de NEFA per sobre del límit de normalitat. Un mes després de la intervenció es va produir un increment de NEFA del 55%, però posteriorment els nivells van tornar a disminuir i als 12 mesos es trobaven dins del rang de normalitat.

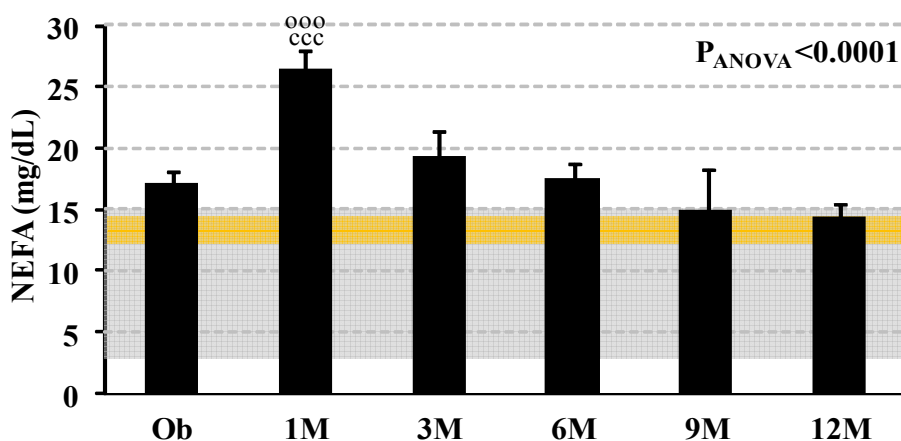


Figura 50. Concentració plasmàtica de NEFA a la població estudiada. La zona ombrejada en gris indica el rang de normalitat, la zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Tres símbols $p < 0.001$.

Pel que fa al **glicerol** (Figura 51), en l'obès els valors es trobaven molt per sobre dels límits de normalitat, i tot i que amb la intervenció es va produir una davallada no significativa del 19%, als 12 mesos no s'arriben a assolir concentracions de glicerol

Resultats i Discussió

considerades normals. El glicerol està altament correlacionat amb els NEFA ($p < 0.001$, $r = 0.52$).

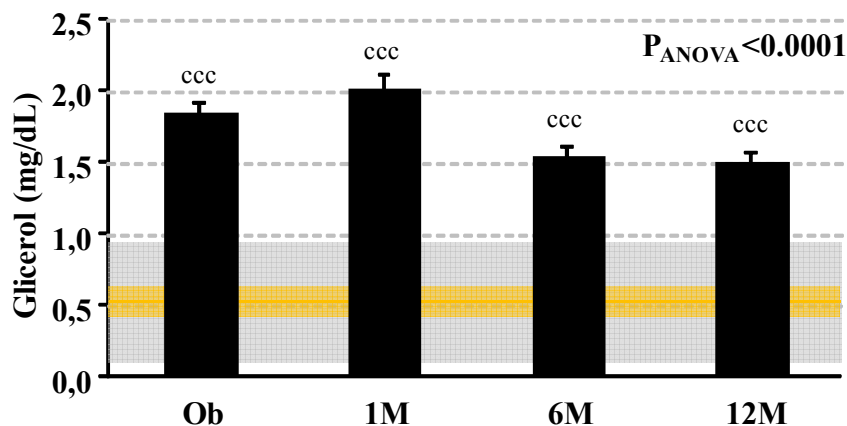


Figura 51. Concentració plasmàtica de glicerol a la població estudiada. La zona ombrejada en gris indica el rang de normalitat, la zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Tres símbols $p < 0.001$.

- **Cossos cetònics**

En els casos de dejuni prolongat la producció de KB augmenta, de manera que l'organisme els pugui utilitzar com a font d'energia. Donat que els nostres individus, un cop operats redueixen la ingesta calòrica de forma considerable i perden pes de forma relativament ràpida, vam voler estudiar el comportament d'aquest metabòlit.

En el cas dels **KB** (Figura 52), s'observa un comportament similar al dels NEFA. Tot i que a l'inici de l'estudi els valors es trobaven dins del rang de normalitat i eren similars als del grup control, un mes després de la intervenció es va produir un augment molt marcat (13 vegades). Tanmateix, als 6 mesos, tot i presentar valors més alts que els controls, la concentració de KB a sang havia disminuït a 2.39 ± 0.59 mg/dL i als 12 mesos ja no presentaven diferències respecte als valors observats al grup control. Els KB presenten molt bona correlació amb els NEFA ($p < 0.001$, $r = 0.55$).

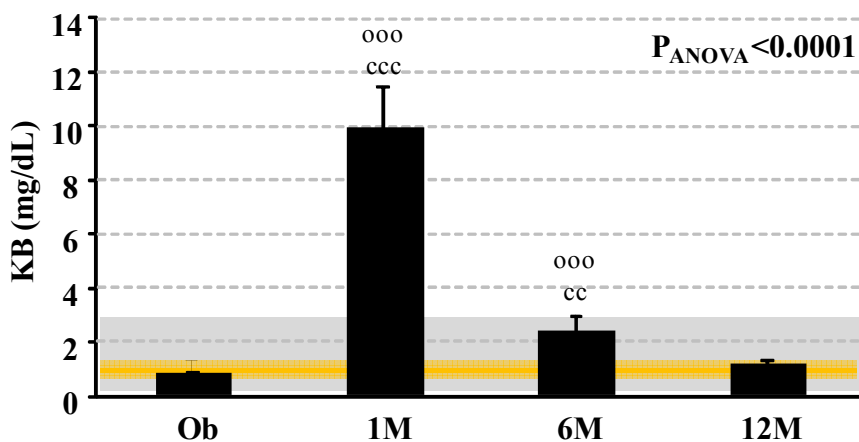


Figura 52. Concentració plasmàtica de KB en la població estudiada. La zona ombrejada en gris indica el rang de normalitat, la zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Dos símbols $p < 0.01$ i tres símbols $p < 0.001$.

Resultats i Discussió

4.4.2 Lipoproteïnes: mida

Després de realitzar l'aïllament de les diferents lipoproteïnes del plasma dels pacients, es va analitzar la seva composició (TAG, PL, proteïna, FC i EC) i a partir d'aquestes dades es va fer una estimació de la seva mida, tenint en compte que els principals components del nucli de les lipoproteïnes són els TAG i el EC, mentre que a la superfície s'hi troben els PL, la proteïna i l'FC.

Com es pot veure a la Figura 53, la mida de les VLDL augmenta després de l'operació, així com la de les LDL. Per contra, les HDL mantenen la seva mida al llarg de tot l'estudi.

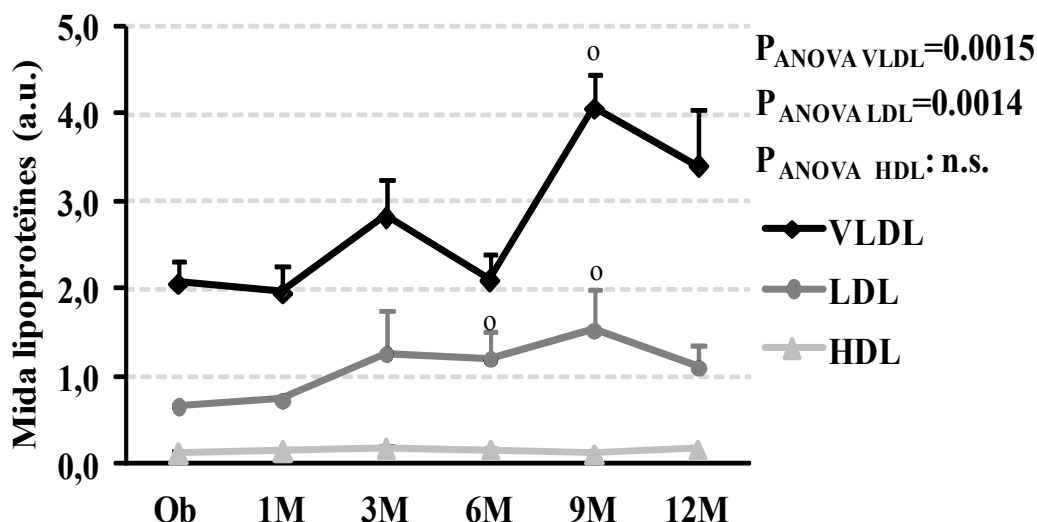


Figura 53. Estimació de la mida de les lipoproteïnes. Comparacions respecte a l'obès (o) mitjançant ANOVA i posttest de Dunn. Un símbol $p < 0.05$.

Vam voler comparar visualment aquestes dades amb les obtingudes mitjançant microscopia electrònica (Figura 54).

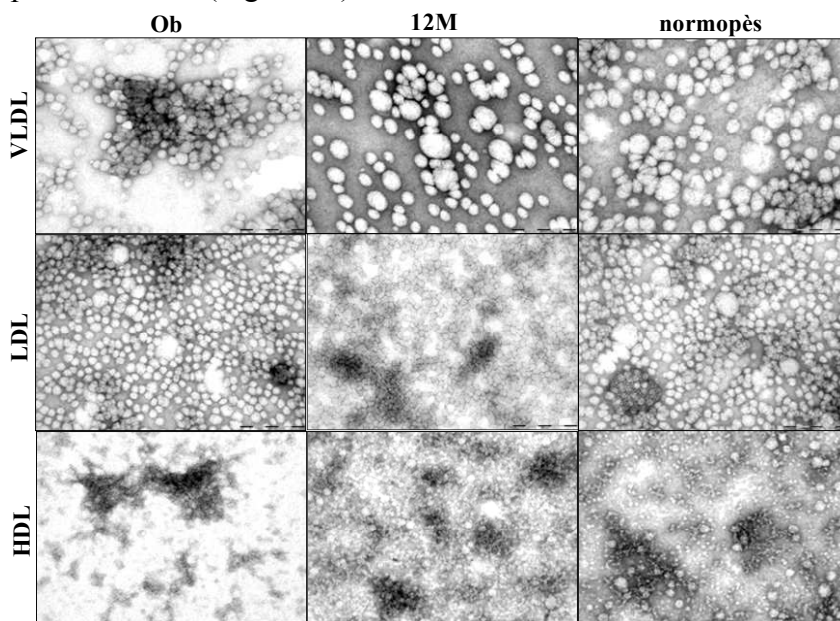


Figura 54. Imatge de microscopia electrònica de les lipoproteïnes a diferents temps. Les imatges es van obtenir a 150 augments i la barra correspon a 200 nm.

Resultats i Discussió

Es pot veure com sobretot les VLDL de l'obès són més petites en comparació amb les dels 12 mesos després de la cirurgia i els individus normopès. Mentre que les HDL sembla que mantenen la seva mida, tot i que a la fotografia obtinguda no s'aprecia gaire bé.

4.4.3 Lipases

Les principals moduladores de la concentració plasmàtica i tissular de lípids són les lipases. L'LPL és l'enzim clau en la captació de lípids presents a les lipoproteïnes per part dels teixits, a més quan aquest enzim s'allibera del seu lloc d'ancoratge als capil·lars viatja per sang fins al fetge per ser eliminat. L'HL per la seva banda, està altament implicada en el metabolisme de l'HDLc.

- **Lipoproteïna lipasa**

L'activitat LPL es pot detectar al plasma preheparínic, tot i que gairebé el 90% de l'enzim es troba en la seva forma inactiva [347]. L'absència de correlació entre les activitats pre- i postheparíniques de l'LPL suggereix que el conjunt d'LPL plasmàtica i endotelial no es troba en equilibri [348]. És per això que el significat clínic de l'LPL preheparínica avui en dia encara és un tema controvertit, de manera que vam voler estudiar la seva possible implicació en l'obesitat i/o la pèrdua de pes.

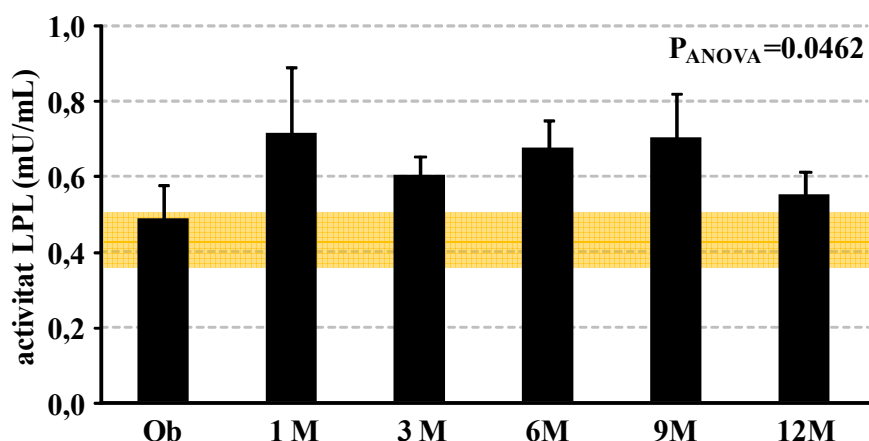


Figura 55. Activitat LPL preheparínica a plasma en la població estudiada. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Dunn.

En el cas dels nostres pacients, es pot veure com en l'obès els nivells d'activitat LPL preheparínica (Figura 55) no difereixen dels del grup control. Passat un més de la intervenció es produeix un lleuger augment de l'activitat, que no arriba a ser estadísticament significatiu. El comportament d'aquest paràmetre és erràtic al llarg del període estudiat, presentant lleus pujades i baixades que no es corresponen amb cap dels paràmetres estudiats fins ara. Als 12 mesos, l'LPL presentava uns nivells d'activitat preheparínica similars als de l'inici de l'estudi.

Resultats i Discussió

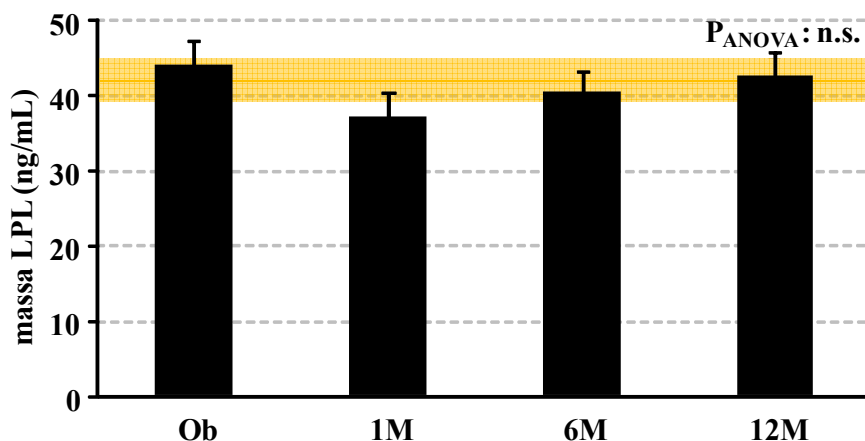


Figura 56. Concentració d'LPL preheparínica a plasma en la població estudiada. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. n.s., no significatiu.

Pel que fa a la **massa d'LPL preheparínica** (Figura 56), no presenta correlació amb l'activitat detectada ($p < 0.775$, $r = -0.03$), fet descrit per altres autors en individus normopès [349]; i tot i presentar un lleuger descens al mes de la intervenció i una posterior tendència a la recuperació dels valors, no s'observen diferències significatives. Els valors dels obesos són similars als del grup control.

- **Lipasa hepàtica**

L'activitat HL preheparínica està altament correlacionada amb la postheparínica, de manera que pot ser una bona mesura del paper que juga l'enzim en el metabolisme de les HDL i les LDL [348].

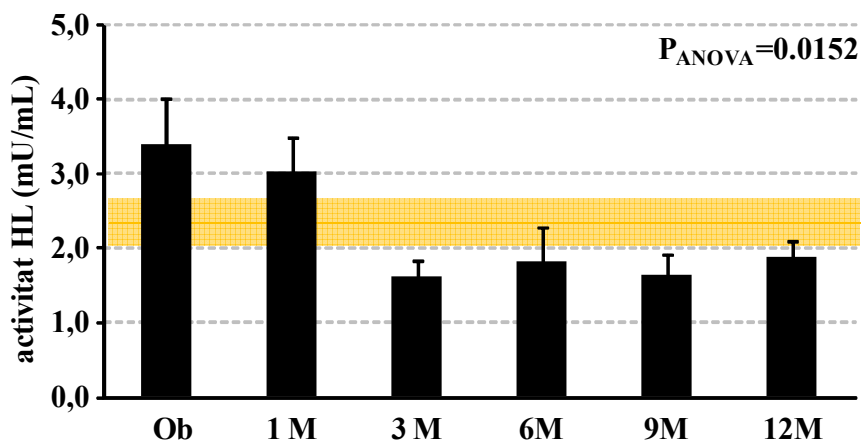


Figura 57. Activitat HL a plasma de la població estudiada. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Dunn.

En el cas dels nostres pacients, veiem que en l'obès l'**activitat HL preheparínica** (Figura 57) era més alta que en el grup control, tot i no assolir significativitat estadística. Durant el primer mes posterior a la intervenció els nivells d'activitat HL van començar a disminuir (11% respecte l'obès), però el descens més important es va

Resultats i Discussió

observar al tercer mes (53% respecte l'obès), moment en el que l'activitat s'estabilitza fins al final del període estudiat.

4.4.4 Discussió sobre dislipèmies

En els nostres pacients s'observa clarament una dislipèmia aterogènica, caracteritzada per hipertrigliceridèmia, nivells baixos d'HDLc, nivells elevats de romanents de lipoproteïnes i sdLDL [350], després de l'operació els nivells dels diferents lípids recuperen els valors de normalitat i la dislipèmia desapareix. Aquests resultats es confirmen amb l'estudi de les relacions entre els diferents tipus de lípids (Figura 45).

L'obesitat està associada amb un major risc d'infart de miocardi i de malaltia coronària i en general, amb un major risc de malaltia cardiovascular [5, 238]. La dislipèmia aterogènica és un dels factors que contribueix a augmentar aquest risc; d'aquí que sigui de gran interès estudiar els paràmetres lipídics en els individus amb obesitat mòrbida i la seva evolució després de la cirurgia bariàtrica [350].

Estudis realitzats amb la mateixa tècnica quirúrgica que nosaltres també mostren com la disminució dels nivells de TAG, en major o menor mesura, és generalitzada; però el moment en el que la disminució és estadísticament significativa varia d'un estudi a l'altre. Així, estudis com el de Nguyen i col·laboradors [340] mostren un marcat descens només un mes després de la intervenció i una reducció total del 63% als 12 mesos, mentre que d'altres observen un descens del 50% en els nivells de TAG i diferències significatives al sisè mes de la intervenció [351]. A llarg termini, estudis com el SOS [238] mostren una reducció mantinguda del 28% deu anys després de la cirurgia.

Es creu que la IR que acompanya l'obesitat podria ser la responsable de l'elevació de TAG a plasma, ja que n'estimula la seva síntesi a fetge. La disminució de la IR que es dona després de la cirurgia, podria afavorir el descens dels TAG, tal i com han suggerit alguns autors [351]. Aquest fet es reflectiria, en el nostre cas, per una correlació de $p < 0.01$ i $r = 0.24$ entre el HOMA-IR i els TAG a plasma.

En el cas del CHOL_T trobem una situació semblant a la dels TAG. En general s'accepta que la pèrdua de pes comporta un descens en els nivells de colesterol, però el moment en que aquest es dona varia en funció de l'estudi. Així doncs, autors com Nguyen i col·laboradors [340] coincideixen amb nosaltres en observar un ràpid descens només un mes després de la intervenció, mentre que d'altres com Brolin i col·laboradors [351], tot i assolir una pèrdua de 14 punts en el BMI i un 56% d'excés de pes perdut, als 12 mesos de la intervenció només veuen reduccions del 18% en el CHOL_T .

Pel que fa a l'efecte de la obesitat sobre els nivells d'LDLc, la majoria d'autors no troben alteracions en aquest tipus de colesterol en els individus obesos amb síndrome metabòlica o IR [342]. En canvi, nosaltres els hem vist lleugerament incrementats. Si ens fixem en els efectes de la cirurgia bariàtrica, hi ha autors que descriuen disminucions similars a les descrites per nosaltres amb la pèrdua de pes [340, 352],

Resultats i Discussió

mentre d'altres, com per exemple Zambon i col·laboradors [353], no veuen cap canvi després de realitzar un seguiment de 12 mesos a un grup d'obesos mòrbids als que se'ls havia provocat una pèrdua de pes de 34 Kg (que representen un descens del 25% del pes) mitjançant una GB.

En el cas de l'HDLc, Nguyen i col·laboradors observen una millora dels nivells d'aquest colesterol en el 83% dels individus, però no té en compte el sexe, de manera que és possible que aquesta dada estigui sobrevalorada [340]. En el nostre cas però, el nivells d'HDLc només es van trobar per sota del líndar recomanable durant els tres mesos posteriors a la intervenció, mentre que tant en l'obès com a partir del sisè mes els valors eren normals.

Avui en dia encara hi ha discrepàncies sobre quins són els mecanismes implicats en la reducció d'HDLc. Les tres hipòtesis amb més força són: a) Una davallada de la producció d'apoAI; b). Un augment de l'eliminació de les HDL, secundari a un augment d'activitat de la CETP; i c) Un augment de les VLDL.

a) Pel que fa a la disminució d'apoAI, hi ha autors que han suggerit una inhibició de la síntesi d'apoAI hepàtica provocada pels elevats nivells de NEFA, sovint presents en els obesos [156], o bé una elevada taxa de degradació d'aquesta [148]. Per altra banda, també hi ha autors que suggereixen una implicació del metabolisme glucídic ja que, en estudis in vivo i en línies cel·lulars d'hepatòcits, s'ha vist que un excés de glucosa suprimeix l'expressió del gen apoAI mentre que la insulina l'estimula. Així, en el cas d'individus amb IR, la suma de la hiperglucèmia més la manca de resposta a la insulina podrien disminuir la quantitat d'apoAI disponible per ensamblar HDL [354]. En el nostre cas, veiem com aquest no semblaria ser el mecanisme ja que els nivells d'apoAI en l'obès són similars als del grup control.

b) La hipòtesi de l'augment de CETP es basa en que una major activitat d'aquest enzim provocaria un major traspàs de colesterol de les HDL cap a lipoproteïnes que el necessitessin, convertint les HDL en millor substrat per l'HL i afavorint la seva degradació. A més, s'ha descrit que la massa de l'enzim també es troba augmentada amb l'obesitat [154].

c) La hipòtesi de l'augment de VLDL defensa que per una banda el fetge insulinoresistent produiria un excés de VLDL, alhora que la mateixa IR inhibiria la recaptació d'IDL, LDL i romanents, de manera que s'allargaria el seu temps de residència a plasma. Aquesta darrera hipòtesi està estretament relacionada amb la de la CETP, ja que les IDL, les VLDL i les LDL naixents serien les principals lipoproteïnes receptors de l'HDLc [149, 150]. Tenint en compte que els nostres pacients pateixen d'hipertriglicèridèmia i presenten uns nivells d'apoB elevats, i que, com veurem més endavant, l'LDLr es troba subexpressat en el nostre grup de pacients (Figura 78), aquesta darrera hipòtesi seria la que més s'ajustaria a la nostra realitat.

Resultats i Discussió

La relació $\text{CHOL}_T/\text{HDLc}$ sembla ser tan útil com la de $\text{l'LDLc}/\text{HDLc}$. La seva similitud es pot explicar perquè aproximadament 2/3 parts del colesterol plasmàtic es troben a les LDL en condicions normals, i per tant el CHOL_T i el l'LDL tenen valors similars. En canvi, en els casos d'hipertrigliceridèmia, és preferible utilitzar la relació $\text{CHOL}_T/\text{HDLc}$ ja que la fracció de VLDL s'enriqueix en colesterol [149] i per tant la relació LDLc/HDLc tendeix a subestimar la magnitud de les alteracions en el metabolisme de les lipoproteïnes [343]. Pel que fa a la relació $\text{no-HDLc}/\text{HDLc}$, hi ha autors que han suggerit que aquesta relació representa una mesura més acurada del colesterol present a les partícules aterogèniques i que per tant és millor marcador de risc cardiovascular [342]. En el nostre cas veiem com el perfil és molt similar al del $\text{CHOL}_T/\text{HDLc}$.

En el cas dels nostres pacients (Figura 45), en tots tres casos es pot veure com la relació entre el CHOL_T , el colesterol no-HDL o l'LDLc respecte a l'HDLc disminueix de forma significativa a partir del novè mes de la intervenció; indicant així un canvi cap a un perfil lipídic menys aterogènic, i per tant una disminució del risc cardiovascular. El pic que s'observa al més de la intervenció, tot i no ser estadísticament significatiu, es correspon amb un augment de la presència d' sdLDL .

La reducció dels TAG, del CHOL_T i de les partícules proaterogèniques es dona només tres mesos després de la intervenció, mentre que l'augment de l'HDLc té lloc tres mesos més tard. Així, la pèrdua de pes després de la cirurgia bariàtrica és un mecanisme efectiu per aconseguir una millora del perfil lipídic i per tant un descens en el risc de patir malalties cardiovasculars. A més, s'ha vist que tot i que els pacients recuperin part del pes perdut (fins a un 15% dos anys després de la intervenció) les millores en el perfil lipídic es mantenen [351].

Existeixen poques dades a la bibliografia que descriu la relació de l'apoAIV i l'obesitat, així com els efectes que la cirurgia bariàtrica té sobre aquesta lipoproteïna.

En el nostre estudi, els nivells d' apoAIV , igual que els d' HDLc i apoAI , a l'inici eren similars als del grup control, disminueixen de forma molt marcada al mes de la intervenció (43%, 34% i 32%, respectivament), i es recuperen amb el temps. El descens inicial podria estar causat per la reducció de la superfície absorbent que produeix el RYGB, ja que per una banda s'han descrit descensos molt importants dels nivells d' apoAIV plasmàtica en pacients als que se'ls ha eliminat més del 50% de l'intestí prim [355] i per altra banda, també s'ha descrit que deplecions del gen de l'apoAI (expressat a intestí i fetge) provoquen un descens de l'HDLc [356]. Una altra causa que podria provocar els descens observats és la nova dieta que segueixen els pacients després de l'operació, en la que es controlen els nivells de carbohidrats i de lípids [357]. Aquestes dues hipòtesis només explicarien el comportament d'aquests paràmetres parcialment ja que el duodè, que és la part d'intestí que queda exclosa del contacte amb els aliments en el RYGB, no és el principal lloc de síntesi de l'apoAIV ; i la composició de la dieta dels pacients durant l'any posterior a la intervenció no varia. Així doncs, resta per explicar què succeeix després del primer mes.

Resultats i Discussió

Tanmateix, el nostre grup de recerca recentment ha descrit que en els humans, l'apoAIV disminueix en casos d'atròfia intestinal, de manera que aquesta lipoproteïna és útil com a indicador de la funcionalitat d'aquest òrgan [346, 358]. Podria ser que al segment d'intestí prim corresponent a les nanses alimentària i comuna que continuen plenament funcionals després del RYGB, hi hagués un augment del nombre d'enteròcits o un major desenvolupament de les vellositats, de manera que es recuperaria part de la superfície absortiva, i això estaria reflectit en l'augment d'apoAIV.

Com hem vist en els nostres resultats, un altre tret característic de la dislipèmia present a l'obesitat és l'elevació de la concentració plasmàtica de NEFA, fet confirmat per altres autors [359]. L'origen dels NEFA podria ser una lipòlisi excessiva a l'AT dels obesos, ja que com veurem més endavant (Figura 62) existeix una manca d'inhibició de la lipòlisi, possiblement per part de la insulina, ja que a mesura que aquest teixit es va expandint es va tornant insulinoresistent [102]. S'ha descrit que la insulinoresistència de l'AT és major en el teixit visceral que en el subcutani [68]. Aquest fet augmentaria el flux de NEFA cap a fetge a través de la porta (hipòtesi portal) i augmentaria l'alliberació de VLDL, reflectida per l'elevada concentració d'apoB detectada a la nostra població a l'inici de l'estudi. Això, alhora, faria que augmentessin els nivells de TAG i colesterol circulants, tal i com hem vist que succeeix en els obesos.

L'elevada concentració de NEFA en plasma pot produir IR tant a múscul esquelètic com a fetge [69, 95]. A més, s'ha descrit que una exposició crònica a elevades concentracions de NEFA pot provocar lipotoxicitat a les cèl·lules β -pancreàtiques [100]. Tot plegat, ha portat a alguns autors a suggerir que l'augment de NEFA en plasma és el principal factor modulador de la sensibilitat a la insulina de manera que els NEFA han estat proposats com el principal nexa d'unió entre l'obesitat i la IR [68, 98, 111, 360].

Ja hem comentat que els NEFA plasmàtics provenen de la lipòlisi dels TAG a l'AT. Donat que en els obesos aquest teixit representa un percentatge considerable de la massa corporal, es podia pensar que les concentracions plasmàtiques de NEFA podrien incrementar en la mateixa proporció. Cal destacar que en el nostre cas en canvi, tot i que els individus obesos tenen un percentatge de greix del 60.3%, (més del doble del que es descriu en individus normopès [32]), els seus nivells de NEFA només estan un 21% per sobre dels del grup control. Hi ha estudis que suggereixen que les concentracions plasmàtiques de NEFA no tenen perquè augmentar en la mateixa proporció que la massa grassa. Així en l'estudi d'Opie i col·laboradors [361] mentre el grup d'obesos presentava unes concentracions plasmàtiques de NEFA un 68% més altes que els individus amb normopès, la diferència en la massa grassa era de 10 vegades. Altres estudis també han demostrat que no hi ha relació entre les concentracions plasmàtiques de NEFA i el BMI o la massa grassa corporal [362].

Amb la cirurgia bariàtrica els nivells de NEFA disminueixen, de manera que teòricament la IR milloraria. Tot i això, segons les nostres dades, l'acció dels NEFA sobre la IR no sembla tant evident, ja que la millora en la IR s'observa al primer mes després de la intervenció i en canvi és en aquest punt quan es dona un major increment de la concentració de NEFA plasmàtica que hauria d'agreujar la situació d'IR. Aquestes

Resultats i Discussió

discrepàncies entre els nivells de NEFA i la IR també han estat observades per altres autors [359].

Per altra banda, cal tenir en compte que la totalitat dels nostres pacients patia algun tipus de desordre alimentari a l'inici de l'estudi: el 44% estaven considerats *biggs*, el 9% *sweets*, el 3% *fast foods*, el 21% *snakers* i el 38% *bingers*. Amb la intervenció es produeix un canvi important en les pautes alimentàries dels pacients donat que passen a seguir una dieta controlada (d'unes 850 Kcal), ja sigui líquida, tova o normal, amb una composició equilibrada (46% d'hidrats de carboni, 33% de proteïna i 21% de greixos). Degut al tipus de cirurgia, en els pacients la sensació de sacietat apareix quan només han ingerit petites quantitats d'aliment (la capacitat de l'estómac es troba molt reduïda) i seria un procés més aviat mecànic. Per altra banda, l'absorció de nutrients com els glúcids o les vitamines hidrosolubles és troba disminuïda. Aquests canvis podrien dur a l'organisme a interpretar, durant el període posterior a la intervenció, que l'entrada d'energia no és suficient i afavoriria la mobilització de reserves energètiques mitjançant l'activació de la lipòlisi generalitzada a l'AT. Aquesta provocaria l'augment de NEFA observat a plasma i en conseqüència el de KB. De fet, hi ha autors que han demostrat un augment de la producció hepàtica de KB quan es perfon aquest teixit amb una solució enriquida amb NEFA [363]. Entre el primer i el tercer mes, les reduccions en pes, BMI i Kg de greix corporal (10%, 11% i 21% respectivament) són similars a les que es produeixen durant el primer mes, i tant la composició de la dieta com la seva aportació energètica no varien respecte al darrer període estudiat. Així, podria existir una adaptació del metabolisme o de l'organisme al número de calories ingerides de manera que l'organisme ja no interpretaria que es troba en una situació contínua de "pseudodejuni", tot i que el balanç energètic continuï sent negatiu. A la bibliografia trobem descrita l'adaptació de l'organisme a determinats tipus de dietes com ara, la rica en greixos en el cas dels esportistes, que els porta a augmentar la seva capacitat oxidativa [364] o l'adaptació de la capacitat aeròbica de l'organisme a una dieta cetogènica en un període de 5-6 setmanes [365]. Caldrien més estudis per confirmar si en els obesos s'està donant una adaptació d'aquest tipus.

Pel que fa a les lipases a plasma, en els nostres pacients, l'activitat preheparínica de l'LPL no sembla guardar relació amb l'obesitat. En canvi, hi ha autors que atribueixen un significat clínic a la massa preheparínica de l'enzim. Així, s'ha descrit una relació entre la massa preheparínica de l'LPL i la síndrome metabòlica, de manera que a més factors de la síndrome metabòlica menys massa d'LPL preheparínica [366]. Altres autors han relacionat una disminució de la massa d'LPL preheparínica amb la presència de DM [367]. En el cas dels nostres pacients, tot i que els valors dels que tenen IR són inferiors als dels no insulinoresistents (40.7 ± 3.9 vs. 52.5 ± 6.1 ng/mL), la diferència no arriba a ser estadísticament significativa ($p=0.12$).

Hi ha autors que han suggerit que la massa d'LPL preheparínica a plasma, que resulta de l'alliberació de l'LPL de l'endotel·li, reflectiria de forma més fisiològica la quantitat d'LPL funcional, en comparació amb l'LPL postheparínica [347, 349].

Resultats i Discussió

Olivecrona i col·laboradors van descriure que la massa preheparínica de l'LPL correlacionava negativament amb la concentració plasmàtica de TAG i positivament amb la d'HDLc en pacients amb infart de miocardi, mentre que aquesta relació no s'observava en individus sans [349]. En el nostre cas no s'observa cap correlació amb els TAG, però sí amb el CHOL_T i l'LDLc ($p < 0.01$, $r = 0.28$ i 0.27 , respectivament) i amb l'HDLc i els NEFA ($p < 0.05$, $r = 0.21$ i 0.21 , respectivament).

Respecte l'HL preheparínica a plasma, tot i que en el grup d'obesos s'observa una tendència a tenir activitats més elevades a l'inici de l'estudi, no detectem cap relació ni amb els paràmetres d'adipositat ni amb les concentracions plasmàtiques dels metabòlits estudiats, a excepció dels TAG ($p < 0.01$, $r = 0.21$). En principi, activitats altes d'HL afavoririen el transport revers de colesterol, sent d'aquesta manera antiaterogènica; però en el cas de la dislipèmia que s'observa en l'obès, l'elevada activitat HL afavoreix l'aparició d'un perfil lipídic més aterogènic ja que degut a un excés d'LDL (o VLDL) es promou l'augment de sdLDL relativament pobres en PL i colesterol, i la disminució de l'HDLc [144]. Aquestes alteracions afectarien tant la formació de la placa ateroscleròtica i a la progressió de malalties cardiovasculars, com la taxa de transport revers de colesterol [144].

Mentre que hi ha diversos estudis que mostren una relació clara entre l'activitat postheparínica de l'HL i l'adipositat [368] hi ha molt poques dades referents a l'activitat HL preheparínica, i molt menys en obesos. Alguns autors han descrit que està relacionada amb l'LDLc [369] o amb el BMI, el WHR i les concentracions d'HDLc i de sdLDL [348]. Sorprenentment, en el cas dels nostres obesos, la relació amb els paràmetres lipídics del plasma es perd, però en canvi trobem una forta correlació amb paràmetres com la glucosa ($p < 0.05$, $r = 0.17$), la insulina ($p < 0.01$, $r = 0.23$) i el HOMA-IR ($p < 0.001$, $r = 0.29$). Tanmateix, no podem afirmar que existeixi una relació directa entre obesitat, IR i HL.

4.5 Metabolisme lipídic: teixit adipós

Un cop analitzat l'estat del plasma des del punt de vista del metabolisme lipídic, ens vam fixar en l'AT, ja que en aquest teixit és on teòricament s'acumulen bona part dels lípids absorbits i per tant, creiem que juga un paper important en el desenvolupament de l'obesitat i les seves comorbiditats.

4.5.1 Contingut de DNA

El contingut de DNA per gram de teixit, un indicador de cel·lularitat, en els obesos era menor que en el grup control (en l'AT subcutani 68.9 ± 2.5 vs. 94.3 ± 4.4 $\mu\text{g DNA/mg}$ teixit, tot i no arribar a ser estadísticament significatiu; i en l'AT visceral 84.5 ± 3.9 vs. 107.6 ± 3.5 $\mu\text{g DNA/mg}$ teixit, $p < 0.05$; respectivament). En el cas de l'AT subcutani va augmentar progressivament després de l'operació (76.1 ± 7.2 $\mu\text{g DNA/mg}$ teixit als sis mesos i 131.5 ± 17.3 $\mu\text{g DNA/mg}$ teixit al final de l'estudi, $P_{\text{ANOVA}} < 0.0001$). S'ha d'assenyalar que tant al control com a l'obès, la quantitat de DNA per gram de teixit era significativament inferior ($p < 0.01$) a l'AT subcutani en comparació amb el visceral.

Resultats i Discussió

4.5.2 Composició lipídica

A continuació es presenten les gràfiques corresponents als TAG, CHOL_T, NEFA, i PL (Figura 58) A, B, C i D, respectivament) tant a l'AT subcutani com al visceral.

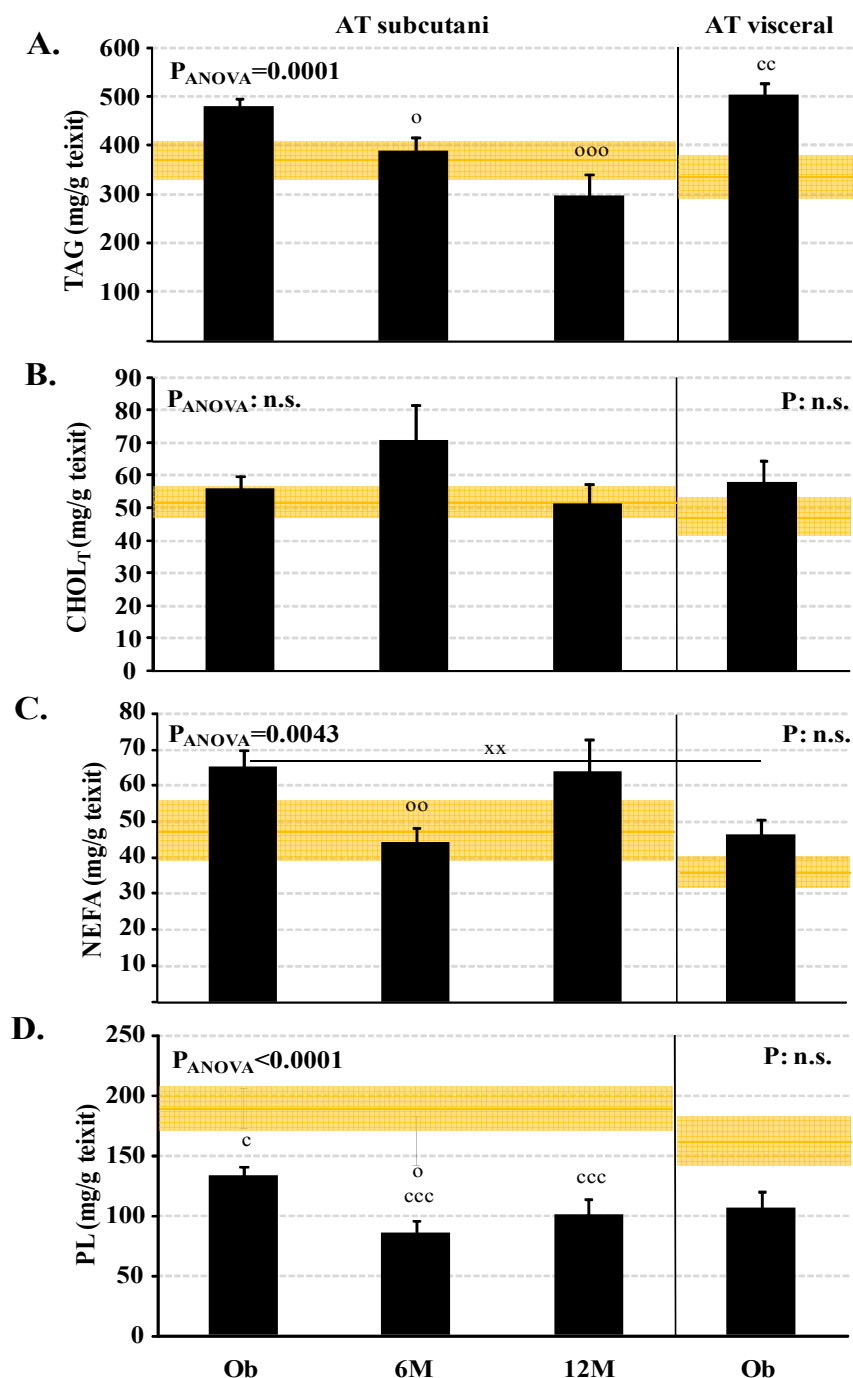


Figura 58. Concentració de lípids a l'AT subcutani i visceral de la població estudiada. A. TAG, B. CHOL_T, C. NEFA i D. PL a l'AT subcutani i visceral. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions en AT subcutani respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey; en AT visceral respecte a AT subcutani (x) i control (c) mitjançant *t* d'Student. Un símbol $p < 0.05$, dos símbols $p < 0.01$, tres símbols $p < 0.001$ i n.s., no significatiu.

La concentració de TAG (Figura 58 A) a l'AT subcutani dels obesos era similar a la del grup control, amb una tendència a ser més elevada, mentre que l'AT visceral presentava una concentració de TAG clarament superior a la del grup control. Després

Resultats i Discussió

de la intervenció, la quantitat de TAG al subcutani va disminuir de forma marcada (reducció del 23% respecte obès).

En el cas d'analitzar els resultats per microgram de DNA (Taula 12), una manera d'expressar el contingut lipídic per cèl·lula, trobem que en l'AT subcutani l'obès tenia 1.8 vegades més TAG per cèl·lula que el grup control i el valor es reduïa en un 50% als 12 mesos de la intervenció. L'AT visceral, presentava 2 vegades més TAG per cèl·lula en comparació amb el grup control. Si comparem tots dos dipòsits grassos en l'obès, l'AT visceral contenia un 12% menys de TAG per cèl·lula en comparació al subcutani.

La concentració de CHOLT a l'AT subcutani es va mantenir constant durant tot el període estudiat, tant si s'expressa en mg CHOLT/mg de teixit (Figura 58 B), com si s'expressa per cèl·lula (Taula 12). No existeixen diferències respecte al control ni entre els dos dipòsits grassos estudiats.

| | AT subcutani | | | | | AT visceral | | | |
|--|-----------------|-----------------|----------------------|-----------|--------------------|--|-----------|-------------------------|---------|
| | Ob | 6M | 12M | Control | P _{ANOVA} | Ob | Control | t d'Student SAT vs. VAT | |
| DNA (µg/g teixit) | 68,9±2,5 | 76,0±7,2 | 131,5±17,1 ooo | 94,3±4,4 | <0,0001 | DNA (µg/mg teixit) | 84,4±3,9 | 107,6±3,5 o | =0,0022 |
| Lípid total (mg/µg DNA) | 11,1±0,4 | 8,87±0,80 | 5,55±1,22 ooo | 7,09±0,74 | <0,0001 | Lípid total (mg/µg DNA) | 9,04±0,63 | 5,39±0,61 ooo | =0,0011 |
| TAG (mg/µg DNA) | 7,17±0,18 | 6,20±0,63 | 3,56±1,01 ooo | 3,98±0,49 | <0,0001 | TAG (mg/µg DNA) | 6,33±0,49 | 3,11±0,42 ooo | =0,0396 |
| CHOL_T (mg/µg DNA) | 0,86±0,07 | 0,97±0,10 | 0,53±0,11 | 0,57±0,06 | =0,0052 | CHOL_T (mg/µg DNA) | 0,72±0,08 | 0,44±0,06 | n.s. |
| NEFA (mg/µg DNA) | 1,01±0,09 cc | 0,64±0,07 oo | 0,55±0,07 oo | 0,51±0,08 | =0,0001 | NEFA (mg/µg DNA) | 0,61±0,07 | 0,31±0,05 | =0,0001 |
| PL (mg/µg DNA) | 2,03±0,14 | 1,31±0,15 oo | 0,90±0,17 ooo, cc | 2,00±0,19 | <0,0001 | PL (mg/µg DNA) | 1,37±0,19 | 1,50±0,19 | =0,0024 |

Taula 12. Concentració de lípids a l'AT de la població estudiada. Comparacions en AT subcutani respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey; en AT visceral respecte a AT subcutani (x) i control (c) mitjançant t d'Student. Un símbol p<0.05, dos símbols p<0.01, tres símbols p<0.001 i n.s., no significatiu.

En el cas dels NEFA, si expressem la concentració per gram de teixit (Figura 58 C), veiem com tant l'AT subcutani de l'obès com el visceral presentaven uns valors aproximadament 1.3 vegades més elevats en comparació amb els dipòsits grassos del grup control. Mentre que si s'expressen per µg de DNA (Taula 12), els valors obtinguts en l'obès resulten el doble dels observats en el grup control.

Després de la intervenció, els NEFA per gram de teixit van experimentar una davallada del 32%, però van tornar a recuperar els valors inicials; mentre que si s'expressen per µg de DNA presentaven un descens continuat, als sis mesos de la intervenció es va observar un descens del 37% en la concentració de NEFA a l'AT subcutani i a l'any, els valors havien disminuït un 46%.

Si comparem els dos dipòsits grassos, l'AT subcutani de l'obès presentava una major quantitat de NEFA que el visceral (aproximadament un 35% més) tant si s'expressa per g de teixit com per µg de DNA (p<0.05 i p<0.001, respectivament).

Resultats i Discussió

Finalment, els PL per gram de teixit (Figura 58 D) es trobaven per sota dels nivells del grup control en tots dos dipòsits grassos al llarg de tot l'estudi, i després de la cirurgia l'AT subcutani presentava una tendència a disminuir encara més, tot i que el descens no va arribar a ser estadísticament significatiu. Si s'expressen per µg de DNA (Taula 12) s'observa una situació similar a la dels NEFA: l'AT subcutani als sis mesos mostrava una baixada significativa del 35% en els nivells de PL, i els valors continuaven baixant fins que als 12 mesos eren un 56% inferiors en comparació amb l'obès.

El contingut de **lípid total per microgram de DNA** (Figura 59), obtingut a partir de la suma dels lípids anteriors, és superior tant en l'AT subcutani (tendència), com en el visceral en comparació amb els controls. En el cas del subcutani, després de la intervenció, la quantitat de lípid per cèl·lula es va reduir a la meitat als 12 mesos.

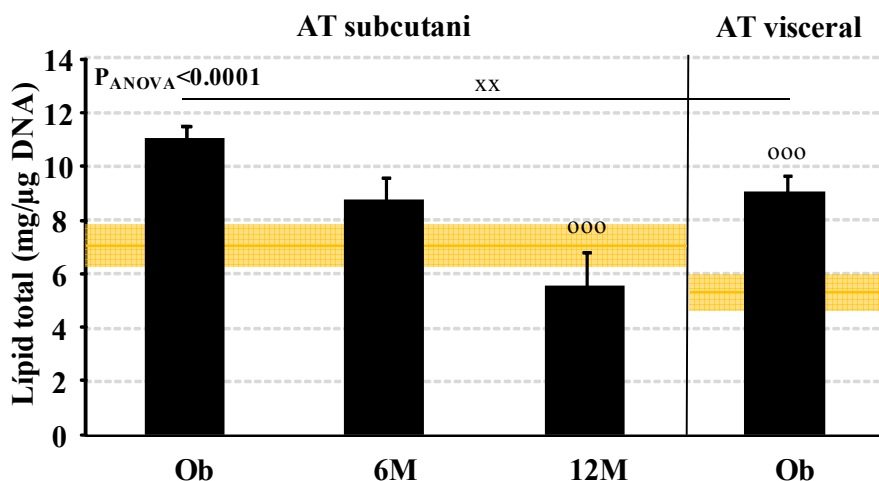


Figura 59. Quantitat de lípid total per cèl·lula a l'AT subcutani i visceral de la població estudiada. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions en AT subcutani respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey; en AT visceral respecte a AT subcutani de l'obès (x) i en AT visceral respecte control (c) mitjançant *t* d'Student. Dos símbols $p < 0.01$ i tres símbols $p < 0.001$.

L'anàlisi d'aquestes dades en conjunt indiquen que en l'obès les cèl·lules de l'AT, tant del subcutani com del visceral, són més grans que les dels controls (per a una mateixa quantitat de teixit es detecta menys DNA, és a dir, un nombre inferior de cèl·lules; i a més, per cada cèl·lula el contingut lipídic (sobretot TAG, NEFA i CHOL) també es troba incrementat. Amb l'operació, a mesura que va tenint lloc la pèrdua de pes, els adipòcits redueixen la seva mida (el contingut de DNA per gram de teixit augmenta) alhora que el contingut lipídic cel·lular disminueix. És a dir, que la hipertròfia de l'AT que s'observava en l'obès remet després de la cirurgia bariàtrica.

4.5.3 Lipases al teixit adipós: activitat i expressió

La massa de l'AT està determinada per un equilibri dinàmic entre l'emmagatzematge de greixos i la lipòlisi. El primer procés està mediat bàsicament per l'LPL, mentre que en la lipòlisi hi intervé principalment l'HSL, i en menor mesura

Resultats i Discussió

l'ATGL. Per això vam voler estudiar quina era la situació d'aquestes lipases en els individus obesos i com evolucionaven després de sotmetre'ls al RYGB.

- **Lipoproteïna lipasa**

En l'AT subcutani de l'obès, l'**activitat LPL per gram de teixit** (Figura 60 A) era 4 vegades superior a la detectada al grup control. De la mateixa manera, l'activitat observada a l'AT visceral dels obesos també es trobava molt per sobre dels valors del grup control, concretament 5.4 vegades. No hem detectat diferències en els nivells d'activitat entre els dos dipòsits grassos estudiats.

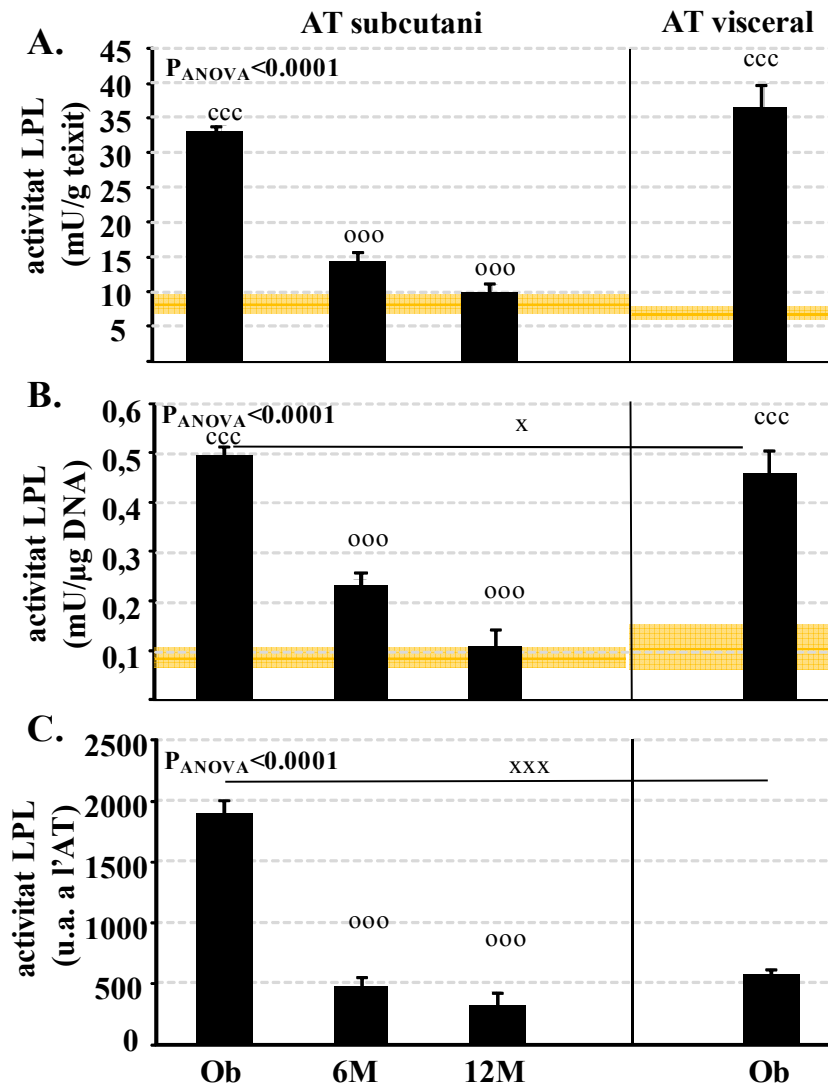


Figura 60. Activitat LPL als diferents AT. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions en AT subcutani respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey; en AT visceral respecte a AT subcutani de l'obès (x) i en AT visceral respecte control (c) mitjançant t d'Student. Un símbol p<0.05, dos símbols p<0.01, tres símbols p<0.001 i u.a., unitats arbitràries.

Per altra banda, l'**activitat per μg de DNA** (Figura 60 B) també es trobava incrementada tant a l'AT subcutani com al visceral. En aquest cas, l'AT subcutani dels obesos presenta una activitat lleugerament superior a la del visceral (p<0.05). Aquest fet podria guardar relació amb la mida de les cèl·lules ja que el contingut de DNA per gram

Resultats i Discussió

de teixit i l'activitat per μg de DNA presenten una bona correlació ($p < 0.001$, $r = -0.70$ en el cas de l'AT subcutani i $p < 0.05$, $r = -0.29$ en el cas de l'AT visceral), és a dir que la capacitat per incorporar lípids en el teixit augmenta com més grans són els adipòcits i aquest fenomen es donaria de forma més pronunciada a l'AT subcutani.

Si tenim en compte la quantitat de greix de cada dipòsit gras podem arribar a tenir una estimació de l'**activitat LPL total en els AT** estudiats (Figura 60 C). D'aquesta manera veiem com en l'obès la capacitat per emmagatzemar TAG a l'AT subcutani era 3.3 vegades superior que la de l'AT visceral.

Després de la cirurgia, l'activitat LPL (tant per gram de teixit com per μg de DNA) van disminuir de forma molt marcada, de l'ordre del 73% en tots dos casos, fins arribar als valors observats en els individus control als 12 mesos després de la intervenció. En la situació de pèrdua de pes, en la que les cèl·lules es van fent més petites, veiem com també presenten una menor activitat LPL.

Per altra banda, es pot veure com hi ha una disminució de la capacitat d'entrada de TAG a l'AT subcutani durant els mesos posteriors a la intervenció (Figura 60 C).

Si mirem l'expressió d'aquest enzim (Figura 61) podem veure com es manté constant al llarg de tot l'estudi i els nivells són similars als dels controls en tots dos AT. En el cas de l'obès, els nivells d'expressió a l'AT visceral són 1.3 vegades més baixos que en el subcutani ($p < 0.01$), mentre que en el grup normopès els nivells d'expressió són similars. L'activitat LPL a l'AT no està correlacionada amb la seva expressió; perquè com ja s'ha descrit, la regulació d'aquest enzim és fonamentalment postraduccional [370].

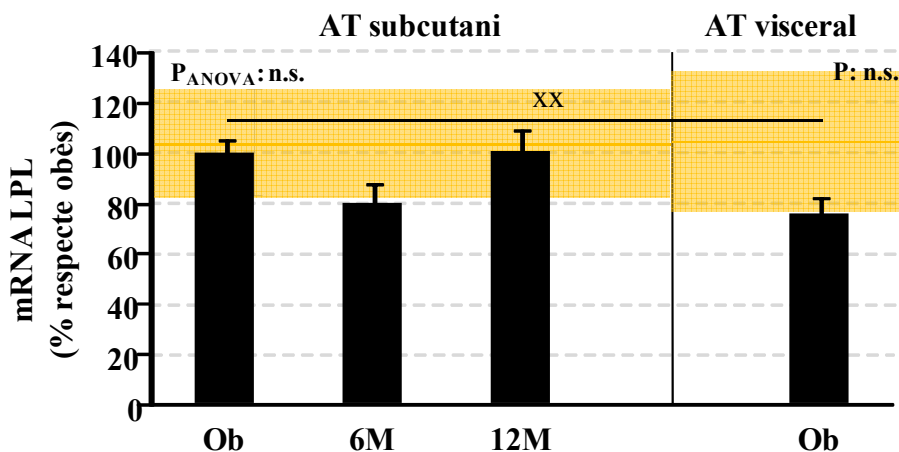


Figura 61. Expressió d'LPL als diferents dipòsits grassos. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions en AT subcutani respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey; en AT visceral respecte a AT subcutani de l'obès (x) i en AT visceral respecte control (c) mitjançant t d'Student. Dos símbols $p < 0.01$ i n.s., no significatiu.

Resultats i Discussió

- **Lipasa sensible a hormones**

Si comparem l'activitat HSL per gram de teixit (Figura 62 A) observada en l'obès amb la del grup control, es pot veure com l'obès presentava 2.8 vegades més activitat, tant a l'AT subcutani com al visceral, tot i tenir menys cèl·lules per gram de teixit. L'activitat HSL a l'AT subcutani de l'obès era similar a la del visceral, fet que també es donava al grup control.

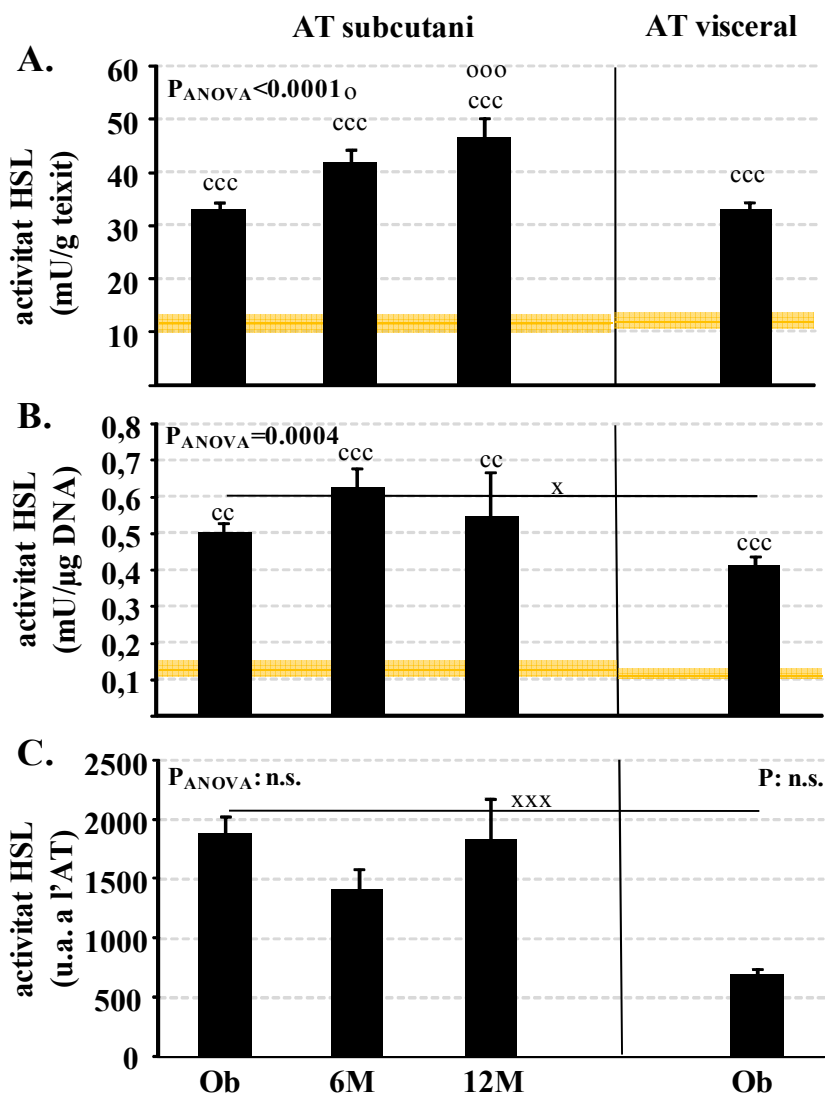


Figura 62. Activitat HSL als diferents AT. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions en AT subcutani respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey; en AT visceral respecte a AT subcutani (x) i en AT visceral respecte control (c) mitjançant *t* d'Student. Un símbol $p < 0.05$, dos símbols $p < 0.01$, tres símbols $p < 0.001$, n.s., no significatiu i u.a., unitats arbitràries.

Per altra banda, l'activitat per μg de DNA (Figura 62 B) també està incrementada en els obesos. A diferència dels controls, l'AT subcutani presenta una major activitat que el visceral. De nou, aquest fet podria guardar relació amb la mida de les cèl·lules ja que el contingut de DNA per gram de teixit i l'activitat HSL per μg de DNA presenten una bona correlació en l'obès ($p < 0.001$, $r = -0.58$ en el cas de l'AT subcutani i $r = -0.56$ en el cas de l'AT visceral). És a dir, que la capacitat per exportar lípids del teixit augmenta com més grans són els adipòcits de tots dos AT.

Resultats i Discussió

Si tenim en compte la quantitat de greix de cada dipòsit gras, podem arribar a tenir una estimació de l'**activitat HSL total** en els AT estudiats (Figura 62 C). D'aquesta manera veiem com en l'obès, la capacitat per exportar TAG de l'AT subcutani era 2.7 vegades superior que la de l'AT visceral.

Després de la cirurgia, l'activitat HSL per gram de teixit a l'AT subcutani va augmentar de forma progressiva, un 27% als 6 mesos i un 42% als 12 mesos (respecte l'obès en tots dos casos), fins arribar a valors gairebé 4 vegades superiors als del grup control. En aquest cas però, tot i que les cèl·lules s'anaven fent més petites a mesura que els individus perdien pes, l'activitat HSL per μg de DNA es va mantenir constant elevada.

Per altra banda, es pot veure com la capacitat per hidrolitzar TAG a l'AT subcutani, tot i que sembla que hi ha una disminució als 6 mesos, es manté als nivells de l'inici de l'estudi (Figura 62 C).

L'activitat HSL a l'AT subcutani correlaciona amb els NEFA plasmàtics ($p < 0.01$, $r = 0.32$), però no hi ha cap correlació amb l'activitat de l'enzim al visceral. A més, l'activitat HSL per cèl·lula també correlaciona amb la concentració de NEFA a l'AT ($\text{mg}/\mu\text{g}$ DNA) ($p < 0.01$ i $r = 0.32$ pel subcutani i $p < 0.05$ i $r = 0.36$ pel visceral).

Si mirem l'expressió d'aquest enzim (Figura 63) podem veure com es va mantenir constant al llarg de tot l'estudi i els nivells eren similars als dels controls en tots dos AT, igual que passava amb l'LPL. En el cas de l'obès, els nivells d'expressió a l'AT visceral són 1.3 vegades més baixos que en el subcutani.

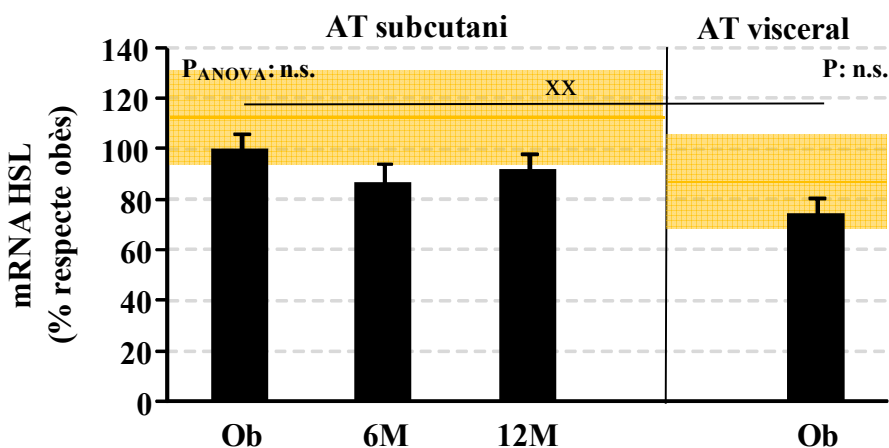


Figura 63. Expressió d'HSL a l'AT subcutani i visceral. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions en AT subcutani respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey; en AT visceral respecte a AT subcutani (x) i en AT visceral respecte control (c) mitjançant t d'Student. Dos símbols $p < 0.01$ i n.s., no significatiu.

Resultats i Discussió

• Triacilglicerol lipasa de l'adipós

Finalment, també es va estudiar l'expressió de l'ATGL als dos AT. Com es pot veure a la Figura 64, els nivells d'expressió a tots dos dipòsits grassos són similars, i no presenten diferències significatives respecte el grup control. Amb la intervenció sembla que hi ha una lleugera disminució, però no arriba a ser estadísticament significativa. L'expressió de l'ATGL i l'HSL presenten una forta correlació ($p < 0.001$, $r = 0.90$).

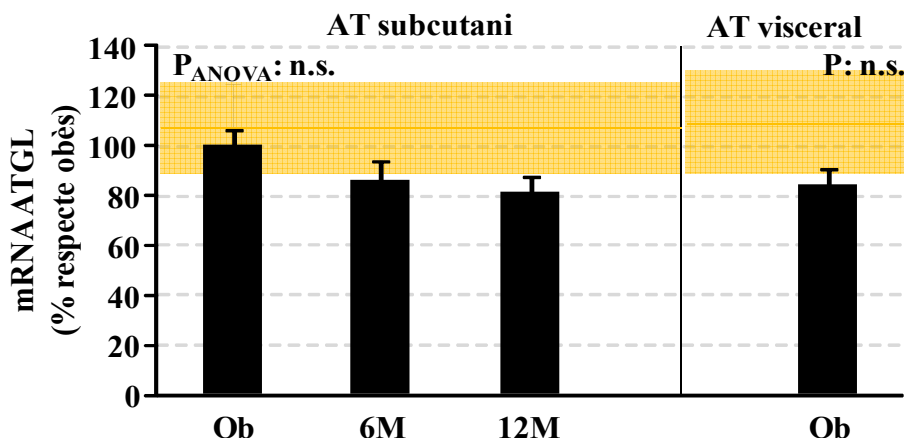


Figura 64. Expressió d'ATGL a l'AT subcutani i visceral. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions en AT subcutani respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey; en AT visceral respecte a AT subcutani (x) i en AT visceral respecte control (c) mitjançant *t* d'Student. n.s., no significatiu.

4.5.4 Transportadors de metabòlits

L'acció de les lipases genera un trànsit de metabòlits (NEFA i glicerol) a través de les membranes dels adipòcits. Nosaltres hem estudiat l'expressió d'un transportador de glicerol l'AQ7 i dos transportadors de NEFA (FABP4 i CD36).

Pel que fa a l'AQ7 (Figura 65), l'obès presenta valors normals, i no hi ha diferències entre els dos dipòsits grassos. Amb la intervenció, els nivells van disminuir un 27% als sis mesos, nivells en els que es va mantenir fins al final de l'estudi.

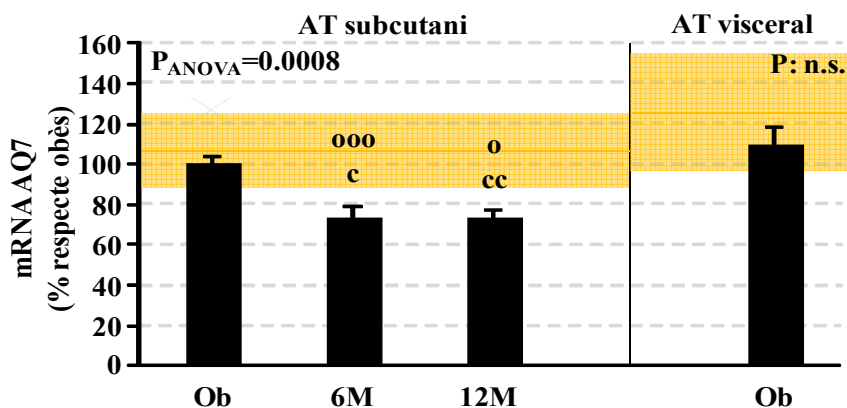


Figura 65. Expressió d'AQ7 a l'AT de la població estudiada. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions en AT subcutani respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey; en AT visceral respecte a AT subcutani (x) i en AT visceral respecte control (c) mitjançant *t* d'Student. Un símbol $p < 0.05$, dos símbols $p < 0.01$, tres símbols $p < 0.001$ i n.s., no significatiu.

Resultats i Discussió

En el cas dels transportadors de NEFA (Figura 66), tant **FABP4** com **CD36** presenten una expressió similar en els obesos respecte el grup control. A més, l'expressió en els obesos no varia amb la intervenció. Cal destacar però, que en l'obès, tots dos transportadors van presentar nivells d'expressió a l'AT visceral inferiors als de l'AT subcutani ($p < 0.05$ en el cas de FABP4 i $p < 0.001$ en el cas de CD36).

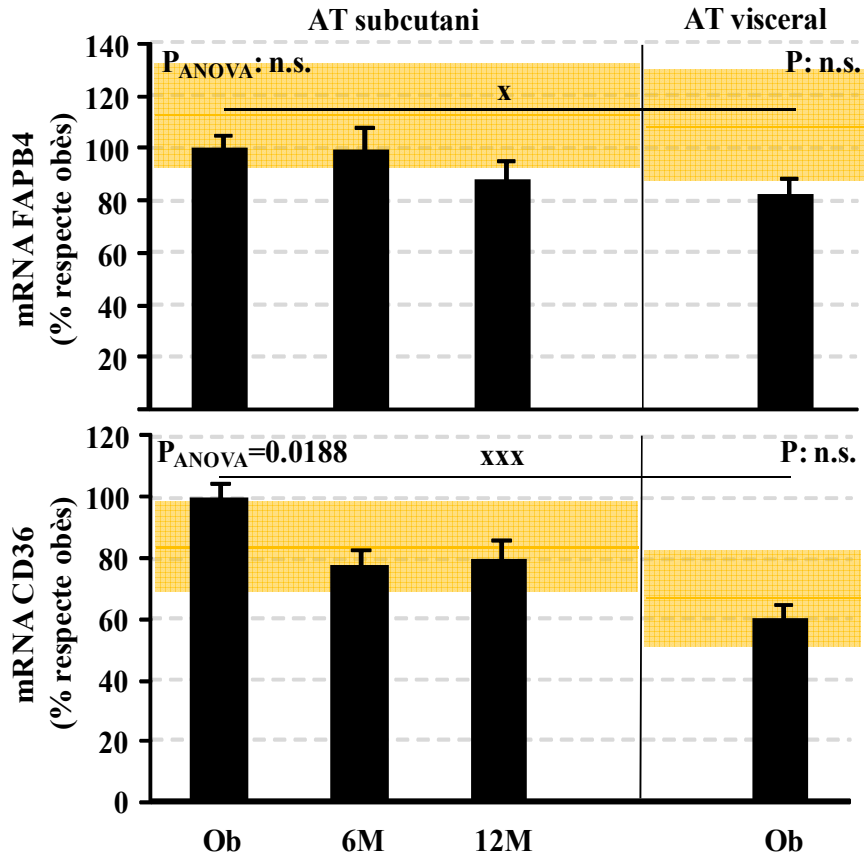


Figura 66. Expressió de FABP4 i CD36 a l'AT de la població estudiada. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions en AT subcutani respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey; en AT visceral respecte a AT subcutani (x) i en AT visceral respecte control (c) mitjançant *t* d'Student. Un símbol $p < 0.05$, tres símbols $p < 0.001$ i n.s., no significatiu.

4.5.5 Proteïnes implicades en la resposta a insulina

S'ha descrit que a mesura que augmenta la mida de les cèl·lules la seva capacitat de resposta a la insulina disminueix, és a dir que el teixit es torna insulinoresistent [83].

En el nostre cas, aquest efecte no el veiem a nivell del **receptor d'insulina** (Figura 67), ja que la seva expressió a l'AT subcutani es manté constatat al llarg de tot el període estudiat i és similar a la dels controls, tant a l'AT subcutani com al visceral.

Resultats i Discussió

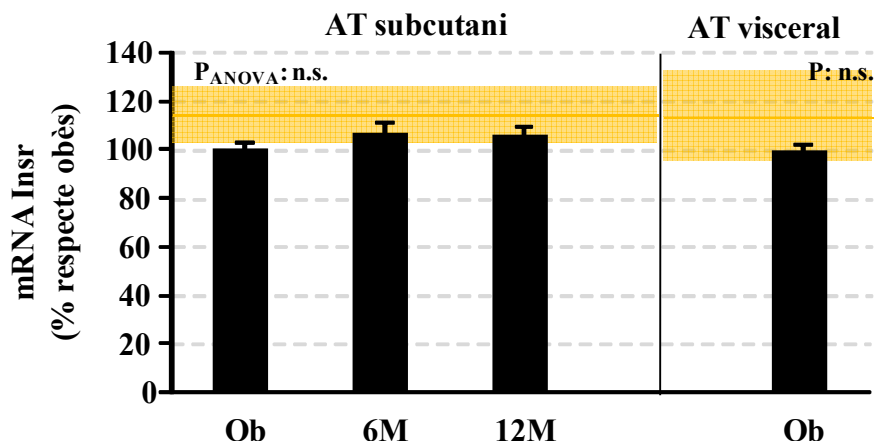


Figura 67. Expressió del receptor d'insulina a l'AT de la població estudiada. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions en AT subcutani respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey; en AT visceral respecte a AT subcutani (x) i en AT visceral respecte control (c) mitjançant *t* d'Student. n.s., no significatiu.

En canvi, si ens fixem en l'expressió de **GLUT4** (Figura 68), el receptor que s'encarrega de captar la glucosa en resposta a la insulina, veiem com en l'AT subcutani de l'obès es troba molt menys expressat en comparació amb el grup control (1.52 vegades menys) i en comparació amb els valors obtinguts als 12 mesos (1.85 vegades menys). Per altra banda, l'AT visceral de l'obès també presenta una expressió inferior a l'observada en el grup control (2.25 vegades menys).

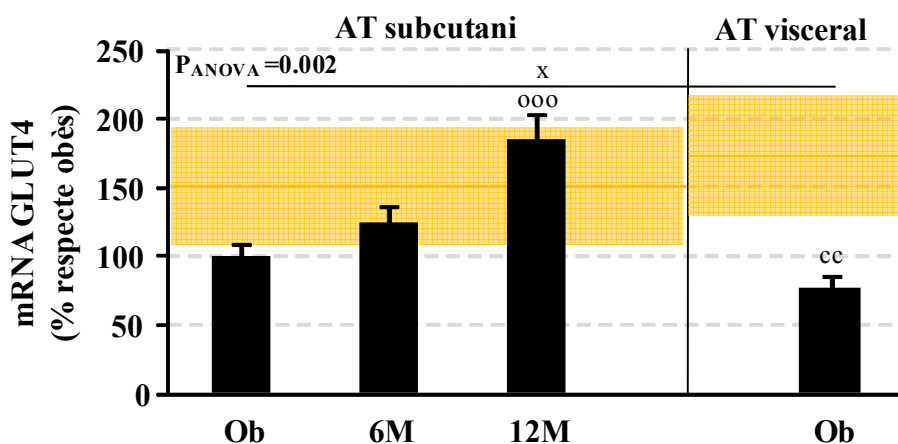


Figura 68. Expressió de GLUT4 a l'AT de la població estudiada. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions en AT subcutani respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey; en AT visceral respecte a AT subcutani (x) i en AT visceral respecte control (c) mitjançant *t* d'Student de dades no aparellades. Un símbol $p < 0.05$, dos símbols $p < 0.01$ i tres símbols $p < 0.001$.

Tot plegat indica que en l'obès tots dos teixits presenten una capacitat de captació de glucosa disminuïda. Amb l'operació, els nivells de GLUT4 a l'AT subcutani augmenten un 85% arribant a valors similars als del grup control. Aquesta proteïna ja ha estat utilitzada com un indicador de la resposta a insulina d'aquest teixit per altres autors [81].

Resultats i Discussió

Que la IR estigui relacionada amb el contingut lipídic de l'AT queda reflectit en el fet que l'expressió de GLUT4 a l'AT subcutani correlaciona negativament amb la quantitat de lípid total en aquest teixit ($p < 0.01$, $r = -0.33$). A més, un altre reflex de la insulinoresistència de l'AT es troba en que l'expressió de GLUT4 al subcutani correlaciona negativament amb la glucosa plasmàtica ($p < 0.001$, $r = -0.41$) amb la insulina ($p < 0.01$, $r = -0.33$) i amb el HOMA-IR ($p < 0.01$, $r = -0.41$).

4.5.6 Discussió sobre metabolisme lipídic al teixit adipós

En el nostre cas, l'AT subcutani dels obesos té uns adipòcits més grans, una activitat LPL per cèl·lula més elevada i una taxa de lipòlisi basal (activitat HSL) superior, en comparació amb l'AT visceral. En relació amb el grup normopès, l'obès presenta una major mida adipocitària i unes activitats LPL i HSL incrementades.

Un any després de la intervenció, l'AT subcutani presenta una disminució en la mida dels adipòcits i una activitat LPL normalitzada, però en canvi l'activitat HSL continua elevada.

Així doncs, els obesos tindrien una major capacitat per emmagatzemar TAG al seu AT, sobretot al subcutani, tot i l'elevada activitat lipolítica de l'HSL. La pèrdua de pes es produiria per una banda per l'activitat HSL mantinguda, però sobretot per una disminució en l'entrada de TAG cap als adipòcits.

Aquests fets estan en concordança amb la idea proposada per alguns autors [80, 91, 371] que defensen que la mida dels adipòcits és un modulador crític del metabolisme dels adipòcits.

En general s'accepta que els obesos tenen adipòcits més grans que els individus amb normopes [372-374], tot i que hi ha autors que no ho comparteixen [373]. Quan l'AT visceral ha d'augmentar la seva capacitat d'emmagatzematge ho fa principalment incrementant el volum de les cèl·lules. En canvi, l'AT subcutani, que presenta una major sensibilitat a l'acció de la insulina i una major capacitat de diferenciació, en primer terme augmenta la diferenciació dels preadipòcits a adipòcits i en segon terme augmenta el volum cel·lular [372]. A partir dels nostres resultats, no veiem indicis d'hiperplàsia a l'AT subcutani dels obesos (basant-nos en les quantitats de PL per gram de teixit), en canvi sí que observem la hipertròfia en tots dos dipòsits grassos (hi ha menys cèl·lules per gram de teixit i aquestes contenen una major quantitat de lípid).

Cal destacar que hi ha autors com Freedland [81] o Virtue i Vidal-Puig [127] que parlen d'un llinar d'expansió de l'AT a partir del qual aquest teixit deixa de poder desenvolupar la seva funció de forma normal. De fet, en l'estudi de Boivin i col·laboradors [80] es pot veure com a mesura que augmenta el BMI dels individus estudiats (de 30.2 ± 4.6 a 58.4 ± 8.2 Kg/m²), l'activitat LPL de l'AT visceral (teixit en el que els adipòcits ja no augmenten més la mida) presenta una tendència a disminuir (de 55 a 45 mmol/10⁶ cèl·lules hora), mentre que en l'AT subcutani, on els adipòcits encara no semblen haver arribat al límit de la seva mida, l'activitat LPL es manté constant. Segons la teoria de l'expandibilitat de l'AT, quan s'assoleix el llinar, el teixit es torna insulinoresistent i comença a secretar citoquines proinflamàtores, amb el conseqüent

Resultats i Discussió

augment de la infiltració de macròfags. De fet, en els nostres pacients els lípids totals per cèl·lula no correlacionen amb cap paràmetre d'IR, però en canvi, els NEFA a l'AT subcutani (que alguns autors han descrit com a possibles promotors de la resposta inflamatòria [375]) correlacionen de forma marcada amb la insulina plasmàtica ($p < 0.01$, $r = 0.34$) i amb el HOMA-IR ($p < 0.05$, $r = 0.29$).

Les correlacions que observem entre GLUT4 i els paràmetres d'IR ens estarien indicant que l'AT de l'obès, sobretot el subcutani, presenta una IR molt marcada, deguda possiblement a un excés de lípids que interferirien en la senyalització del receptor d'insulina. Amb la intervenció, la quantitat de lípid disminueix, la funcionalitat del teixit es normalitzaria i la resposta a la insulina milloraria.

També hi ha força controvèrsia pel que fa a les activitats lipàsiques dels diferents AT, havent-se descrit activitats augmentades, disminuïdes o iguals en l'AT subcutani respecte l'AT visceral, tant per l'LPL [79, 80, 92] com per l'HSL [79, 80, 376]; així com en la comparació d'activitats entre obesos i normopès i els efectes que té la pèrdua de pes sobre aquests enzims [373].

Sovint s'especula que part d'aquestes diferències es deuen a la manera en com s'expressen els resultats (per lípid total, per número de cèl·lules, per gram de teixit, etc.). Nosaltres creiem que per poder donar una interpretació més precisa de l'activitat enzimàtica en un teixit, en casos com l'AT dels obesos en el que la hipertròfia del teixit és un fenomen important i freqüent, és imprescindible donar els resultats no només per gram de teixit sinó que també cal expressar-los per cèl·lula, i és a partir de la interpretació conjunta de les dades que es pot explicar de forma més precisa el què està passant.

Dins de la variabilitat de dades que trobem a la bibliografia, també cal tenir en compte variables com el nombre d'individus estudiats, el rang de BMI emprat, la proporció entre sexes [80], les diferències anatòmiques dels llocs d'origen de les mostres, el tipus de mostra que s'utilitzi (adipòcits aïllats, explants de teixit, línies cel·lulars, etc.) o el tipus de paràmetre que es triï per descriure els resultats (activitat enzimàtica, alliberament de metabòlits, sensibilitat/resistència a l'acció d'agonistes, percentatge de resposta, etc.) [79].

Ja hem vist que l'activitat LPL per cèl·lula augmenta a mesura que l'adipòcit incrementa la seva mida. Estudis com el de Tchernof i col·laboradors [79], realitzat només en dones normopès, observaven que els adipòcits de l'AT subcutani eren de mitjana un 18% més grans ($p < 0.001$) i presentaven un 34% més d'activitat. Fried i col·laboradors [377] van trobar resultats similars en un estudi realitzat en 14 homes i 26 dones amb obesitat mòrbida en el que s'estudiava la mida adipocitària i l'activitat LPL per cèl·lula en diferents localitzacions adiposes, tant subcutànies com viscerals. Així, en el cas de les dones (BMI promig de 45.9 Kg/m^2) els adipòcits més grans es trobaven a l'AT femoral, seguit del gluteal, l'abdominal, el mesentèric, l'epigàstric i el visceral i l'activitat disminuïa seguint el mateix ordre. En canvi, en els homes (BMI promig de 51.1 Kg/m^2) els adipòcits més grans es trobaven a l'AT mesentèric, seguit per l'abdominal, l'epigàstric, el femoral i el gluteal que tenen una mida similar; i finalment

Resultats i Discussió

el visceral; mentre que l'activitat LPL era similar en els 5 primers dipòsits grassos i notablement inferior al visceral. És a dir, segons aquest estudi el sexe dels individus sembla alterar en certa mesura la relació entre activitat LPL i mida adipocitària [53].

Si comparem els obesos amb els normopès, hi ha autors que descriuen una activitat LPL reduïda a l'AT subcutani dels obesos [370]. Altres autors, en canvi observen un increment notable (del 40%) en l'activitat LPL d'aquest teixit [378]. Donat que no s'observen canvis en l'expressió de l'enzim que depenguin del grau d'obesitat o de la mida dels adipòcits [53, 92, 373], aquest increment en els nivells d'activitat LPL podria venir donat per una disminució de l'ANGPL4, proteïna que inhibeix l'activitat LPL i que es troba disminuïda en individus amb sobrepès [379]. Altres factors que també podrien jugar un paper important són la GPIHBP1, les citoquines, els glucocorticoides o la sensibilitat a la insulina, tots ells alterats en l'obesitat [53].

Hi ha autors que no troben una implicació directa entre l'activitat LPL i la susceptibilitat a l'obesitat [380]. D'altres en canvi proposen que un increment d'activitat LPL podria ser una resposta de l'organisme per contrarestar l'excés de TAG presents a plasma [381]. Tanmateix, un excés d'activitat LPL podria portar a la hiperplàsia dels adipòcits que, duta a l'extrem, podria afectar al correcte funcionament de les cèl·lules de l'AT. Com hem comentat anteriorment, això implicaria una estimulació de la secreció de citoquines proinflamàtores [84] i una desregulació de l'expressió de factors relacionats amb el processament de lípids, tal i com descriu Clemente-Postigo i col·laboradors en un estudi realitzat en 38 individus amb obesitat mòrbida extrema [382].

Pel que fa a l'activitat HSL, en general es descriuen un nivells d'activitat basal més elevats a l'AT subcutani en comparació amb el visceral [79, 91]. En canvi, quan s'estimula l'activitat de l'enzim per catecolamines, els nivells d'activitat són superiors a l'AT visceral [80, 91, 383] degut a un major nombre de receptors β adrenèrgics i un menor nombre de receptors α adrenèrgics [78, 80].

Si ens fixem en les diferències entre obesos i normopès, nombrosos autors coincideixen amb nosaltres en que l'AT dels obesos presenta una taxa lipolítica basal incrementada [45, 374, 384]. Tanmateix, encara se'n desconeixen les causes. Alguns autors proposen que la IR que es desenvolupa en aquest teixit podria reduir l'efecte inhibitori de la insulina sobre l'HSL [45]. Altres autors, en canvi, proposen que l'augment de la lipòlisi podria estar promogut per la reducció dels nivells de perilipina, degut a l'augment de TNF α i altres citoquines proinflamàtores que disminuirien la seva transcripció [84, 385]. L'augment de citoquines proinflamàtores es veuria agreujat per l'elevada activitat LPL que promouria la saturació de la capacitat dels adipòcits.

L'activitat HSL incrementada en els obesos també ha estat proposada per alguns autors com una adaptació de l'organisme per mantenir la mida dels adipòcits dintre d'uns nivells que no alteressin el seu metabolisme [91]. Altres autors en canvi descriuen que l'activitat lipolítica per Kg de greix en els obesos disminueix a mesura que augmenta la massa grassa. Tanmateix, aquesta reducció podria quedar parcialment

Resultats i Discussió

emascarada per un augment de la massa grassa total. Aquests autors proposen que la disminució de l'activitat lipolítica podria ser una adaptació a llarg termini de l'organisme a la hiperinsulinèmia, de manera que es reduiria la quantitat de NEFA abocats a la circulació [362].

Per contra, l'activitat HSL estimulada per catecolamines sovint es troba disminuïda en la població obesa. Autors com Languin i col·laboradors [384] proposen que aquest també podria ser un mecanisme adaptatiu de l'organisme per reduir la secreció de NEFA a plasma similar al proposat per Karpe i col·laboradors [362]. Tanmateix, la disminució de la resposta a catecolamines podria ser un defecte primari que conduiria al desenvolupament de l'obesitat, ja que dificulta la mobilització de greixos.

No hi ha gaires estudis publicats en els que s'hagi realitzat un seguiment després de la intervenció, i els que trobem es centren en l'AT subcutani, ja que per qüestions ètiques no és viable obtenir mostres d'AT visceral a diferents temps. Tot i que sembla haver coincidència en que la pèrdua de pes no afecta per igual al subcutani d'homes i dones, hi ha discrepàncies pel que fa als resultats obtinguts. Mentre que Löfgren i col·laboradors descriuen una disminució (i normalització) de la lipòlisi basal 2 anys després d'una GB en dones [374], Kolehmainen i col·laboradors no observen canvis 1 any després d'haver realitzat el mateix tipus d'intervenció [373]. En homes, en canvi, Löfgren i col·laboradors no observen cap variació pel que fa a l'activitat HSL després de la intervenció [374] mentre que Kolehmaninen i col·laboradors descriuen un descens [373]. En cap d'aquests treballs s'estudia la mida dels adipòcits, i aquest paràmetre podria ser important alhora d'explicar les diferències detectades [79, 80].

En suport de l'activitat HSL mantinguda que observem en els nostres pacients trobem que els transportadors de NEFA, tant FABP4 com CD36, tot i que no es troben alterats respecte al grup control, mantenen estables els seus nivells d'expressió a l'AT subcutani (tot i que CD36 sembla presentar una tendència a disminuir als 6 mesos de la intervenció), fet que permetria mantenir l'exportació de NEFA fora de l'AT.

La dada que sobta es l'AQ7, ja que tot i que l'activitat HSL es manté constant després de la intervenció, aquest canal de glicerol redueix progressivament la seva expressió després de la intervenció, fins i tot per sota dels nivells observats al grup control. L'obesitat està associada amb una disminució de l'esterificació dels NEFA tant a l'AT com a múscul esquelètic. La incapacitat per emmagatzemar els NEFA de forma adequada a l'AT podria iniciar una cascada d'events que portarien a la sobrecàrrega de NEFA als teixits no adiposos, una sobrecàrrega de la via oxidativa i una acumulació d'espècies lipídiques tòxiques i TAG en aquests teixits que aniria acompanyada d'un augment de la IR [386]. La disminució de l'AQ7 podria estar indicant que la reesterificació de NEFA a l'AT, alterada en els obesos, es podria estar normalitzant durant la pèrdua de pes.

Després de la intervenció, els individus porten una dieta equilibrada i, en la majoria dels casos, augmenten la seva activitat física. S'ha observat que l'activitat LPL a múscul

Resultats i Discussió

després d'una pèrdua de pes es troba disminuïda, en alguns casos més del 70% [53], alhora que s'ha descrit una reducció de la capacitat oxidativa muscular en individus obesos o que han perdut pes [387]. En aquesta situació, una activitat HSL augmentada, com la que observem en els nostres pacients, podria proporcionar a l'organisme la quantitat d'energia necessària.

Un esquema de la situació de l'AT abans i després de la cirurgia bariàtrica és el que es presenta a la Figura 69.

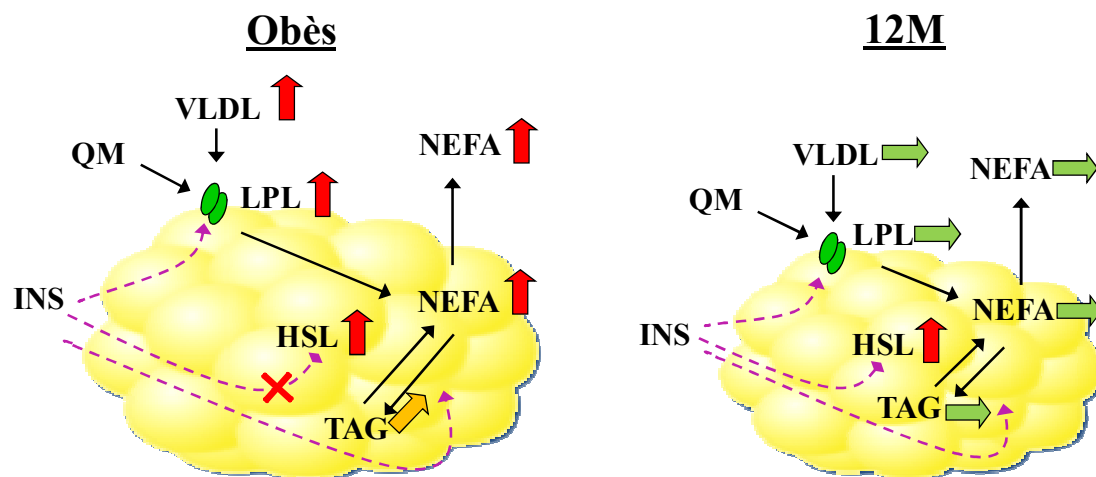


Figura 69. Representació esquemàtica del metabolisme lipídic a l'adipòs de la població estudiada. Ins, insulina; QM, quilomicrons; VLDL, lipoproteïnes de molt baixa densitat; NEFA, àcids grassos no esterificats; TAG, triacilglicèrids; LPL, lipoproteïna lipasa; HSL, lipasa sensible a hormones. Les fletxes indiquen la concentració del metabòlit a plasma o per cèl·lula o bé l'activitat enzimàtica per cèl·lula en comparació amb el grup normopès.

4.6 Metabolisme lipídic: NAFLD

Una alteració freqüent en els obesos és el fetge gras o NAFLD. Sovint se la descriu com la manifestació hepàtica de la síndrome metabòlica. És per això que vam estudiar en quin estat es trobava el fetge dels nostres pacients i quina evolució presentaven després de la cirurgia bariàtrica.

4.6.1 Paràmetres plasmàtics

• Transaminases

Els nostres pacients van presentar en general uns nivells de transaminases (Taula 13) dintre dels rangs de normalitat, excepte l'ALT al mes de la intervenció que es trobava lleugerament augmentada. Tot i això, als 3 mesos ja s'havia normalitzat.

Resultats i Discussió

| | Ob | 1 M | 3 M | 6M | 9M | 12M | P _{ANOVA} |
|------------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| AST(UI/L) | 24,4±2,6 | 35,7±2,5 ooo | 25,8±2,0 | 19,9±1,2 | 19,4±1,1 | 20,6±1,6 | <0,0001 |
| ALT (UI/L) | 33,9±3,2 | 55,1±5,4 oo | 32,4±4,1 | 21,0±2,2 oo | 18,4±1,4 ooo | 20,2±1,9 oo | <0,0001 |
| GGT (UI/L) | 43,1±6,5 | 46,4±9,6 oo | 25,0±4,3 ooo | 27,0±6,8 ooo | 24,4±7,3 ooo | 17,2±1,6 ooo | <0,0001 |

Taula 13. Concentració de transaminases plasmàtica en la població estudiada. Comparacions respecte a l'obès (o) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Dos símbols p<0.01 i tres símbols p<0.001.

Els nivells de gamma glutamil transpeptidasa (GGT) es trobaven en tots els casos excepte un per sota dels valors de referència, permetent descartar l'existència d'una esteatohepatitis alcohòlica.

- **Índex AST/ALT**

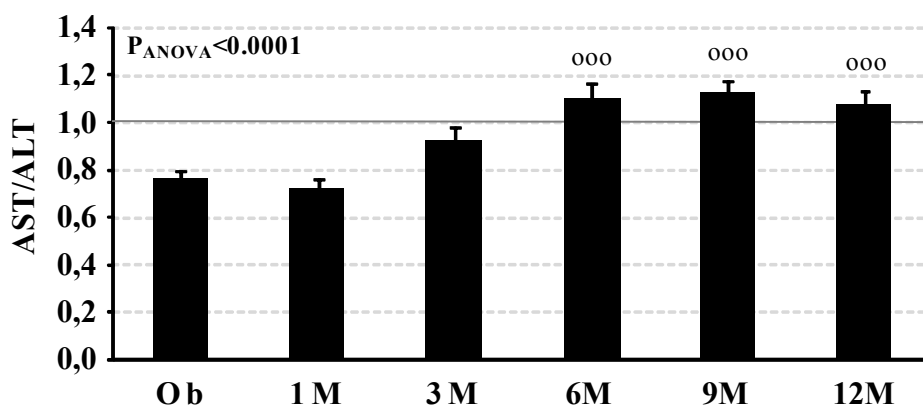


Figura 70. Quocient AST/ALT en la població estudiada. La línia gris indica el valor llinar de normalitat. Comparacions respecte a l'obès (o) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Tres símbols p<0.001.

Un quocient AST/ALT inferior a 1 ha estat proposat per alguns autors com a bon indicador de patologia hepàtica [388]. En el cas dels nostres pacients, a l'inici de l'estudi aquest quocient (Figura 70) es trobava per sota d'1 i, tot i mantenir el valor estable durant el primer mes posterior a la intervenció, va anar augmentant fins a valors de normalitat durant el període estudiat.

4.6.2 Histologia i classificació de Brunt

De les biòpsies obtingudes durant la intervenció i posteriorment als 12 mesos, es va realitzar una histologia per poder determinar el grau i l'estadi de NAFLD. Un exemple representatiu de les imatges observades és el que es mostra a la Figura 71.

Resultats i Discussió

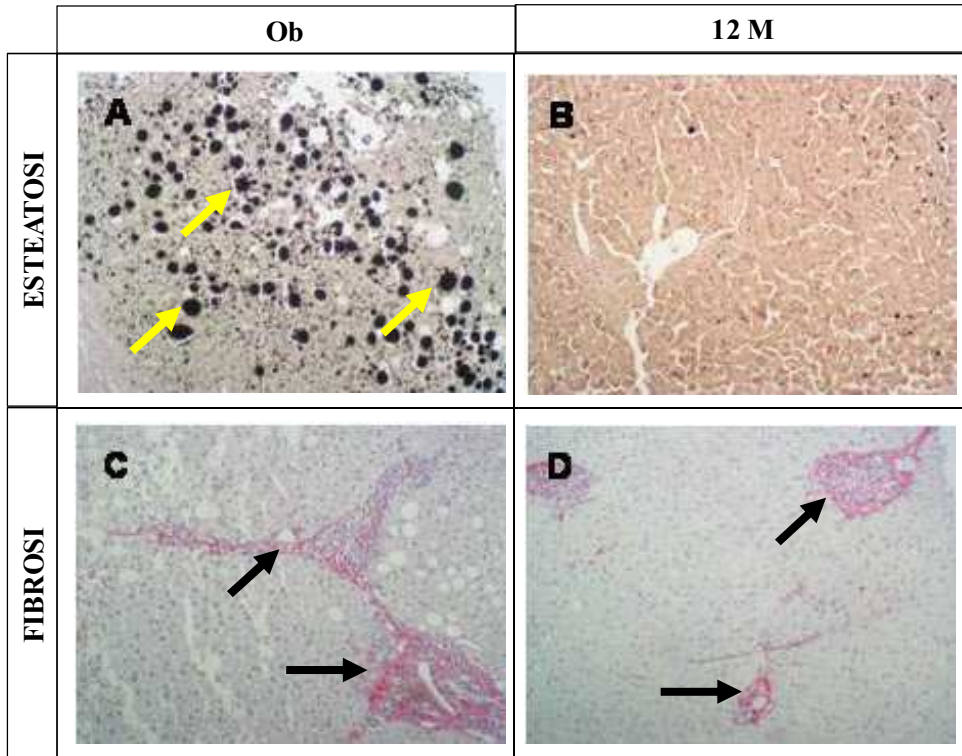


Figura 71. Imatges de microscopia de les biòpsies analitzades. Les imatges superiors corresponen a biòpsies hepàtiques tenyides amb osmi. Les imatges inferiors corresponen a biòpsies hepàtiques tenyides amb picrosiri. Les fletxes grogues indiquen dipòsits lipídics i les negres zones fibròtiques.

En la imatge es pot observar com els dipòsits lipídics disminueixen de forma dràstica als 12 mesos de la intervenció, mentre que les zones fibròtiques, tot i que també disminueixen ho fan en menor mesura.

Els resultats dels estudis d'histologia que es van dur a terme a l'Hospital de la Vall d'Hebron es mostren a la Taula 14.

| % d'individus en cada cas | | Grau o estadi | | | |
|---------------------------|-----|---------------|----|----|----|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Esteatosi | Ob | 3,2 | 55 | 29 | 13 |
| | 12M | 92 | 8 | - | - |
| Balonització | Ob | 35 | 39 | 23 | 3 |
| | 12M | 96 | 4 | - | - |
| Inflamació lobulillar | Ob | 3 | 90 | 6 | - |
| | 12M | 58 | 42 | - | - |
| Inflamació portal | Ob | 3 | 87 | 10 | - |
| | 12M | 25 | 75 | - | - |
| Fibrosi | Ob | 3 | 61 | 29 | 6 |
| | 12M | 33 | 46 | 17 | 4 |

Taula 14. Puntuació histològica segons la classificació de Brunt. El grau i l'estadi es classifiquen de menor (0) a major (3) gravetat. Els resultats s'expressen en percentatge d'individus en cada cas.

Resultats i Discussió

Es pot veure com en l'obès, el 97% dels individus presentaven algun grau d'esteatosi i en més del 90% dels casos també presentaven algun signe d'inflamació o fibrosi. Així, a l'inici de l'estudi el 3% dels individus presentaven només NAFLD i el 94% NASH. Als 12 mesos de la intervenció l'esteatosi havia desaparegut en gairebé tots els pacients excepte 4 (un d'ells presentava un BMI per sobre de 40 Kg/m² al final de l'estudi), que encara continuaven patint NASH. Cal destacar que tot i que l'estadi de la fibrosi també millora en la majoria dels casos, és una afectació que no s'acaba de resoldre després de la intervenció.

4.6.3 DNA

La quantitat de DNA per gram de teixit va disminuir amb l'operació (1,9±0,1 mg DNA/g teixit en l'obès vs. 1,3±0,1 mg DNA/g teixit als 12 mesos; p=0.0007).

4.6.4 Composició lipídica

Donat que el fetge és un altre teixit altament implicat en el metabolisme dels lípids, i aquests es troben alterats al plasma i a l'AT dels obesos, vam voler estudiar la composició lipídica del fetge, igual que havíem fet amb l'AT.

Pel que fa als diferents components lipídics, TAG, CHOL (total, lliure i esterificat), NEFA i PL es presenten a la següent gràfica, tant en l'obès com als 12M.

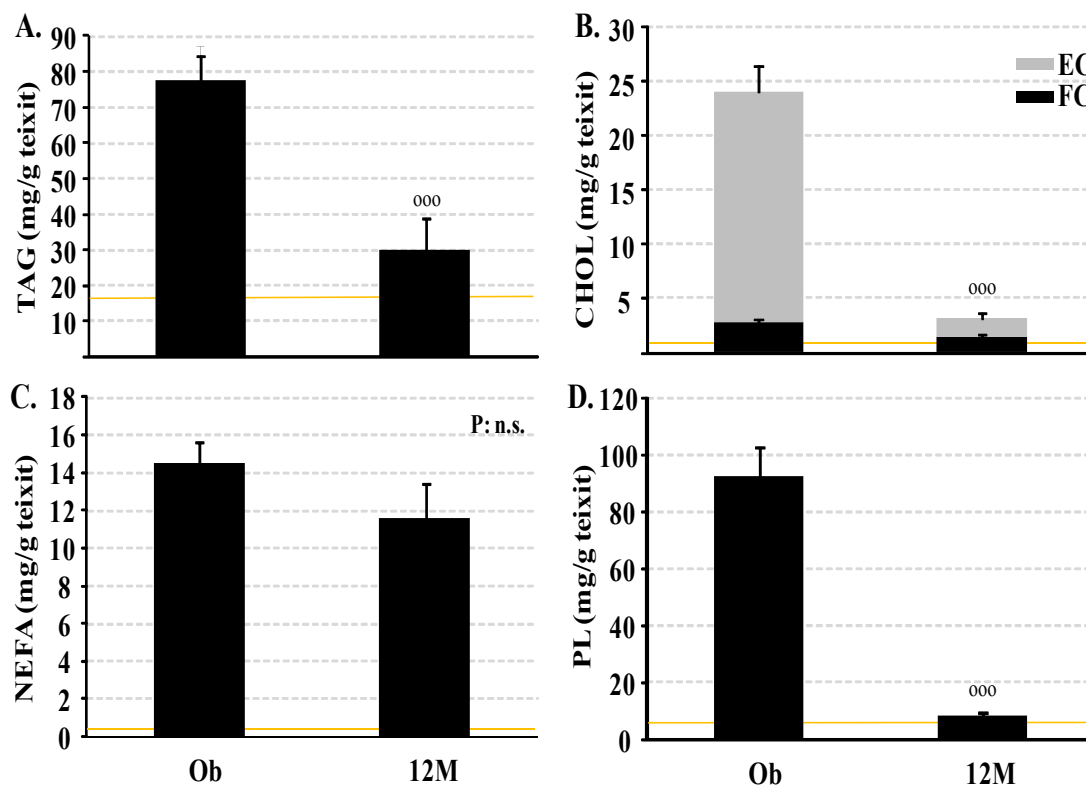


Figura 72. Concentració de lípids al fetge de la població estudiada. A. Triacilglicerols, B. Colesterol (total, lliure i esterificat), C. Àcids grassos no esterificats i D. Fosfolípids. La línia taronja correspon als valors del fetge control. Comparacions respecte a l'obès (o) mitjançant *t* d'Student. Tres símbols p<0.001 i n.s., no significatiu.

Resultats i Discussió

Tal i com es pot veure a la Figura 72, en general tots els lípids estudiats presenten concentracions notablement elevades en l'obès en comparació als valors obtinguts al fetge control.

Després de la intervenció, la quantitat de TAG per gram de teixit disminueix de forma marcada (61%).

El CHOL_T també presenta una reducció important amb la intervenció (90%). La reducció es dona de forma més pronunciada a la fracció d'EC (92%); mentre que l'FC per g de teixit es redueix en un 54%.

Els PL, igual que la resta de lípids esmentats fins ara, també presenten un descens pronunciat de la seva concentració (aproximadament del 90%).

Una dada que crida l'atenció és el comportament dels NEFA. De tots els lípids estudiats, aquests són els que presenten una disminució menor per g de teixit (només un 13,4%). És a dir, que mentre tots els lípids mostren una clara tendència a disminuir, apropant els seus valors als observats al fetge control, i per tant indicant una tendència a la normalització, els NEFA continuen clarament alterats 12 mesos després de la intervenció.

No s'ha fet cap mesura de la taxa d'oxidació dels NEFA però l'expressió de CPT1A, l'enzim implicat en el transport dels NEFA cap a l'interior de la mitocondria per a la seva posterior oxidació, era similar en els obesos respecte al fetge control i la seva expressió no es va alterar amb la intervenció $100 \pm 4,7\%$ en els obesos, $90,5 \pm 10,6\%$ als 12 M i 75% en el fetge control).

A l'inici de l'estudi, els fetges dels individus obesos tenien un percentatge de lípids al teixit (Figura 73) unes 8 vegades per sobre dels valors observats al fetge control i 4.2 vegades superior en comparació amb els valors observats als 12 mesos de l'operació (descens del 76%), moment en el que els valors són similars als del control.

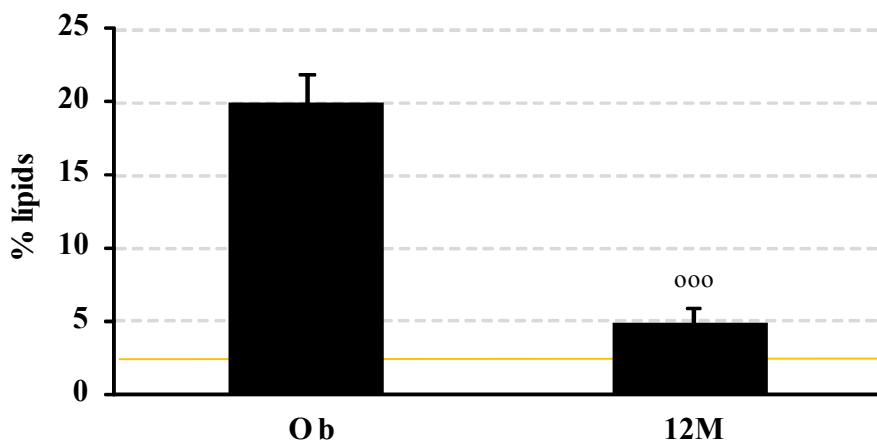


Figura 73. Percentatge de lípids al fetge de la població estudiada. La línia taronja correspon als valors del fetge control. Comparacions respecte a l'obès (o) mitjançant *t* d'Student. Tres símbols $p < 0.001$.

El percentatge de lípids hepàtics presenta una molt bona correlació ($p < 0,001$) tant amb el contingut hepàtic de TAG ($r = 0.91$), com amb el de CHOL_T ($r = 0.92$) i amb els NEFA ($p < 0.01$, $r = 0,39$). En el nostre cas, cal destacar que el percentatge de lípids a fetge també correlaciona positivament amb mesures antropomètriques com el BMI

Resultats i Discussió

($p < 0.01$, $r = 0.41$), el WHR ($p < 0.01$, $r = 0.55$) i els Kg de greix visceral ($p < 0.05$, $r = 0.40$) establint una relació entre l'obesitat i la patologia del fetge gras. També presenta correlació amb paràmetres com la insulina o el HOMA-IR ($p < 0.05$, $r = 0.37$ i $r = 0.38$, respectivament).

4.6.5 Lipases: activitat i expressió

De la mateixa manera que a l'AT, també ens vam interessar per l'estat de les lipases al fetge.

- **Lipasa hepàtica**

La lipasa hepàtica es troba implicada en el metabolisme de les lipoproteïnes, ja que promou la captació hepàtica de l'HDLc. Donat que hem vist que tant la composició lipídica del fetge com l'HDLc es troben alterades en els obesos, vam voler conèixer l'estat d'aquesta lipasa en els nostres pacients.

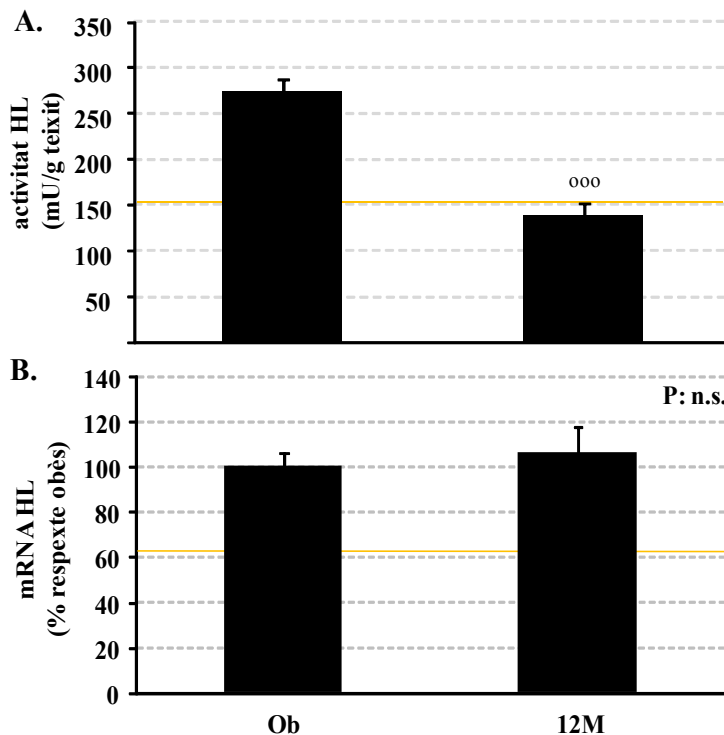


Figura 74. Activitat i expressió de l'HL a fetge en la població estudiada. La línia taronja correspon als valors del fetge control. Comparacions respecte a l'obès (o) mitjançant *t* d'Student. Tres símbols $p < 0.001$ i n.s., no significatiu.

El fetge dels obesos mòrbids presentava gairebé el doble d'activitat HL per gram de teixit que el fetge control, i l'activitat d'aquest enzim es va normalitzar als 12 mesos de l'operació (Figura 74 A).

En canvi, l'expressió de l'HL (Figura 74 B) no varia durant tot el període estudiat i es manté 1.6 vegades per sobre dels nivells d'expressió del fetge control. L'elevada activitat HL que s'observa al fetge dels obesos podria estar directament implicada en l'elevació de TAG i PL en aquest òrgan.

Resultats i Discussió

L'HL correlaciona amb paràmetres antropomètrics com el BMI ($p < 0,001$, $r = 0,52$) i els Kg de greix total ($p < 0,01$, $r = 0,45$). A més, també correlaciona amb paràmetres plasmàtics com la leptina ($p < 0,01$, $r = 0,40$) i paràmetres hepàtics com els NEFA ($p < 0,05$, $r = 0,36$) o la CRP ($p < 0,05$, $r = 0,38$), ambdós possibles fonts d'inflamació.

• Lipoproteïna lipasa

La presència d'LPL activa en el fetge adult és un fenomen poc habitual o gairebé anecdòtic, i generalment la que es detecta correspon a la que arriba pel torrent sanguini per ser degradada. Tanmateix, el nostre grup ha descrit en model murí que en situacions com el fetge de neonat de rata [389] o en un model de regeneració hepàtica en rata [390] l'enzim no només hi és present en la seva forma activa sinó que també s'hi troba l'mRNA.

Com que havíem detectat LPL hepàtica en situacions patològiques, ens vam preguntar si en el NALFD, malaltia en la que el contingut lipídic del fetge augmenta, l'LPL podria estar jugant un paper clau.

El fetge dels obesos mòrbids també presenta el doble d'activitat LPL per gram de teixit que el fetge control (Figura 75) i l'activitat de l'enzim, disminueix un 25% als 12 mesos de la intervenció.

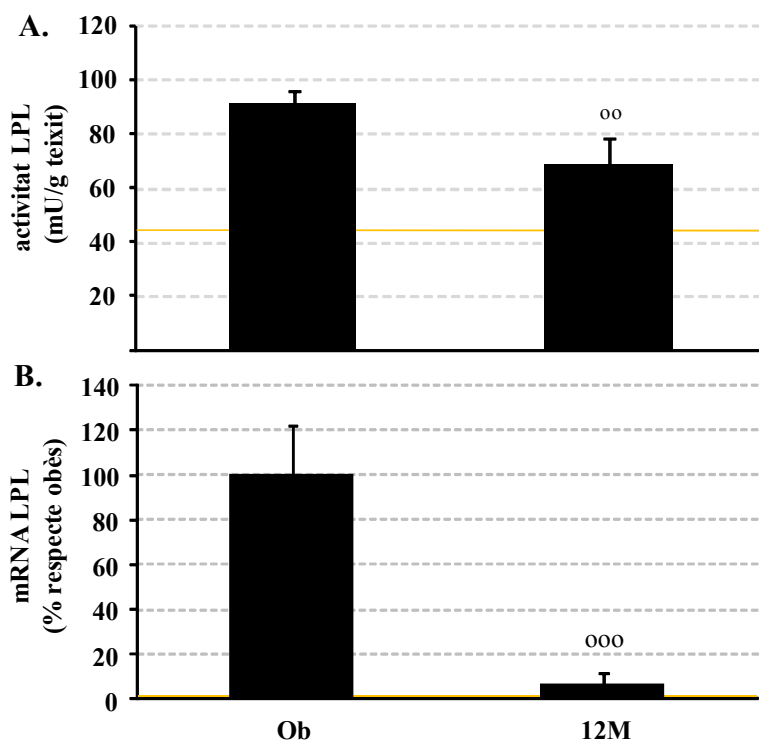


Figura 75. Activitat i expressió de l' LPL a fetge de la població estudiada. La línia taronja correspon als valors del fetge control. Comparacions respecte a l'obès (o) mitjançant *t* d'Student. Dos símbols $p < 0,01$.

Si ens mirem l'expressió de l'LPL a fetge (Figura 75) es pot observar com en l'obès l'expressió d'LPL és perfectament detectable, mentre que als 12 mesos, igual que al grup control, l'enzim gairebé no s'expressava.

Resultats i Discussió

Donat que tant a l'any de la intervenció com en el fetge control es detecta activitat de l'LPL però no expressió de l'enzim, es podria dir que aquesta LPL és d'origen extrahepàtic, és la que prové de la resta de l'organisme i arriba a fetge per ser degradada.

L'activitat LPL a fetge presenta una bona correlació amb el pes corporal ($p < 0.01$, $r = 0.44$) i amb el perímetre de cintura ($p < 0.05$, $r = 0.33$). Per altra banda, no correlaciona amb cap dels paràmetres lipídics de plasma, excepte els KB ($p < 0.05$, $r = -0.35$). En canvi, correlaciona amb la concentració intrahepàtica de NEFA ($p < 0.05$, $r = 0.37$). L'expressió no correlaciona amb el percentatge de lípids a fetge ni amb els principals lípids estudiats, però sí que presenta correlació amb la concentració plasmàtica de TAG ($p < 0.001$, $r = 0.62$) i de CHOL_T ($p < 0.05$, $r = 0.33$).

- **Triacilglicerol lipasa de l'adipós**

Tot i que l'expressió de l'ATGL és perfectament detectable a fetge, aquesta no presenta cap variació amb la intervenció ($100 \pm 3.6\%$ en l'obès *vs.* $106.0 \pm 6.5\%$ als 12 mesos, respecte l'obès) ni diferències significatives en comparació amb el fetge control (105.9% d'expressió respecte l'obès).

4.6.6 Proteïnes implicades en el metabolisme del colesterol a fetge

- **Hidroximetil-glutaril CoA reductasa**

L'HMGCoA reductasa, l'enzim clau en la regulació hepàtica de colesterol, no va presentar diferències significatives respecte els valors observats al fetge control ($100 \pm 12.2\%$ en l'obès *vs.* 112.5% al fetge control) ni tenia alterada la seva expressió amb la intervenció ($123.1 \pm 21.0\%$ d'expressió respecte l'obès).

- **Receptor escombriaire de tipus B1**

L'SRB1 (Figura 76) en canvi, va presentar un 27% més d'expressió en l'obès en comparació amb el fetge control i va continuar augmentant ($p < 0,01$) als 12 mesos de la intervenció.

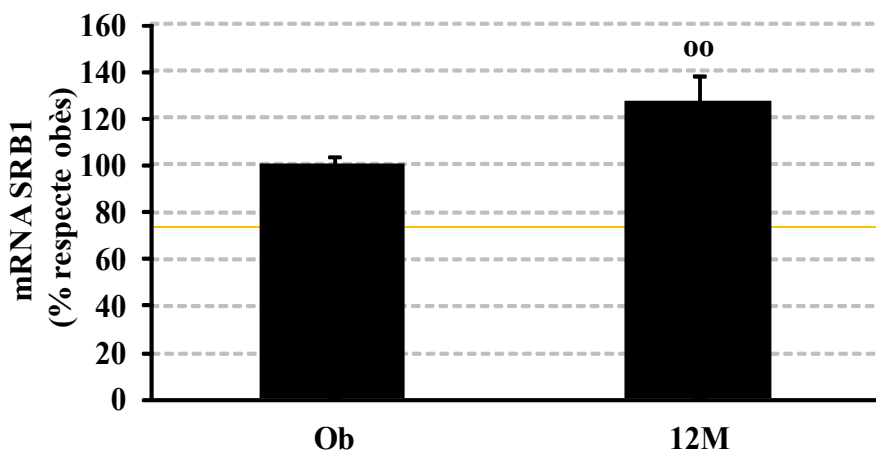


Figura 76. Expressió d'SRB1 a fetge de la població estudiada. La línia taronja correspon als valors del fetge control. Comparacions respecte a l'obès (o) mitjançant *t* d'Student. Dos símbols $p < 0.01$.

Resultats i Discussió

- **7 α hidroxilasa**

La CYP7 α 1 (Figura 77), enzim limitant de la síntesi de sals biliars a partir de CHOL, va presentar una expressió considerablement inferior a l'observada al fetge control, i encara va disminuir un 55% als 12 mesos de la intervenció.

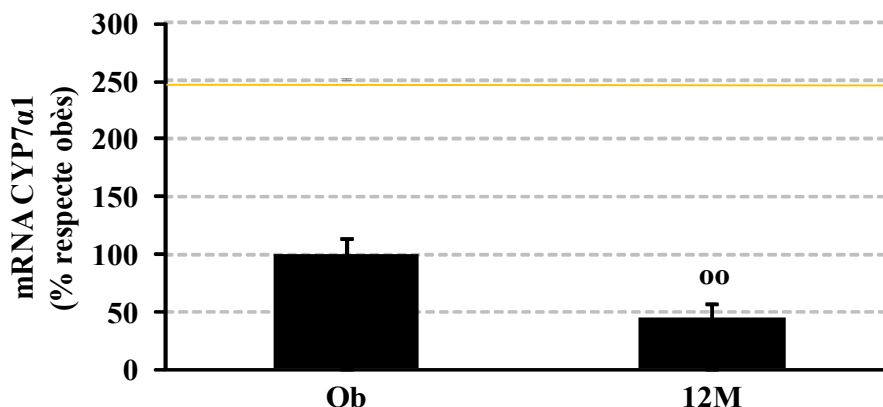


Figura 77. Expressió de la CYP7 α 1 al fetge de la població estudiada. La línia taronja correspon als valors del fetge control. Comparacions respecte a l'obès (o) mitjançant *t* d'Student. Dos símbols $p < 0.01$.

Això podria estar indicant una síntesi de sals biliars disminuïda en l'obès i que encara es redueix més després de la intervenció. Als nostres pacients se'ls practica una colecistectomia preventiva, ja que la incidència de litiasi biliar després d'una intervenció de cirurgia bariàtrica augmenta de forma significativa [391]. S'ha descrit que una operació d'aquest tipus augmenta l'expressió de la Cyp7 α 1 [392]. Desconeixem quina pot ser la causa del descens que observem en els nostres pacients.

4.6.7 Proteïnes implicades en el metabolisme hepàtic de les lipoproteïnes

- **Receptor d'LDL**

En l'obès, l'expressió hepàtica de l'LDLr (Figura 78) es trobava un 106% per sota de l'observada en la mostra control, i tot i que presentava una lleu tendència a augmentar 12 mesos després de la intervenció, l'increment no arriba a ser estadísticament significatiu, continuant així molt per sota dels nivells d'expressió detectats en el fetge control.

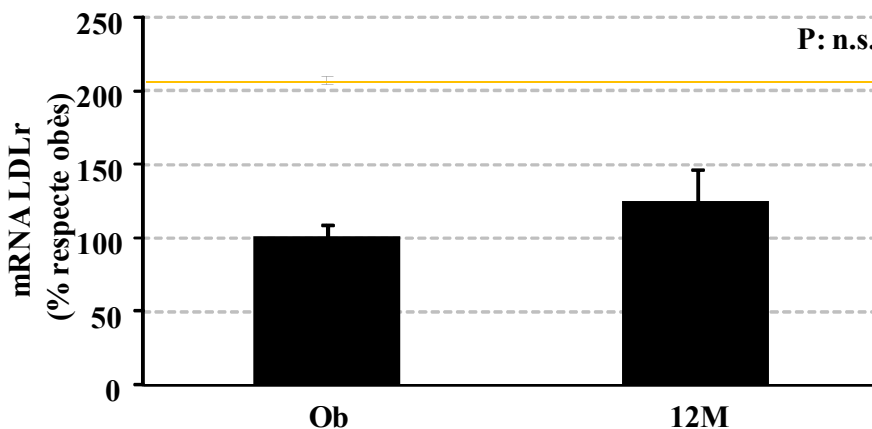


Figura 78. Expressió hepàtica de l'LDLr en la població estudiada. La línia taronja correspon als valors del fetge control. Comparacions respecte a l'obès (o) mitjançant *t* d'Student. n.s., no significatiu.

Resultats i Discussió

• Apolipoproteïna B

L'apoB 100, apolipoproteïna indispensable per a l'ensamblatge de les VLDL, va presentar uns nivells d'expressió (Figura 79) un 16% inferiors als observats al fetge control. Dotze mesos després de la intervenció els nivells es van normalitzar.

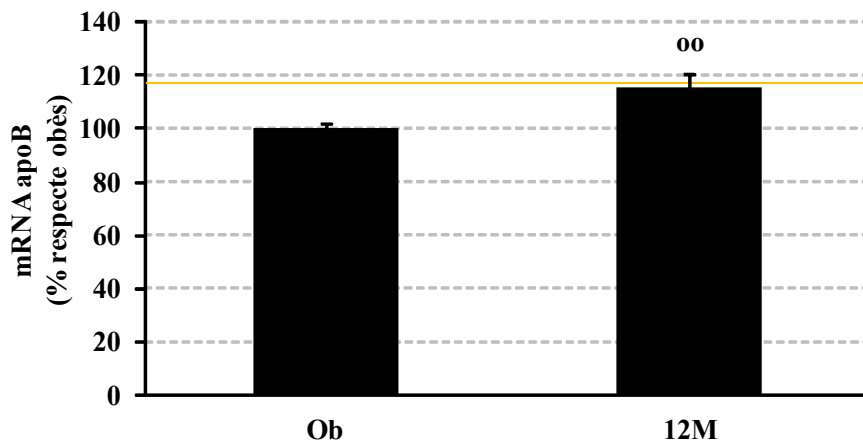


Figura 79. Expressió hepàtica d'apoB en la població estudiada. La línia taronja correspon als valors del fetge control. Comparacions respecte a l'obès (o) mitjançant *t* d'Student. Dos símbols $p < 0.01$.

• CD36

Pel que fa al CD36 (Figura 80), un dels principals transportadors de NEFA del fetge, en l'obès es trobava un 54% per sobre dels valors observats al fetge control, mentre que després de la intervenció es va produir una davallada del 35%, presentant una clara tendència a la normalització dels valors.

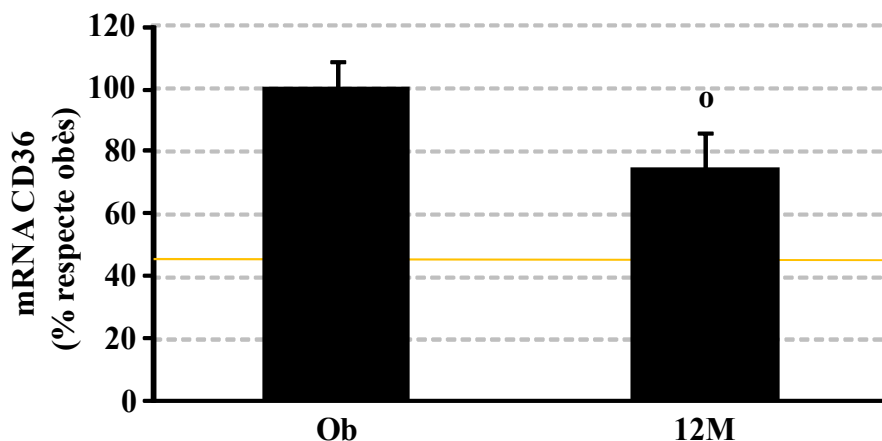


Figura 80. Expressió hepàtica de CD36 en la població estudiada. La línia taronja correspon als valors del fetge control. Comparacions respecte a l'obès (o) mitjançant *t* d'Student. Un símbol $p < 0.05$.

4.6.8 Discussió sobre NAFLD

El NAFLD és una afectació altament freqüent entre el nostre grup de pacients, trobant-se en gairebé tots els casos. Tot i que la majoria d'ells presentaven un estat avançat de la patologia (NASH), no es va detectar una alteració palesa de les transaminases. Això fa que la biòpsia hepàtica, tot i que invasiva, continuï sent el millor sistema de diagnòstic per aquesta patologia.

Resultats i Discussió

La majoria dels pacients amb NAFLD, independentment del grau de progressió de la malaltia, són asimptomàtics o presenten una lleu-moderada alteració de les transaminases, de manera que aquestes resulten un mal indicador pel diagnòstic del NAFLD [159, 178]. Altres factors que s'ha vist que estan fortament relacionats amb la severitat del NAFLD són: la hipertrigliceridèmia, nivells d'HDLc baixos [393] o la presència d'IR [394]; tots ells paràmetres que es troben alterats en major o menor grau en els nostres pacients.

A banda dels resultats histològics, quan estudiem la composició del fetge en els nostres pacients observem com aquesta està altament alterada.

Primerament, veiem com la quantitat de DNA per gram de teixit està molt augmentada respecte els valors detectats als 12 mesos. A diferència de l'AT, on la quantitat de DNA per gram de teixit es pot interpretar com un indicador de la cel·lularitat, en el cas del fetge aquesta dada no es pot interpretar de la mateixa manera, ja que els hepatòcits poden ser binucleats i presentar poliploidia [395] i desconeixem la proporció de cada tipus cel·lular en els nostres pacients.

Així, una major quantitat de DNA per gram de teixit, el que podria estar indicant en aquest cas és la presència de cèl·lules de major mida o bé un major nombre de cèl·lules poliploides. Aquest fenomen s'ha descrit com a habitual durant el procés d'envelliment del fetge, però també s'ha detectat en processos inflamatoris com l'hepatitis i com resposta a citoquines proinflamàtores (TNF α o interferó- γ) [395]

Per altra banda, la composició lipídica dels teixits també es troba alterada, trobant-se concentracions incrementades de tots els lípids estudiats, en concordança amb l'esteatosi descrita en aquests pacients. L'excés de lípids (sobretot de NEFA i lípids derivats de la hidròlisi dels TAG (DAG i ceramides) [110, 111], igual que en altres teixits, podria provocar la inflamació hepàtica que observem en els nostres pacients.

L'esteatosi hepàtica es desenvolupa quan la taxa d'entrada de NEFA (tant la captació com la síntesi i posterior esterificació a TAG) és superior a la taxa de sortida (oxidació i secreció), de manera que lípids com els TAG i els NEFA s'hi acumulen.

Així, alguns autors han descrit que en els obesos, la lipòlisi descontrolada de l'AT deguda a la IR perifèrica proporciona un flux de NEFA incrementat i continu cap al fetge [157]. Generalment, en l'estat postabsortiu, la principal font de NEFA (60%) és l'AT, principalment el subcutani, mentre que el visceral només aporta el 5% dels NEFA. En canvi, en els individus obesos s'ha descrit que l'aportació de NEFA del visceral al fetge (teoria portal) pot arribar a representar el 20% [396]. Els resultats obtinguts en els nostres pacients concorden amb aquesta teoria, ja que ens els obesos hem observat una activitat HSL a l'AT, tant al subcutani com al visceral, molt per sobre de l'observada en el grup dels normopès, tot i que aquest increment d'activitat lipolítica només es tradueix en un lleuger ascens de la concentració plasmàtica de NEFA. Un possible destí dels NEFA podria ser la incorporació a múscul per ser oxidats, però hi ha autors que han descrit que la capacitat oxidativa dels individus obesos es troba

Resultats i Discussió

disminuïda [387]. Una altra destinació pels NEFA seria el fetge, que coincidiria amb els resultats que hem observat.

L'increment detectat en l'expressió de CD36 (un important regulador de la captació de NEFA del plasma) i la tendència en l'augment d'activitat de l'HL observades també podrien estar implicades en l'augment de la captació de lípids en aquest teixit. Hi ha autors que també atribueixen un paper en la captació de lípids a l'LDLr (vist en ratolins) [397], tot i que nosaltres no hem observat cap variació en l'expressió d'aquesta proteïna.

A més, nosaltres proposem que la presència d'LPL a fetge podria ser un altre factor que promoguéss l'acumulació de lípids a fetge i per tant l'aparició/progressió del NAFLD. S'ha descrit que TNF α pot provocar l'estimulació de l'expressió d'LPL a fetge [57], i com veurem més endavant, aquesta citoquina es troba sobreexpressada a fetge. De fet, un augment d'LPL funcional a fetge afavoriria la captació de l'excés de TAG plasmàtics presents a QM i VLDL, i aquests s'acumularien al fetge en forma de NEFA i TAG promovent l'esteatosi. Els nostres resultats es veurien recolzats per la hipòtesi del drenatge hepàtic de NEFA postulada per Berge i col·laboradors [398], on es suggereix que els NEFA es deriven cap als hepatòcits per ser oxidats o per ser convertits a KB (nosaltres observem un increment molt marcat al mes de la intervenció). Segons aquesta hipòtesi l'increment d'expressió d'LPL a fetge seria un mecanisme de defensa desenvolupat per redirigir l'acumulació de lípids al fetge i reduir la pressió que fa la hiperlipèmia plasmàtica sobre altres teixit en els que podria provocar greus alteracions (pàncrees, múscul, etc). Quan el fetge deixa de ser esteatòtic no presenta expressió d'LPL.

Fins i tot podria existir alguna relació entre la IR hepàtica i la sobreexpressió d'LPL en aquest òrgan. Així, Kim i col·laboradors descriuen que la sobreexpressió d'LPL a fetge provoca un augment indirecte dels DAG hepàtics i aquests impedeixen la correcta senyalització hepàtica de la insulina promovent-hi la IR [399]. Nosaltres observem que paràmetres com la glucosa plasmàtica o el HOMA-IR hi estan correlacionats ($p < 0,05$, $r = 0,42$ i $0,37$, respectivament).

Una segona font de lípids a fetge és la lipogènesi *de novo*. L'excés d'hidrats de carboni provinents de la dieta o de la resta de teixits de l'organisme que no els han pogut captar per la IR, és derivat a fetge per a la síntesi de lípids. En els individus amb normopès, la contribució de la lipogènesi *de novo* als lípids hepàtics és petita (5%), però en els individus amb NAFLD pot arribar a ser del 23% [396] ja que, tot i que els individus sovint presenten IR, paradoxalment la via continua sent sensible a l'estimulació per insulina i per tant es troba sobreestimulada [400].

Si ens fixem en les vies hepàtiques de sortida dels lípids veurem com aquestes també es troben alterades en els nostres pacients. La principal és la secreció a través de les VLDL. En els nostres pacients s'observa un descens en l'expressió de l'apoB. Aquesta inhibició podria ser deguda a la hiperinsulinèmia, ja que s'ha descrit que en redueix l'expressió [401]. Tanmateix, això no es tradueix en una disminució de la concentració plasmàtica d'apoB (Figura 47), el que està indicant no només que s'està

Resultats i Discussió

regulant el recanvi de la proteïna a nivell postraducciona sinó que aquesta via de secreció hepàtica de lípids es troba estimulada en el grup d'obesos estudiat. S'ha descrit que la taxa de secreció de VLDL en individus amb NAFLD està augmentada, fins i tot pot arribar a ser del doble en individus obesos amb NAFLD [168]. Tot i això, sembla que aquest mecanisme acaba per saturar-se, de manera que no pot compensar l'augment en l'entrada de greixos [168].

Pel que fa a altres mecanismes de sortida, s'ha observat que la β -oxidació dels NEFA es troba disminuïda en els individus amb NAFLD, possiblement degut a la inhibició que provoca l'augment de malonilCoA sobre la CPT1 [172], tot i que no es veu reflectit en els nostres resultats. Una alternativa proposada per alguns autors és l'augment d'UCP2 [396] que permetria l'eliminació de l'excés de NEFA. Per altra banda, la condensació de l'acetilCoA cap a la via de la cetogènesi, la qual trobem altament incrementada, sobretot després del primer mes de la intervenció en el que suposadament s'està mobilitzant una gran quantitat de greixos, també ha estat proposada com una via d'eliminació de l'excés de lípids [396].

Si ens centrem en la inflamació hepàtica, s'ha proposat que en el NASH associat a l'obesitat, existeix una implicació directa dels macròfags activats de l'AT en la progressió de la malaltia. Per explicar la relació es proposen dues hipòtesis: la primera d'elles postula que els macròfags activats de l'AT secretessin alguna molècula que promoguéssin la inflamació en llocs remots (com ara el fetge). Una molècula candidata podria ser TNF α o IL6 [393, 402], tot i que els resultats obtinguts fins al moment són discrepants ja que, com veurem més endavant, no sempre s'ha vist una implicació directa d'aquestes citocines en el desenvolupament/millora del NASH [403]. La segona hipòtesi proposa que els macròfags promoguessin la inhibició de la secreció d'algun factor. En aquest cas la proteïna candidata seria l'adiponectina, molècula que es troba reduïda en els AT amb elevada infiltració de macròfags. L'adiponectina estimula l'oxidació hepàtica de NEFA i la cetogènesi, mentre que inhibeix la síntesi de TAG i CHOL així com la secreció de citocines com TNF α [173], en els obesos aquesta citocina està disminuïda i per tant no pot dur a terme les seves funcions.

Pel que fa als efectes de la pèrdua de pes sobre la funció hepàtica i la seva morfologia, aquests varien en funció del mecanisme emprat per aconseguir la pèrdua de pes. Quan la pèrdua de pes es dona ràpidament s'observa un augment de les lesions histològiques (com en el cas del bypass jejunoileal o a l'inici de la pèrdua de pes després d'un bypass gàstric) degut a la ràpida mobilització de NEFA intra- o extrahepàtics [165, 241]. Aquest augment de NEFA es veu reflectit al plasma dels nostres pacients i es podria traduir en l'augment de les transaminases al primer mes després de la intervenció. En canvi, si la pèrdua de pes és gradual (com la que es donaria uns mesos després de la cirurgia bariàtrica) generalment s'observa una millora del pronòstic [165]. Hi ha autors que han descrit que la sobreexpressió d'ATGL millora l'esteatosi [404], però en el nostre cas no observem cap canvi en l'expressió d'aquest enzim durant el període estudiat.

Resultats i Discussió

Amb la intervenció i la pèrdua de pes la majoria dels paràmetres hepàtics es normalitzen, però crida l'atenció que els NEFA al teixit continuen elevats. Això podria ser degut a que la taxa lipolítica als AT, al menys al subcutani, encara continua incrementada. Tanmateix, no disposem de les dades a l'AT visceral, que seria, en principi, qui més n'aportaria, per poder-ho confirmar.

4.7 Inflamació

Com ja s'ha comentat a la introducció d'aquest treball, l'obesitat es troba lligada a un cert grau d'inflamació lleu i crònic [66, 112]. A la bibliografia existeixen nombrosos marcadors d'inflamació inespecífics com ara el recompte leucocitari, l'albumina, la fosfatasa alcalina, el fibrinogen [405].

A banda d'aquests, també vam voler estudiar el comportament d'altres marcadors inflamatoris (PAI1, NO, CRP, IL6 i TNF α) que recentment han guanyat importància en el camp de l'obesitat.

4.7.1 Marcadors d'inflamació inespecífics

- **Recompte leucocitari i hematologia**

Durant tot l'estudi els valors del **recompte leucocitari** (Figura 81) es troben dins del rang de normalitat (4.10 a 9.90×10^9 cèl·lules/L). Tanmateix, en l'obès, els valors són de $8.44 \pm 0.06 \times 10^9$ cèl·lules/L, mentre que tot just un mes després de la intervenció baixen de forma significativa a $6.95 \pm 0.31 \times 10^9$ cèl·lules/L.

Durant la resta del període estudiat els nivells es mantenen estables. Als 12 mesos eren de $6.88 \pm 0.32 \times 10^9$ cèl·lules/L, un 18% més baixos que a l'inici de l'estudi.

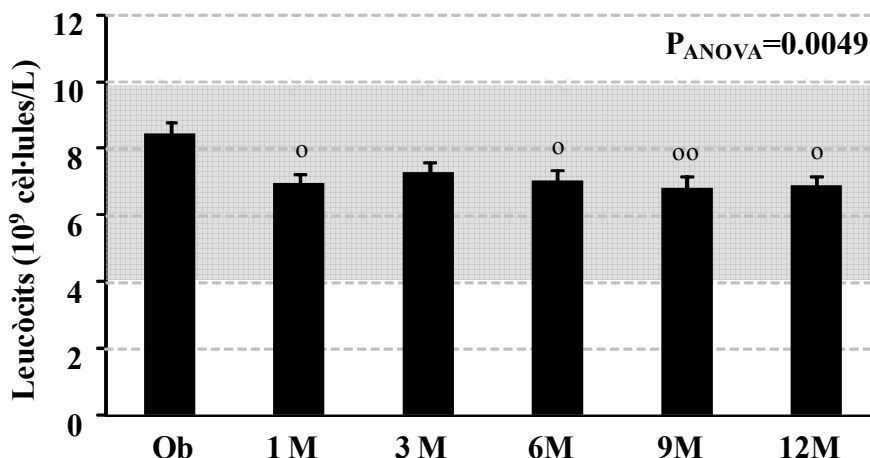


Figura 81. Recompte leucocitari en la població estudiada. La zona ombrejada en gris indica el rang de normalitat. Comparacions respecte a l'obès mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Un símbol $p < 0.05$ i dos símbols $p < 0.01$.

La resta de paràmetres hematològics (Taula 15) es trobaven dintre dels rangs de normalitat, tot i que en la majoria dels casos, els valors promitjos obtinguts eren propers al límit superior.

Resultats i Discussió

Els paràmetres de la **sèrie vermella** (hematies, hematòcrit i hemoglobina) no van experimentar cap variació amb la cirurgia. Per contra, tots els recomptes de cèl·lules de la **sèrie blanca** (leucòcits, neutròfils, limfòcits, monòcits, eosinòfils, basòfils i reticulòcits) van disminuir en major o menor mesura de forma significativa.

El número de **plaquetes** no va variar amb la intervenció, però en canvi sí que ho va fer el seu volum mitjà, mostrant un increment significatiu del 4.5%.

| | Ob | 1M | 3M | 6M | 9M | 12M | Referència | P _{ANOVA} |
|---|-----------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------|--------------------|
| Hematies (x10¹² cèl·lules/L) | 4,9±0,1 | 4,8±0,1 | 4,9±0,1 | 4,8±0,1 | 4,7±0,1 | 4,7±0,1 | 3,9 - 4,9 | n.s. |
| VCM dels hematies (fL) | 85,4±0,9 | 85,0±1,0 | 84,8±0,9 | 86,0±1,0 | 86,6±0,9 | 86,6±1,2 | 82,1 - 96,2 | n.s. |
| Hematòcrit (%) | 41,3±0,5 | 40,9±0,6 | 41,5±0,6 | 41,2±0,6 | 40,9±0,6 | 40,9±0,7 | 35,9 - 44,1 | n.s. |
| Hemoglobina (g/dL) | 11,9±0,2 | 13,7±0,2 | 13,8±0,2 | 13,9±0,2 | 13,7±0,2 | 13,7±0,2 | 11,8 - 14,7 | n.s. |
| Leucòcits (x10⁹ cèl·lules/L) | 8,4±0,4 | 7,0±0,3 _o | 7,3±0,3 | 7,0±0,3 _o | 6,8±0,3 _{oo} | 6,9±0,3 _o | 4,1 - 9,9 | <0,01 |
| Neutròfils (x10⁹ cèl·lules/L) | 5,2±0,3 | 4,1±0,2 _o | 4,2±0,2 | 4,3±0,3 | 3,9±0,2 _{oo} | 4,2±0,3 _o | 1,4 - 6,5 | <0,01 |
| Limfòcits (x10⁹ cèl·lules/L) | 2,4±0,1 | 2,0±0,1 | 2,3±0,1 | 2,1±0,1 | 2,1±0,1 | 2,1±0,1 | 1,2 - 3,4 | <0,05 |
| Monòcits (x10⁹ cèl·lules/L) | 0,6±0,0 | 0,6±0,0 | 0,5±0,0 | 0,5±0,0 _o | 0,4±0,0 _{oo} | 0,4±0,0 _o | 0,2 - 1,6 | <0,001 |
| Eosinòfils (x10⁹ cèl·lules/L) | 0,2±0,0 | 0,2±0,0 | 0,2±0,0 | 0,1±0,0 | 0,1±0,0 | 0,2±0,0 | < 0,7 | <0,01 |
| Basòfils (x10⁹ cèl·lules/L) | 0,04±0,00 | 0,02±0,01 | 0,01±0,01 | 0,01±0,01 | 0,01±0,01 | 0,01±0,01 | < 0,2 | <0,05 |
| Reticulòcits (x10⁹ cèl·lules/L) | 57,1±6,2 | 41,2±5,0 | 35,4±4,1 | 29,0±4,0 _{ooo} | 29,1±3,0 _{oo} | 27,7±2,4 _{oo} | 25 - 75 | <0,001 |
| Plaquetes (x10⁹ cèl·lules/L) | 286±12 | 282±17 | 275±13 | 272±13 | 279±17 | 268±12 | 150 - 386 | n.s. |
| VPM (fL) | 8,9±0,2 | 10,1±0,2 _{oo} | 10,2±0,3 _{ooo} | 9,7±0,2 _o | 9,6±0,2 | 9,3±0,2 | 7,4 - 10,4 | <0,001 |

Taula 15. Resultats de les analítiques d'hematologia de la població estudiada. A la penúltima columna es mostren els valors de referència de l'Hospital de la Vall d'Hebron per a aquests paràmetres. Comparacions respecte a l'obès (o) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey o Dunn segons s'escaigui. Un símbol p<0,05, dos símbols p<0.01, tres símbols p<0.001 i n.s., no significatiu.

• Albúmina

A l'inici de l'estudi, l'**albúmina** plasmàtica (Figura 82) presentava una concentració de 4.11±0.06 g/dL, dins del rang de normalitat (3.5-5.5 g/dL). Aquest paràmetre es va mantenir estable durant tot el període estudiat, presentant uns valors de 4.21±0.05 g/dL als 12 mesos de la intervenció.

Resultats i Discussió

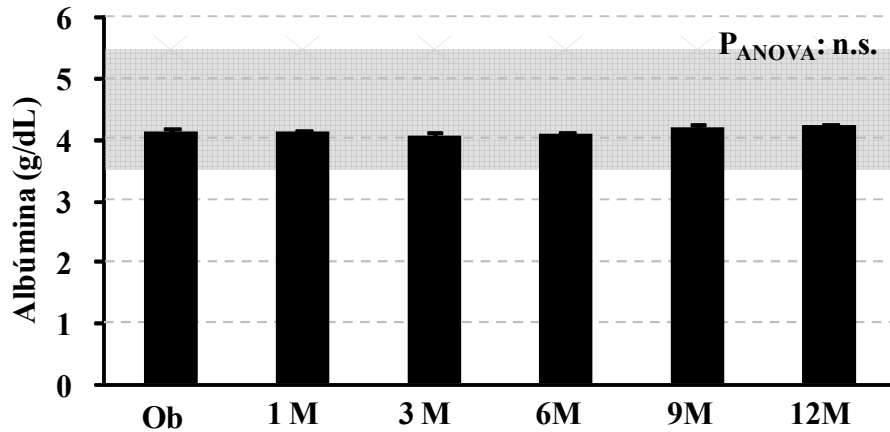


Figura 82. Concentració d'albumina plasmàtica a la població estudiada. La zona ombrejada en gris indica el rang de normalitat. Comparacions respecte a l'obès mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. n.s., no significatiu.

- **Fosfatasa alcalina**

La **fosfatasa alcalina** presenta un comportament similar al de l'albumina, mantenint els seus valors estables i dins del rang de normalitat (40-140 IU/L) durant tot el període estudiat. L'obès presentava uns valors de 77.6 ± 3.6 IU/L i als 12 mesos de la intervenció els valors eren de 87.5 ± 3.9 IU/L (ANOVA no significativa).

- **Fibrinogen**

Pel que fa al **fibrinogen** (Figura 83), a l'inci de l'estudi els valors eren de 402.9 ± 9.5 mg/dL, un 26% per sobre del límit superior de normalitat (230-320 mg/dL). Després de l'operació els nivells de fibrinogen es mantenen constants fins que al novè més comencen a disminuir, assolint nivells de 343.3 ± 11.9 mg/dL als 12 mesos. Tot i el descens de gairebé el 15%, no es van aconseguir valors de normalitat.

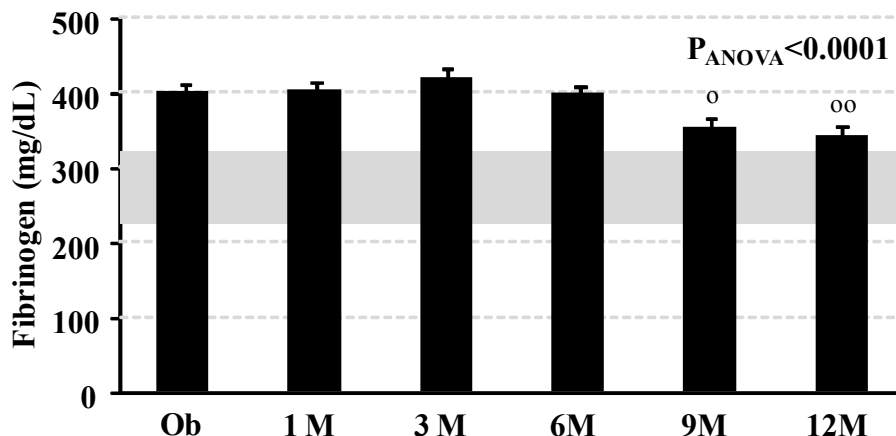


Figura 83. Concentració plasmàtica de fibrinogen en la població estudiada. La zona ombrejada en gris indica el rang inferior de normalitat. Comparacions respecte a l'obès mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Un símbol $p < 0.05$ i dos símbols $p < 0.01$.

En el nostre cas, els nivells de fibrinogen correlacionen ($p = 0.001$) de forma positiva amb el BMI ($r = 0.34$) i el % d'excés de pes ($r = 0.30$) i de forma no tan marcada ($p < 0.05$) amb el perímetre de cintura ($r = 0.33$), el greix total ($r = 0.22$) i el greix visceral ($r = 0.30$),

Resultats i Discussió

en canvi no presenta correlació amb el greix subcutani, fet que relacionaria la inflamació amb l'obesitat central. Pel que fa als paràmetres glucídics, el fibrinogen correlaciona de forma positiva amb la insulina ($p < 0.01$, $r = 0.24$) i amb el HOMA-IR ($p < 0.05$, $r = 0.21$) i no presenta cap correlació amb la glucosa.

4.7.2 Activador de l'inhibidor del plasminogen de tipus 1

Una altra proteïna de fase aguda que s'ha estudiat en el nostre grup de pacients és el PAI1. Els nivells plasmàtics de PAI1 (Figura 84) en els obesos van ser el doble dels observats en els individus amb normopes (tot i no assolir significativitat estadística), i van anar disminuint progressivament després de la intervenció assolint valors fins i tot inferiors als del grup control.

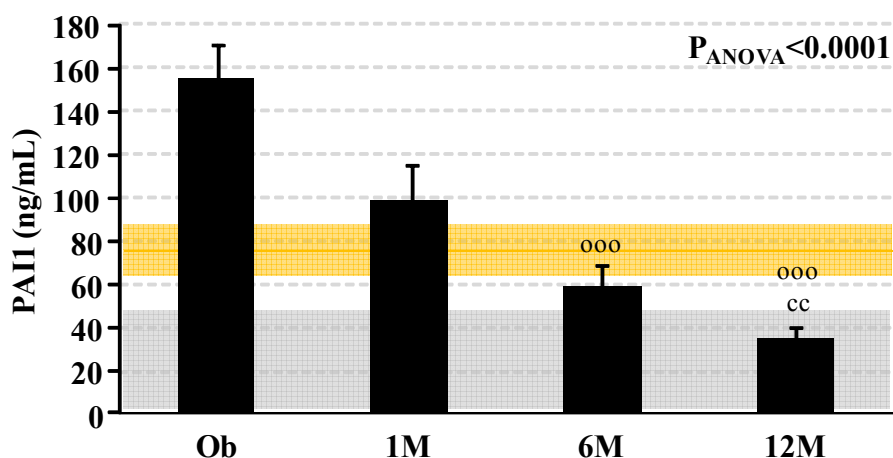


Figura 84. Concentració plasmàtica de PAI1 a la població estudiada. La zona ombrejada en gris indica el rang de normalitat, la zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Dos símbols $p < 0.01$ i tres símbols $p < 0.001$.

En aquest cas també hem estudiat l'expressió de PAI1. Podem veure com en l'AT subcutani dels obesos (Figura 85) no es van observar grans increments en l'expressió de la proteïna en comparació amb el grup normopes, en canvi al visceral l'expressió en l'obès era 1.7 vegades superior que al grup control. Tanmateix, en el cas de l'AT subcutani, als 6 mesos de la intervenció es va produir una reducció en els nivells d'expressió considerable (del 58%). En els obesos, PAI1 s'expressa 1.9 vegades més al subcutani que al visceral, mentre que en els controls no hi ha diferències significatives.

En canvi, en el cas del fetge (Figura 85), en els obesos l'expressió de PAI1 es trobava molt incrementada respecte al fetge control (3.2 vegades) i 12 mesos després de la intervenció els nivells es van normalitzar, mostrant un descens de gairebé el 60%.

La concentració plasmàtica de PAI1 presenta una molt bona correlació ($p < 0.001$) amb l'expressió de la proteïna a l'AT subcutani ($r = 0.53$) i a fetge ($r = 0.57$), no així amb l'expressió a l'AT visceral ($p = 0.82$).

Resultats i Discussió

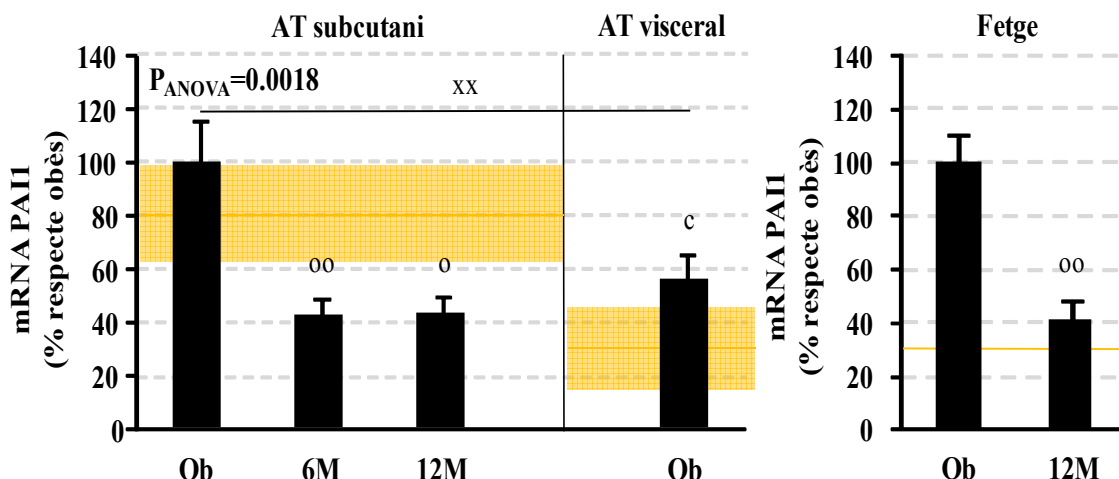


Figura 85. Expressió de PAII a l'AT subcutani i visceral i afetge de la població estudiada. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions en AT subcutani respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey; en AT visceral respecte a AT subcutani de l'obès (x) i AT visceral respecte control (c) mitjançant *t* d'Student. Un símbol $p < 0.05$ i dos símbols $p < 0.01$.

4.7.3 Òxid nítric i sintases d'òxid nítric

L'NO en petites quantitats té propietats antiateroscleròtiques ja que regula positivament el to vascular, inhibeix l'agregació plaquetària, l'adhesió de leucòcits i la peroxidació de lípids [406]; però una sobreproducció pot tenir efectes contraproductius, provocant la disfunció de les cèl·lules endotelials i l'oxidació de biomolècules (proteïnes, NEFA i DNA); podent provocar fins i tot la mort cel·lular [407].

A plasma, els valors d'NO mesurats com a concentració de nitrats (Figura 86) en l'obès eren 1.7 vegades inferiors als observats en els individus amb normopes. Al mes de la intervenció van mostrar un augment significatiu (del 49%), assolint valors similars als dels individus normopes, però van tornar a disminuir als 6 mesos de la intervenció mantenint-se aproximadament 1.7 vegades per sota dels valors del grup normopes fins al final del període estudiat.

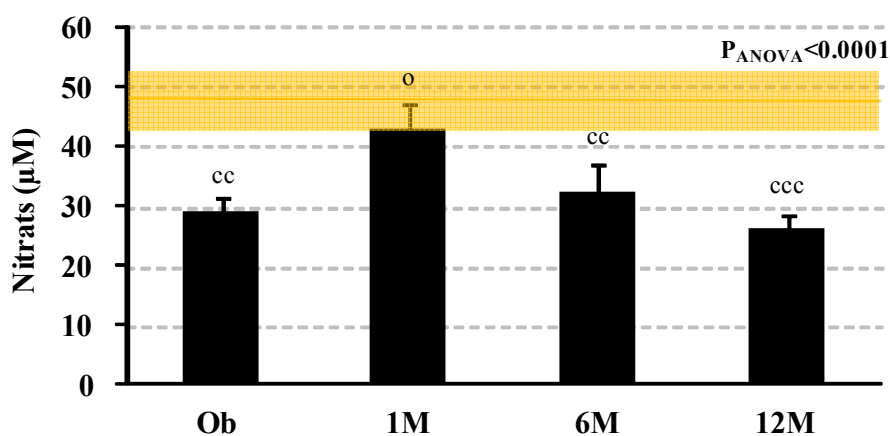


Figura 86. Concentració plasmàtica d'NO en la població estudiada. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Un símbol $p < 0.05$, dos símbols $p < 0.01$ i tres símbols $p < 0.001$.

Resultats i Discussió

Els nitrats són sintetitzats a partir d'arginina per les NOS. En aquest treball hem estudiat l'expressió de la NOS induïble (iNOS) i l'endotelial (eNOS) en els AT i el fetge.

La iNOS, tant a AT com a fetge mostrava uns nivells d'expressió baixos, propers als límits de detecció de la tècnica; en canvi, la eNOS era perfectament detectable.

En l'AT dels obesos (Figura 87) no s'observava una alteració en l'expressió de les NOS estudiades en comparació amb el grup normopès, ni al subcutani ni al visceral. Als 12 mesos en canvi, mentre que la iNOS mostrava una certa tendència a augmentar sense arribar a ser significativa, la eNOS es va estabilitzar en valors un 31% inferiors als de l'obès.

L'expressió d'iNOS a l'AT subcutani presenta una bona correlació amb l'expressió d'aquest enzim a l'AT visceral ($p < 0.01$ i $r = 0.45$), no així la eNOS ($p = 0.71$).

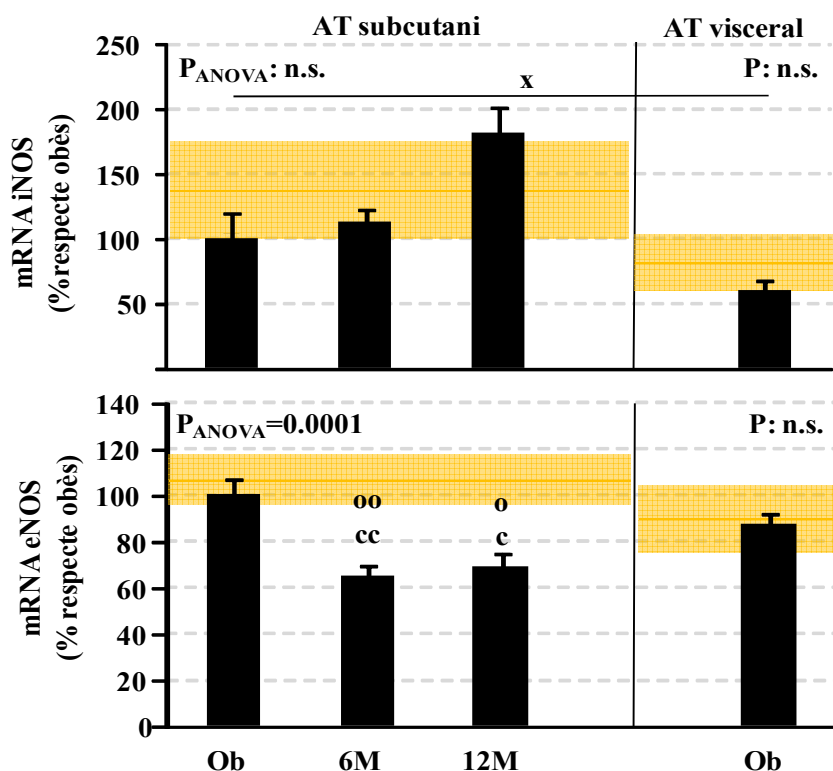


Figura 87. Expressió de les NOS induïble i endotelial a l'AT de la població estudiada. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions en AT subcutani respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey; en AT visceral respecte a AT subcutani de l'obès (x) i AT visceral respecte control (c) mitjançant *t* d'Student. Un símbol $p < 0.05$, dos símbols $p < 0.01$ i n.s., no significatiu.

Resultats i Discussió

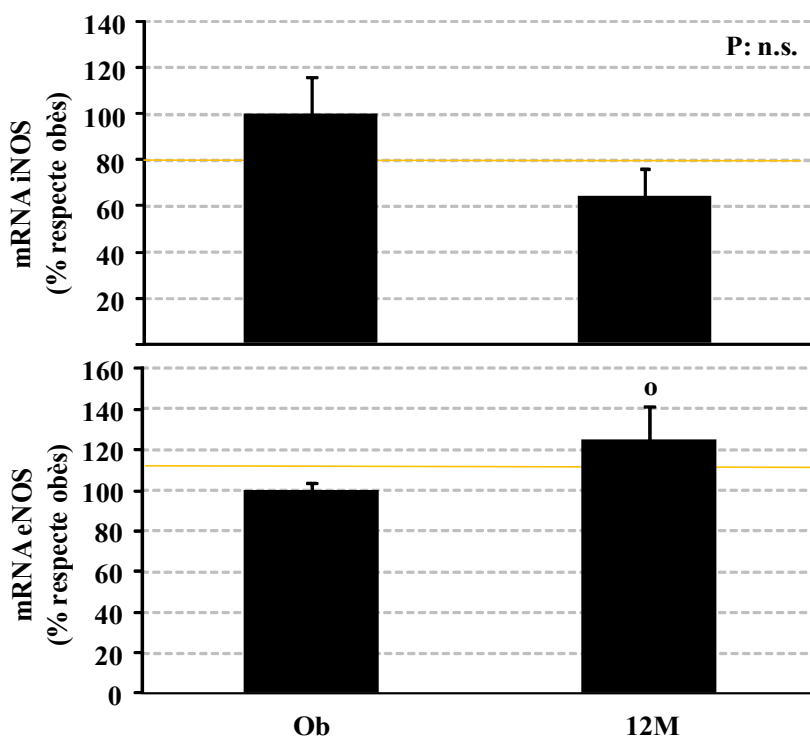


Figura 88. Expressió de les NOS induïble i endotelial a fetge de la població estudiada. La línia taronja correspon als valors del fetge control. Comparacions a l'obès (o) mitjançant *t* d'Student. Dos símbols $p < 0.01$ i n.s., no significatiu.

A fetge (Figura 88) en canvi, tot i que els valors d'expressió de les NOS sempre es trobaven al voltant dels obtinguts en el fetge control. Amb la intervenció, la iNOS presentava una tendència a disminuir (descens en l'expressió del 36%) mentre que la eNOS mostrava un augment de l'expressió del 25%.

No s'observa correlació entre la concentració d'NO plasmàtica i l'expressió enzimàtica de cap de les dues NOS en cap dels teixits estudiats. Tampoc hi ha cap correlació entre l'NO plasmàtic i els paràmetres antropomètrics estudiats.

4.7.4 Proteïna C reactiva

A banda dels marcadors ja esmentats, una altra proteïna que recentment està guanyant importància com a marcador de la inflamació característica de l'obesitat és la CRP.

La **CRP** (Figura 89), a l'inici de l'estudi, presentava valors a plasma de 21.3 ± 1.8 mg/L, molt per sobre dels valors de normalitat (inferiors a 8 mg/L) i estadísticament superiors als valors obtinguts en el grup control (6.9 ± 0.9 mg/L), indicant d'aquesta manera que la inflamació es trobava present en els individus estudiats. Els valors d'aquest paràmetre es van mantenir elevats al menys fins un mes després de la intervenció. En canvi, als sis mesos d'aquesta es va detectar una disminució pronunciada (10.8 ± 1.4 mg/L), que va continuar fins al final de l'estudi (4.2 ± 0.6 mg/L) on es van assolir valors dins del rang de normalitat. En general, la disminució resulta estadísticament significativa.

Resultats i Discussió

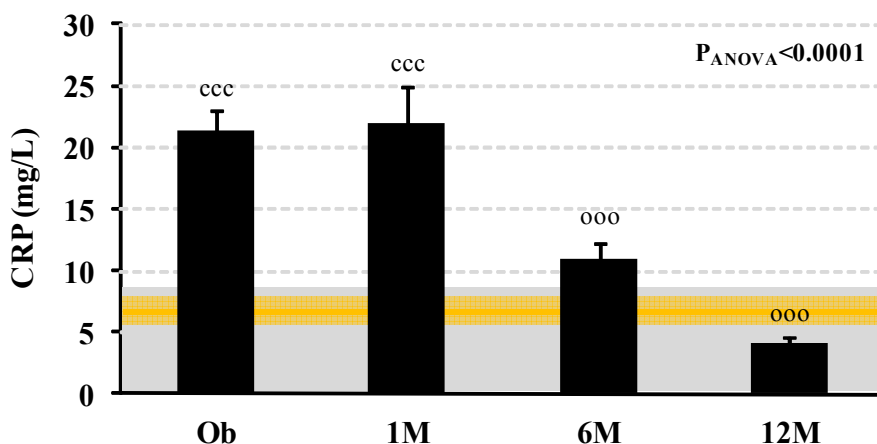


Figura 89. Concentració plasmàtica de CRP en la població estudiada. La zona ombrejada en gris indica el rang de normalitat, la zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Tres símbols $p < 0.001$.

Si tenim en compte tot el període estudiat, la CRP plasmàtica presenta una correlació positiva forta ($p < 0.001$) amb el BMI ($r = 0.53$), els perímetre de cintura i maluc ($r = 0.58$ i 0.48 , respectivament), amb el percentatge de greix total ($r = 0.43$), i amb els Kg de greix subcutani i visceral ($r = 0.48$ i 0.47 , respectivament). A més, també presenta una forta correlació positiva ($p < 0.001$) amb els paràmetres d'IR estudiats: glucosa ($r = 0.34$), insulina ($r = 0.35$) i HOMA-IR ($r = 0.40$). Finalment, la CRP mostra una correlació positiva amb el fibrinogen ($p < 0.001$, $r = 0.54$) mentre que correlaciona negativament amb l'adiponectina ($p < 0.001$, $r = -0.37$), corroborant les accions contraposades d'aquestes dues proteïnes en comparació amb l'adiponectina pel que fa a la inflamació.

Les alteracions en la concentració de CRP no només les hem vistes a nivell plasmàtic sinó que a nivell tissular trobem una situació similar (Figura 90). Així, a l'AT subcutani la concentració tissular de CRP és 5 vegades superior que en els controls (0.21 ± 0.03 vs. 0.04 ± 0.02 ng/mg) i a l'AT visceral 6 vegades superior (0.24 ± 0.03 vs. 0.04 ± 0.03 ng/mg). De la mateixa manera, a fetge la CRP és 18 vegades superior en els individus obesos que en els controls (3.68 ± 0.52 vs. 0.20 ± 0.08 ng/mg).

La CRP de plasma correlaciona positivament ($p < 0.001$) amb la CRP a l'AT subcutani ($r = 0.63$), a l'AT visceral ($r = 0.59$) i al fetge ($r = 0.73$). També hi ha correlació entre la CRP a fetge i a l'AT subcutani en els obesos ($p < 0.001$, $r = 0.64$). En canvi no existeix correlació entre la CRP a l'AT subcutani i al visceral.

La CRP plasmàtica també presenta una forta correlació amb la concentració de NEFA a l'AT subcutani ($p < 0.001$ i $r = 0.45$) i amb la concentració de lípid en aquest teixit ($p < 0.01$, $r = 0.36$) així com amb el percentatge de lípids a fetge ($p < 0.001$, $r = 0.61$) i amb la concentració de NEFA en aquest teixit ($p < 0.05$, $r = 0.31$). No s'observa cap correlació entre la CRP plasmàtica i l'AT visceral.

Resultats i Discussió

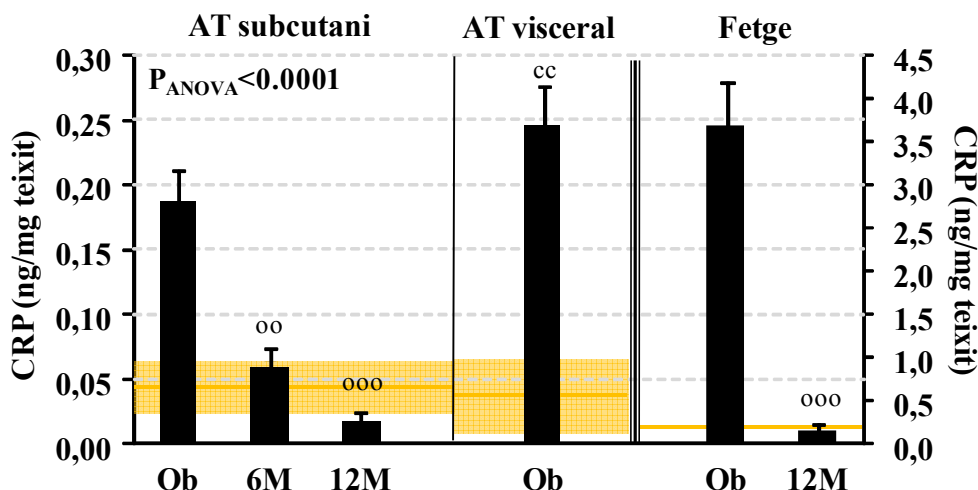


Figura 90. Concentracions tissulars de CRP en la població estudiada. La zona ombrrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i el control (c) mitjançant Kruskal-Wallis i posttest de Dunn. Dos símbols $p < 0.01$ i tres símbols $p < 0.001$.

4.7.5 Interleuquina 6

Donat que l'expressió de CRP està controlada per IL6, TNF α i glucocorticoides [408, 409], vam estudiar la seva expressió en el nostre grup de pacients.

En el cas d'IL6 (Figura 91), tot i que les diferències no són estadísticament significatives, observem una tendència a que els obesos tinguin valors més elevats que els controls a l'inici de l'estudi, tant a AT subcutani com a visceral, tal i com s'ha descrit a la bibliografia [71, 114]. Per altra banda, també observem una tendència a la normalització dels valors a l'any de la intervenció. La IL6 a subcutani correlaciona ($p < 0.05$) amb la del visceral ($r = 0.42$). En el cas del fetge, la IL6 només es va poder detectar de forma fiable en el 20% dels casos a l'inici de l'estudi, i a l'any de l'operació cap individu presentava uns nivells d'expressió d'IL6 detectables amb les nostres condicions de PCR; tampoc no es va poder detectar IL6 al fetge del grup control.

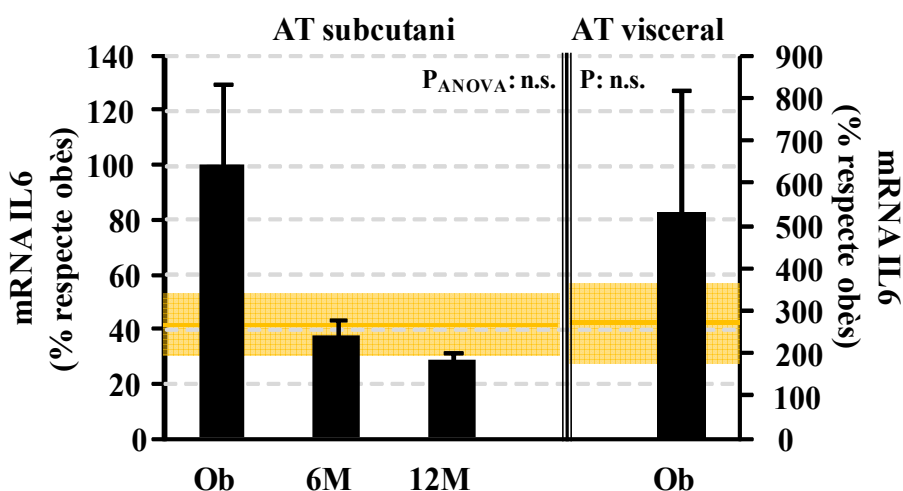


Figura 91. Expressió d'IL6 a AT subcutani i visceral en la població estudiada. La zona ombrrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès i el control mitjançant Kruskal-Wallis i posttest de Dunn. n.s., no significatiu.

Resultats i Discussió

4.7.6 Factor de necrosi tumoral α

Pel que fa a l'expressió de $\text{TNF}\alpha$ (Figura 92), no s'observen canvis significatius a l'AT subcutani després de l'operació, ni es detecten diferències en els nivells d'expressió d'aquesta citoquina respecte al grup control, ni entre els dos dipòsits grassos; fet descrit a la bibliografia [66, 92]. En canvi, a fetge sí que s'observen diferències significatives entre l'obès i el grup control. Aquestes diferències desapareixen a l'any de la intervenció, però el descens no arriba a ser estadísticament significatiu.

Aquestes dades suggereixen que l'AT dels obesos, a diferència del fetge, no està directament implicat en l'elevació dels nivells plasmàtics de $\text{TNF}\alpha$ descrita per alguns autors [378].

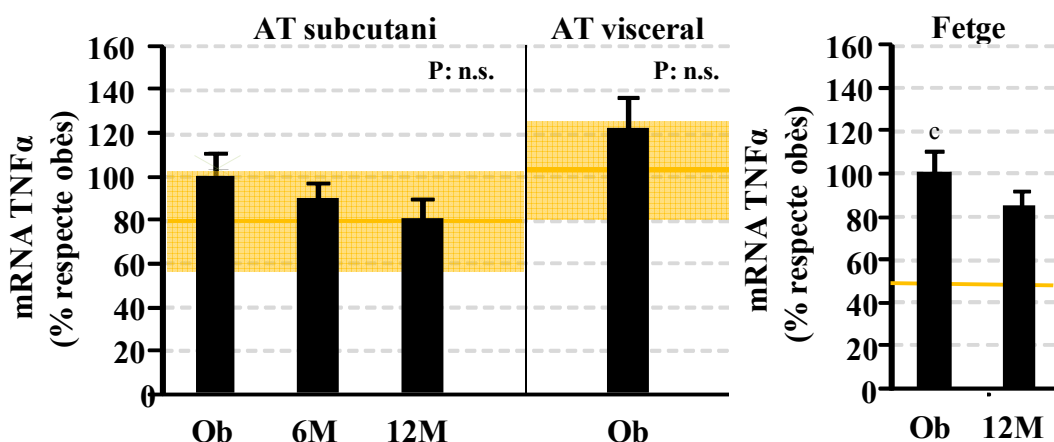


Figura 92. Expressió de $\text{TNF}\alpha$ a l'AT subcutani i visceral i al fetge de la població estudiada. La zona ombrejada en taronja correspon als valors del grup control. Comparacions respecte al control (c) mitjançant Kruskal-Wallis i posttest de Dunn. Un símbol $p < 0.05$ i n.s., no significatiu.

Mentre que l'expressió d'IL6 a l'AT subcutani correlaciona ($p < 0.01$) amb el BMI i el greix total ($r = 0.33$ i 0.34 , respectivament), la IL6 de l'AT visceral i del fetge i $\text{TNF}\alpha$ en els teixits estudiats no correlacionen amb cap dels paràmetres antropomètrics analitzats, fet que no coincideix amb altres autors els quals han descrit correlacions positives entre l'expressió de $\text{TNF}\alpha$ i el BMI o el percentatge de greix corporal [378]. Per altra banda, la IL6 d'AT subcutani correlaciona amb el fibrinogen ($p < 0.01$, $r = 0.36$) i amb el $\text{TNF}\alpha$ d'AT visceral ($p < 0.05$, $r = 0.42$). $\text{TNF}\alpha$ al subcutani correlaciona amb la CRP plasmàtica ($p < 0.05$, $r = 0.26$). A l'AT visceral, existeix una forta correlació entre la IL6 i el $\text{TNF}\alpha$ d'aquest teixit ($p < 0.001$, $r = 0.59$), i també correlaciona amb el $\text{TNF}\alpha$ a fetge ($p < 0.01$, $r = 0.49$). Tot i que s'ha descrit que IL6 estimula la producció de CRP a fetge [410], nosaltres no hem vist cap correlació entre aquests dos paràmetres.

Resultats i Discussió

4.7.7 Paràmetres relacionats amb els glucocorticoides

- **Hormona adrenocorticotropa**

Els nivells d'ACTH, l'hormona que regula la producció de cortisol a les glàndules adrenals, van presentar uns nivells dins del rang de normalitat (7-51 pg/mL) durant tot el període estudiat, però van experimentar un descens estadísticament significatiu del 51% durant l'any posterior a l'operació (Figura 93).

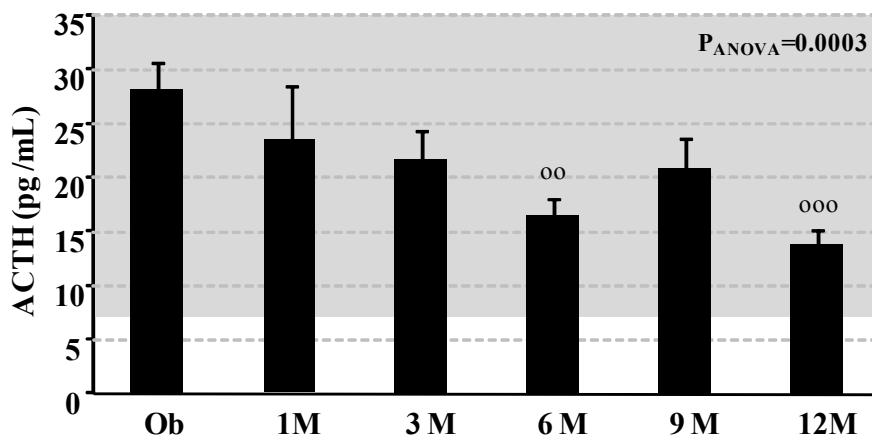


Figura 93. Concentració plasmàtica d'ACTH a la població estudiada. La zona ombrejada en gris indica el rang de normalitat. Comparacions respecte a l'obès mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. Dos símbols $p < 0.01$ i tres símbols $p < 0.001$.

- **Cortisol**

Pel que fa als corticoides, trobem que el **cortisol** a plasma (Figura 94) no presenta una variació estadísticament significativa després de l'operació (15.2 ± 1.0 a l'inici vs. 12.6 ± 0.6 $\mu\text{g/dL}$ al final de l'estudi) i els valors del paràmetre estan dins del rang de normalitat (5-25 $\mu\text{g/dL}$) durant tot l'estudi.

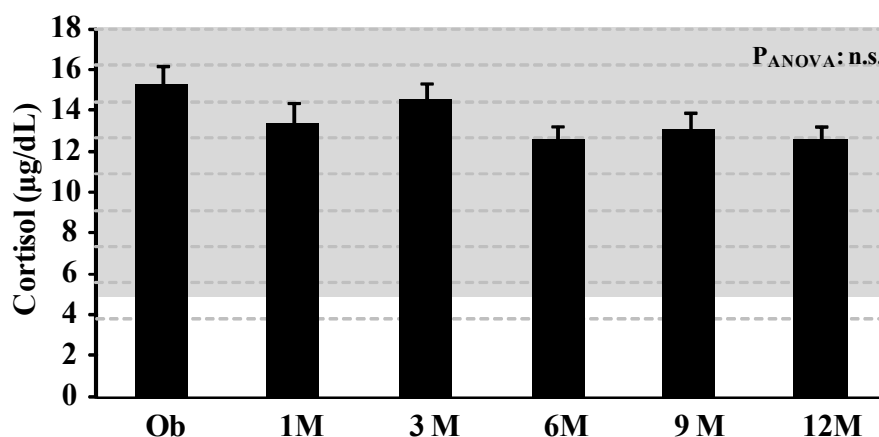


Figura 94. Concentració plasmàtica de cortisol a la població estudiada. La zona ombrejada en gris indica el rang de normalitat. Comparacions respecte a l'obès mitjançant ANOVA i posttest de Tukey. n.s., no significatiu.

- **11 β hidroxisteroid deshidrogenasa de tipus 1**

Els glucocorticoides secretats generalment viatgen per la sang units a la proteïna d'unió a glucocorticoides (CBG). En el nostre cas no hem observat variacions estadísticament significatives ni en la concentració d'aquesta proteïna a plasma

Resultats i Discussió

(60.2±2.4 a l'inici vs. 58.8±3.0 ng/μL) ni en la seva capacitat d'unió a cortisol (151.1±17.2 vs. 133.8±21.2 nmol cortisol/μL).

Donat que no es van detectar variacions en la CBG, ens vam plantejar estudiar els nivells de cortisol tissulars de forma indirecta. Així, una font de cortisol és la que s'obté, als teixits com el fetge i l'AT, de la conversió al cortisol a partir del metabòlit inactiu cortisona mitjançant l'activitat de l'11βHSD1 [86, 87]. En el nostre cas hem vist que aquest enzim (Figura 95) es troba sobreexpressat a l'AT subcutani dels individus obesos, i que després de la intervenció els nivells d'expressió de l'enzim disminueixen de forma significativa en un 42%. Tant a fetge com a l'AT visceral no trobem diferències significatives respecte del grup control, ni variacions amb la cirurgia.

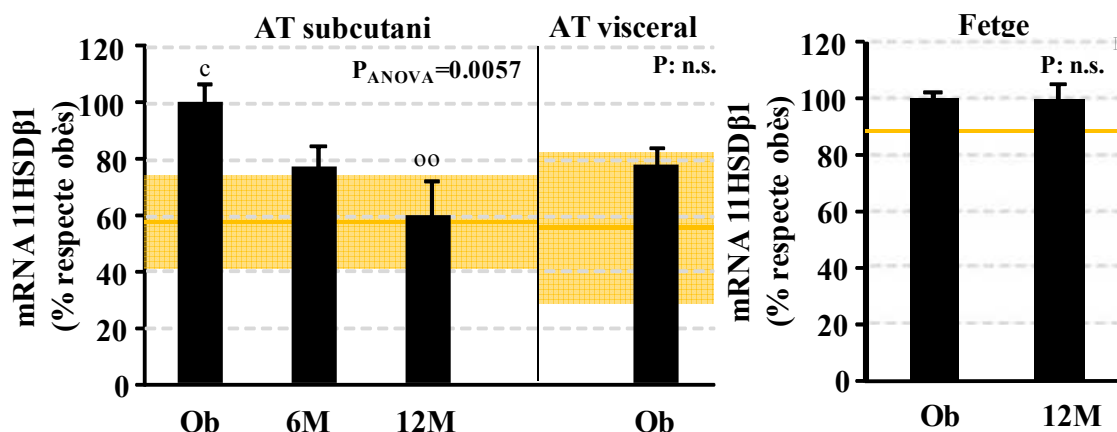


Figura 95. Expressió relativa d'11HSDβ1 a AT subcutani i visceral i a fetge en la població estudiada. Les zones ombrejades en taronja corresponen als valors del grup control. Comparacions respecte a l'obès (o) i al control (c) mitjançant ANOVA i posttest de Tukey (TAB) o amb *t* d'Student (fetge). Un símbol $p < 0.05$, dos símbols $p < 0.01$ i n.s., no significatiu.

L'expressió de l'11βHSD1 correlaciona amb els nivells de CRP a l'AT subcutani ($p < 0.05$, $r = 0.28$). No s'observa cap correlació amb els nivells de CRP ni a l'AT visceral ni a fetge.

4.7.8 Discussió sobre marcadors d'inflamació

En el cas dels marcadors inespecífics d'inflamació, observem com en la majoria dels casos (fibrinogen, PAI) els obesos presenten nivells elevats en major o menor mesura i aquests es normalitzen després de la intervenció. En altres casos, com en el recompte leucocitari i altres paràmetres hematològics els valors es troben propers al límit superior de normalitat sense arribar a superar-lo, però s'observen canvis significatius en les concentracions d'algunes tipologies cel·lulars (leucòcits, limfòcits, monòcits). Tot i que els canvis observats en els paràmetres inflamatoris són més lleus que els que es donen en els processos inflamatoris aguts, la cronicitat d'aquest tipus d'inflamació pot ser clau en la progressió de l'obesitat i les comorbilitats que porta associades [405].

Resultats i Discussió

Hi ha estudis clínics que han aportat evidències de que els nivells de fibrinogen es troben elevats en individus amb sobrepès i en obesos, i s'ha observat una correlació positiva entre el BMI i el fibrinogen, tanmateix es desconeix si s'estableix una relació de causa-efecte directa [410]. Tot i que no s'ha descrit la síntesi de fibrinogen a l'AT, l'alliberació de citoquines per part d'un AT amb la funció alterada podria influenciar la producció de fibrinogen a fetge. De fet, es coneix que l'AT visceral en particular, provoca un augment de la síntesi de fibrinogen mitjançant la secreció d'IL6 [200]. En aquest aspecte, els nivells elevats de fibrinogen podrien reflectir l'estat d'inflamació de l'AT que s'associa amb la IR i l'obesitat [410].

Pel que fa als efectes de la pèrdua de pes sobre els nivells de fibrinogen, els resultats descrits a la bibliografia són controvertits. Hi ha autors que descriuen una millora d'aquest paràmetre mentre que d'altres no observen cap efecte [410, 411]. Sembla ser que calen pèrdues de com a mínim el 10% del pes inicial per obtenir reduccions significatives en els nivells d'aquesta proteïna [201]. En el nostre cas no observem cap diferència fins que la pèrdua de pes no és del 34%.

A més de l'alteració en la concentració de fibrinogen, en els obesos el sistema fibrinolític es troba alterat en altres punts. Un elevat recompte leucocitari o la concentració plasmàtica de NEFA alterada, provoquen danys als vasos sanguinis que afavoreixen el procés de coagulació. A més, els valors elevats de PAI1 a plasma impedeixen la degradació de la fibrina, de manera que aquesta tendeix a polimeritzar i formar trombos.

S'ha descrit que el fetge és una de les principals fonts de PAI1, juntament amb les cèl·lules endotelials [68]. En el cas dels nostres individus, la producció hepàtica de PAI1 es troba molt incrementada (al menys a nivell d'expressió), però creiem que la producció d'aquesta proteïna a l'AT també pot contribuir de forma considerable a l'increment dels nivells plasmàtics de PAI1.

Nosaltres hem observat que l'AT subcutani produeix més PAI1 que el visceral, tot i que hi ha autors que han descrit el contrari [412], potser degut a que el teixit que empraven provenia d'individus amb normopès. Tanmateix, després de la intervenció, els nivells d'expressió al subcutani disminueixen considerablement fins a nivells similars als del visceral. Hi ha autors que relacionen els nivells de PAI1 amb l'obesitat visceral [68, 77], però en el nostre cas les correlacions amb el BMI i els Kg de greix tant subcutani com visceral eren similars i en canvi no en veiem amb el WHR.

S'ha proposat que l'increment de PAI1 a plasma, en el cas dels obesos, es deu a la inflamació de l'AT [413]. De fet, en el cas dels nostres individus, l'expressió de PAI1 a l'AT subcutani correlaciona amb la d'IL6 i al visceral amb la d'IL6 i TNF α . Però a més, a fetge també correlaciona amb la de TNF α , fet que podria indicar que l'esteatosi hepàtica que promou la inflamació d'aquest òrgan també hi podria estar contribuint [414].

Pel que fa a l'NO, cal destacar que presenta un comportament inesperat. Són diversos els estudis que descriuen que l'obesitat es troba associada amb una

Resultats i Discussió

sobreproducció d'NO i l'atribueixen a la sobreexpressió de la iNOS a l'AT subcutani, principalment [407]. En el nostre cas no només no detectem l'excés d'iNOS en l'obès sinó que els nivells d'NO en plasma es troben per sota dels detectats al grup control i continuen així als 12 mesos de la intervenció. Alguns autors ho atribueixen a que els obesos tenen un excés d'inhibició de la producció d'NO [406]. Així, Lin i col·laboradors també descriuen un descens significatiu del 44% en els nivells d'NO després de la cirurgia bariàtrica [406] però, tot i que ho atribueixen a una disminució de la iNOS, no estudien directament l'expressió de l'enzim.

Per altra banda, al mes de la cirurgia s'observa un clar increment de la concentració d'NO en plasma. Durant el primer més posterior a la intervenció és quan es produeix la major pèrdua de pes (11%) i coincideix amb un dels majors descensos en la massa de greix visceral (38%). Això implicaria una gran mobilització de greixos, reflectida per l'increment de NEFA a plasma en aquest període. S'ha descrit que aquests NEFA podrien actuar com a substàncies proinflamatòries [108], estimulants l'expressió d'iNOS, la qual podria provocar l'augment d'NO a plasma. Malauradament no disposem de les dades d'expressió de les NOS en aquest punt.

En el nostre cas, l'expressió de la iNOS a l'AT després del RYGB no es correspon amb un increment de l'NO a plasma, tot i que en principi, l'expressió d'aquest enzim implicaria un augment marcat de la producció d'NO. En canvi, la eNOS, que en teoria proporciona nivells d'NO baixos (és a dir, vasodilatadors i cardioprotectors), redueix la seva expressió a l'AT. Tanmateix, la interpretació d'aquesta reducció és difícil, ja que en principi, no té perquè traduir-se en un descens de l'activitat perquè la funcionalitat d'aquest enzim és dependent de calci-calmodulina [415]. Per altra banda, recentment s'ha descrit que factors com l'adiponectina, la grelina o la leptina també poden modular la funció de la eNOS [415, 416]. Seria necessari un estudi amb més profunditat per acabar d'aclarir el paper que estan jugant l'NO i les NOS en la inflamació i el risc cardiovascular que acompanya l'obesitat.

Si ens fixem en la CRP, els canvis en el pes corporal i en el percentatge de greix es troben associats positivament amb la reducció de la CRP plasmàtica. De fet, s'han descrit disminucions dels nivells de CRP en individus que han perdut pes amb dieta o exercici. Tanmateix, en el cas dels obesos mòrbids, la cirurgia bariàtrica s'ha mostrat com el tractament més efectiu a llarg termini per aconseguir reduccions estables de la CRP plasmàtica [417].

Hi ha autors que afirmen que la CRP només es produeix a fetge [408]. Els nostres resultats confirmen que el fetge és una font molt important de CRP [409]. Però creiem que, tot i que les quantitats detectades a AT són relativament més petites que a fetge, si es té en compte que l'AT representa el 61% del greix corporal, aquest teixit també pot resultar una font important de CRP. Alhora, els resultats reafirmen que en els individus obesos existeix un procés inflamatori que afecta al menys el fetge i l'AT i que aquest procés inflamatori remet amb la pèrdua de pes [408].

Els resultats obtinguts de les citoquines proinflamatòries IL6 i TNF α suggereixen que la IL6 procedent de l'AT (sobretot del subcutani) i el TNF α hepàtic (no pas el de l'AT) podrien estar implicades en l'augment de CRP observat en els obesos. El seu

Resultats i Discussió

descens 12 mesos després de la intervenció tindria com a conseqüència la disminució de la CRP tant a fetge com a AT i això provocaria el descens de la CRP a plasma.

En relació amb el metabolisme glucídic, com que la IL6 utilitza les mateixes vies de senyalització que la insulina, el fet que n'augmenti la seva expressió en determinats teixits podria fer que també augmentés el grau d'interferència, provocant d'aquesta manera IR [71]. Per altra banda, TNF α fosforil·la l'IRS1 en els residus de serina inhibint la senyalització de la insulina [66], de manera que si augmenta la seva concentració també hauria d'augmentar el grau d'interferència amb la senyalització de la insulina.

Per altra banda, una CRP elevada es troba altament relacionada amb malalties cardiovasculars, per l'efecte proinflamatori que produeix sobre l'endoteli [418]. La CRP uneix LDL (alterades en l'obès), que són capturades pels macròfags situats als llocs amb dany endotelial donant lloc a cèl·lules escumoses, les quals poden iniciar les plaques d'ateroma [417]. Com que es tracta d'una proteïna de fase aguda, la CRP pot induir la producció de molècules d'adhesió i la producció de factors quimioatracients de monòcits a les cèl·lules de l'endoteli promovent d'aquesta manera respostes locals inflamatòries (NO), agreujant així les plaques ateroscleròtiques [417].

El disseny del nostre estudi no ens permet establir el paper concret que juguen els paràmetres inflamatoris en l'augment del risc cardiovascular, però la relació positiva que hem detectat entre paràmetres proaterogènics com l'LDLc augmentat, l'HDLc disminuït i PAII elevat amb la CRP i el fibrinogen dona suport a la hipòtesi que la inflamació podria jugar un paper directe en la etiologia de la malaltia cardiovascular en l'obesitat.

Finalment, tot i que els valors d'ACTH i cortisol es troben dins del rang de normalitat per a cada paràmetre, es pot observar que existeix cert grau de desconexió en l'eix hipòfisi-pituïtària-adrenal (HPA) ja que mentre els nivells d'ACTH disminueixen després de la intervenció, els de cortisol, l'hormona efectora, no varien. En general, en els individus obesos s'ha descrit que tant la producció com la taxa d'eliminació de cortisol es troben augmentades, [87]; tot i això, quan es valora el cortisol circulant es troben nivells normals [419] o disminuïts [420]. És a dir, que l'augment del recanvi de glucocorticoides observat en l'obesitat no va associat a un augment dels nivells circulants; fet que coincideix amb els nostres resultats.

En canvi, s'ha descrit que l'activitat de l'11 β HSD1 està disminuïda al fetge de persones obeses i augmentada a l'AT subcutani [87], degut a l'augment d'IL6 i TNF α que l'estimulen [86, 87]. També s'ha descrit una major activitat enzimàtica en cultius primaris de cèl·lules provinents de l'AT visceral, degut a un major nombre de receptors de glucocorticoides [421], afavorint l'acumulació de greix en aquesta zona [422]. Nosaltres però, detectem l'alteració de l'expressió de l'11 β HSD1 en l'AT subcutani dels obesos, mentre que a l'AT visceral i al fetge els nivells són similars als del control. Així, és possible que al menys en l'AT subcutani s'estigui produint un augment de la producció de cortisol independent de l'eix HPA.

Així doncs, es postula que la desregulació de l'HPA i les alteracions perifèriques del metabolisme del cortisol podrien tenir un paper important en la patofisiologia de

Resultats i Discussió

l'obesitat central [421]. A més, l'increment en l'activitat de l'eix HPA podria tenir un paper en l'establiment de la IR i la DM en individus obesos [421, 422].

En resum, els nivells elevats dels marcadors d'inflamació CRP i fibrinogen podrien ser la conseqüència de la suma d'un augment d'IL6 i TNF α , juntament amb l'increment de producció de corticoides a l'AT. Després de l'operació, totes dues citokines disminueixen la seva expressió degut a una disminució de la inflamació, reflectida per un descens del fibrinogen i de la CRP (tant a plasma com a teixits). La disminució d'aquests paràmetres proinflamatoris també es veuria afavorida per la normalització de la funció de l'eix HPA que s'intueix amb els nostres resultats i que ja han descrit altres autors, els quals han vist la normalització en pacients sotmesos a cirurgia bariàtrica (VBG) [423].

Amb la pèrdua de pes, disminueixen els paràmetres proinflamatoris alhora que augmenten els antiinflamatoris (adiponectina), de manera que les interferències en la senyalització del receptor d'insulina es redueixen o desapareixen i la sensibilitat a la insulina millora [424].

4.8 Discussió final

En l'actualitat, existeix un gran nombre de treballs que se centren en l'estudi de l'obesitat i les comorbiditats que l'acompanyen (DM, dislipèmia, esteatosi hepàtica, etc.), així com en els tractaments que s'han desenvolupat en els darrers anys per combatre-la (des de modificacions en l'estil de vida fins a la cirurgia bariàtrica). Tanmateix, en la majoria dels casos aquests treballs se centren només en alguna de les afectacions o en aspectes molt concrets d'aquestes. A més, tot i que la tendència està canviant, sovint els grups estudiats estan formats per un nombre reduït de pacients i es fan seguiments a curt termini.

En el nostre treball hem pogut fer un seguiment complert a un grup de 34 individus amb obesitat mòrbida des d'un mes abans de sotmetre's a un RYGB fins a un any després de la intervenció, establint períodes de control curts (al mes de la intervenció i posteriorment cada 3 mesos), aconseguint un compliment del seguiment de les visites per part dels pacients molt elevat.

A diferència d'altres treballs, hem pogut obtenir mostres (tant plasmàtiques com tissulars) dels mateixos pacients quan aquests encara eren obesos mòrbids i a mesura que anaven perdent pes. Això, ens han permès abordar la problemàtica de l'obesitat mòrbida i la seva evolució després d'un procediment de cirurgia bariàtrica des de diferents punts de vista, aconseguint una visió global del metabolisme d'aquests individus durant tot el període estudiat, temps en el que la majoria dels individus han aconseguit la resolució de bona part de les comorbiditats que els afectaven.

Els nostres pacients, com hem pogut veure al llarg d'aquest treball, presentaven una alteració profunda del metabolisme glucídic i lipídic (Figura 96). En el cas dels obesos, una ingesta calòrica excessiva o una taxa metabòlica basal disminuïda fan que existeixi un excés de calories a l'organisme que generalment, es presenta en forma de TAG i que

Resultats i Discussió

normalment, acaben emmagatzemant-se a l'AT. El fet de tenir una activitat LPL augmentada en aquest teixit, tal i com hem demostrat, els permet captar lípids de forma més eficient; tanmateix, això no és suficient per normalitzar-ne les concentracions plasmàtiques.

Com a conseqüència de l'augment de l'entrada de lípids a l'AT, el teixit s'acaba hipertrofiant, és a dir, que els adipòcits tenen un major contingut lipídic i augmenten de mida. Creiem que quan la hipertròfia es prolonga en el temps el teixit s'inflama, i tal i com han descrit altres autors, s'hi infiltrin macròfags [425], que serien en part els responsables de l'augment de la secreció de citoquines (CRP, IL6, PAI1), algunes de les quals interfereixen en la senyalització de la insulina. De les conseqüències més importants que hem detectat a nivell de l'AT destaquem: el descens de la resposta de GLUT4, que es tradueix en una disminució de la captació de la glucosa circulant i per tant en hiperglucèmia; i una lipòlisi incrementada (major activitat HSL) que fa que l'AT aboqui grans quantitats de NEFA al torrent sanguini, empitjorant la dislipèmia.

Com que els NEFA en plasma poden arribar a ser altament tòxics, l'organisme busca la manera de reduir-ne la concentració.

Una primera via seria l'augment de la β -oxidació a múscul, que nosaltres no hem estudiat. Una segona via seria derivar els NEFA cap a fetge, un òrgan que en menor mesura també està preparat per metabolitzar els lípids.

Un cop els NEFA arriben al fetge, aquest els pot reesterificar i, juntament amb EC i apoB, tornar-los a posar en circulació a disposició de la resta de teixits en forma de VLDL. Tanmateix, aquest sistema de canalització dels NEFA és saturable. En el cas dels obesos mòrbids, el fetge no seria capaç d'assimilar l'allau de lípids, així que aquests acabarien per acumular-s'hi, tal i com ho demostra l'anàlisi citològic i de la composició lipídica d'aquest teixit que hem dut a terme.

De la mateixa manera que en l'AT, l'acumulació excessiva de lípids al fetge (esteatosi) provocaria la inflamació del teixit i l'augment de la secreció de citoquines proinflamàtòries (fibrinogen, CRP, PAI, TNF α) que alterarien la seva funció. Un exemple clar seria l'aparició d'expressió d'LPL, la qual creiem que pot contribuir a la captació de lípids a fetge.

La dislipèmia provocada per la incapacitat de l'AT i el fetge per metabolitzar correctament l'excés de lípids plasmàtics faria que aquests acabessin per acumular-se de forma ectòpica en altres teixits (pàncrees i múscul), provocant lipotoxicitat i IR [100].

Aquests resultats situen l'AT en una posició clau en el desenvolupament de les comorbilitats associades a l'obesitat, tal i com s'ha suggerit en estudis recents [127, 417, 426].

Amb el RYGB es redueix tant la ingesta com l'absorció de nutrients, alhora que comporta una reorganització del tracte digestiu. Un dels efectes d'aquest tipus de cirurgia que crida més l'atenció és la millora de la IR, que sovint es dona molt abans que hi hagi una pèrdua de pes significativa. En primer terme, tot i que nosaltres no ho hem estudiat directament, nombrosos autors han descrit el paper de les incetines en la millora de la IR després de la cirurgia bariàtrica; aquestes promourien una

Resultats i Discussió

sensibilització sistèmica vers la insulina, independentment del pes i del greix corporal [122, 123, 125, 126].

En segon terme, quan la pèrdua de pes ja és un fet (Figura 97), l'AT ha començat a mobilitzar les reserves energètiques de forma eficient (es redueix l'activitat LPL però l'HSL continua incrementada) i els adipòcits recuperen la seva mida i composició normal. Això va acompanyat d'una disminució de la inflamació (els valors de CRP, PAI1 i IL6 es normalitzen). El fet que l'AT recuperi la seva capacitat per emmagatzemar lípids alliberaria a la resta de teixits (fetge, múscul i pàncrees) de la pressió lipotòxica a la que estaven sotmesos, tal i com queda reflectit per exemple, en l'elevat nombre d'individus que deixen de patir esteatosi i IR.

Resultats i Discussió

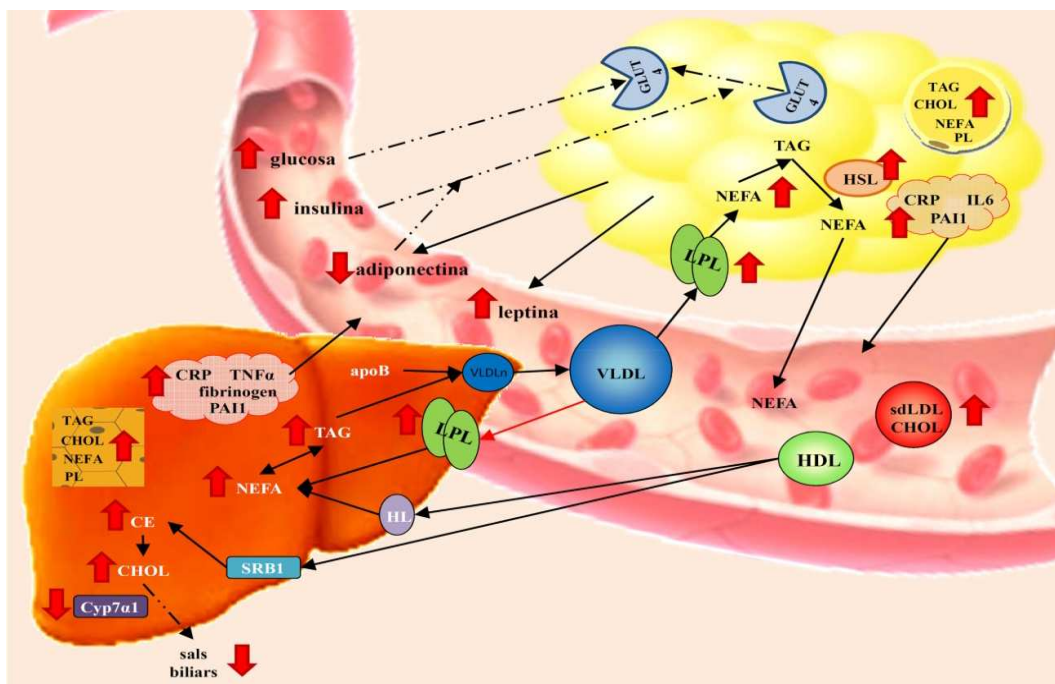


Figura 96. Esquema resum del metabolisme en l'obès mòrbid i de la relació que s'estableix entre l'AT i el fetge. Les fletxes negres fines indiquen processos que es donen, les fletxes negres discontinues indiquen processos que no es donen correctament, la fletxa vermella fina indica un procés que normalment no es dona. Les fletxes vermelles ↑ indiquen paràmetres que es troben alterats i representen un risc per a la salut. Les abreviatures es troben descrites a l'apartat sigles i abreviatures.

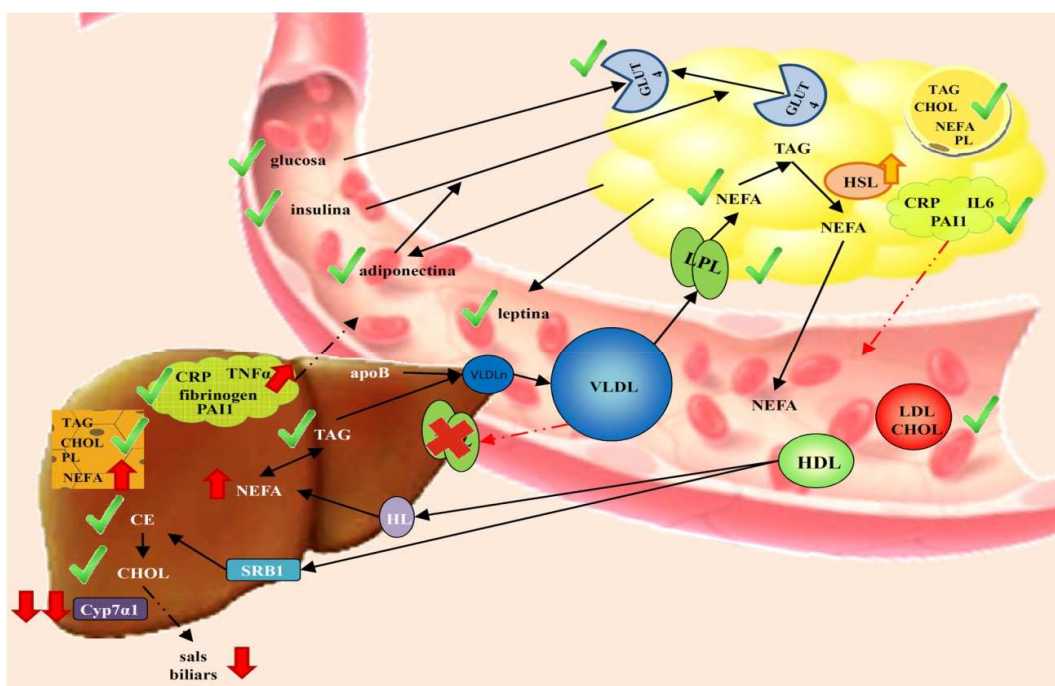


Figura 97. Esquema resum del metabolisme en l'obès mòrbid a l'any de la intervenció de RYGP i de la relació que s'estableix entre l'AT i el fetge. Les fletxes negres fines indiquen processos que es donen, les fletxes negres discontinues indiquen processos que no es donen correctament, la fletxa vermella discontinua indica un procés que ja no es dona. Les fletxes vermelles (↑) indiquen paràmetres que es troben alterats i representen un risc per a la salut, la fletxa taronaja (↑) indica un paràmetre que es troba alterat però no té perquè representar un risc per a la salut, els símbols verds (✓) indiquen paràmetres que s'han normalitzat. Les abreviatures es troben descrites a l'apartat sigles i abreviatures.

Resultats i Discussió

5. CONCLUSIONS

Conclusions

1. L'AT dels obesos mòrbids es troba hipertrofiat i inflammat. El dèficit de capacitat d'emmagatzematge a l'AT, reflectit per la dislipèmia aterogènica que pateix aquest tipus de pacient, faria que els lípids s'acumulessin en altres teixits, promovent d'aquesta manera l'aparició de les comorbilitats metabòliques que acompanyen l'obesitat.
2. L'esteatosi present en els obesos es podria veure afavorida per l'expressió anòmala d'LPL en aquest teixit. En l'activació d'aquesta expressió hi podria intervenir el TNF α .
3. El RYGB és una tècnica de cirurgia bariàtrica útil per aconseguir reduccions de pes sostingudes en el temps en pacients amb obesitat mòrbida. Aquesta reducció es deu principalment a la pèrdua de greix corporal.
4. La reducció de l'excés de pes comporta la millora de les comorbilitats que acompanyen l'obesitat mòrbida:
 - a. La millora de la IR s'aconsegueix molt abans d'obtenir la pèrdua de l'excés de pes desitjada.
 - b. El perfil lipídic dels individus es normalitza en la majoria dels casos, de manera que la dislipèmia remet i el risc cardiovascular que comporta disminueix. Aquesta millora es podria deure, en part, a la normalització gairebé total de la funcionalitat de l'AT i el fetge.

6. BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

1. Neel, J.V., *Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"?* Am J Hum Genet, 1962. 14: p. 353-62.
2. Bray, G.A., *Contemporary diagnosis and management of obesity and the metabolic syndrome*. 2003, NewTown, P.A.: Handbooks in Health Care.
3. Quetelet, A., *Physique sociale ou essai sur le development des facultés de l'homme*. 1969. 2.
4. Rubio-Herrera, M.A., et al., *Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica*. Rev Esp Obes, 2007: p. 7-48.
5. Aranceta, J., et al., *Obesidad y riesgo cardiovascular. Estudio DORICA*. 2004, Madrid: Panamericana.
6. Gutierrez-Fisac, J.L., et al., *Prevalence of general and abdominal obesity in the adult population of Spain, 2008-2010: the ENRICA study*. Obes Rev, 2012. 13(4): p. 388-92.
7. Van Itallie, T.B., *"Morbid" obesity: a hazardous disorder that resists conservative treatment*. Am J Clin Nutr, 1980. 33(2 Suppl): p. 358-63.
8. Rubio-Herrera, M.A., *Manual de obesidad mórbida*. 2005, Madrid: Editorial Médica Panamericana.
9. Aronne, L.J. and K.R. Segal, *Adiposity and fat distribution outcome measures: assessment and clinical implications*. Obes Res, 2002. 10 Suppl 1: p. 14S-21S.
10. Obesity, N.T.F.o.t.P.a.T.o., *Overweight, obesity, and health risk*. Arch Intern Med, 2000. 160(7): p. 898-904.
11. Clegg, A.J., et al., *The clinical effectiveness and cost-effectiveness of surgery for people with morbid obesity: a systematic review and economic evaluation*. Health Technol Assess, 2002. 6(12): p. 1-153.
12. Prentice, A.M., et al., *High levels of energy expenditure in obese women*. Br Med J (Clin Res Ed), 1986. 292(6526): p. 983-7.
13. Stunkard, A.J. and T.A. Wadden, *Psychological aspects of severe obesity*. Am J Clin Nutr, 1992. 55(2 Suppl): p. 524S-532S.
14. Scott, K.M., et al., *Obesity and mental disorders in the adult general population*. J Psychosom Res, 2008. 64(1): p. 97-105.
15. Vague, J., *La diferenciación sexual, factor determinante de las formas de la obesidad*. Presse Med, 1947. 55(30): p. 339.
16. Foz, M. and X. Formiguera, *Obesidad*. 1998, Barcelona: Harcourt Brace.
17. Kaplan, N.M., *The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension*. Arch Intern Med, 1989. 149(7): p. 1514-20.
18. Kissebah, A.H. and G.R. Krakower, *Regional adiposity and morbidity*. Physiol Rev, 1994. 74(4): p. 761-811.
19. Montague, C.T., et al., *Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution*. Diabetes, 1997. 46(3): p. 342-7.
20. Conway, J.M., et al., *Visceral adipose tissue differences in black and white women*. Am J Clin Nutr, 1995. 61(4): p. 765-71.
21. Rodriguez, A., et al., *Visceral and subcutaneous adiposity: are both potential therapeutic targets for tackling the metabolic syndrome?* Curr Pharm Des, 2007. 13(21): p. 2169-75.
22. WHO, W.H.O., *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity*. 1998: Geneve.

Bibliografía

23. Expert Panel on Detection, E., And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults, *Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)*. JAMA, 2001. 285(19): p. 2486-97.
24. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw, *The metabolic syndrome--a new worldwide definition*. Lancet, 2005. 366(9491): p. 1059-62.
25. Kyle, U.G., et al., *Bioelectrical impedance analysis--part I: review of principles and methods*. Clin Nutr, 2004. 23(5): p. 1226-43.
26. Kyle, U.G., et al., *Bioelectrical impedance analysis-part II: utilization in clinical practice*. Clin Nutr, 2004. 23(6): p. 1430-53.
27. Ryo, M., et al., *A new simple method for the measurement of visceral fat accumulation by bioelectrical impedance*. Diabetes Care, 2005. 28(2): p. 451-3.
28. Kamel, E.G., G. McNeill, and M.C. Van Wijk, *Usefulness of anthropometry and DXA in predicting intra-abdominal fat in obese men and women*. Obes Res, 2000. 8(1): p. 36-42.
29. Pérez-Miguelsanz, M.J., et al., *Distribución regional de la grasa corporal. Uso de técnicas de imagen como herramienta de diagnóstico nutricional*. Nutrición Hospitalaria, 2010. 25(2): p. 207-223.
30. SEEDO, S.E.p.e.E.d.I.O., *Consenso español 1995 para la evaluación de la obesidad y para la realización de estudios epidemiológicos*. Med. Clin., 1996. 107: p. 782-787.
31. Alberti, K.G., 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 Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity*. Circulation, 2009. 120(16): p. 1640-5.
32. Deurenberg, P., J.A. Weststrate, and J.C. Seidell, *Body mass index as a measure of body fatness: age- and sex-specific prediction formulas*. Br J Nutr, 1991. 65(2): p. 105-14.
33. Lean, M.E., T.S. Han, and P. Deurenberg, *Predicting body composition by densitometry from simple anthropometric measurements*. Am J Clin Nutr, 1996. 63(1): p. 4-14.
34. Bonora, E., et al., *Is it possible to derive a reliable estimate of human visceral and subcutaneous abdominal adipose tissue from simple anthropometric measurements? Metabolism*, 1995. 44(12): p. 1617-25.
35. Hausman, G.J., *The comparative anatomy of adipose tissue*. New perspectives in adipose tissue: structure, function and development. 1985, London: Cryer and Van RLR.
36. Farmer, S.R., *Regulation of PPARgamma activity during adipogenesis*. Int J Obes (Lond), 2005. 29 Suppl 1: p. S13-6.
37. Spalding, K.L., et al., *Dynamics of fat cell turnover in humans*. Nature, 2008. 453(7196): p. 783-7.
38. Faust, I.M., et al., *Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity*. Am J Physiol, 1978. 235(3): p. E279-86.
39. Arner, E., et al., *Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology*. Diabetes, 2010. 59(1): p. 105-9.
40. Zimmermann, R., et al., *Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase*. Science, 2004. 306(5700): p. 1383-6.

Bibliografia

41. Villena, J.A., et al., *Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis*. J Biol Chem, 2004. 279(45): p. 47066-75.
42. Jenkins, C.M., et al., *Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities*. J Biol Chem, 2004. 279(47): p. 48968-75.
43. Zimmermann, R., et al., *Fate of fat: the role of adipose triglyceride lipase in lipolysis*. Biochim Biophys Acta, 2009. 1791(6): p. 494-500.
44. Wang, S., et al., *Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism*. Mol Genet Metab, 2008. 95(3): p. 117-26.
45. Watt, M.J. and G.R. Steinberg, *Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism*. Biochem J, 2008. 414(3): p. 313-25.
46. Haemmerle, G., et al., *Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase*. Science, 2006. 312(5774): p. 734-7.
47. Scow, R.O. and T. Egelrud, *Hydrolysis of chylomicron phosphatidylcholine in vitro by lipoprotein lipase, phospholipase A2 and phospholipase C*. Biochim Biophys Acta, 1976. 431(3): p. 538-49.
48. Williams, K.J., *Some things just have to be done in vivo: GPIHBP1, caloric delivery, and the generation of remnant lipoproteins*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. 29(6): p. 792-5.
49. Davies, B.S., et al., *GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries*. Cell Metab, 2010. 12(1): p. 42-52.
50. Olivecrona, T. and G. Bengtsson-Olivecrona, *Lipoprotein lipase from milk- the model enzyme in lipoprotein lipase research*. Lipoprotein lipase. 1988, Chicago: Evener Publishers, Inc.
51. Weinstein, M.M., et al., *Abnormal patterns of lipoprotein lipase release into the plasma in GPIHBP1-deficient mice*. J Biol Chem, 2008. 283(50): p. 34511-8.
52. Dallinga-Thie, G.M., et al., *The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight*. Atherosclerosis, 2010. 211(1): p. 1-8.
53. Wang, H. and R.H. Eckel, *Lipoprotein lipase: from gene to obesity*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. 297(2): p. E271-88.
54. Sukonina, V., et al., *Angiopietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(46): p. 17450-5.
55. Vilaro, S., et al., *Lipoprotein lipase uptake by the liver: localization, turnover, and metabolic role*. Am J Physiol, 1988. 254(5 Pt 1): p. G711-22.
56. Enerback, S., et al., *Tissue-specific regulation of guinea pig lipoprotein lipase; effects of nutritional state and of tumor necrosis factor on mRNA levels in adipose tissue, heart and liver*. Gene, 1988. 64(1): p. 97-106.
57. Preiss-Landl, K., et al., *Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism*. Curr Opin Lipidol, 2002. 13(5): p. 471-81.
58. Mead, J.R., S.A. Irvine, and D.P. Ramji, *Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease*. J Mol Med, 2002. 80(12): p. 753-69.
59. Lago, F., et al., *Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007. 3(12): p. 716-24.
60. Arora, S. and Anubhuti, *Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review*. Neuropeptides, 2006. 40(6): p. 375-401.

Bibliografía

61. Meier, U. and A.M. Gressner, *Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin*. Clin Chem, 2004. 50(9): p. 1511-25.
62. Faraj, M., et al., *Plasma acylation-stimulating protein, adiponectin, leptin, and ghrelin before and after weight loss induced by gastric bypass surgery in morbidly obese subjects*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. 88(4): p. 1594-602.
63. Elissondo, N., et al., *Adiponectina: una adipocitoquina con múltiples funciones protectoras*. Acta Bioquim Clin Latinoam, 2008. 42(1): p. 17-33.
64. Kadowaki, T., et al., *Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome*. J Clin Invest, 2006. 116(7): p. 1784-92.
65. Butner, K.L., et al., *A review of weight loss following Roux-en-Y gastric bypass vs restrictive bariatric surgery: impact on adiponectin and insulin*. Obes Surg, 2010. 20(5): p. 559-68.
66. Bastard, J.P., et al., *Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance*. Eur Cytokine Netw, 2006. 17(1): p. 4-12.
67. Vendrell, J., et al., *Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity*. Obes Res, 2004. 12(6): p. 962-71.
68. Wajchenberg, B.L., *Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome*. Endocr Rev, 2000. 21(6): p. 697-738.
69. Ibrahim, M.M., *Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences*. Obes Rev, 2010. 11(1): p. 11-8.
70. Fruhbeck, G., et al., *The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. 280(6): p. E827-47.
71. Hoene, M. and C. Weigert, *The role of interleukin-6 in insulin resistance, body fat distribution and energy balance*. Obes Rev, 2008. 9(1): p. 20-9.
72. Fukuhara, A., et al., *Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin*. Science, 2005. 307(5708): p. 426-30.
73. Berndt, J., et al., *Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans*. Diabetes, 2005. 54(10): p. 2911-6.
74. Pagano, C., et al., *Reduced plasma visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obesity is not related to insulin resistance in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. 91(8): p. 3165-70.
75. Bastelica, D., et al., *Stromal cells are the main plasminogen activator inhibitor-1-producing cells in human fat: evidence of differences between visceral and subcutaneous deposits*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. 22(1): p. 173-8.
76. Trayhurn, P. and J.H. Beattie, *Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ*. Proc Nutr Soc, 2001. 60(3): p. 329-39.
77. Alessi, M.C. and I. Juhan-Vague, *PAI-1 and the metabolic syndrome: links, causes, and consequences*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(10): p. 2200-7.
78. Arner, P., *Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues*. Ann Med, 1995. 27(4): p. 435-8.
79. Tchernof, A., et al., *Regional differences in adipose tissue metabolism in women: minor effect of obesity and body fat distribution*. Diabetes, 2006. 55(5): p. 1353-60.
80. Boivin, A., et al., *Regional differences in adipose tissue metabolism in obese men*. Metabolism, 2007. 56(4): p. 533-40.

Bibliografia

81. Freedland, E.S., *Role of a critical visceral adipose tissue threshold (CVATT) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review*. Nutr Metab (Lond), 2004. 1(1): p. 12.
82. Misra, A. and N.K. Vikram, *Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots*. Nutrition, 2003. 19(5): p. 457-66.
83. Bolinder, J., et al., *Differences at the receptor and postreceptor levels between human omental and subcutaneous adipose tissue in the action of insulin on lipolysis*. Diabetes, 1983. 32(2): p. 117-23.
84. Mi-Jeong, L. and K.S. Fried, *Depot-specific biology of adipose tissue: links to fat distribution and metabolic risk*, in *Adipose tissue in health and disease*, T. Leff and J.G. Granneman, Editors. 2010, Wiley-Blackwell: Weinheim. p. 285-306.
85. Rebuffe-Scrive, M., K. Lundholm, and P. Bjorntorp, *Glucocorticoid hormone binding to human adipose tissue*. Eur J Clin Invest, 1985. 15(5): p. 267-71.
86. Walker, B.R. and R. Andrew, *Tissue production of cortisol by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and metabolic disease*. Ann N Y Acad Sci, 2006. 1083: p. 165-84.
87. Grasa, M.M., *Glucocorticoides y obesidad*. Rev Esp Obes, 2004. 11(1): p. 13-30.
88. Ostman, J., et al., *Regional differences in the control of lipolysis in human adipose tissue*. Metabolism, 1979. 28(12): p. 1198-205.
89. Lundgren, M., et al., *Glucocorticoids down-regulate glucose uptake capacity and insulin-signaling proteins in omental but not subcutaneous human adipocytes*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. 89(6): p. 2989-97.
90. Fisher, F.M., et al., *Differences in adiponectin protein expression: effect of fat depots and type 2 diabetic status*. Horm Metab Res, 2002. 34(11-12): p. 650-4.
91. Reynisdottir, S., et al., *Comparison of hormone-sensitive lipase activity in visceral and subcutaneous human adipose tissue*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. 82(12): p. 4162-6.
92. Montague, C.T., et al., *Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes*. Diabetes, 1998. 47(9): p. 1384-91.
93. Fried, S.K., et al., *Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men*. J Clin Invest, 1993. 92(5): p. 2191-8.
94. Mairal, A., et al., *Human adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is not regulated by obesity and exhibits low in vitro triglyceride hydrolase activity*. Diabetologia, 2006. 49(7): p. 1629-36.
95. De Pablos Velasco, P.L. and F.J. Martínez Martín, *Clinical significance of abdominal obesity*. Endocrinol. Nutr., 2007. 54(5): p. 265-271.
96. Simoneau, J.A., et al., *Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss*. FASEB J, 1999. 13(14): p. 2051-60.
97. Bjorntorp, P., *Abdominal obesity and the metabolic syndrome*. Ann Med, 1994(24): p. 465-468.
98. Wilding, J.P., *The importance of free fatty acids in the development of Type 2 diabetes*. Diabet Med, 2007. 24(9): p. 934-45.
99. Nauck, M.A., *Glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetes: the β -cell and beyond*. Diabetes, obesity and metabolism, 2008. 10(s3): p. 2-13.

Bibliografia

100. Wajchenberg, B.L., *beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment*. *Endocr Rev*, 2007. 28(2): p. 187-218.
101. Butler, A.E., et al., *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2003. 52(1): p. 102-10.
102. Lelliott, C.J., M. Oresic, and A.J. Vidal-Puig, *Obesity and diabetes: lipotoxicity*, in *Adipose tissue in health and disease*, T. Leff and J.G. Granneman, Editors. 2010, Wiley-Blackwell: Weinheim.
103. DeFronzo, R.A., J.D. Tobin, and R. Andres, *Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance*. *Am J Physiol*, 1979. 237(3): p. E214-23.
104. Matthews, D.R., et al., *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. *Diabetologia*, 1985. 28(7): p. 412-9.
105. Ascaso, J.F., et al., *Insulin resistance quantification by fasting insulin plasma values and HOMA index in a non-diabetic population*. *Med Clin (Barc)*, 2001. 117(14): p. 530-3.
106. Katz, A., et al., *Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. 85(7): p. 2402-10.
107. Robertson, R.P., et al., *Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection*. *Diabetes*, 2003. 52(3): p. 581-7.
108. Biddinger, S.B. and E. Brice, *Insulin resistance in the metabolic syndrome*, in *Metabolic basis of obesity*, R.S. Ahima, Editor. 2011, Springer Science+Business Media: New York.
109. Randle, P.J., et al., *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus*. *Lancet*, 1963. 1(7285): p. 785-9.
110. Delarue, J. and C. Magnan, *Free fatty acids and insulin resistance*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2007. 10(2): p. 142-8.
111. Samuel, V.T., K.F. Petersen, and G.I. Shulman, *Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism*. *Lancet*, 2010. 375(9733): p. 2267-77.
112. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue*. *J Clin Invest*, 2003. 112(12): p. 1785-8.
113. Hotamisligil, G.S., *Inflammation and metabolic disorders*. *Nature*, 2006. 444(7121): p. 860-7.
114. Curat, C.A., et al., *Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin*. *Diabetologia*, 2006. 49(4): p. 744-7.
115. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. *J Clin Invest*, 2003. 112(12): p. 1796-808.
116. Surmi, B.K. and A.H. Hasty, *Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling*. *Future Lipidol*, 2008. 3(5): p. 545-556.
117. Stienstra, R., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation promotes infiltration of alternatively activated macrophages into adipose tissue*. *J Biol Chem*, 2008. 283(33): p. 22620-7.
118. Canello, R., et al., *Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss*. *Diabetes*, 2005. 54(8): p. 2277-86.

Bibliografia

119. Vidal, H., et al., *The expression of ob gene is not acutely regulated by insulin and fasting in human abdominal subcutaneous adipose tissue*. J Clin Invest, 1996. 98(2): p. 251-5.
120. Vetter, M.L., et al., *Narrative review: effect of bariatric surgery on type 2 diabetes mellitus*. Ann Intern Med, 2009. 150(2): p. 94-103.
121. Scopinaro, N., et al., *Biliopancreatic diversion*. World J Surg, 1998. 22(9): p. 936-46.
122. Strader, A.D., et al., *Weight loss through ileal transposition is accompanied by increased ileal hormone secretion and synthesis in rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. 288(2): p. E447-53.
123. Pories, W.J. and R.J. Albrecht, *Etiology of type II diabetes mellitus: role of the foregut*. World J Surg, 2001. 25(4): p. 527-31.
124. Rubino, F., et al., *The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes*. Ann Surg, 2006. 244(5): p. 741-9.
125. Rubino, F., *Bariatric surgery: effects on glucose homeostasis*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006. 9(4): p. 497-507.
126. Rubino, F. and M. Gagner, *Potential of surgery for curing type 2 diabetes mellitus*. Ann Surg, 2002. 236(5): p. 554-9.
127. Virtue, S. and A. Vidal-Puig, *Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective*. Biochim Biophys Acta, 2010. 1801(3): p. 338-49.
128. Stralfors, P., *Autolysis of isolated adipocytes by endogenously produced fatty acids*. FEBS Lett, 1990. 263(1): p. 153-4.
129. Schmitt, M.G., Jr., et al., *Absorption of short-chain fatty acids from the human ileum*. Am J Dig Dis, 1977. 22(4): p. 340-7.
130. Olivecrona, G. and T. Olivecrona, *Triglyceride lipases and atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 1995. 6(5): p. 291-305.
131. Kampf, J.P., D. Cupp, and A.M. Kleinfeld, *Different mechanisms of free fatty acid flip-flop and dissociation revealed by temperature and molecular species dependence of transport across lipid vesicles*. J Biol Chem, 2006. 281(30): p. 21566-74.
132. Stump, D.D., X. Fan, and P.D. Berk, *Oleic acid uptake and binding by rat adipocytes define dual pathways for cellular fatty acid uptake*. J Lipid Res, 2001. 42(4): p. 509-20.
133. Abumrad, N., C. Coburn, and A. Ibrahim, *Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm*. Biochim Biophys Acta, 1999. 1441(1): p. 4-13.
134. Tontonoz, P., et al., *PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL*. Cell, 1998. 93(2): p. 241-52.
135. Coburn, C.T., et al., *Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice*. J Biol Chem, 2000. 275(42): p. 32523-9.
136. Febbraio, M., et al., *A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism*. J Biol Chem, 1999. 274(27): p. 19055-62.
137. Sfeir, Z., et al., *Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1997. 57(1): p. 17-21.

Bibliografia

138. Febbraio, M., D.P. Hajjar, and R.L. Silverstein, *CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism*. J Clin Invest, 2001. 108(6): p. 785-91.
139. Havel, R.J. and J.P. Kane, *The metabolic basis of inherited disease*. Structure and metabolism of plasma lipoproteins. 1989, New Yoirk: McGraw-Hill.
140. Havel, R.J., *Postprandial lipid metabolism: an overview*. Proc Nutr Soc, 1997. 56(2): p. 659-66.
141. Perret, B., et al., *Hepatic lipase: structure/function relationship, synthesis, and regulation*. J Lipid Res, 2002. 43(8): p. 1163-9.
142. Santamarina-Fojo, S., et al., *Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. 24(10): p. 1750-4.
143. Jansen, H., A.J. Verhoeven, and E.J. Sijbrands, *Hepatic lipase: a pro- or anti-atherogenic protein?* J Lipid Res, 2002. 43(9): p. 1352-62.
144. Deeb, S.S., et al., *Hepatic lipase and dyslipidemia: interactions among genetic variants, obesity, gender, and diet*. J Lipid Res, 2003. 44(7): p. 1279-86.
145. Londos, C., et al., *Perilipin: unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells*. Biochem Soc Trans, 1995. 23(3): p. 611-5.
146. Holm, C., *Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis*. Biochem Soc Trans, 2003. 31(Pt 6): p. 1120-4.
147. Hibuse, T., et al., *Aquaporins and glycerol metabolism*. Biochim Biophys Acta, 2006. 1758(8): p. 1004-11.
148. Ginsberg, H.N., Y.L. Zhang, and A. Hernandez-Ono, *Metabolic syndrome: focus on dyslipidemia*. Obesity (Silver Spring), 2006. 14 Suppl 1: p. 41S-49S.
149. Adiels, M., et al., *Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. 28(7): p. 1225-36.
150. Lewis, G.F., et al., *Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals*. Diabetes, 1993. 42(6): p. 833-42.
151. Panarotto, D., et al., *Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in an adipose tissue-specific manner*. Eur J Clin Invest, 2002. 32(2): p. 84-92.
152. Chan, D.C., et al., *Apolipoprotein B-100 kinetics in visceral obesity: associations with plasma apolipoprotein C-III concentration*. Metabolism, 2002. 51(8): p. 1041-6.
153. Fredenrich, A., *Role of apolipoprotein CIII in triglyceride-rich lipoprotein metabolism*. Diabetes Metab, 1998. 24(6): p. 490-5.
154. MacLean, P.S., et al., *Suppression of hepatic cholesteryl ester transfer protein expression in obese humans with the development of type 2 diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. 90(4): p. 2250-8.
155. Toh, S.A., M. Levin, and D.J. Rader, *Atherogenic lipid metabolism in obesity*, in *Metabolic basis of obesity*, R.S. Ahima, Editor. 2011, Springer Science + Business Media: New York.
156. Kolovou, G.D., K.K. Anagnostopoulou, and D.V. Cokkinos, *Pathophysiology of dyslipidaemia in the metabolic syndrome*. Postgrad Med J, 2005. 81(956): p. 358-66.
157. Neuschwander-Tetri, B.A. and S.H. Caldwell, *Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference*. Hepatology, 2003. 37(5): p. 1202-19.

Bibliografia

158. Machado, M., P. Marques-Vidal, and H. Cortez-Pinto, *Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery*. J Hepatol, 2006. 45(4): p. 600-6.
159. Targher, G., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased prevalence of chronic kidney disease and proliferative/laser-treated retinopathy in type 2 diabetic patients*. Diabetologia, 2008. 51(3): p. 444-50.
160. Brunt, E.M., *Pathology of nonalcoholic fatty liver disease*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010. 7(4): p. 195-203.
161. Dixon, J.B., P.S. Bhathal, and P.E. O'Brien, *Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese*. Gastroenterology, 2001. 121(1): p. 91-100.
162. Campos, G.M., et al., *A clinical scoring system for predicting nonalcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients*. Hepatology, 2008. 47(6): p. 1916-23.
163. Brunt, E.M., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions*. Am J Gastroenterol, 1999. 94(9): p. 2467-74.
164. Brunt, E.M., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: histologic features and clinical correlations with 30 blinded biopsy specimens*. Hum Pathol, 2004. 35(9): p. 1070-82.
165. Luyckx, F.H., P.J. Lefebvre, and A.J. Scheen, *Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss*. Diabetes Metab, 2000. 26(2): p. 98-106.
166. Utzschneider, K.M. and S.E. Kahn, *Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. 91(12): p. 4753-61.
167. Najjar, S.M., *Non-Alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome*, in *Metabolic basis of obesity*, R.S. Ahima, Editor. 2011, Springer Science+Business Media: New York.
168. Fabbrini, E., S. Sullivan, and S. Klein, *Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications*. Hepatology, 2010. 51(2): p. 679-89.
169. Dowman, J.K., J.W. Tomlinson, and P.N. Newsome, *Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease*. QJM, 2009. 103(2): p. 71-83.
170. Carrasco Loza, R.A., et al., *La enfermedad de hígado graso no alcohólica y su asociación con obesidad y estrés oxidativo hepático*. MEDUNAB, 2003. 6(16): p. 15-20.
171. Pasumathy, L. and J. Srouf, *Nonalcoholic steatohepatitis: a review of the literature and updates in management*. South Med J, 2010. 103(6): p. 547-50.
172. Miquilena Colina, M.E. and C. Garcia Monzon, *[Obesity and liver disease]*. Gastroenterol Hepatol, 2010. 33(8): p. 591-604.
173. Pagano, C., et al., *Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease*. Eur J Endocrinol, 2005. 152(1): p. 113-8.
174. Angulo, P., *NAFLD, obesity, and bariatric surgery*. Gastroenterology, 2006. 130(6): p. 1848-52.
175. Wigg, A.J., et al., *The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis*. Gut, 2001. 48(2): p. 206-11.
176. Kotronen, A. and H. Yki-Jarvinen, *Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. 28(1): p. 27-38.
177. Younossi, Z.M., et al., *A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2005. 42(3): p. 665-74.

Bibliografia

178. Wieckowska, A., et al., *In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2006. 44(1): p. 27-33.
179. Wree, A., et al., *Obesity affects the liver - the link between adipocytes and hepatocytes*. Digestion, 2011. 83(1-2): p. 124-33.
180. Targher, G., C.P. Day, and E. Bonora, *Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. N Engl J Med, 2010. 363(14): p. 1341-50.
181. Seppala-Lindroos, A., et al., *Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. 87(7): p. 3023-8.
182. Romeo, S., et al., *Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease*. Nat Genet, 2008. 40(12): p. 1461-5.
183. Petersen, K.F., et al., *Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease*. N Engl J Med, 2010. 362(12): p. 1082-9.
184. Sazci, A., et al., *Association of apolipoprotein E polymorphisms in patients with non-alcoholic steatohepatitis*. Dig Dis Sci, 2008. 53(12): p. 3218-24.
185. Hall, J.E., *The kidney, hypertension, and obesity*. Hypertension, 2003. 41(3 Pt 2): p. 625-33.
186. Aranceta, J., et al., *Tables of coronary risk evaluation adapted to the Spanish population: the DORICA study*. Med Clin (Barc), 2004. 123(18): p. 686-91.
187. Sironi, A.M., et al., *Visceral fat in hypertension: influence on insulin resistance and beta-cell function*. Hypertension, 2004. 44(2): p. 127-33.
188. Brown, C.D., et al., *Body mass index and the prevalence of hypertension and dyslipidemia*. Obes Res, 2000. 8(9): p. 605-19.
189. Summers, L.K., et al., *Subcutaneous abdominal adipose tissue blood flow: variation within and between subjects and relationship to obesity*. Clin Sci (Lond), 1996. 91(6): p. 679-83.
190. Van Gaal, L.F., I.L. Mertens, and C.E. De Block, *Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease*. Nature, 2006. 444(7121): p. 875-80.
191. Cassis, L.A. and S.B. Police, *Adipose tissue and blood pressure regulation.*, in *Adipose tissue in health and disease*, T. Leff and J.G. Granneman, Editors. 2010, Wiley-Blackwell: Weinheim.
192. Rowe, J.W., et al., *Effect of insulin and glucose infusions on sympathetic nervous system activity in normal man*. Diabetes, 1981. 30(3): p. 219-25.
193. Rahmouni, K., et al., *Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms*. Hypertension, 2005. 45(1): p. 9-14.
194. Avogaro, A. and S.V. de Kreutzenberg, *Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity*. Clin Chim Acta, 2005. 360(1-2): p. 9-26.
195. Rask-Madsen, C. and G.L. King, *Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2007. 3(1): p. 46-56.
196. Goodfriend, T.L. and D.A. Calhoun, *Resistant hypertension, obesity, sleep apnea, and aldosterone: theory and therapy*. Hypertension, 2004. 43(3): p. 518-24.
197. Neter, J.E., et al., *Influence of weight reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Hypertension, 2003. 42(5): p. 878-84.
198. Borissoff, J.I., H.M. Spronk, and H. ten Cate, *The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis*. N Engl J Med, 2011. 364(18): p. 1746-60.

Bibliografia

199. Nguyen, X.M., et al., *Changes in inflammatory biomarkers across weight classes in a representative US population: a link between obesity and inflammation*. J Gastrointest Surg, 2009. 13(7): p. 1205-12.
200. Faber, D.R., P.G. de Groot, and F.L. Visseren, *Role of adipose tissue in haemostasis, coagulation and fibrinolysis*. Obes Rev, 2009. 10(5): p. 554-63.
201. Mertens, I. and L.F. Van Gaal, *Obesity, haemostasis and the fibrinolytic system*. Obes Rev, 2002. 3(2): p. 85-101.
202. Mosca, L., *C-reactive protein--to screen or not to screen?* N Engl J Med, 2002. 347(20): p. 1615-7.
203. Devaraj, S., D.Y. Xu, and I. Jialal, *C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis*. Circulation, 2003. 107(3): p. 398-404.
204. Reaven, G.M., *Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease*. Diabetes, 1988. 37(12): p. 1595-607.
205. DeFronzo, R.A. and E. Ferrannini, *Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease*. Diabetes Care, 1991. 14(3): p. 173-94.
206. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation*. Diabet Med, 1998. 15(7): p. 539-53.
207. Cornier, M.A., et al., *The metabolic syndrome*. Endocr Rev, 2008. 29(7): p. 777-822.
208. Eckel, R.H., S.M. Grundy, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome*. Lancet, 2005. 365(9468): p. 1415-28.
209. Lorenzo, C., et al., *Geographic variations of the International Diabetes Federation and the National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III definitions of the metabolic syndrome in nondiabetic subjects*. Diabetes Care, 2006. 29(3): p. 685-91.
210. Meshkani, R. and K. Adeli, *Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease*. Clin Biochem, 2009. 42(13-14): p. 1331-46.
211. Kotronen, A., et al., *Liver fat in the metabolic syndrome*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. 92(9): p. 3490-7.
212. Sise, A. and F.K. Friedenberg, *A comprehensive review of gastroesophageal reflux disease and obesity*. Obes Rev, 2008. 9(3): p. 194-203.
213. Friedenberg, F.K., et al., *The association between gastroesophageal reflux disease and obesity*. Am J Gastroenterol, 2008. 103(8): p. 2111-22.
214. Dittrick, G.W., et al., *Gallbladder pathology in morbid obesity*. Obes Surg, 2005. 15(2): p. 238-42.
215. Pérez de Llano, L.A., *Efectos de la obesidad sobre el aparato respiratorio*. Pneuma, 2007(7): p. 19-26.
216. Salvador, J., et al., *The obstructive sleep apnoea syndrome in obesity: a conspirator in the shadow*. Rev Med Univ Navarra, 2004. 48(2): p. 55-62.
217. Forga, L., E. Petrina, and J.J. Barberia, *[Complications of obesity]*. An Sist Sanit Navar, 2002. 25 Suppl 1: p. 117-26.
218. Anandacoomarasamy, A., et al., *The impact of obesity on the musculoskeletal system*. Int J Obes (Lond), 2008. 32(2): p. 211-22.
219. Felson, D.T., et al., *Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study*. Ann Intern Med, 1988. 109(1): p. 18-24.

Bibliografía

220. *Arthritis related statistics 2006*. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. Division of Adult and Community Health, Health Care and Aging Studies Branch, 2006.
221. Bergstrom, A., et al., *Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe*. Int J Cancer, 2001. 91(3): p. 421-30.
222. Moloney, M., *Dietary treatments of obesity*. Proc Nutr Soc, 2000. 59(4): p. 601-8.
223. Obesity, N.T.F.o.t.P.a.T.o., *Very low-calorie diets. National Task Force on the Prevention and Treatment of Obesity, National Institutes of Health*. JAMA, 1993. 270(8): p. 967-74.
224. Ahima, R.S., *Principles of obesity therapy*, in *Metabolic basis of obesity*, R.S. Ahima, Editor. 2011, Springer Science+Business Media: New York.
225. Brand-Miller, J.C., et al., *Glycemic index and obesity*. Am J Clin Nutr, 2002. 76(1): p. 281S-5S.
226. Andersen, R.E., et al., *Effects of lifestyle activity vs structured aerobic exercise in obese women: a randomized trial*. JAMA, 1999. 281(4): p. 335-40.
227. Sandvik, L., et al., *Physical fitness as a predictor of mortality among healthy, middle-aged Norwegian men*. N Engl J Med, 1993. 328(8): p. 533-7.
228. Kissane, N.A. and J.S. Pratt, *Medical and surgical treatment of obesity*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2011. 25(1): p. 11-25.
229. Gemar, E., J.A. Baena-Fustegueras, and J.M. Fort, *Programa de cirugía bariátrica de la Unidad de Cirugía Endocrina del Hopsital Universitario de la Vall d'Hebrón*.
230. Stylopoulos, N. and V. Aguirre, *Mechanisms of bariatric surgery and implications for the development of endoluminal therapies for obesity*. Gastrointest Endosc, 2009. 70(6): p. 1167-75.
231. Deitel, M., *Handbook of obesity surgery. Current concepts and therapy of morbid obesity and related disease*. 1 ed, ed. M. Deitel, et al. 2010, Toronto: FD-Communications Inc.
232. Montes de Oca, D.M., *Tratamiento quirúrgico de la obesidad mórbida mediante la técnica de derivación biliopancreática de Scopinaro.*, in *Facultad de Ciências de la salud, departamento de Ciências Médicas y Quirúrgicas*. 2010, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria: Las Palmas de Gran Canaria.
233. Bult, M.J., T. van Dalen, and A.F. Muller, *Surgical treatment of obesity*. Eur J Endocrinol, 2008. 158(2): p. 135-45.
234. Mauri, S., et al., *Complicaciones nutricionales después del tratamiento quirúrgico de la obesidad: ¿qué ocurre en el bypass gástrico?* Endocrinol Nutr, 2007. 54(4): p. 193-199.
235. Coates, P.S., et al., *Gastric bypass surgery for morbid obesity leads to an increase in bone turnover and a decrease in bone mass*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. 89(3): p. 1061-5.
236. Morales, M.J., et al., *Tratamiento quirúrgico de la obesidad: recomendaciones prácticas basadas en la evidencia*. Endocrinol Nutr, 2008. 55(Supl. 3): p. 1-24.
237. Sjostrom, L., et al., *Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects*. N Engl J Med, 2007. 357(8): p. 741-52.
238. Sjostrom, L., et al., *Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery*. N Engl J Med, 2004. 351(26): p. 2683-93.
239. Buchwald, H., et al., *Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis*. JAMA, 2004. 292(14): p. 1724-37.

Bibliografia

240. Hansen, E.N., A. Torquati, and N.N. Abumrad, *Results of bariatric surgery*. *Annu Rev Nutr*, 2006. 26: p. 481-511.
241. Dixon, J.B., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss*. *Hepatology*, 2004. 39(6): p. 1647-54.
242. Kral, J.G., et al., *Effects of surgical treatment of the metabolic syndrome on liver fibrosis and cirrhosis*. *Surgery*, 2004. 135(1): p. 48-58.
243. Verna, E.C. and P.D. Berk, *Role of fatty acids in the pathogenesis of obesity and fatty liver: impact of bariatric surgery*. *Semin Liver Dis*, 2008. 28(4): p. 407-26.
244. Fobi, M.A.L., H. Lee, and A.W. Fleming, *The surgical technique of the banded Roux-en-Y gastric bypass*. *J. Obes. and Weight Regulation*, 1989. 8(1): p. 99-102.
245. Capella, R.F., et al., *Vertical Banded Gastroplasty-Gastric Bypass: preliminary report*. *Obes Surg*, 1991. 1(4): p. 389-395.
246. Mason, E.E. and C. Ito, *Gastric bypass in obesity*. *Surg Clin North Am*, 1967. 47(6): p. 1345-51.
247. Torres, J. and C. Oca, *Gastric bypass lesser curvature with distal Roux-en-Y*. *Bariatric Surg.*, 1987. 5: p. 10-15.
248. *Metropolitan Life Insurance Company: 1983 Metropolitan height and weight tables*. *Stat. Bull.*, 1983(64): p. 2-9.
249. Himes, J.H. and C. Bouchard, *Do the new Metropolitan Life Insurance weight-height tables correctly assess body frame and body fat relationships?* *Am J Public Health*, 1985. 75(9): p. 1076-9.
250. Lohman, T.G., A.F. Roche, and R. Martorell, *Anthropometric standarization reference manual*, ed. H.K. Books. 1988, Champaign, Illinois.
251. Rodriguez-Sureda, V. and J. Peinado-Onsurbe, *A procedure for measuring triacylglyceride and cholesterol content using a small amount of tissue*. *Anal Biochem*, 2005. 343(2): p. 277-82.
252. Hara, A. and N.S. Radin, *Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent*. *Anal Biochem*, 1978. 90(1): p. 420-6.
253. Rodriguez-Sureda, V., et al., *Ultracentrifugation micromethod for preparation of small experimental animal lipoproteins*. *Anal Biochem*, 2002. 303(1): p. 73-7.
254. Van Holde, M., *Capítulo, 18. Metabolismo lipídico I: ácidos grassos, triacilglicéridos i lipoproteínas*. *Bioquímica*. 1998, Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.
255. Robards, A.W. and A.J. Wilson, *Procedures in electron microscopy*. 1993, Chichester - England: Wiley. 700.
256. Shimizu, S., et al., *Enzymatic determination of serum-free fatty acids: a colorimetric method*. *Anal Biochem*, 1980. 107(1): p. 193-8.
257. Allain, C.C., et al., *Enzymatic determination of total serum cholesterol*. *Clin Chem*, 1974. 20(4): p. 470-5.
258. Stahler, F., et al., *[A practical enzymatic cholesterol determination]*. *Med Lab (Stuttg)*, 1977. 30(2): p. 29-37.
259. Kienstsch-Engel, R.I. and E.A. Siess, *D-(β)-3-Hydroxybutyrate and acetoacetate in Methods of enzymatic analysis*. Vol. 8. 1985, Weinheim, Germany: H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, and M. Grabl editors.
260. Takayama, M., et al., *A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids*. *Clin Chim Acta*, 1977. 79(1): p. 93-8.
261. Garland, P.B. and P.J. Randle, *A rapid enzymatic assay for glycerol*. *Nature*, 1962. 196: p. 987-8.

Bibliografia

262. Ricart-Jane, D., M. Llobera, and M.D. Lopez-Tejero, *Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method*. Nitric Oxide, 2002. 6(2): p. 178-85.
263. Griess, P., *Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselky und Benedikt Ueber einige Azoverbindungen*. Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft, 1879(12): p. 426-428.
264. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. 72: p. 248-54.
265. Fossati, P. and L. Prencipe, *Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide*. Clin Chem, 1982. 28(10): p. 2077-80.
266. Declerck, P.J., et al., *Measurement of plasminogen activator inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay*. Blood, 1988. 71(1): p. 220-5.
267. Nakano, Y., et al., *Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma*. J Biochem, 1996. 120(4): p. 803-12.
268. Marcovina, S.M. and J.J. Albers, *Apolipoprotein assays: standardization and quality control*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1990. 198: p. 58-65.
269. Hosoda, H., et al., *Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 279(3): p. 909-13.
270. Ma, Z., et al., *Radioimmunoassay of leptin in human plasma*. Clin Chem, 1996. 42(6 Pt 1): p. 942-6.
271. Price, C.P., et al., *Development and validation of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay for C-reactive protein*. J Immunol Methods, 1987. 99(2): p. 205-11.
272. Shine, B., F.C. de Beer, and M.B. Pepys, *Solid phase radioimmunoassays for human C-reactive protein*. Clin Chim Acta, 1981. 117(1): p. 13-23.
273. Julve, J., *Activitats LPL i HL en hepatòcits de nadó de rata: efectes horminals*. 1994, Memòria per optar al grau de Llicenciat en Cinències Biològiques. Departament de Bioquímica. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona: Barcelona.
274. Ramirez, I., et al., *Characterization of triacylglycerol hydrolase activities in isolated myocardial cells from rat heart*. Biochem J, 1985. 232(1): p. 229-36.
275. Julve, J., et al., *Hormonal regulation of lipoprotein lipase activity from 5-day-old rat hepatocytes*. Mol Cell Endocrinol, 1996. 116(1): p. 97-104.
276. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. 162(1): p. 156-9.
277. Mueller, O., S. Lightfoot, and A. Schoreder, *RNA Integrity Number (RIN) - Standardization of RNA Quality Control*. Agilent application note, 2011. 5989-1165EN
278. D'Alessio, J.M., et al., *One-tube double-stranded cDNA synthesis using cloned M-MLV reverse transcriptase*. Focus, 1987. 9(1): p. 1-4.
279. Gubler, U. and B.J. Hoffman, *A simple and very efficient method for generating cDNA libraries*. Gene, 1983. 25(2-3): p. 263-9.
280. Higuchi, R., et al., *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences*. Biotechnology (N Y), 1992. 10(4): p. 413-7.

Bibliografía

281. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. 230(4732): p. 1350-4.
282. VanGuilder, H.D., K.E. Vrana, and W.M. Freeman, *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis*. Biotechniques, 2008. 44(5): p. 619-26.
283. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. 25(4): p. 402-8.
284. Vytasek, R., *A sensitive fluorometric assay for the determination of DNA*. Anal Biochem, 1982. 120(2): p. 243-8.
285. (SEEDO), S.E.p.e.E.d.I.O., *Consenso español 1995 para la evaluación de la obesidad y para la realización de estudios epidemiológicos*. Med. Clin., 1996. 107: p. 782-787.
286. Romero-Corral, A., et al., *Accuracy of body mass index in diagnosing obesity in the adult general population*. Int J Obes (Lond), 2008. 32(6): p. 959-66.
287. Brozek, J., et al., *Densitometric Analysis of Body Composition: Revision of Some Quantitative Assumptions*. Ann N Y Acad Sci, 1963. 110: p. 113-40.
288. Siri, E.W., *Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods.*, in *Techniques for measuring body composition*, J. Brozek and A. Henschel, Editors. 1961, National Academy of Sciences. Natural Resources Council: Washington DC. p. 223 - 244.
289. Martinez-Olmos, M.A., D. Bellido-Guerrero, and V. Blay-Cortés, *Métodos de valoración de la distribución de la grasa corporal en el paciente obeso*. Rev Esp Obes, 2004. 2(1): p. 42 - 49.
290. Oka, R., et al., *Comparison of waist circumference with body mass index for predicting abdominal adipose tissue*. Diabetes Res Clin Pract, 2009. 83(1): p. 100-5.
291. Bouza, A., et al., *Estimation of visceral and subcutaneous abdominal fat in obese patients from anthropometric regression models*. Rev Esp Obes, 2008. 6(3): p. 153 - 162.
292. Magro, D.O., et al., *Long-term weight regain after gastric bypass: a 5-year prospective study*. Obes Surg, 2008. 18(6): p. 648-51.
293. Tadross, J.A. and C.W. le Roux, *The mechanisms of weight loss after bariatric surgery*. Int J Obes (Lond), 2009. 33 Suppl 1: p. S28-32.
294. Gomez-Ambrosi, J., et al., *Influence of waist circumference on the metabolic risk associated with impaired fasting glucose: effect of weight loss after gastric bypass*. Obes Surg, 2007. 17(5): p. 585-91.
295. Madan, A., et al., *Does Laparoscopic Gastric Bypass Result in a Healthier Body Composition? An Affirmative Answer*. Obesity Surgery, 2006. 16(4): p. 465-468.
296. Sharma, A.M. and R.F. Kushner, *A proposed clinical staging system for obesity*. Int J Obes (Lond), 2009. 33(3): p. 289-95.
297. Kuk, J.L., et al., *Edmonton Obesity Staging System: association with weight history and mortality risk*. Appl Physiol Nutr Metab, 2011. 36(4): p. 570-6.
298. Padwal, R.S., et al., *Using the Edmonton obesity staging system to predict mortality in a population-representative cohort of people with overweight and obesity*. CMAJ, 2011.
299. Brolin, R.E., *Bariatric surgery and long-term control of morbid obesity*. JAMA, 2002. 288(22): p. 2793-6.

Bibliografia

300. Brolin, R.E., et al., *Malabsorptive gastric bypass in patients with superobesity*. J Gastrointest Surg, 2002. 6(2): p. 195-203; discussion 204-5.
301. Maggard, M.A., et al., *Meta-analysis: surgical treatment of obesity*. Ann Intern Med, 2005. 142(7): p. 547-59.
302. Martin-Moreno, V., J.B. Gomez-Gandoy, and M.J. Antoranz-Gonzalez, *Body fat estimated by bioelectrical impedance, skinfold thickness and anthropometric equations. A comparative analysis*. Rev Esp Salud Pública, 2001(75): p. 221 - 236.
303. Gallagher, D., et al., *Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index*. Am J Clin Nutr, 2000. 72(3): p. 694-701.
304. Lloret Linares, C., et al., *Validity of Leg-to-Leg Bioelectrical Impedance Analysis to Estimate Body Fat in Obesity*. Obesity Surgery, 2011. 21(7): p. 917-923.
305. Levitt, D.G., et al., *Comparison of DXA and water measurements of body fat following gastric bypass surgery and a physiological model of body water, fat, and muscle composition*. J Appl Physiol, 2010. 109(3): p. 786-95.
306. Lin, E., et al., *Contribution of adipose tissue to plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations during weight loss following gastric bypass surgery*. Obesity (Silver Spring), 2011. 19(3): p. 588-94.
307. Olbers, T., et al., *Body composition, dietary intake, and energy expenditure after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and laparoscopic vertical banded gastroplasty: a randomized clinical trial*. Ann Surg, 2006. 244(5): p. 715-22.
308. Chaston, T.B. and J.B. Dixon, *Factors associated with percent change in visceral versus subcutaneous abdominal fat during weight loss: findings from a systematic review*. Int J Obes (Lond), 2008. 32(4): p. 619-28.
309. Engl, J., et al., *Effect of pronounced weight loss on visceral fat, liver steatosis and adiponectin isoforms*. Eur J Clin Invest, 2008. 38(4): p. 238-44.
310. Haynes, W.G., *Role of leptin in obesity-related hypertension*. Exp Physiol, 2005. 90(5): p. 683-8.
311. Bloomgarden, Z.T., *Gut and adipocyte peptides*. Diabetes Care, 2006. 29(2): p. 450-6.
312. van Dielen, F.M., et al., *Leptin and soluble leptin receptor levels in obese and weight-losing individuals*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. 87(4): p. 1708-16.
313. Havel, P.J., *Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis*. Exp Biol Med (Maywood), 2001. 226(11): p. 963-77.
314. Morton, G.J. and M.W. Schwartz, *Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism*. Physiol Rev, 2011. 91(2): p. 389-411.
315. Ceddia, R.B., et al., *Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance*. FASEB J, 2002. 16(10): p. 1163-76.
316. Neary, M.T. and R.L. Batterham, *Gut hormones: implications for the treatment of obesity*. Pharmacol Ther, 2009. 124(1): p. 44-56.
317. Fruhbeck, G., et al., *Fasting plasma ghrelin concentrations 6 months after gastric bypass are not determined by weight loss or changes in insulinemia*. Obes Surg, 2004. 14(9): p. 1208-15.
318. Gnanapavan, S., et al., *The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. 87(6): p. 2988.

Bibliografia

319. Varela, L., et al., *Ghrelin and lipid metabolism: key partners in energy balance*. J Mol Endocrinol, 2011. 46(2): p. R43-63.
320. Broglio, F., et al., *Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. 86(10): p. 5083-6.
321. Lee, H.M., et al., *Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations*. Endocrinology, 2002. 143(1): p. 185-90.
322. Salehi, A., et al., *Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice*. Regul Pept, 2004. 118(3): p. 143-50.
323. Barazzoni, R., et al., *Relationships between desacylated and acylated ghrelin and insulin sensitivity in the metabolic syndrome*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. 92(10): p. 3935-40.
324. Tong, J., et al., *Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans*. Diabetes, 2010. 59(9): p. 2145-51.
325. Barazzoni, R., et al., *Higher total ghrelin levels are associated with higher insulin-mediated glucose disposal in non-diabetic maintenance hemodialysis patients*. Clin Nutr, 2008. 27(1): p. 142-9.
326. Pacifico, L., et al., *Acylated and nonacylated ghrelin levels and their associations with insulin resistance in obese and normal weight children with metabolic syndrome*. Eur J Endocrinol, 2009. 161(6): p. 861-70.
327. Degawa-Yamauchi, M., et al., *Regulation of adiponectin expression in human adipocytes: effects of adiposity, glucocorticoids, and tumor necrosis factor alpha*. Obes Res, 2005. 13(4): p. 662-9.
328. de Luis, D.A., et al., *The Ratio of Adiponectin to HOMA as an Index of Metabolic Syndrome in Obese Women*. Ann Nutr Metab, 2011. 58(4): p. 301-306.
329. Navab, M., N. Gharavi, and A.D. Watson, *Inflammation and metabolic disorders*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2008. 11(4): p. 459-64.
330. Rubino, F., et al., *The early effect of the Roux-en-Y gastric bypass on hormones involved in body weight regulation and glucose metabolism*. Ann Surg, 2004. 240(2): p. 236-42.
331. Kelley, D.E., et al., *Relative effects of calorie restriction and weight loss in noninsulin-dependent diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. 77(5): p. 1287-93.
332. Rubino, F. and J. Marescaux, *Effect of duodenal-jejunal exclusion in a non-obese animal model of type 2 diabetes: a new perspective for an old disease*. Ann Surg, 2004. 239(1): p. 1-11.
333. Geloneze, B., et al., *Surgery for nonobese type 2 diabetic patients: an interventional study with duodenal-jejunal exclusion*. Obes Surg, 2009. 19(8): p. 1077-83.
334. Kindel, T.L., et al., *Bypassing the duodenum does not improve insulin resistance associated with diet-induced obesity in rodents*. Obesity (Silver Spring), 2010. 19(2): p. 380-7.
335. Aguirre, V., et al., *An endoluminal sleeve induces substantial weight loss and normalizes glucose homeostasis in rats with diet-induced obesity*. Obesity (Silver Spring), 2008. 16(12): p. 2585-92.

Bibliografia

336. Rodriguez-Grunert, L., et al., *First human experience with endoscopically delivered and retrieved duodenal-jejunal bypass sleeve*. *Surg Obes Relat Dis*, 2008. 4(1): p. 55-9.
337. Cummings, D.E., et al., *Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery*. *N Engl J Med*, 2002. 346(21): p. 1623-30.
338. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice*. *Diabetes*, 2008. 57(6): p. 1470-81.
339. Backhed, F., et al., *Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(3): p. 979-84.
340. Nguyen, N.T., et al., *Resolution of hyperlipidemia after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass*. *J Am Coll Surg*, 2006. 203(1): p. 24-9.
341. Yoshida, A., et al., *Usefulness of serum total cholesterol/triglyceride ratio for predicting the presence of small, dense LDL*. *J Atheroscler Thromb*, 2004. 11(4): p. 215-9.
342. Hoenig, M.R., *Implications of the obesity epidemic for lipid-lowering therapy: non-HDL cholesterol should replace LDL cholesterol as the primary therapeutic target*. *Vasc Health Risk Manag*, 2008. 4(1): p. 143-56.
343. Millan, J., et al., *Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention*. *Vasc Health Risk Manag*, 2009. 5: p. 757-65.
344. *Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report*. *Circulation*, 2002. 106(25): p. 3143-421.
345. Gordon, T., et al., *High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study*. *Am J Med*, 1977. 62(5): p. 707-14.
346. Traves, C., et al., *Clinical approach to intestinal maturation in neonates prenatally exposed to alcohol*. *Alcohol Alcohol*, 2007. 42(5): p. 407-12.
347. Watanabe, H., et al., *Preheparin serum lipoprotein lipase mass level: the effects of age, gender, and types of hyperlipidemias*. *Atherosclerosis*, 1999. 145(1): p. 45-50.
348. Watson, T.D., et al., *Measurement and physiological significance of lipoprotein and hepatic lipase activities in preheparin plasma*. *Clin Chem*, 1995. 41(3): p. 405-12.
349. Tornvall, P., et al., *Lipoprotein lipase mass and activity in plasma and their increase after heparin are separate parameters with different relations to plasma lipoproteins*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. 15(8): p. 1086-93.
350. Bamba, V. and D.J. Rader, *Obesity and atherogenic dyslipidemia*. *Gastroenterology*, 2007. 132(6): p. 2181-90.
351. Brodin, R.E., et al., *Lipid risk profile and weight stability after gastric restrictive operations for morbid obesity*. *J Gastrointest Surg*, 2000. 4(5): p. 464-9.
352. Cowan, G. and C.K. Buffington, *Significant changes in blood pressure, glucose, and lipids with gastric bypass surgery*. *World J. Surg.*, 1998(22): p. 987-992.
353. Zambon, S., et al., *Bariatric surgery improves atherogenic LDL profile by triglyceride reduction*. *Obes Surg*, 2009. 19(2): p. 190-5.
354. Mooradian, A.D., et al., *Obesity-related changes in high-density lipoprotein metabolism*. *Obesity (Silver Spring)*, 2008. 16(6): p. 1152-60.

Bibliografia

355. Sherman, J.R. and R.B. Weinberg, *Serum apolipoprotein A-IV and lipoprotein cholesterol in patients undergoing total parenteral nutrition*. Gastroenterology, 1988. 95(2): p. 394-401.
356. Schaefer, E.J., et al., *Plasma apolipoprotein A-I absence associated with a marked reduction of high density lipoproteins and premature coronary artery disease*. Arteriosclerosis, 1982. 2(1): p. 16-26.
357. Weinberg, R.B., C. Dantzker, and C.S. Patton, *Sensitivity of serum apolipoprotein A-IV levels to changes in dietary fat content*. Gastroenterology, 1990. 98(1): p. 17-24.
358. Traves, C., et al., *Concomitant apolipoprotein A-IV and citrulline plasma changes during short-term parenteral nutrition in surgical patients*. European e-journal of clinical nutrition and metabolism, 2010(5): p. e219-224.
359. Heath, M.L., et al., *Abdominal adiposity and liver fat content 3 and 12 months after gastric banding surgery*. Metabolism, 2009. 58(6): p. 753-8.
360. Boden, G. and G.I. Shulman, *Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction*. Eur J Clin Invest, 2002. 32 Suppl 3: p. 14-23.
361. Opie, L.H. and P.G. Walfish, *Plasma free fatty acid concentrations in obesity*. N Engl J Med, 1963. 268: p. 757-60.
362. Karpe, F., J.R. Dickmann, and K.N. Frayn, *Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation*. Diabetes, 2011. 60(10): p. 2441-9.
363. Krebs, H.A. and R. Hems, *Fatty acid metabolism in the perfused rat liver*. Biochem J, 1970. 119(3): p. 525-33.
364. Helge, J.W., *Long-term fat diet adaptation effects on performance, training capacity, and fat utilization*. Med Sci Sports Exerc, 2002. 34(9): p. 1499-504.
365. Phinney, S.D., *Ketogenic diets and physical performance*. Nutr Metab (Lond), 2004. 1(1): p. 2.
366. Saiki, A., et al., *Preheparin serum lipoprotein lipase mass might be a biomarker of metabolic syndrome*. Diabetes Res Clin Pract, 2007. 76(1): p. 93-101.
367. Miyashita, Y., et al., *Low lipoprotein lipase mass in preheparin serum of type 2 diabetes mellitus patients and its recovery with insulin therapy*. Diabetes Res Clin Pract, 2002. 56(3): p. 181-7.
368. Despres, J.P., et al., *Role of hepatic-triglyceride lipase activity in the association between intra-abdominal fat and plasma HDL cholesterol in obese women*. Arteriosclerosis, 1989. 9(4): p. 485-92.
369. Glaser, D.S., T.J. Yost, and R.H. Eckel, *Preheparin lipoprotein lipolytic activities: relationship to plasma lipoproteins and postheparin lipolytic activities*. J Lipid Res, 1992. 33(2): p. 209-14.
370. Ong, J.M. and P.A. Kern, *Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue*. J Clin Invest, 1989. 84(1): p. 305-11.
371. Farnier, C., et al., *Adipocyte functions are modulated by cell size change: potential involvement of an integrin/ERK signalling pathway*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003. 27(10): p. 1178-86.
372. Thomou, T., T. Tchkonja, and J.L. Kirkland, *Cellular and molecular basis of functional differences among fat depots*, in *Adipose tissue in health and disease*, T. Leff and J.G. Granneman, Editors. 2010, Wiley-Blackwell: Weinheim.
373. Kolehmainen, M., et al., *Hormone sensitive lipase expression and adipose tissue metabolism show gender difference in obese subjects after weight loss*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2002. 26(1): p. 6-16.

Bibliografia

374. Lofgren, P., et al., *Major gender differences in the lipolytic capacity of abdominal subcutaneous fat cells in obesity observed before and after long-term weight reduction*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. 87(2): p. 764-71.
375. de Heredia, F.P., S. Gomez-Martinez, and A. Marcos, *Obesity, inflammation and the immune system*. Proc Nutr Soc. 71(2): p. 332-8.
376. Marin, P., et al., *The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men*. Metabolism, 1992. 41(11): p. 1242-8.
377. Fried, S.K. and J.G. Kral, *Sex differences in regional distribution of fat cell size and lipoprotein lipase activity in morbidly obese patients*. Int J Obes, 1987. 11(2): p. 129-40.
378. Bullo, M., et al., *TNFalpha expression of subcutaneous adipose tissue in obese and morbid obese females: relationship to adipocyte LPL activity and leptin synthesis*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2002. 26(5): p. 652-8.
379. Robciuc, M.R., et al., *Quantitation of serum angiopoietin-like proteins 3 and 4 in a Finnish population sample*. J Lipid Res, 2010. 51(4): p. 824-31.
380. Dahlman, I. and P. Arner, *Obesity and polymorphisms in genes regulating human adipose tissue*. Int J Obes (Lond), 2007. 31(11): p. 1629-41.
381. Koike, T., et al., *Overexpression of lipoprotein lipase in transgenic Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits improves hyperlipidemia and obesity*. J Biol Chem, 2004. 279(9): p. 7521-9.
382. Clemente-Postigo, M., et al., *Adipose tissue gene expression of factors related to lipid processing in obesity*. PLoS One, 2011. 6(9): p. e24783.
383. Li, Y., et al., *Visceral fat: higher responsiveness of fat mass and gene expression to calorie restriction than subcutaneous fat*. Exp Biol Med (Maywood), 2003. 228(10): p. 1118-23.
384. Langin, D., et al., *Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity*. Diabetes, 2005. 54(11): p. 3190-7.
385. Mottagui-Tabar, S., et al., *Evidence for an important role of perilipin in the regulation of human adipocyte lipolysis*. Diabetologia, 2003. 46(6): p. 789-97.
386. Bucci, M., et al., *Human obesity is characterized by defective fat storage and enhanced muscle fatty acid oxidation, and trimetazidine gradually counteracts these abnormalities*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. 301(1): p. E105-12.
387. Thyfault, J.P., et al., *Impaired plasma fatty acid oxidation in extremely obese women*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. 287(6): p. E1076-81.
388. Sorbi, D., J. Boynton, and K.D. Lindor, *The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease*. Am J Gastroenterol, 1999. 94(4): p. 1018-22.
389. Vilaro, S., et al., *Synthesis of lipoprotein lipase in the liver of newborn rats and localization of the enzyme by immunofluorescence*. Biochem J, 1988. 249(2): p. 549-56.
390. Sabugal, R., et al., *Hepatic regeneration induces changes in lipoprotein lipase activity in several tissues and its re-expression in the liver*. Biochem J, 1996. 318 (Pt 2): p. 597-602.
391. Taylor, J., I.M. Leitman, and M. Horowitz, *Is routine cholecystectomy necessary at the time of Roux-en-Y gastric bypass?* Obes Surg, 2006. 16(6): p. 759-61.
392. Almond, H.R., et al., *Bile acid pools, kinetics and biliary lipid composition before and after cholecystectomy*. N Engl J Med, 1973. 289(23): p. 1213-6.

Bibliografia

393. Kashyap, S.R., et al., *Triglyceride levels and not adipokine concentrations are closely related to severity of nonalcoholic fatty liver disease in an obesity surgery cohort*. Obesity (Silver Spring), 2009. 17(9): p. 1696-701.
394. Gholam, P.M., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease in severely obese subjects*. Am J Gastroenterol, 2007. 102(2): p. 399-408.
395. Martin, N.C., et al., *Functional analysis of mouse hepatocytes differing in DNA content: volume, receptor expression, and effect of IFN γ* . J Cell Physiol, 2002. 191(2): p. 138-44.
396. Donnelly, K.L., et al., *Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. J Clin Invest, 2005. 115(5): p. 1343-51.
397. Degrace, P., et al., *Association of liver steatosis with lipid oversecretion and hypotriglyceridaemia in C57BL/6j mice fed trans-10,cis-12-linoleic acid*. FEBS Lett, 2003. 546(2-3): p. 335-9.
398. Berge, R.K., et al., *The metabolic syndrome and the hepatic fatty acid drainage hypothesis*. Biochimie, 2005. 87(1): p. 15-20.
399. Kim, J.K., et al., *Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(13): p. 7522-7.
400. Kohjima, M., et al., *Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease*. Int J Mol Med, 2007. 20(3): p. 351-8.
401. Charlton, M., et al., *Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2002. 35(4): p. 898-904.
402. Abiru, S., et al., *Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis*. Liver Int, 2006. 26(1): p. 39-45.
403. Rabelo, F., et al., *Pro- and anti-inflammatory cytokines in steatosis and steatohepatitis*. Obes Surg, 2010. 20(7): p. 906-12.
404. Reid, B.N., et al., *Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis*. J Biol Chem, 2008. 283(19): p. 13087-99.
405. Bullo, M., et al., *Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression*. Obes Res, 2003. 11(4): p. 525-31.
406. Lin, L.Y., et al., *Nitric oxide production is paradoxically decreased after weight reduction surgery in morbid obesity patients*. Atherosclerosis, 2007. 190(2): p. 436-42.
407. Jobgen, W.S., et al., *Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates*. J Nutr Biochem, 2006. 17(9): p. 571-88.
408. Puglisi, M.J. and M.L. Fernandez, *Modulation of C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and adiponectin by diet, exercise, and weight loss*. J Nutr, 2008. 138(12): p. 2293-6.
409. Ridker, P.M., *Beyond cholesterol: C-reactive protein and homocysteine as predictors of cardiovascular risk*, in *Handbook of lipoprotein testing*, N. Rifari, Editor. 2000, AACCC Press: Washington.
410. Tzotzas, T., P. Evangelou, and D.N. Kiortsis, *Obesity, weight loss and conditional cardiovascular risk factors*. Obes Rev, 2010. 12(5): p. e282-9.
411. Primrose, J.N., et al., *Reduction in factor VII, fibrinogen and plasminogen activator inhibitor-1 activity after surgical treatment of morbid obesity*. Thromb Haemost, 1992. 68(4): p. 396-9.

Bibliografia

412. Alessi, M.C., et al., *Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: possible link between visceral fat accumulation and vascular disease*. Diabetes, 1997. 46(5): p. 860-7.
413. Rega, G., et al., *Inflammatory cytokines interleukin-6 and oncostatin m induce plasminogen activator inhibitor-1 in human adipose tissue*. Circulation, 2005. 111(15): p. 1938-45.
414. Lindeman, J.H., et al., *Human visceral adipose tissue and the plasminogen activator inhibitor type I*. Int J Obes (Lond), 2007. 31(11): p. 1671-9.
415. Xu, X., et al., *Molecular mechanisms of ghrelin-mediated endothelial nitric oxide synthase activation*. Endocrinology, 2008. 149(8): p. 4183-92.
416. Beltowski, J., G. Wojcicka, and A. Jamroz, *Stimulatory effect of leptin on nitric oxide production is impaired in dietary-induced obesity*. Obes Res, 2003. 11(12): p. 1571-80.
417. Chen, S.B., et al., *Serum C-reactive protein and white blood cell count in morbidly obese surgical patients*. Obes Surg, 2009. 19(4): p. 461-6.
418. López-Jaramillo, P., L.P. Pradilla, and Y. Bracho, *The role of adipocytes in metabolic syndrome inflammation*. Acta Med Colomb, 2005. 30(3).
419. Stewart, P.M., et al., *Cortisol metabolism in human obesity: impaired cortisone->cortisol conversion in subjects with central adiposity*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. 84(3): p. 1022-7.
420. Strain, G.W., et al., *Sex difference in the influence of obesity on the 24 hr mean plasma concentration of cortisol*. Metabolism, 1982. 31(3): p. 209-12.
421. Pasquali, R., et al., *The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in obesity and the metabolic syndrome*. Ann N Y Acad Sci, 2006. 1083: p. 111-28.
422. Black, P.H., *The inflammatory consequences of psychologic stress: relationship to insulin resistance, obesity, atherosclerosis and diabetes mellitus, type II*. Med Hypotheses, 2006. 67(4): p. 879-91.
423. Guldstrand, M., et al., *Alteration of the counterregulatory responses to insulin-induced hypoglycemia and of cognitive function after massive weight reduction in severely obese subjects*. Metabolism, 2003. 52(7): p. 900-7.
424. Swarbrick, M.M., et al., *Longitudinal changes in pancreatic and adipocyte hormones following Roux-en-Y gastric bypass surgery*. Diabetologia, 2008. 51(10): p. 1901-11.
425. Poulain-Godefroy, O., et al., *Inflammation is associated with a decrease of lipogenic factors in omental fat in women*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. 295(1): p. R1-7.
426. Engstrom, G., et al., *Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with future weight gain*. Diabetes, 2003. 52(8): p. 2097-101.
427. Coulter, W.H., *High speed automatic bloodcell counter and cell size analyser*. Natl. Elec. Conf. Proc., 1956. 12: p. 1034-1042.
428. Clauss, A., *Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen*. Acta Haematol, 1957. 17(4): p. 237-46.
429. Dumas, B.T., W.A. Watson, and H.G. Biggs, *Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green*. Clin Chim Acta, 1971. 31(1): p. 87-96.
430. Friedewald, W.T., R.I. Levy, and D.S. Fredrickson, *Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge*. Clin Chem, 1972. 18(6): p. 499-502.

Bibliografia

431. Havel, R.J., H.A. Eder, and J.H. Bragdon, *The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum*. J Clin Invest, 1955. 34(9): p. 1345-53.
432. Lindstrom, L., L. Meurling, and T. Lovgren, *The measurement of serum cortisol by a solid-phase chemiluminescence immunoassay*. J Steroid Biochem, 1982. 16(4): p. 577-80.
433. Kay, H.D., *Plasma phosphatase: I. Method of determination. Some properties of the enzyme*. J. Biol. Chem., 1930. 89(1): p. 235-247.
434. Bessey, O.A., S.H. Lowry, and M.H. Brock, *A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic milliliters of serum*, . J. Biol. Chem., 1946. 164(1): p. 321-330.
435. Barthelmai, W. and R. Czok, *[Enzymatic determinations of glucose in the blood, cerebrospinal fluid and urine.]*. Klin Wochenschr, 1962. 40: p. 585-9.
436. Vogeser, M., et al., *Evaluation of a luminescent enhanced immunoenzymometric assay for plasma corticotropin (ACTH) using the IMMULITE1 system*. Clin. Lab., 1999(45): p. 37-45.
437. Henley, K.S. and H.M. Pollard, *A new method for the determination of glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase in plasma*. J Lab Clin Med, 1955. 46(5): p. 785-9.
438. Gella, F.J., et al., *A simple procedure for the routine determination of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase with pyridoxal phosphate*. Clin Chim Acta, 1985. 153(3): p. 241-7.
439. Karmen, A., F. Wroblewski, and J.S. Ladue, *Transaminase activity in human blood*. J Clin Invest, 1955. 34(1): p. 126-31.
440. Persijn, J.P. and W. van der Slik, *A new method for the determination of gamma-glutamyltransferase in serum*. J Clin Chem Clin Biochem, 1976. 14(9): p. 421-7.

7. ANNEXOS

Annex I: Determinacions realitzades de rutina a Vall d'Hebron

1. Analítiques d'hematologia

1.1 Comptatge cel·lular

Per a la determinació dels comptatges cel·lulars s'ha utilitzat el mètode basat en el Principi de Coulter [427]. Les cèl·lules es compten i dimensionen mitjançant la mesura del canvi en la resistència elèctrica que té lloc quan les cèl·lules suspeses en un líquid conductor (plasma amb anticoagulant) passen a través d'una obertura en la que s'aplica un corrent elèctric. El recompte de cèl·lules es realitza en una cambra amb 3 obertures a través de les quals s'aplica un corrent continu entre dos elèctrodes. El pas de les cèl·lules actua com a aïllant, de manera que es produeix un augment de la resistència (disminució del voltatge) entre els dos elèctrodes que provoca un impuls elèctric mesurable, el valor del qual és proporcional a la mida de la cèl·lula que l'ha provocat. Els comptatges es van realitzar a l'analitzador hematològic Beckman Coulter LH 700 series de l'Hospital (Beckman Coulter; Califòrnia, USA).

1.1.1 Sèrie vermella

- **Hematies o glòbuls vermells**

Tots els impulsos mesurats entre 36 i 360 fL es consideren glòbuls vermells. Un cop comptats els glòbuls vermells d'una mostra, es pot obtenir el volum corpuscular mitjà (VCM), que es correspon a la mitjana aritmètica dels volums dels hematies enregistrats.

Un cop s'ha obtingut el comptatge dels glòbuls vermells es pot calcular l'hematòcrit, ja que és el percentatge del volum total de la sang ocupat pels glòbuls vermells.

Els **valors de referència** de l'Hospital per a aquests paràmetres són de 3.9×10^{12} a 4.9×10^{12} hematies/L, de 82.1 a 96.2 fL pel VCM i de 35.9 a 44.1% d'hematòcrit.

- **Hemoglobina**

Per a la determinació de l'hemoglobina present a la mostra s'ha utilitzat un mètode colorimètric. El reactiu que s'utilitza per lisar els eritròcits reacciona amb l'hemoglobina present a la mostra formant un compost, la cianometahemoglobina, que té un màxim d'absorbància a 525 nm. L'absorbància a aquesta longitud d'ona és proporcional a la concentració d'hemoglobina de la mostra.

Els **valors de referència** de l'Hospital per a aquest paràmetre són de 11.8 a 14.7 g/dL.

1.1.2 Sèrie blanca

Tots els impulsos mesurats per sobre de 35 fL, després d'haver afegit a la mostra un reactiu per lisar els glòbuls vermells, es consideren leucòcits. Per poder classificar els

leucòcits en els seus cinc tipus (**neutròfils**, **limfòcits**, **monòcits**, **eosinòfils** i **basòfils**), és a dir, per poder calcular el diferencial leucocitari, l'aparell utilitza la tecnologia del sistema de colat en buit. Aquesta tecnologia implica la fusió de la informació recollida a partir de tres components: el químic, l'electrònic i el matemàtic.

Component químic: utilitza el reactiu *Erithrolyse*, una solució hipotònica àcida que trenca els eritròcits i tot seguit s'afegeix un segon reactiu, el *Stabilysse*, una solució hipertònica alcalina que torna el medi al seu estat isotònic i neutralitza el pH, de manera que els limfòcits poden recuperar la seva mida i morfologia normal.

Component electrònic: obté les dades numèriques de tres característiques morfomètriques dels leucòcits: la impedància, la conductivitat i la dispersió làser. Es processen 8192 cèl·lules.

- *Impedància*: mesura la mida de les cèl·lules segons el Principi de Coulter. Les cèl·lules amb impulsos mesurats entre 35 i 90 fL es consideren limfòcits, les que tenen impulsos entre 90 i 175 fL són monòcits, eosinòfils o basòfils i, finalment, les que tenen impulsos per sobre dels 175 fL són neutròfils.
- *Conductivitat*: la quantitat de corrent que travessa una cèl·lula quan s'aplica un corrent de 23 MHz permet determinar la complexitat interna de la cèl·lula i la relació nucli/citoplasma.
- *Dispersió làser*: la mesura de la dispersió d'un feix de llum a 655 nm, emesa per un làser d'heli-neó, permet determinar la granulació de l'interior de la cèl·lula.

Component matemàtic: l'aparell utilitza la metodologia d'anàlisi de contorns de les poblacions Accugate (Beckman Coulter; Califòrnia, USA).

Els resultats es poden donar en número de cèl·lules per litre de plasma o, en el cas dels diferents subtipus cel·lulars, en percentatge respecte al número total de leucòcits.

Els **valors de referència** de l'Hospital per a aquests paràmetres són de 4.1 a 9.9×10^9 leucòcits/L i dels diferents subtipus cel·lulars són els que es presenten a la Taula 16.

| Subtipus cel·lular | $\times 10^9$ cells/L | % |
|--------------------|-----------------------|----------|
| Neutròfils | 1.4 a 6.5 | 40 a 80 |
| Limfòcits | 1.2 a 3.4 | 20 a 50 |
| Monòcits | 0.2 a 1.6 | 2.8 a 16 |
| Eosinòfils | < 0.7 | 0.5 a 11 |
| Basòfils | < 0.2 | < 2.1 |

Taula 16. Valors de referència de l'Hospital pels diferents tipus de leucòcits.

1.1.3 Reticulòcits

Per a la determinació del número de reticulòcits també s'utilitza el sistema de colat en buit, però amb les següents peculiaritats:

Component químic: s'utilitza el blau de metilè per tenyir els ribosomes i una solució de rentat que fa que els glòbuls vermells agafin forma d'esfera.

D'aquesta manera no interfereixen en les mesures de dispersió del làser.

Component electrònic: obté les dades morfomètriques de 32225 cèl·lules.

Component matemàtic: també utilitza l'Accugate.

Els resultats es poden donar en número de cèl·lules/L o bé en número de reticulòcits per cada 1000 hematies.

Els **valors de referència** de l'Hospital per aquest paràmetre són de 25 a 75×10^9 reticulòcits/L, o bé de 5 a 30 reticulòcits/1000 hematies.

1.1.4 Plaquetes

Tots els impulsos mesurats entre 2 i 20 fL es consideren plaquetes. Un cop comptades les plaquetes, es pot obtenir el volum plaquetari mitjà (VPM) fent el producte del número de plaquetes comptabilitzat pel valor del volum mitjà enregistrat i tot dividit entre el número total de plaquetes.

Els **valors de referència** de l'Hospital per a aquests paràmetres són de 150×10^9 a 386×10^9 plaquetes/L i de 7.4 a 10.4 fL pel VPM.

1.2 Hemostàsia

1.2.1 Fibrinogen

Per a la determinació de la concentració de fibrinogen en plasma s'ha utilitzat el mètode descrit per Clauss [428]. El mètode mesura el temps de transformació del fibrinogen del plasma a fibrina quan s'incuba el plasma, diluït 1:9 amb tampó citrat d'Owren i en excés de trombina. La concentració de fibrinogen és inversament proporcional al temps de coagulació mesurat per mètodes mecànics per l'autoanalitzador Amelung CS-400 (Grifols; Barcelona, Espanya).

Els **valors de referència** de l'Hospital per a aquest paràmetre són de 230 a 320 mg/dL.

2 Analítiques bioquímica

2.1 Albúmina

Per a la determinació de la concentració d'albúmina en plasma s'ha utilitzat un mètode colorimètric basat en el descrit per Doumas i col·laboradors [429]. L'albúmina present a la mostra s'uneix al verd de bromocresol en medi àcid. El complex que es forma té un màxim d'absorbància a 630 nm que és mesurat a l'autoanalitzador AU 5400

(Olympus Life and Material Science Europa GmbH; Clare, Irlanda). La concentració d'aquest complex és directament proporcional a l'albumina present a la mostra.

Els **valors de referència** de l'Hospital per a aquest paràmetre són de 3.4 a 4.8 g/dL.

2.2 Colesterol d'HDL

Per a la determinació de la concentració de l'HDLc s'ha utilitzat un mètode colorimètric enzimàtic. L'apoB present als quilomicrons, a les VLDL i a les LDL és reconeguda per l'anticòs anti-apoB del primer reactiu del kit, d'aquesta manera els complexos antigen-anticòs que es formen aconseguen bloquejar les reaccions enzimàtiques que tenen lloc en les lipoproteïnes quan s'afegeix el segon reactiu. Amb l'addició del segon reactiu, el colesterol de les HDL, per acció de la colesterol esterasa, es transforma en NEFA i FC, el qual passa a colesterol-3-ona per acció de la colesterol oxidasa, reacció en la que té lloc la formació de peròxid d'hidrogen. Aquest peròxid, gràcies a l'acció de la peroxidasa, reacciona amb un cromogen (el F-DAOS) que genera un producte que pot ser detectat per l'autoanalitzador AU 5400 (Olympus Life and Material Science Europa GmbH; Clare, Irlanda). La concentració d'aquest producte és proporcional al contingut d'HDLc de la mostra.

Els **valors de referència** de l'Hospital per a aquest paràmetre són superiors a 40 mg/dL.

2.3 Colesterol d'LDL

Per a la determinació de l'LDLc s'ha utilitzat la fórmula descrita per Friedewald i col·laboradors [430]. Aquesta fórmula utilitza les concentracions de CHOL_T (mg/dL), HDLc (mg/dL) i TAG (mg/dL).

$$\frac{mg\ LDLc}{dL} = C_T - HDLc - (TAG/5)$$

A l'Hospital, aquesta fórmula es fa servir en els casos en que la concentració de TAG a plasma és inferior a 250 mg/dL. Quan la concentració de TAG és superior a 250 mg/dL s'utilitza el procés de separació seqüencial de lipoproteïnes per ultracentrifugació descrit per Havel i col·laboradors [431] amb el que se separen les diferents lipoproteïnes del plasma augmentant amb NaCl la densitat del solvent en la que es troba diluït el plasma.

Els **valors de referència** de l'Hospital per a aquest paràmetre són de menys de 130 mg/dL.

2.4 Cortisol

Per a la determinació del cortisol en plasma s'ha utilitzat l'assaig immunoenzimàtic competitiu quimioluminiscent descrit per Lindström i col·laboradors [432]. El cortisol

present a la mostra de plasma competeix amb el cortisol marcat amb fosfatasa alcalina del kit per la unió als anticossos de la fase sòlida. La fosfatasa alcalina del cortisol que s'hagi unit a la fase sòlida reaccionarà amb un substrat quimioluminiscent i la luminescència serà detectada amb l'autoanalitzador Immulite 2500 (Siemens Medical Solutions Diagnostics; Los Angeles, EUA).

Els **valors de referència** de l'Hospital per a aquest paràmetre són de 5 a 25 µg/dL. Per fer la conversió a nM s'ha de multiplicar per 27.59 la concentració en pg/mL.

2.5 Fosfatasa alcalina

Per a la determinació de la fosfatasa alcalina s'ha utilitzat el mètode descrit per Kay [433] amb les modificacions de Bessey i col·laboradors [434]. La fosfatasa alcalina present a la mostra hidrolitza el p-nitrofenil fosfat en presència d'ions Zinc, Magnesi i 2-amino-2-metil-1-propanol i dóna p-nitrofenol, un cromògen amb un màxim d'absorbància a 415 nm, que es va detectar amb l'autoanalitzador AU5400 (Olympus Life and Material Science Europa GmbH; Clare, Irlanda). La concentració de fosfatasa alcalina és proporcional a la formació del p-nitrofenol.

Els **valors de referència** de l'Hospital per a aquest paràmetre són entre 20 i 90 UI/L.

2.6 Glucosa

Per a la determinació de la concentració de glucosa en plasma s'ha utilitzat el mètode descrit per Barthelmai i Czok [435]. La glucosa present a la mostra es fosforil·la en presència d'ATP i passa a glucosa-6-fosfat per acció de l'hexoquinasa. La glucosa-6 fosfat, per acció de la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa, s'oxida i es converteix en gluconat-6-fosfat alhora que es produeix la reducció de NAD^+ a NADH^+ , fet que es pot mesurar en un autoanalitzador AU5400 (Olympus Life and Material Science Europa GmbH; Clare, Irlanda) a 340 nm. La concentració de glucosa és proporcional a l'augment d'absorbància a 340 nm.

Els **valors de referència** de l'Hospital per a aquest paràmetre són de 71 a 110 mg/dL. Per fer la conversió a mM s'ha de dividir entre 18 la concentració en mg/dL.

2.7 Hormona adrenocorticotropa

Per a la determinació de l'hormona adrenocorticotropa (ACTH) s'ha utilitzat l'assaig immunoenzimàtic quimioluminiscent descrit per Vogeser i col·laboradors [436]. L'ACTH present a la mostra de plasma s'uneix en primer lloc a un anticòs policlonal de captura, unit a una fase sòlida. En un segon pas, s'afegeix un segon anticòs policlonal anti-ACTH marcat amb fosfatasa alcalina. Aquest enzim reaccionarà amb un substrat quimioluminiscent i la luminescència serà detectada amb l'autoanalitzador Immulite 2500 (Siemens Medical Solutions Diagnostics; Los Angeles, EUA).

Els **valors de referència** de l'Hospital per a aquest paràmetre són de 7 a 51 pg/mL. Per fer la conversió a pM s'ha de multiplicar per 0.222 la concentració en pg/mL.

2.8 Insulina

Per a la determinació d'insulina en plasma s'ha utilitzat un assaig immunoenzimàtic quimioluminiscent. El principi del mètode és el mateix que s'ha descrit per l'ACTH. La luminescència es va detectar amb l'autoanalitzador Immulite 2500 (Siemens Medical Solutions Diagnostics; Los Angeles, EUA).

Els **valors de referència** de l'Hospital per a aquest paràmetre són de 6 a 27 mUI/L. Per fer la conversió a pM s'ha de multiplicar per 7.217 la concentració en μ UI/mL.

2.9 Transaminases

2.9.1 Alanina aminotransferasa

Per a la determinació de l'ALT, també coneguda com a glutamat-piruvat transaminasa (GPT), s'ha utilitzat un mètode enzimàtic basat en el descrit per Henley i Pollard [437] amb les modificacions de Gella i col·laboradors [438]. L'ALT present a la mostra catalitza la transferència del grup amino des de l'alanina fins al 2-oxoglutarat, amb la formació de piruvat i glutamat. En el següent pas, el piruvat es transforma en lactat gràcies a la lactat deshidrogenasa. Aquesta darrera reacció porta acoblada l'oxidació del NADH, que té absorbància a 340 nm, a NAD^+ . La disminució d'absorbància a 340 nm, com a conseqüència de la formació d' NAD^+ , es va detectar en l'autoanalitzador AU5400 (Olympus Life and Material Science Europa GmbH; Clare, Irlanda). La disminució d'absorbància a 340 nm és inversament proporcional al contingut d'ALT de la mostra.

Els valors de referència de l'Hospital per a aquest paràmetre són de 5 a 40 UI/L.

2.9.2 Aspartat aminotransferasa

Per a la determinació de l'AST, també coneguda com a glutamat-oxalacetat transaminasa (GOT), s'ha utilitzat un mètode enzimàtic basat en el descrit per Karmen i col·laboradors [439] amb les modificacions de Gella i col·laboradors [438]. L'AST present a la mostra catalitza la transferència del grup amino de l'aspartat al 2-oxoglutarat, amb la formació d'oxalacetat i glutamat. En el següent pas, l'oxalacetat es transforma en malat gràcies a la malat deshidrogenasa. Aquesta darrera reacció porta acoblada l'oxidació del NADH, que té absorbància a 340 nm, a NAD^+ . La disminució d'absorbància a 340 nm, com a conseqüència de la formació d' NAD^+ , es va detectar a l'autoanalitzador AU5400 (Olympus Life and Material Science Europa GmbH; Clare, Irlanda). La disminució d'absorbància a 340 nm és inversament proporcional al contingut d'AST de la mostra.

Els valors de referència de l'Hospital per a aquest paràmetre són de 5 a 37 UI/L.

2.9.3 Gamma glutamil transpeptidasa

Per a la determinació de la GGT s'ha utilitzat un mètode enzimàtic basat en el descrit per Persijn i col·laboradors [440]. La GGT present a la mostra catalitza la transferència del grup γ -glutàmic del γ -glutamil-3-carboxil-4-nitroanilida a la glicil-glicina, amb la formació de 5-amino-2-nitrobenzoat. L'absorbància d'aquests substrat a 405 nm es va detectar a l'autoanalitzador AU5400 (Olympus Life and Material Science Europa GmbH; Clare, Irlanda). L'increment d'absorbància és proporcional al contingut de GGT de la mostra.

Els valors de referència de l'Hospital per a aquest paràmetre són de menys de 55 UI/L.

3. Histologia

Un cop la mostra de fetge estava fixada en el formaldehid al 10% (v/v), una petita part (3-5 mm) es va fixar amb àcid òsmic per a la quantificació de l'esteatosi. La resta de la mostra es va incloure en parafina per poder-la tallar i realitzar les següents tincions:

- **Hematoxilina-Eosina:** es tracta d'una tinció en la que l'hematoxilina tenyeix les estructures àcides, com per exemple el nucli, de color blau-porpra, mentre que les estructures bàsiques, com per exemple el citoplasma, queden tenyides de color rosa. Aquesta tinció permet veure el nombre d'inclusions lipídiques que hi ha al citoplasma dels hepatòcits.
- **Vermell de picrosiri:** es tracta d'una tinció en la que el vermell de picrosiri tenyeix les fibres de col·lagen. Aquesta tinció serveix per valorar l'estadi de fibrosi.
- **Gordon-Sweet:** es tracta d'una tinció en la que se sensibilitza la mostra per que la plata pugui tenyir les fibres de reticulina del teixit conjuntiu. En un fetge sa les fibres formen bandes contínues, però en un fetge necròtic/fibròtic les fibres tenen un patró discontinu.
- **Blau de Perls:** es tracta d'una tinció en la que després d'un tractament de la mostra amb àcid clorhídric per que les proteïnes alliberin els ions fèrrics, s'afegeix ferrocianur potàssic per que els ions precipitin donant un color blau-verdós. Aquesta tinció serveix per valorar el número de dipòsits d'hemosiderina.
- **Tetraòxid d'osmi:** es tracta d'una tinció en la que el tetraòxid d'osmi oxida els lípids de la mostra formant un precipitat de color negre. Aquesta tinció permet veure el grau d'esteatosi.

L'estudi de les preparacions es va dur a terme amb un microscopi òptic i es van valorar les mostres segons l'índex de Brunt [163] per realitzar el diagnòstic de NAFLD. Es va aplicar el mateix índex per les biòpsies del moment de l'operació com per les d'un any.

Annex II. Taules de resultats

Taula 17. Paràmetres antropomètrics:

| | Ob | 1M | 3M | 6M | 9M | 12M | P _{ANOVA} |
|--------------------------|-----------|-----------------|---------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------|
| pes (Kg) | 130,0±3,4 | 115,2±3,2 oo | 103,5±2,8 ooo | 93,4±2,8 ooo, 111, | 86,1±3,0 ooo, 111, 33 | 82,1±2,9 ooo, 111, 333 | <0,0001 |
| BMI (Kg/m ²) | 48,8±0,9 | 43,6±0,8 ooo | 38,7±0,8 ooo, 11 | 35,0±0,8 ooo, 111, 3 | 32,0±0,9 ooo, 111, 333 | 30,9±0,9 ooo, 111, 333, 6 | <0,0001 |
| cintura (cm) | 136,1±2,3 | 120,2±5,4 | 112,0±3,7 ooo | 105,1±4,5 ooo | 91,4±3,0 ooo, 11, 3 | 98,5±2,9 ooo, 1, | <0,0001 |
| maluc (cm) | 145,0±2,3 | 132,6±4,9 | 126,2±4,2 oo | 123,8±4,5 ooo | 115,5±9,5 o | 117,8±3,1 ooo | <0,0001 |
| WHR (u.a.) | 0,95±0,01 | 0,91±0,01 | 0,89±0,02 | 0,84±0,02 oo | 0,80±0,01 | 0,90±0,02 | 0,0008 |
| % excés de pes | 101,7±3,9 | 80,0±3,7 ooo | 60,0±3,4 ooo, 11 | 46,0±3,2 ooo, 111 | 33,9±3,5 ooo, 111, 333 | 30,2±3,5 ooo, 111, 333, 6 | <0,0001 |

Taula 18. Greixos corporals:

| | Ob | 1M | 3M | 6M | 9M | 12M | P _{ANOVA} |
|--------------------------|----------|-----------------|---------------------|----------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------|
| greix corporal (Kg) | 78,7±3,0 | 62,7±2,5 ooo | 49,8±2,1 ooo, 11 | 41,2±2,0 ooo, 111 | 34,5±2,0 ooo, 111, 333 | 32,4±1,9 ooo, 111, 333 | =0,03 |
| greix subcutani (Kg) | 58,0±2,8 | 46,8±5,5 | 36,1±3,5 ooo | 33,2±3,6 ooo | 24,3±5,0 oo | 28,4±2,3 ooo | <0,0001 |
| greix visceral (Kg) | 21,4±1,3 | 13,2±2,6 | 12,9±1,9 oo | 11,5±1,6 ooo | 5,4±1,9 oo | 4,42±1,03 ooo | <0,0001 |
| greix corporal (%) | 60,3±1,6 | 54,4±1,5 | 48,1±1,6 ooo | 43,9±1,6 ooo, 111 | 39,9±1,6 ooo, 111, 33 | 39,1±1,6 ooo, 111, 33 | <0,0001 |
| greix corporal dones (%) | 64,8±1,3 | 58,0±1,2 oo | 52,7±1,1 ooo | 48,1±1,3 ooo, 111 | 31,4±1,5 ooo, 111, 333 | 42,5±1,5 ooo, 111, 333, 6 | <0,0001 |
| greix corporal homes (%) | 49,7±2,0 | 44,0±1,9 | 37,5±1,7 ooo | 33,8±2,0 ooo, 11 | 31,4±1,9 ooo, 111 | 31,1±2,1 ooo, 111 | <0,0001 |
| greix subcutani (%) | 73,7±1,7 | 78,5±1,7 | 73,5±3,2 | 73,2±3,1 | 82,6±2,8 | 77,3±2,4 | n.s. |
| greix visceral (%) | 27,3±1,7 | 21,5±1,7 | 26,5±3,2 | 26,8±3,1 | 17,4±2,8 | 22,7±2,4 | n.s. |

Taula 19. Hormones reguladores de la ingesta:

| | Ob | 1M | 3M | 6M | 9M | 12M | Control | P _{ANOVA} |
|----------------------|----------|-----------|-----------|-----------------|---------------------|-------------------------|-------------------|--------------------|
| Adiponectina (ug/mL) | 11,2±1,0 | 10,3±1,0 | - | 14,8±1,2 1 | - | 20,4±1,6 ooo, 111, 6 | 18,1±2,3 o, 11 | <0,0001 |
| Leptina (ng/mL) | 36,9±4,0 | 23,8±2,9 | 18,4±2,2 | 14,9±2,0 ooo | 10,2±1,7 ooo, 11 | 8,0±1,4 ooo, 111, 33 | - | <0,0001 |
| Grelina (pg/mL) | 70,7±7,0 | 81,5±10,1 | 98,5±10,9 | 94,1±10,4 | 102,3±12,1 | 125,5±13,0 oo, 1 | - | =0,0081 |

Annex II

Taula 20. Paràmetres de metabolisme glucídic:

| | Ob | 1M | 3M | 6M | 9M | 12M | P _{ANOVA} |
|-------------------------|-----------|---------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| Glucosa (mg/dL) | 125,9±9,3 | 96,3±3,6 o | 94,1±2,7 oo | 91,7±2,3 ooo | 90,5±2,0 ooo | 91,1±3,0 ooo | <0,0001 |
| Insulina (mUI/L) | 24,2±2,8 | 13,9±1,6 o | 11,7±1,1 oo | 9,4±0,9 ooo | 8,3±0,9 ooo | 8,2±0,8 ooo | <0,0001 |
| HOMA-IR (u.a.) | 7,4±1,0 | 3,3±0,5 oo | 2,6±0,3 ooo | 2,2±0,2 ooo | 1,9±0,3 ooo | 1,8±0,2 ooo | <0,0001 |

Taula 21. Paràmetres lipídics a plasma:

| | Ob | 1M | 3M | 6M | 9M | 12M | Control | P _{ANOVA} |
|---------------------------------|-----------|------------------|------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|--|--------------------|
| TAG (mg/dL) | 143,3±9,5 | 146,7±11,1 | 131,5±9,1 | 115,4±8,8 | 97,6±7,3 oo, 11, 3 | 95,1±5,7 oo, 11, 3 | 71,6±9,6 ooo, 111, 333, 666, 99, 12 | <0,0001 |
| CHOL_T (mg/dL) | 210,1±7,3 | 156,5±8,0 ooo | 159,9±6,6 ooo | 170,6±9,2 oo | 171,9±8,3 oo | 162,2±4,9 ooo | 181,2±9,3 | <0,0001 |
| HDLc (mg/dL) | 47,9±1,8 | 34,0±1,2 ooo | 38,3±1,2 o | 44,5±1,9 11 | 49,2±2,0 111, 33 | 51,0±1,8 111, 333 | 45,9±4,4 11 | <0,0001 |
| LDLc (mg/dL) | 133,5±5,2 | 91,7±7,1 ooo | 97,1±5,7 ooo | 103,1±7,3 oo | 99,5±5,8 oo, 11, 3 | 92,2±3,9 ooo | 121,0±9,7 | <0,0001 |
| no HDLc (mg/dL) | 162,2±6,2 | 117,5±9,1 oo | 122,0±6,1 oo | 126,1±8,1 oo | 122,7±7,4 ooo | 111,2±4,2 ooo | 128,9±11,2 | <0,0001 |
| Tc/HDLc | 4,42±0,13 | 4,68±0,25 | 4,27±0,18 | 3,87±0,15 | 3,56±0,15 oo, 11, 3 | 2,23±0,10 ooo, 111, 333 | 4,52±0,43 1212 | <0,0001 |
| LDLc/HDLc | 2,82±0,10 | 2,65±0,25 | 2,56±0,14 | 2,33±0,12 | 2,05±0,15 oo | 1,85±0,08 ooo, 11, 3 | 3,13±0,39 1212 | <0,0001 |
| no-HDLc/HDLc | 3,44±0,12 | 3,68±0,25 | 3,27±0,17 | 2,87±0,15 | 2,56±0,15 oo, 11, 3 | 2,23±0,10 ooo, 111, 333 | 3,52±0,43 1212 | <0,0001 |
| ApoAI (mg/dL) | 185,6±5,0 | 126,4±3,6 ooo | - | 163,1±5,5 o, 111 | - | 188,9±6,5 111, 66 | 197,5±6,4 111, 666 | <0,0001 |
| ApoB (mg/dL) | 85,1±3,0 | 70,4±3,4 o | - | 69,7±3,9 oo | - | 64,1±2,6 ooo | 68,4±4,9 oo | <0,0001 |
| ApoB/ApAI | 0,46±0,02 | 0,57±0,04 | - | 0,42±0,03 1 | - | 0,35±0,02 ooo, 111, 6 | 0,35±0,03 oo, 111 | <0,0001 |
| ApoAIV (%) | 98,2±1,6 | 55,6±7,9 o | 73,8±10,3 | 85,7±10,72 | 93,34±11,1 | 101,8±6,0 11 | 100 1 | =0,0049 |
| NEFA (mg/dL) | 17,0±1,0 | 26,4±1,4 ooo | 19,3±2,0 | 17,5±1,2 111 | 14,8±3,5 11 | 14,4±1,0 111 | 13,4±1,1 111 | <0,0001 |
| KB (mg/dL) | 0,79±0,14 | 9,95±1,54 ooo | - | 2,39±0,59 ooo, 111 | - | 1,14±0,18 111 | 0,97±0,30 111, 66 | <0,0001 |
| PL (mg/dL) | 195,0±2,8 | 165,8±5,0 ooo | - | 176,7±0,5 o | - | 173,3±6,2 o | 205,1±4,0 111, 666, 121212 | <0,0001 |
| Glicerol (mg/dL) | 1,84±0,09 | 2,01±0,11 | - | 1,53±0,09 11 | - | 1,49±0,09 11 | 0,54±0,11 ooo, 111, 666, 121212 | <0,0001 |
| Mida VLDL (a.u.) | 2,06±0,26 | 1,96±0,3 | 2,82±0,44 | 2,10±0,32 | 4,07±5,00 o, 11 | 3,41±0,65 | - | =0,0015 |
| Mida LDL (a.u.) | 0,67±0,03 | 0,74±0,104 | 1,27±0,49 | 1,21±0,31 o | 1,53±0,46 o | 1,11±0,26 | - | =0,0014 |
| Mida HDL (a.u.) | 0,14±0,01 | 0,15±0,01 | 0,19±0,04 | 0,17±0,03 | 0,13±0,03 | 0,17±0,21 | - | n.s. |

Annex II

Taula 22. Lipases a plasma:

| | Ob | 1M | 3M | 6M | 9M | 12M | Control | P _{ANOVA} |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------------|
| LPL (mU/mL) | 0,49±0,09 | 0,72±0,17 | 0,60±0,05 | 0,68±0,07 | 0,70±0,11 | 0,55±0,06 | 0,42±0,07 | =0,0462 |
| LPL (ng/mL) | 43,9±3,3 | 37,0±3,4 | - | 40,4±2,8 | - | 42,5±3,2 | 42,0±2,8 | n.s. |
| HL (mU/mL) | 3,39±0,63 | 3,03±0,46 | 1,61±0,22 | 1,83±0,46 | 1,65±0,27 | 1,88±0,23 | 2,37±0,36 | =0,0152 |

Taula 23. Composició lipídica de l'AT subcutani i visceral:

| | AT subcutani | | | | | AT visceral | | | t Student SAT vs. VAT |
|---------------------------------|--------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------|-------------|------------|--------------------------|-----------------------|
| | Ob | 6M | 12M | Control | P _{ANOVA} | Ob | Control | t Student Ob vs. control | |
| TAG (mg/g teixit) | 480,9±16,1 | 390,6±27,1 _o | 297,0±46,5 _{ooo} | 370,2±37,6 | <0,0001 | 504,5±24,4 | 335,5±45,4 | =0,0053 | n.s. |
| CHOL _T (mg/g teixit) | 56,2±3,6 | 71,0±10,8 | 51,4±6,3 | 52,0±4,6 | n.s. | 58,2±6,6 | 47,7±6,0 | n.s. | n.s. |
| NEFA (mg/g teixit) | 65,3±4,8 | 44,4±4,1 _{oo} | 63,7±9,4 | 47,4±8,3 | =0,0043 | 46,3±4,6 | 35,8±4,5 | n.s. | =0,002 |
| PL (mg/g teixit) | 133,2±7,8 | 92,9±10,1 _o | 100,6±13,9 | 188,9±17,1 _{o, 666, 121212} | <0,0001 | 106,1±13,4 | 161,7±20,4 | n.s. | n.s. |
| TAG (mg/μg) | 7,17±0,18 | 6,20±0,63 | 3,56±1,01 _{ooo, 666} | 3,98±0,49 | <0,0001 | 6,33±0,49 | 3,11±0,42 | <0,0001 | =0,0396 |
| CHOL _T (mg/μg) | 0,86±0,07 | 0,97±0,10 | 0,53±0,11 ₆₆ | 0,57±0,06 | =0,0052 | 0,72±0,08 | 0,44±0,06 | n.s. | n.s. |
| NEFA (mg/μg) | 1,01±0,09 | 0,64±0,07 _{oo} | 0,55±0,07 _{oo} | 0,51±0,08 _{oo} | =0,0001 | 0,61±0,07 | 0,31±0,05 | n.s. | =0,0001 |
| PL (mg/μg) | 2,03±0,14 | 1,31±0,15 _{oo} | 0,90±0,17 _{ooo} | 2,00±0,19 ₁₂₁₂ | <0,0001 | 1,37±0,19 | 1,50±0,19 | n.s. | =0,0024 |
| DNA (μg/g teixit) | 68,9±2,5 | 76,0±7,2 | 131,5±17,1 _{ooo, 666} | 94,3±4,4 | <0,0001 | 84,4±3,9 | 107,6±3,5 | <0,05 | =0,0022 |
| Lípid total (mg/μg) | 11,1±0,4 | 8,87±0,80 | 5,55±1,22 _{ooo, 666} | 7,09±0,74 | <0,0001 | 9,04±0,63 | 5,39±0,61 | =0,0008 | =0,0011 |

Taula 24. Lipases a l'AT subcutani i visceral:

| | AT subcutani | | | | | AT visceral | | | t Student SAT vs. VAT |
|-----------------|--------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------|-------------|-----------|--------------------------|-----------------------|
| | Ob | 6M | 12M | Control | P _{ANOVA} | Ob | Control | t Student Ob vs. control | |
| LPL (mU/g txt) | 32,9±1,0 | 14,2±1,6 _{ooo} | 9,8±1,4 _{ooo} | 8,2±1,4 _{ooo} | <0,0001 | 36,5±3,3 | 6,8±1,0 | <0,0001 | n.s. |
| LPL (mU/ug DNA) | 0,49±0,02 | 0,24±0,03 _{ooo} | 0,12±0,03 _{ooo} | 0,09±0,02 _{ooo} | <0,0001 | 0,46±0,05 | 0,11±0,04 | =0,0004 | n.s. |
| LPL (mU AT) | 1889±121 | 469±90 _{ooo} | 302±117 _{ooo} | - | <0,0001 | 569±51 | - | - | <0,0001 |
| HSL (mU/g txt) | 32,8±1,6 | 41,6±2,6 _o | 46,6±3,7 _{ooo} | 11,9±1,4 _{ooo, 666, 121212} | <0,0001 | 32,9±1,6 | 12,0±1,4 | <0,0001 | n.s. |
| HSL (mU/ug DNA) | 0,50±0,03 | 0,63±0,05 | 0,54±0,12 | 0,13±0,02 _{oo, 666, 1212} | =0,0004 | 0,41±0,02 | 0,11±0,01 | <0,0001 | =0,0421 |
| HSL (mU AT) | 1883±149 | 1399±187 | 1826±346 | - | n.s. | 692±47 | - | - | <0,0001 |

Annex II

Taula 25. Transaminases:

| | Ob | 1 M | 3 M | 6M | 9M | 12M | P _{ANOVA} |
|------------|----------|-------------------|---------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------|
| AST(UI/L) | 24,4±2,6 | 35,7±2,5 ooo | 25,8±2,0 11 | 19,9±1,2 111 | 19,4±1,1 111 | 20,6±1,6 111 | <0,0001 |
| ALT (UI/L) | 33,9±3,2 | 55,1±5,4 oo | 32,4±4,1 111 | 21,0±2,2 oo, 111, 3 | 18,4±1,4 ooo, 111, 333 | 20,2±1,9 oo, 111, 3 | <0,0001 |
| AST/ALT | 0,8±0,0 | 0,7±0,0 1 | 0,9±0,1 ooo, 111 | 1,1±0,1 ooo, 111 | 1,1±0,1 ooo, 111 | 1,1±0,1 ooo, 111 | <0,0001 |
| GGT (UI/L) | 43,1±6,5 | 46,4±9,6 oo, 1 | 25,0±4,3 ooo, 11 | 27,0±6,8 ooo, 111 | 24,4±7,3 ooo, 111 | 17,2±1,6 ooo, 111 | <0,0001 |

Taula 26. Composició lipídica del fetge:

| | Ob | 12M | Control | t Student Ob vs. 12M | | Ob | 12M | Control | t Student Ob vs. 12M |
|------------------------------------|------------|-----------------|---------|-------------------------|----------------------------------|------------|------------|---------|-------------------------|
| TAG (mg/g teixit) | 77,7±9,1 | 30,0±8,8 ooo | 16,8 | <0,0001 | TAG (µg/mg DNA) | 43,8±5,5 | 30,84±11,0 | 8,6 | n.s. |
| CHOL _T (mg/g teixit) | 24,0±2,4 | 2,6±0,7 ooo | 1,0 | <0,0001 | CHOL _T (µg/mg DNA) | 13,4±1,6 | 2,6±0,8 | 0,5 | <0,0001 |
| FC (mg/g teixit) | 2,8±0,3 | 1,3±0,8 | 0,1 | 0,0009 | FC (mg/µg DNA) | 1,5±0,2 | 1,3±0,3 | 0,1 | n.s. |
| EC (mg/g teixit) | 21,2±2,4 | 1,8±0,5 | 0,9 | <0,0001 | EC (mg/µg DNA) | 12,3±1,6 | 1,7±0,6 | 0,5 | <0,0001 |
| NEFA (mg/g teixit) | 14,5±1,2 | 11,5±1,9 | 0,5 | n.s. | NEFA (mg/µg DNA) | 7,9±0,7 | 9,6±1,9 | 0,3 | n.s. |
| PL (mg/g teixit) | 92,6±10,2 | 8,2±1,0 ooo | 6,0 | <0,0001 | PL (µg/mg DNA) | 52,1±6,6 | 7,4±1,2 | 3,1 | =0,0004 |
| Lípid total (mg/g teixit) | 119,0±20,4 | 48,3±0,2 | 69,1 | <0,0001 | Lípid total (mg/mg DNA) | 112,1±12,9 | 46,7±12,8 | 12,5 | =0,0108 |
| % lípid | 19,9±2,0 | 4,8±1,0 | 2,4 | <0,0001 | DNA (µg/mg teixit) | 1,9±0,1 | 1,3±0,1 | 2,8 | =0,0007 |

Taula 27. Lipases a fetge:

| | Ob | 12M | Control | t Student Ob vs. 12M |
|----------------------|------------|------------|---------|-------------------------|
| HL (mU/g teixit) | 272,3±14,7 | 136,9±15,4 | 152,6 | <0,0001 |
| HL (mU/mg DNA) | 145,3±7,6 | 103,3±12,1 | 87,0 | =0,0085 |
| LPL (mU/g teixit) | 91,3±4,8 | 68,4±10,3 | 43,7 | =0,0067 |
| LPL (mU/mg DNA) | 49,2±2,6 | 52,0±6,2 | 25,0 | n.s. |

Taula 28. Paràmetres hematològics:

| | Ob | 1M | 3M | 6M | 9M | 12M | P _{ANOVA} |
|---|-----------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|--------------------|
| Hematies (x10 ¹² cèl·lules/L) | 4,9±0,1 | 4,8±0,1 | 4,9±0,1 | 4,8±0,1 | 4,7±0,1 | 4,7±0,1 | n.s. |
| VCM dels hematies (fL) | 85,4±0,9 | 85,0±1,0 | 84,8±0,9 | 86,0±1,0 | 86,6±0,9 | 86,6±1,2 | n.s. |
| Hematòcrit (%) | 41,3±0,5 | 40,9±0,6 | 41,5±0,6 | 41,2±0,6 | 40,9±0,6 | 40,9±0,7 | n.s. |
| Hemoglobina (g/dL) | 11,9±0,2 | 13,7±0,2 | 13,8±0,2 | 13,9±0,2 | 13,7±0,2 | 13,7±0,2 | n.s. |
| Leucòcits (x10 ⁹ cèl·lules/L) | 8,4±0,4 | 7,0±0,3 o | 7,3±0,3 | 7,0±0,3 o | 6,8±0,3 oo | 6,9±0,3 o | =0,0049 |
| Neutròfils (x10 ⁹ cèl·lules/L) | 5,2±0,3 | 4,1±0,2 o | 4,2±0,2 | 4,3±0,3 | 3,9±0,2 oo | 4,2±0,3 o | =0,0053 |
| Limfòcits (x10 ⁹ cèl·lules/L) | 2,4±0,1 | 2,0±0,1 | 2,3±0,1 | 2,1±0,1 | 2,1±0,1 | 2,1±0,1 | =0,0360 |
| Monòcits (x10 ⁹ cèl·lules/L) | 0,6±0,0 | 0,6±0,0 | 0,5±0,0 | 0,5±0,0 o | 0,4±0,0 oo, 1 | 0,4±0,0 o | =0,0004 |
| Eosinòfils (x10 ⁹ cèl·lules/L) | 0,2±0,0 | 0,2±0,0 | 0,2±0,0 | 0,1±0,0 1 | 0,1±0,0 1 | 0,2±0,0 | =0,0077 |
| Basòfils (x10 ⁹ cèl·lules/L) | 0,04±0,00 | 0,02±0,01 | 0,01±0,01 | 0,01±0,01 | 0,01±0,01 | 0,01±0,01 | =0,0420 |
| Reticulòcits (x10 ⁹ cèl·lules/L) | 57,1±6,2 | 41,2±5,0 | 35,4±4,1 | 29,0±4,0 ooo | 29,1±3,0 oo | 27,7±2,4 oo | =0,0005 |
| Plaquetes (x10 ⁹ cèl·lules/L) | 286±12 | 282±17 | 275±13 | 272±13 | 279±17 | 268±12 | n.s. |
| VPM (fL) | 8,9±0,2 | 10,1±0,2 oo | 10,2±0,3 ooo | 9,7±0,2 o | 9,6±0,2 | 9,3±0,2 3 | <0,0001 |

Annex II

Taula 29. Paràmetres inflamatoris:

| | Ob | 1M | 3M | 6M | 9M | 12M | Control | P _{ANOVA} |
|----------------------------------|------------|---------------|------------|----------------------|---------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------|
| Fibrinogen (mg/mL) | 402,9±9,5 | 404,4±10,2 | 419,5±12,7 | 400,4±9,7 | 353,9±11,7 o, 1, 33, 6 | 343,3±11,9 oo, 11, 333, 66 | - | <0,0001 |
| Albúmina (g/dL) | 4,11±0,06 | 4,11±0,06 | 4,06±0,05 | 4,07±0,05 | 4,20±0,07 | 4,21±0,05 | - | n.s. |
| Fosfata a alcalina (IU/L) | 77,6±3,6 | 87,0±4,3 | 81,8±3,7 | 88,9±4,0 | 91,6±4,4 | 87,5±3,9 | - | n.s. |
| CRP (mg/L) | 21,3±1,8 | 21,9±2,9 | - | 10,8±1,4 ooo, 111 | - | 4,2±0,6 ooo, 111, 666 | 6,9±0,9 ooo, 111 | <0,0001 |
| CRP TABsc (ng/mg) | 0,21±0,03 | - | - | 0,06±0,01 oo | - | 0,02±0,01 ooo | 0,04±0,02 o | <0,0001 |
| CRP TABvc (ng/mg) | 0,24±0,03 | - | - | - | - | - | 0,04±0,03 oo | <0,0041 |
| CRP fetge (ng/mg) | 3,68±0,52 | - | - | - | - | 0,15±0,08 ooo | 0,20±0,08 oo | =0,0002 |
| PAI1 (ng/mL) | 159,6±16,6 | 98,6±16,7 | - | 58,8±10,5 ooo | - | 34,7±5,5 ooo, 111 | 78,9±10,4 1212 | <0,0001 |
| NO (µM) | 28,8±2,4 | 42,8±4,0 o | - | 32,1±5,0 l | - | 26,1±2,2 11 | 47,6±4,5 oo, 66, 121212 | <0,0001 |
| ACTH (pg/mL) | 28,2±2,4 | 23,5±4,9 | 21,5±2,8 | 16,5±1,5 oo | 20,8±2,8 | 13,9±1,1 ooo | - | =0,0003 |
| Cortisol (µg /dL) | 15,2±1,0 | 13,3±1,1 | 14,43±0,9 | 12,6±0,6 | 13,1±0,8 | 12,6±0,6 | - | n.s. |
| CBG (ng(uL) | 60,2±2,4 | | | 55,9±2,3 | | 58,8±3,0 | 53,1±2,0 | n.s. |
| binding CBG (nmolH*/µL) | 151,1±17,2 | | | 128,9±16,1 | | 133,8±21,2 | - | n.s. |

Annex II

Taula 30. Expressió relativa dels gens estudiats a l'AT subcutani i visceral:

| | AT subcutani | | | | | AT visceral | | | <i>t</i> -Student SAT vs. VAT |
|---------------------|--------------|-----------------|-------------------|-----------------------|--------------------|-------------|------------|----------------------------------|-------------------------------|
| | Ob | 6M | 12M | Control | P _{ANOVA} | Ob | Control | <i>t</i> -Student Ob vs. Control | |
| Leptina | 100,0±8,2 | 54,3±6,9 ooo | 52,0±6,7 ooo | 58,0±8,7 o | <0,0001 | 53,9±7,1 | 44,3±17,5 | n.s. | <0,0001 |
| Adiponectina | 100,0±5,8 | 115,9±8,7 | 112,9±6,6 | 133,6±20,7 | n.s. | 79,41±7,2 | 100,8±22,7 | n.s. | =0,0298 |
| NOSi | 100,0±20,6 | 104,9±9,5 | 138,6±20,0 | 136,3±36,8 | n.s. | 59,7±7,6 | 82,5±21,2 | n.s. | =0,0298 |
| NOSe | 100,0±7,0 | 64,5±5,1 oo | 68,9±6,1 o | 107,7±11,0 66, 12 | =0,0001 | 87,3±4,6 | 90,7±14,4 | n.s. | n.s. |
| CD36 | 100,0±4,6 | 77,7±5,3 o | 79,6±6,5 | 84,5±14,0 | =0,0188 | 60,3±5,1 | 66,9±14,8 | n.s. | <0,0001 |
| GLUT4 | 100,0±8,5 | 124,2±12,3 | 185,0±19,4 ooo | 152,3±43,4 | =0,0020 | 77,3±8,7 | 174,3±43,3 | =0,0058 | =0,0301 |
| IL6 | 100,0±29,6 | 37,3±6,9 | 28,4±3,7 | 42,3±11,1 | n.s. | 533,7±281,4 | 42,1±14,0 | n.s. | n.s. |
| TNFα | 100,0±10,9 | 90,1±7,1 | 80,7±9,2 | 79,3±24,0 | n.s. | 122,6±13,4 | 103,7±21,9 | n.s. | n.s. |
| LPL | 100,0±5,5 | 79,8±6,9 | 100,6±8,8 | 103,9±20,9 | n.s. | 76,1±7,0 | 104,9±28,8 | n.s. | =0,0097 |
| HSL | 100,0±5,1 | 88,4±7,1 | 91,5±6,9 | 112,3±18,3 | =0,0441 | 74,2±7,1 | 87,6±18,7 | n.s. | =0,0047 |
| ATGL | 100,0±5,1 | 85,6±7,1 | 80,9±5,2 | 106,8±17,8 | n.s. | 83,8±7,1 | 109,5±20,7 | n.s. | n.s. |
| 11βHSD1 | 100,0±6,8 | 76,9±7,9 | 59,7±12,5 o | 57,9±16,5 o | =0,0057 | 77,5±6,6 | 55,6±26,5 | n.s. | =0,0204 |
| AQ7 | 100,0±4,0 | 72,6±6,6 ooo | 72,7±5,2 o | 108,3±18,6 6, 1212 | =0,0008 | 108,7±10,8 | 126,8±29,3 | n.s. | n.s. |
| FABP4 | 100,0±4,9 | 99,0±9,0 | 87,5±7,1 | 113,1±19,3 | n.s. | 81,9±6,9 | 108,7±21,0 | n.s. | =0,0367 |
| INSr | 100,0±2,8 | 106,5±4,9 | 105,2±4,8 | 113,8±11,8 | n.s. | 98,01±3,6 | 114,8±17,9 | n.s. | n.s. |
| PAII | 100,0±15,6 | 42,35±6,8 oo | 43,2±6,9 o | 80,7±17,4 | =0,0018 | 53,9±9,3 | 31,2±14,8 | =0,0462 | =0,0039 |

Taula 31. Expressió relativa dels gens estudiats al fetge:

| | Fetge | | | <i>t</i> -Student Ob vs. 12M |
|----------------------|------------|------------|----------|---------------------------------|
| | Ob | 12M | Control | |
| SRB1 | 100,0±3,7 | 127,2±11,5 | 73,8 | =0,0053 |
| iNOS | 100,0±15,8 | 64,1±12,2 | 79,6 | n.s. |
| eNOS | 100,0±3,8 | 125,3±16,2 | 112,4 | =0,0371 |
| CD36 | 100,0±8,4 | 74,0±12,1 | 45,7 | =0,0332 |
| 7αhidroxilasa | 100,0±13,5 | 45,2±11,6 | 251 | =0,0042 |
| IL6 | 100,0±33,6 | 72,6±32,0 | 0 | n.s. |
| TNFα | 100,0±8,0 | 84,6±12,6 | 54,3 | n.s. |
| LPL | 100,0±22,2 | 6,9±5,0 | 0 | <0,0001 |
| HL | 100,0±5,5 | 100,6±11,1 | 63,3 | n.s. |
| ATGL | 100,0±3,6 | 106,0±6,5 | 105,9 | n.s. |
| 11βHSD1 | 100,0±2,5 | 98,9±6,1 | 88,7 | n.s. |
| LDLrec | 100,0±8,6 | 123,6±22,8 | 206,5 | n.s. |
| ApoB | 100,0±2,1 | 115,3±5,3 | 116,6 | =0,0027 |
| HMGCoA red | 100,0±12,2 | 123,1±21,0 | 112,5 | n.s. |
| PAI1 | 100,0±17,0 | 41,3±9,9 | 31,2±7,1 | =0,0011 |
| CPT1a | 100,0±4,7 | 90,5±10,6 | 75 | n.s. |

