



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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

**Efecto de la gastrectomía vertical
laparoscópica en la expresión
y metilación del ADN de genes
relacionados con el metabolismo
energético y la inflamación en
leucocitos de sangre periférica**

**Tesis Doctoral
Marc Beisani Pellisé**

Barcelona 2018

"Mide lo que se pueda medir; y lo que no, hazlo medible"
Galileo Galilei (1564-1642)

A mi madre, que lo pidió hace tanto tiempo.

Efecto de la gastrectomía vertical laparoscópica en la expresión y metilación del ADN de genes relacionados con el metabolismo energético y la inflamación en leucocitos de sangre periférica

Doctorando:

Marc Beisani Pellisé

Directores:

Dr. José María Balibrea del Castillo

Dr. Manuel Armengol Carrasco

Tutor:

Dr. Manuel Armengol Carrasco

Universitat Autònoma de Barcelona

**Departamento de Cirugía
Programa de Doctorado en Cirugía y Ciencias Morfológicas**

AGRADECIMIENTOS

Si hablamos en términos generales y de la tesis doctoral como el documento que certifica que uno conoce el método científico, no me vería capaz ni de empezar la lista de gigantes, algunos famosos y otros completamente anónimos, cuyos rastros más o menos ocultos me han permitido llegar hasta aquí.

Si hablamos en particular de este trabajo, no obstante, la cosa cambia. Este proyecto sigue fielmente la estela dejada por el Dr. José M. Balibrea, artífice del estudio y buen amigo. Sin su inteligencia y su siempre sorprendente capacidad de mantener la calma en medio de la tempestad, quién sabe cuantas veces hubiese naufragado. También quisiera agradecer especialmente la ayuda del Dr. Manel Armengol, que ha creído en este proyecto y ha puesto las facilidades necesarias para que llegara a buen puerto.

Gran parte de lo aprendido en este camino se lo debo a la Dra. Silvia Pellitero, la Dra. Mireia Jordà y la Dra. Edurne Pedrosa, que han resuelto siempre mis dudas con una sonrisa y una palabra de ánimo. Además, este trabajo nunca hubiera sido posible sin la colaboración de mucha más gente, de los Servicios de Bioquímica Clínica, Endocrinología y Cirugía General del *Hospital Universitari Germans Trias y Pujol*, por ejemplo, o el conjunto de los equipos del *Institut de Recerca Germans Trias i Pujol* y el *Institut de Medicina Predictiva i Personalitzada del Càncer*, así como los atentos y resolutivos integrantes de la *Unitat Docent Vall d'Hebron*.

Por otro lado, quisiera agradecer el apoyo recibido durante estos últimos años por los miembros del Servicio de Cirugía del Hospital Universitari Arnau de Vilanova y por la familia del CREBA, en especial al Dr. Jorge Olsina por la confianza que siempre me ha demostrado, a la Dra. Carmen Mías por su contagiosa energía y a la Dra. Lola García, conversadora insuperable y científica de raza.

También el de aquellos compañeros que me vieron nacer y crecer, quirúrgicamente hablando: los adjuntos, residentes y personal administrativo de los Servicios de Cirugía General y Cirugía Hepatobiliopancreática del Hospital Universitari Vall d'Hebron. A todos ellos les debo más de lo que nunca podré devolverles, particularmente a Elena, Juanito, Silvia y Eider, que tanto me han enseñado explicándome y preguntándome.

Y sin embargo, a pesar del inmenso talento de toda esta gente con la que he tenido el placer de trabajar, esta andadura hubiera sido imposible sin el afecto y la comprensión de muchas personas que quedan fuera del ámbito profesional. De los amigos que me he ido encontrando por el camino y se han quedado a mi lado, a compartir preocupaciones y alegrías. De mi madre, toda ilusiones y empeño. De mi padre, que sigue intentando, y a veces lo consigue, que tenga la cabeza ordenada y el corazón blando. De mi hermano, mucho más grande que yo en tantas cosas. De Esther, y su amor felino y tan profundo.

Barcelona, junio 2018

ÍNDICE

ABREVIATURAS	15
TABLAS	17
1. RESUMEN	23
2. INTRODUCCIÓN	27
2.1. ASPECTOS GENERALES DE LA OBESIDAD	27
2.1.1 Epidemiología de la obesidad	27
2.1.2 Control del metabolismo energético	29
2.1.3 Metabolismo energético, obesidad e inflamación	35
2.2 TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD	39
2.2.1 Estrategias de pérdida de peso	39
2.2.2 Técnicas quirúrgicas para el tratamiento de la obesidad	40
2.2.3 Resultados de la cirugía bariátrica	43
2.3 OBESIDAD Y EXPRESIÓN GÉNICA	44
2.3.1 Cambios en la expresión génica asociados a la obesidad	44
2.3.2 Cambios en la expresión génica tras cirugía bariátrica	45
2.4 OBESIDAD Y EPIGENÉTICA	47
2.4.1 Regulación epigenética de la expresión génica	47
2.4.2 Cambios de metilación del ADN asociados a la obesidad	49
2.4.3 Cambios de metilación del ADN tras cirugía bariátrica	50
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
3.1 HIPÓTESIS	55
3.2 OBJETIVO GENERAL	55
3.3 OBJETIVOS PARTICULARES	56
4. MATERIAL Y MÉTODOS	59
4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	59
4.1.1 Participantes	60
4.1.2 Intervenciones	62
4.2 VARIABLES CLÍNICAS Y BIOQUÍMICAS	63
4.2.1 Variables antropométricas	63
4.2.2 Variables bioquímicas generales	64
4.2.3 Variables hormonales	66
4.2.4 Comorbilidades	67
4.2.5 Perfiles de obesidad	69

4.3 ANÁLISIS MOLECULAR	70
4.3.1 Genes analizados	71
4.3.2 Análisis de la expresión génica	73
4.3.3 Análisis de metilación del ADN de regiones promotoras	75
4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	77
5. RESULTADOS	81
5.1 RESULTADOS CLÍNICOS Y BIOQUÍMICOS	81
5.1.1 Datos clínicos y bioquímicos basales (t0)	81
5.1.2 Resultados quirúrgicos	83
5.1.3 Evolución del peso corporal	84
5.1.4 Evolución de la resistencia insulínica	85
5.1.5 Evolución de la PCR	85
5.1.6 Evolución hormonal	86
5.1.7 Evolución de las comorbilidades	87
5.2 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	87
5.2.1 Expresión génica basal	88
5.2.2 Cambios en la expresión génica tras DMBC	88
5.2.4 Estudio de correlación entre expresión génica y peso, HOMA-IR y PCR	89
5.3 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL ADN DE REGIONES PROMOTORAS	92
5.3.1 Estado basal de metilación	92
5.3.2 Cambios de metilación tras DMBC	92
5.3.3 Cambios de metilación tras GVL	93
5.4 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE SUBGRUPOS	99
6. DISCUSIÓN	102
7. CONCLUSIONES	121
8. ANEXOS	125
ANEXO I: TÉCNICAS DE ANÁLISIS MOLECULAR	125
ANEXO II: GENES ANALIZADOS	132
ANEXO III: CARACTERÍSTICAS DEL ANÁLISIS MOLECULAR	137
9. BIBLIOGRAFIA	145

ABREVIATURAS

%EPP: Porcentaje de exceso de peso perdido

%PTP: Porcentaje de peso total perdido

ADIPOQ: Adiponectina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGL: Ácidos grasos libres

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosín trifosfato

BPGL: Bypass gástrico laparoscópico

cADN: ADN complementario

CCL1: Ligando 1 de quimiocinas motivo C-C (*chemokine (C-C motif) ligand 1*)

CCL2: Ligando 2 de quimiocinas motivo C-C (*chemokine (C-C motif) ligand 2*), también llamado proteína quimiotáctica de monocitos 1 (*MCP1*)

CT: *cycle threshold* (umbral de ciclo).

DLP: Dislipemia

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

DMBC: Dieta de muy bajas calorías

dNTP: Desoxinucleotidos trifosfato

EDTA: Ácido etilendiaminetetraacético

eNAMPT: Nicotinamida fosforibosiltransferasa extracelular (visfatina)

FAS: Receptor de apoptosis de superficie celular (*fas cell surface death receptor*)

FASN: Ácido graso sintasa (*fatty acid synthase*)

FTO: Gen relacionado con la grasa corporal y la obesidad (*fat mass and obesity related gen*)

GHRL: Ghrelina

GPT: Transaminasa glutámico pirúvica (o alanina aminotransferasa)

GVL: Gastrectomía vertical laparoscópica

HbA1c: Hemoglobina glucosilada

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HOMA-IR: Índice de resistencia a la insulina (*homeostatic model assessment of insulin resistance*)

HTA: Hipertensión arterial

IL-6: Interleuquina 6

IMC: Índice de masa corporal

iNAMPT: Nicotinamida fosforibosiltransferasa intracelular

IRS1: Sustrato 1 del receptor de la insulina (*insulin receptor substrate 1*)

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LEP: Leptina

LINE: *Long interspersed nuclear elements*

LSP: Leucocitos de sangre periférica

MC4R: Receptor de melanocortina 4 (*melanocortin 4 receptor*)

NAMPT: Visfatina (nicotinamida fosforibosiltransferasa)

PB: Pacientes bariátricos

PBEF: Factor potenciador de colonias de células pre-B (*pre-B-cell colony-enhancing factor*), también conocido como eNAMPT o visfatina

PCR: Proteína C-Reactiva

PPARG: Receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*)

PTP: Peso total perdido

qRCP: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RCP: Reacción en cadena de la polimerasa

RETN: Resistina

SAHOS: Síndrome de apnea-hipoapnea obstructiva del sueño

SM: Síndrome metabólico

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism*)

t(0): Tiempo 0, antes de cualquier intervención

t(1): Tiempo 1, después de la dieta y antes de la gastrectomía

t(2): Tiempo 2, seis meses después de la gastrectomía

t(3): Tiempo 3, 1 año después de la gastrectomía

TNF: Factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*)

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

TABLAS

Tabla 1. Genes analizados.	72
Tabla 2. Datos clínicos y bioquímicos basales.	81
Tabla 3. Datos basales y evolutivos del peso corporal, resistencia insulínica, PCR y hormonas plasmáticas.	82
Tabla 4. Principales comorbilidades basales en los sujetos del estudio.	83
Tabla 5. Expresión en leucocitos de sangre periférica de los genes estudiados.	91
Tabla 6. Estado de metilación del ADN de regiones promotoras en los genes estudiados.	98
Tabla 7. Cebadores utilizados para el análisis de la expresión génica.	137
Tabla 8. Cebadores utilizados en el análisis de metilación del ADN.	138

FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado de las acciones de la insulina a nivel del metabolismo energético.	30
Figura 2. Esquema de la regulación y funciones de la ghrelina.	32
Figura 3. Regulación de la homeostasis de la reserva energética.	34
Figura 4. Adiposopatía.	37
Figura 5. Cirugía bariátrica.	41
Figura 6. Tendencias en cirugía bariátrica.	42
Figura 7. Metilación del ADN.	48
Figura 8. Diseño del estudio.	60
Figura 9. Pasos del análisis de expresión.	74
Figura 10. Pasos del análisis de metilación del ADN.	75
Figura 11. Evolución del índice de masa corporal entre los pacientes.	84
Figura 12. Evolución de la resistencia insulínica.	85
Figura 14. Evolución de la ghrelina (a) y visfatina (b) plasmáticas.	86
Figura 13. Evolución de la proteína C-reactiva.	86
Figura 15. Evolución de las comorbilidades al año de seguimiento.	87
Figura 16. Evolución de la expresión en leucocitos de sangre periférica de los genes estudiados.	90
Figura 17. Evolución de la metilación del ADN del promotor de GHRL en leucocitos de sangre periférica.	94
Figura 18. Lollipop del análisis de metilación de ADN del promotor de GHRL.	95
Figura 19. Evolución de la metilación del ADN del promotor de NAMPT en leucocitos de sangre periférica.	95
Figura 20. Evolución de la metilación del ADN del promotor de FAS en leucocitos de sangre periférica.	97
Figura 21. Estudio de subgrupos a nivel basal.	99
Figura 22. Cambios de temperatura durante una reacción en cadena de la polimerasa.	126
Figura 23. Ejemplo de curvas de respuesta de una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de dos secuencias diferentes (X y Y).	128
Figura 24. Conversión por bisulfito.	129

Figura 25. Análisis de pirosecuenciación.	130
Figura 26. Secuencia de la región promotora de GHRL después e la conversión por bisulfito.	139

RESUMEN

1. RESUMEN

La obesidad induce alteraciones del metabolismo energético y las vías de la inflamación, con consecuencias graves a nivel sistémico. La gastrectomía vertical laparoscópica (GVL) es la técnica bariátrica más habitualmente usada a nivel mundial, pero poco se conoce de los cambios que provoca a nivel molecular.

El presente estudio tuvo como objetivo analizar, en leucocitos de sangre venosa periférica (LSP) de una cohorte de pacientes bariátricos, los efectos de la GVL sobre la expresión y la metilación del ADN de una serie de genes relacionados con la inflamación y el metabolismo energético.

Entre julio 2013 y junio 2014, se obtuvieron muestras de un grupo de pacientes obesos con indicación de cirugía bariátrica (n=35) en 3 puntos del proceso de pérdida de peso: antes de recibir ninguna intervención (t0), después de dos semanas de dieta de muy bajas calorías (t1) y a los 6 meses de recibir una GVL (t2). Se extrajo también una muestra de sangre de un grupo control (n=33), compuesto por sujetos delgados y sanos. En todas las muestras, se analizó la expresión en LSP de 12 genes (*GHRL*, *NAMPT*, *IRS1*, *FTO*, *CCL2*, *TNF*, *FAS*, *LEP*, *PPARG*, *ADIPOQ*, *FASN* y *MC4R*) mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. En 6 pacientes y 6 controles, se analizó además el estado de metilación del ADN de los promotores de los genes *GHRL*, *NAMPT* y *FAS* mediante pirosecuenciación por bisulfito.

Siete de los 12 genes analizados presentaron expresión detectable en LSP (*GHRL*, *NAMPT*, *IRS1*, *FTO*, *CCL2*, *TNF* y *FAS*). A los 6 meses de la GVL, se observó un aumento de la expresión de *FTO* y un descenso de la expresión de *FAS* y *CCL2*. El estado de metilación del ADN del promotor de *GHRL* varió de forma armónica en los 4 sitios CpG explorados, aumentando tras la dieta y disminuyendo a los 6 meses de la GVL. *IRS1* y *NAMPT* presentaron mayor expresión basal en aquellos pacientes que antes de recibir ningún tratamiento tenían un índice de masa corporal ≥ 40 kg/m² y una proteína C-reactiva ≥ 5 mg/L, respectivamente. No se encontró ningún gen cuya expresión o metilación basal permitiera predecir la evolución del peso ni la resolución de comorbilidades al año de seguimiento tras la GVL.



INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ASPECTOS GENERALES DE LA OBESIDAD

2.1.1 Epidemiología de la obesidad

En España, el sobrepeso, definido como un índice de masa corporal (IMC) entre 25 y 30 kg/m², afecta a un 39% de la población. La obesidad, definida como un IMC >30 kg/m², a un 22% [1,2]. La prevalencia de obesidad aumenta con la edad, alcanzando el 35% en las personas de más de 65 años [1]. No se trata de un fenómeno aislado, ya que en el resto de países occidentales se describen porcentajes similares [3,4]. Además, estudios epidemiológicos a escala mundial apuntan, en las últimas décadas, hacia un aumento progresivo del IMC en las poblaciones de casi todas las regiones del planeta [5,6]. Estas cifras globales pueden parecer poco relevantes si no se tiene en cuenta que, cuando se habla de obesidad, no se hace referencia exclusivamente a una alteración de la imagen corporal y una cierta limitación para la actividad física, sino también, inevitablemente, a toda una constelación de patologías asociadas que pueden llegar a ser muy graves.

Más allá de las nada despreciables repercusiones en la autoestima y la aceptación social que puede acarrear la obesidad, y que en no pocas ocasiones llegan a afectar la calidad de vida y requieren atención psicológica y psiquiátrica específicas [7], el aumento del peso corporal tiene consecuencias directas sobre el funcionamiento del cuerpo humano a todos los niveles [8]. Por ejemplo, el exceso de peso favorece la aparición de artropatías graves, dolor lumbar crónico y alteraciones del sueño como el síndrome de apnea-hipoapnea obstructiva del sueño (SAHOS). Y el aumento del volumen de grasa intrabdominal contribuye a la aparición de enfermedad por reflujo gastroesofágico e incontinencia urinaria severa, entre otros trastornos [9-11].

Pero, principalmente, los efectos perjudiciales del exceso de grasa corporal se manifiestan a nivel microscópico y molecular. El riesgo relativo de padecer diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es 7 veces mayor en obesos ^[12,13] y la incidencia de hipertensión arterial (HTA) es el doble que en personas con normopeso ^[9]. Además, el 60% de obesos sufre de dislipemia (DLP) ^[14] y hasta el 90% de esteatosis hepática ^[15]. De hecho, la asociación entre exceso de tejido adiposo, DM2, HTA y DLP es tan estrecha que a finales de los 90 se estableció el termino Síndrome Metabólico (SM) para hacer referencia a la conjunción de estas cuatro patologías ^[16]. Aunque los criterios diagnósticos del SM han ido variando con el tiempo, y por tanto también su prevalencia, aproximadamente el 40% de europeos padecerían de SM según la definición propuesta en 2005 por la *International Diabetes Federation* ^[17], muy similar al actual consenso de 2009 ^[18]. El nexo común que explicaría la asociación entre estas diferentes enfermedades se encuentra en el concepto de que el tejido adiposo es, en si mismo, un órgano endocrino activo que puede desregularse en lo que ha venido a llamarse "adiposopatía", "enfermedad del tejido adiposo" o "*sick fat*" ^[8,19]. Esta desregulación afecta también al sistema inmunitario, induciendo un estado crónico de inflamación leve que se traduce en una elevación mantenida de los reactantes de fase aguda, como el fibrinógeno y la proteína C-reactiva (PCR) ^[20,21], y un incremento de la resistencia a la insulina ^[22]. Quizá la consecuencia más grave de esta situación es el elevado riesgo cardiovascular que presentan los sujetos con SM ^[23], aunque no es la única. Incluso se apunta a que la adiposopatía podría estar relacionada con el incremento en la incidencia y mortalidad por diferentes tipos de neoplasias que se ha observado en los obesos ^[9,24].

En resumen, la obesidad es una enfermedad en auge que afecta ya aproximadamente a un cuarto de la población de los países desarrollados y tiene una influencia directa en la calidad de vida y en la supervivencia global. De hecho, se calcula que una persona de 40 años con un $IMC \geq 30$ kg/m² tiene una esperanza de vida unos 6,5 años menor que otra del mismo sexo con normopeso ^[25]. Así pues, no parece exagerado afirmar que la obesidad constituye actualmente un problema de salud pública de primer orden.

2.1.2 Control del metabolismo energético

El estudio de la regulación del metabolismo energético es un campo extremadamente complejo. En tanto que obtener, almacenar y consumir energía es quizá la actividad más importante de los seres vivos, no sólo intervienen en ella multitud de vías de señalización y metabolismo celular, sino, en mayor o menor medida, prácticamente todos los tejidos y sistemas de comunicación del organismo. Además, debe reconocerse que, si bien se han hecho progresos importantes en las últimas décadas, aún estamos lejos de poder trabajar con un modelo único y consistente. Dicho esto, y sin la intención de hacer una exposición exhaustiva, se comentarán a continuación las características de algunos de los principales agentes involucrados en el control del metabolismo energético humano.

Con diferencia, una de las sustancias que más se ha estudiado es la insulina ^[26]. Secretada por las células beta del páncreas, la insulina es una hormona que promueve procesos anabólicos, es decir, la síntesis de componentes celulares a partir de precursores de más bajo peso molecular (**Figura 1**). Una de sus principales funciones es la de aumentar la captación celular de glucosa plasmática, especialmente en músculo, hígado y tejido adiposo ^[27,28]. El destino principal de la glucosa plasmática es el músculo esquelético, donde se almacena en forma de glucógeno ^[27]. En el hígado, además de la glucogenogénesis, la insulina estimula también la lipogénesis, es decir, la síntesis de triglicéridos a partir de glucosa ^[26]. En esta reacción, la acetil-CoA, un producto intermedio del metabolismo de la glucosa, es convertida a ácido palmítico a través de la acción del complejo enzimático ácido graso sintasa (FASN) y, posteriormente, esterificado para formar triglicéridos. Estos triglicéridos constituyen los principales componentes de las lipoproteínas de muy baja densidad (*very low-density lipoprotein*, VLDL) que serán finalmente liberadas al torrente sanguíneo ^[26,29]. En el tejido adiposo, las principales funciones de la insulina son inhibir la lipólisis, favorecer la lipogénesis a partir de la glucosa plasmática por vías similares a las del hígado y estimular la captación y almacenaje de los triglicéridos contenidos en los quilomicrones de la dieta y las VLDL liberadas por el hígado ^[27].

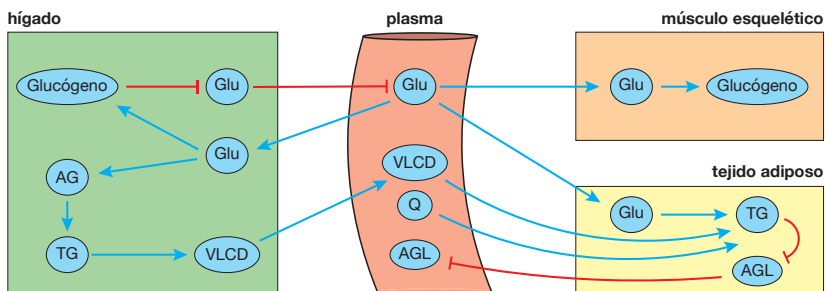


Figura 1. Esquema simplificado de las acciones de la insulina a nivel del metabolismo energético. Glu: Glucosa; AG: Ácidos grasos; ADL: Ácidos grasos libres; TG: Triglicéridos; Q: Quilomicrones.

La insulina, al ser una sustancia exclusivamente extracelular, requiere para su efectividad de la mediación de un receptor transmembrana que, a su vez, actúa sobre una serie de proteínas citosólicas que son las que ejecutan las diferentes acciones metabólicas en las células diana. En caso de alterarse esta secuencia intracelular de acontecimientos, los efectos de la insulina pueden debilitarse o incluso perderse completamente, un fenómeno que se conoce como resistencia insulínica [27].

Una de estas proteínas citosólicas mejor caracterizada, y presente en prácticamente todas las células del organismo, es el sustrato 1 del receptor de la insulina (*insulin receptor substrate 1*, IRS1). Cuando la insulina entra en contacto con su receptor, el dominio intracelular del receptor fosforila a IRS1, que penetra en el núcleo celular y dispara diferentes vías de señalización para regular la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético y el ciclo celular [30]. Las alteraciones de la función de IRS1 se han relacionado con un agravamiento de las consecuencias de la diabetes y con diferentes procesos de carcinogénesis [30,31].

Otra proteína con un papel destacado en la regulación intracelular del metabolismo energético es el receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, PPAR γ). Se trata de un receptor nuclear que, al activarse, modifica

la expresión de una serie de genes, como los que codifican a IRS1 y adiponectina, induciendo un aumento de la adipogénesis y la sensibilidad a la insulina [28,29]. PPAR γ también es conocido como "receptor de glitazonas", una familia de ligandos exógenos utilizada con éxito en el tratamiento de la DM2 y la DLP [32].

La nicotamida fosoribosiltransferasa (NAMPT), en su forma intracelular (iNAMPT), es una enzima involucrada en reacciones de oxidación-reducción, ubicua y fundamental para la supervivencia celular [33]. No obstante, recientemente se ha descubierto que el mismo producto del gen *NAMPT* tiene también un papel extracelular, en el que se conoce bajo los nombres de eNAMPT, factor potenciador de colonias de células pre-B o visfatina. La liberación extracelular de visfatina, que parece que estaría regulada por la glucemia, la hipoxia y ciertas citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF), tiene lugar principalmente en adipocitos y leucocitos, aunque se ha detectado también en otros tejidos [33-35]. Se le atribuyen las funciones de aumentar la secreción de insulina y su sensibilidad periférica, y de aumentar la ingesta de alimentos. Paralelamente, también se ha involucrado en el desarrollo de múltiples neoplasias, como el melanoma o el cáncer de mama [33].

Otra hormona importante en la regulación del metabolismo energético y el control del peso corporal es la ghrelina. La ghrelina es una proteína sintetizada principalmente en las células enteroendocrinas del fundus gástrico, aunque también se produce en pequeñas cantidades en otras regiones del aparato digestivo y del cerebro [36,37] (**Figura 2**). Su forma activa es la acil-ghrelina, que corresponde únicamente a un 10% del total [38]. A pesar de encontrarse en la mucosa gástrica, las células productoras de ghrelina no están en contacto con los alimentos, y el contenido gástrico no parece afectar a su función. Al parecer, serían estimuladas a través del sistema nervioso simpático, e inhibidas por los neuropéptidos secretados por el intestino delgado, así como por la concentración de glucosa, lípidos y aminoácidos en plasma [39,40]. La ghrelina actúa principalmente a nivel hipotalámico, donde tiene una función orexigénica, es decir, de aumento del apetito [39,40]. También tendría un efecto directo en el páncreas, inhibiendo la secreción de insulina y aumentando la liberación de glucagón [40-42]. Además, se cree que su efecto estimulante del vaciamiento gástrico podría

ser debido a una acción directa sobre el estómago [41]. Característicamente, la concentración plasmática de ghrelina sube de forma progresiva durante el ayuno para caer en picado después de las comidas, por lo que actuaría como marcapasos alimentario [40].

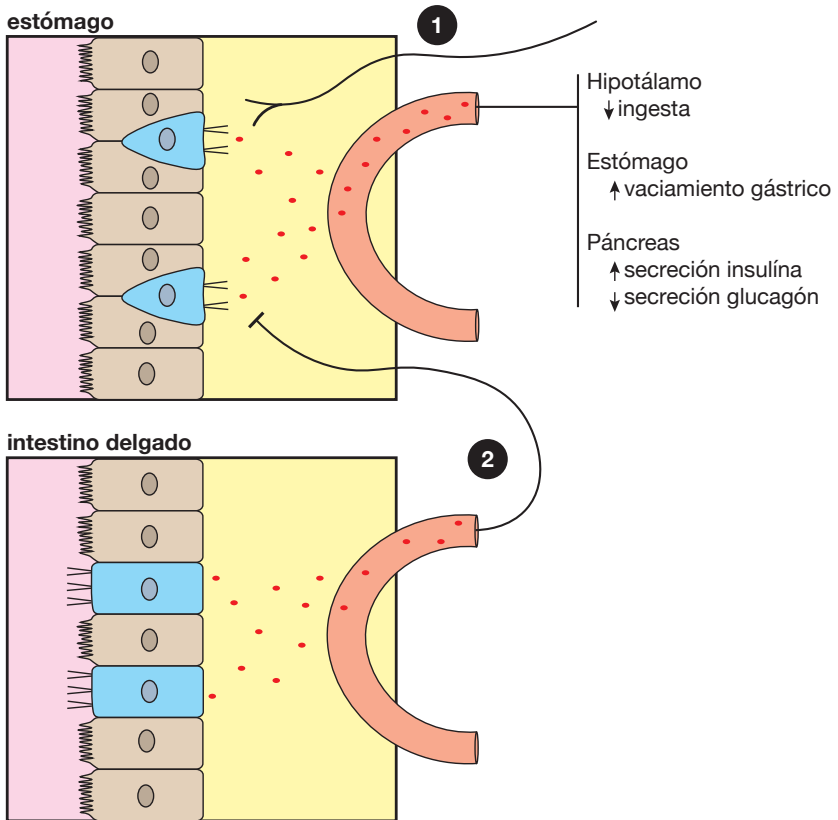


Figura 2. Esquema de la regulación y funciones de la ghrelina. La ghrelina es estimulada principalmente por el sistema nervioso autónomo (1) e inhibida por a través de señales hormonales secretadas en el intestino delgado (2). Adaptado de Steinert et al., *Physiological Reviews*, 2017 [40].

Un buen ejemplo de la complejidad de esta materia y de la evolución continua que tiene lugar en nuestro modelo de comprensión del metabolismo energético lo encontramos en el descubrimiento de la leptina y el cambio de paradigma que supuso en relación a las funciones atribuidas al tejido adiposo.

La leptina es una proteína secretada al torrente sanguíneo por los adipocitos, con un ritmo circadiano predominantemente vespertino, y que actúa sobre receptores específicos presentes en otros tejidos, sobretudo en el hipotálamo, induciendo una disminución de la ingesta y un aumento del metabolismo basal, además de inhibir la lipogénesis y aumentar la lipólisis [38,43]. Cumple, pues, con los requisitos necesarios para ser considerada una hormona. Así, tras su descubrimiento en 1994 [44], se dejó de considerar al tejido adiposo como un depósito pasivo de energía en forma de triglicéridos y se empezó a plantear seriamente la posibilidad de que conformara un órgano endocrino de pleno derecho. Fue la primera integrante de la familia de las "adipoquinas", como se ha llamado a las proteínas liberadas por los adipocitos con capacidad para interactuar con otras células, cuyos miembros actualmente se cuentan a centenares [43,45].

Otra adipoquina importante es la adiponectina. La adiponectina es una proteína estructuralmente similar al factor 1q del complemento que, aunque sorprendentemente abundante en plasma (supone aproximadamente el 0,01% de todas las proteínas plasmáticas [28]), no fue descrita hasta 1995 [46]. Actualmente se sabe que incrementa la sensibilidad a la insulina a nivel sistémico, que tiene un efecto anti-inflamatorio y que podría reducir el gasto energético basal. Además, es un elemento imprescindible para la activación de diferentes proteínas intracelulares involucradas, por ejemplo, en el metabolismo de los triglicéridos [32,43,45]. Al contrario que la de leptina, la concentración en plasma de adiponectina aumenta cuando disminuye el tamaño de los adipocitos. De este modo, mientras la adiponectina tiende a aumentar la reserva energética ante una disminución del tejido adiposo, la leptina tiende a reducirla cuando aumenta el acumulo de grasa, actuando ambas hormonas de forma complementaria para mantener la homeostasis de la reserva energética del organismo y, secundariamente, el peso corporal [43] (**Figura 3**).

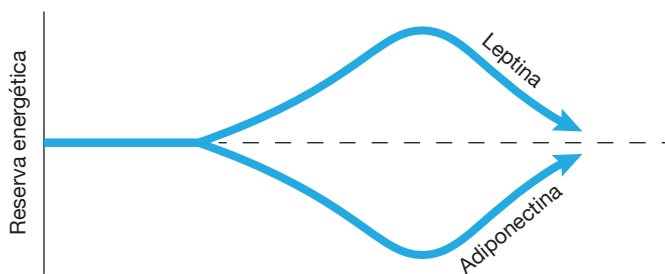


Figura 3. Regulación de la homeostasis de la reserva energética. La leptina tiende a disminuir el tamaño de los adipocitos cuando sube la reserva energética del organismo, mientras que la adiponectina tiene a aumentarlo cuando esta baja.

Por último, cabe mencionar la importancia del sistema nervioso en la regulación energética. No sólo el tejido adiposo es rico en terminaciones nerviosas simpáticas que inducen la lipólisis [28], sino que el sistema nervioso central tiene un papel fundamental en la integración de las diferentes señales neuronales y hormonales que marcan el estado energético del organismo. Esto permite establecer una estrategia adecuada para el aprovechamiento de las fuentes de energía presentes en el ambiente. Esta integración se realiza principalmente en el núcleo arcuato del hipotálamo y el núcleo del tracto solitario del tronco cerebral, mediante vías relacionadas con la melanocortina [47]. Así, el receptor 4 de la melanocortina (*melanocortin 4 receptor*, MC4R) es sensible a la insulina, la ghrelina, la leptina y los ácidos grasos libres (AGL). Su disfunción provoca un aumento del peso corporal, al inducir un incremento de la ingesta de alimentos y una supresión de la termogénesis sistémica que disminuye de forma importante el gasto energético basal [28,47].

Además de las vías de recompensa mediadas por MC4R, otras proteínas cerebrales intervienen en el metabolismo energético [48]. La primera mutación asociada con la obesidad, de hecho, fue la de un gen de acción predominantemente central, el gen relacionado con la grasa corporal y la obesidad (*fat mass and obesity related gen*, FTO), que sintetiza una demetilasa de ácido ribonucleico (ARN) de acción cerebral [49]. Desde entonces, varias mutaciones puntuales (*single nucleotide polymorphism*, SNP) del gen *FTO* se han asociado a un cambio en los patrones de ingesta de

alimentos, con una disminución de la sensación de saciedad post-prandial y un aumento de la ingesta de alimentos altamente energéticos [50]. También se ha visto que *FTO* se expresa en tejidos periféricos, sobretodo musculo y tejido adiposo, y ha sido involucrado en la regulación de la lipólisis [51]. Sin embargo, su rol periférico continúa siendo poco conocido [50,52].

Así, en esta breve presentación de algunos de los protagonistas del control del metabolismo energético (y a falta de mencionar muchos otros igualmente importantes, como el cortisol, el peptido similar al glucagon 1, la resistina, la omentina, la vaspina, etc.), ya vemos que se trata de una función compleja, que abarca todos los niveles de regulación del organismo y afecta a prácticamente todos los tejidos, estableciéndose relaciones entre ellos que estamos muy lejos de entender con profundidad.

2.1.3 Metabolismo energético, obesidad e inflamación

Como se ha comentado anteriormente, a día de hoy se sabe que el tejido adiposo tiene una acción sistémica, actuando como órgano endocrino a través de la secreción de adipocinas. Además, a raíz del estudio de la obesidad, se ha descubierto que existe una interrelación muy estrecha entre el metabolismo energético y el sistema inmunitario, dando pie a la introducción del término "inmunometabolismo" [22,53,54].

Si bien es de suponer que, las conozcamos o no, las relaciones inmunometabólicas bidireccionales que se establecen entre el tejido adiposo y el resto del organismo se encuentran en equilibrio en el sujeto sano, en el obeso estas interacciones pueden verse alteradas. Este concepto representa la base de la "adiposopatía" [8,19]. Según esta teoría, si ante un balance energético positivo el organismo no responde con una hiperplasia homogénea de los adipocitos subcutáneos y viscerales sino con una hipertrofia selectiva del tejido adiposo visceral, esta expansión patológica se acompañará de una isquemia relativa que disparará la respuesta inflamatoria local, induciendo una alteración en el perfil de liberación de adipocinas con repercusiones sistémicas [45,55].

La adiposopatía es un concepto relativamente nuevo y aún debe consolidarse a nivel experimental, pero la evidencia apunta hacia que, efectivamente, en los obesos con peor control metabólico existe una hipertrofia y una hipoplasia relativa del tejido adiposo visceral ^[56,57] (**Figura 4**). También muestra que este tejido adiposo hipertrófico está sometido a un estrés hipóxico ^[55]. Y confirma que, en condiciones de hipoxia, el tejido adiposo disminuye la liberación de adiponectina ^[58] y aumenta la liberación de leptina ^[59]. En principio, como se ha comentado anteriormente, esta adaptación hormonal debería servir para recalibrar a la baja el umbral de equilibrio energético, provocando una pérdida de reserva energética y una disminución del tamaño de los adipocitos. Sin embargo, en los sujetos obesos se ha observado una resistencia a la acción de la leptina que limitaría enormemente el efecto beneficioso de esta medida reguladora ^[38].

Además, la obesidad induce un aumento de la migración de células inflamatorias hacia el tejido adiposo ^[20,53,54]. Posiblemente esta migración esté originada en los fenómenos de apoptosis relacionados con la hipoxia, aunque este punto es controvertido ^[55,60]. En cualquier caso, en el tejido adiposo de los sujetos obesos se ha observado una mayor población de macrófagos y un aumento de TNF, CCL2, IL-6 y otras citoquinas inflamatorias ^[20,22,53,54,61]. Estas citoquinas favorecen la infiltración por leucocitos mononucleares proinflamatorios, como los linfocitos T CD8+, T CD4+ h1 y B2, que, a su vez, promueven la migración de nuevos macrófagos y su diferenciación a estados pro-inflamatorios ^[53,62]. La liberación de citoquinas pro-inflamatorias en el tejido adiposo también provoca un aumento de la síntesis de PCR en el hígado ^[20], perpetuando un estado de inflamación leve pero crónica y sistémica.

Por otra parte, esta situación conlleva la aparición de una resistencia a la insulina. Una razón es que TNF interfiere en la fosforilación de IRS1 ^[20,22,30,61], limitando su función de transductor de la señal de la insulina en los adipocitos, y, aunque no está completamente demostrado en humanos, probablemente también a nivel sistémico ^[22,53]. Otra causa es que, en el tejido adiposo, la inflamación y la resistencia a la insulina generan un aumento de la lipólisis y la liberación de un exceso de AGL ^[26,27,63]. Los AGL interfieren de forma independiente con las vías de comunicación de la insulina ^[22,26] y también actúan como agentes proinflamatorios sistémicos,

amplificando la cascada de eventos que alteran el metabolismo energético [53,54,63]. Además, los AGL favorecen el acumulo ectópico de lípidos, sobretodo en hígado, musculo y vasos arteriales, potenciando las disfunciones específicas de estos tejidos [19,27,43].

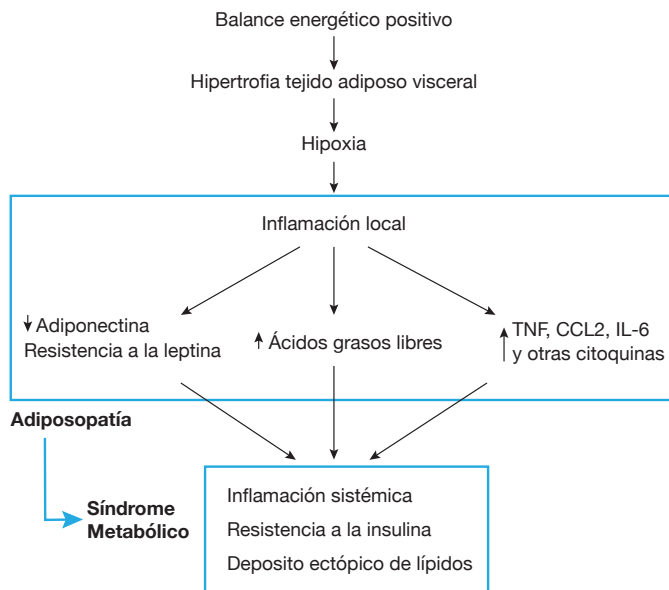


Figura 4. Adiposopatía. Esquema de las alteraciones metabólicas características de la adiposopatía y su relación con el síndrome metabólico.

La onda expansiva de la adiposopatía, sin embargo, podría ser aún más importante. Por ejemplo, la obesidad provoca una disminución de la secreción basal de ghrelina, una disminución de sus oscilaciones plasmáticas en relación a la ingesta y una pérdida del efecto orexigénico tras su infusión central y periférica [38-40]. Estas observaciones sugieren una pérdida de sensibilidad de las células productoras de ghrelina a sus estímulos reguladores, así como una resistencia hipotalámica a su acción. Una de las causas podría ser el efecto inhibitor del aumento de la insulina plasmática, que aparece como respuesta a la resistencia insulínica sistémica [40,64]. Y, debido a sus funciones antagónicas a nivel central, el incremento de leptina podría estar también involucrado con estos fenómenos, aunque no

hay datos sólidos para afirmarlo ^[39]. Dado que la ghrelina es una hormona que aumenta el apetito, esta situación podría ser comprendida como un intento de evitar la sobrealimentación en periodos de balance energético excesivamente positivo ^[39].

Menos se conoce de los efectos que la obesidad tiene sobre la visfatina, aunque diversos estudios apuntan a que su concentración plasmática estaría aumentada, correlacionándose positivamente con el IMC ^[33,65] y la concentración plasmática de citoquinas pro-inflamatorias ^[66]. Este aumento de visfatina podría contribuir a intentar mejorar la sensibilidad a la insulina, aunque a nivel central provocaría también un efecto orexigénico.

En resumen, los cambios metabólicos concretos que ocurren en la obesidad son complejos y no están del todo esclarecidos. Además, la presentación exhaustiva de las múltiples hormonas involucradas en estos procesos y sus interacciones con los diferentes tejidos del organismo queda fuera del alcance de este texto. Aun así, esta breve exposición ya permite entender la estrecha relación entre el metabolismo energético y las vías de la inflamación, y algunas de las múltiples maneras como la obesidad podría provocar las alteraciones sistémicas característicamente asociadas al SM.

No obstante, cabe mencionar que no todos los obesos sufren de complicaciones sistémicas ^[14]. Aunque no hay un consenso claro al respecto, se suele definir como "obesos sanos" a aquellas personas con IMC > 30 kg/m² que no presentan ninguna de las demás patologías características del SM ^[67]. Su prevalencia en la literatura es muy variable, con resultados muy dispares en función de la definición usada, el país, la franja de edad y el sexo, oscilando entre el 2% y el 28% ^[68]. Estos individuos, sin embargo, no deben considerarse completamente sanos ya que también presentan alteraciones características de los obesos en plasma y, en algunos estudios, aunque menor que el de los "obesos enfermos", continúan presentando un riesgo cardiovascular mayor que el de los sujetos delgados ^[69,70].

2.2 TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD

2.2.1 Estrategias de pérdida de peso

En un sentido estricto, el objetivo de cualquier tratamiento de la obesidad debe ser la pérdida de peso, asumiendo esta variable como subrogada a la pérdida de tejido adiposo ^[10]. En un sentido más amplio, la razón última de corregir la obesidad debería ser la de revertir la adiposopatía y sus consecuencias deletéreas para la salud ^[10,11]. Se ha comprobado que estos dos objetivos están relacionados, ya que, en pacientes obesos, la pérdida de peso se ha asociado a una disminución del riesgo cardiovascular, la DM2, la DLP la HTA, el SAHOS, el dolor articular, el cáncer, y la mortalidad global, así como a una mejoría de la calidad de vida ^[11,71].

Existen dos grandes familias de estrategias para perder peso: las basadas exclusivamente en el manejo médico, es decir, en dieta y fármacos, y las basadas fundamentalmente en técnicas de cirugía bariátrica ^[71,72]. El manejo médico ha demostrado su efectividad en términos de pérdida de peso y resolución de comorbilidades ^[71-74]. No obstante, el manejo quirúrgico ha demostrado en diversos estudios ser más eficaz que el manejo médico en la pérdida de peso, el control de las comorbilidades y el incremento de la calidad de vida ^[75-78]. Además, la cirugía bariátrica ha demostrado ser costo-efectiva ^[79]. Así pues, actualmente las guías internacionales recomiendan considerar la cirugía bariátrica tras un intento fallido de control médico en todos los pacientes con un IMC ≥ 40 kg/m² o un IMC ≥ 35 kg/m² y comorbilidades asociadas relacionadas con la obesidad ^[10,71,80].

2.2.2 Técnicas quirúrgicas para el tratamiento de la obesidad

Existen diferentes técnicas quirúrgicas para el control de la obesidad. A día de hoy, las dos más utilizadas son el bypass gástrico laparoscópico (BPGL) y la gastrectomía vertical laparoscópica (GVL) (**Figura 5**).

El BPGL se popularizó a principios de los años 90 y rápidamente se convirtió en la técnica de referencia de la mayoría de grupos ^[81,82]. Consiste en la confección de una bolsa gástrica de unos 25 cm³, la sección de la primera asa yeyunal unos 30 cm después del ángulo de Treitz y, finalmente, la reconstrucción del tránsito intestinal mediante una anastomosis gastroyeyunal (entre el cabo distal del asa yeyunal y la bolsa gástrica) y una anastomosis yeyuno-yeyunal (entre el cabo proximal del asa yeyunal, que vehicula las secreciones biliopancreáticas, y el yeyuno distal, unos 150 cm después de la anastomosis gastroyeyunal). Así, esta técnica combina el efecto restrictivo de la reducción gástrica y el efecto malabsortivo de la anastomosis yeyuno-yeyunal distal, que reducirá el tramo de intestino delgado con capacidad de absorber nutrientes ^[83].

La GVL es una técnica más sencilla que el BPGL y consiste en la creación de una manga gástrica tubular de unos 70 cm³ mediante una sección vertical completa y la posterior extracción del fundus gástrico. Así, en principio, la GVL presenta únicamente un componente restrictivo ^[84-86]. Inicialmente se utilizó como primer tiempo bariátrico en pacientes en los que, por sus características (IMC ≥ 60 kg/m², comorbilidades severas o edad > 60 años), no se consideraba seguro realizar de entrada otras técnicas más complejas, como el cruce duodenal o el BPGL ^[84,87]. No obstante, la evolución del peso y las comorbilidades de la mayoría de estos pacientes era tan satisfactoria que muchos no llegaban a requerir nunca el segundo tiempo quirúrgico para añadir el componente malabsortivo.

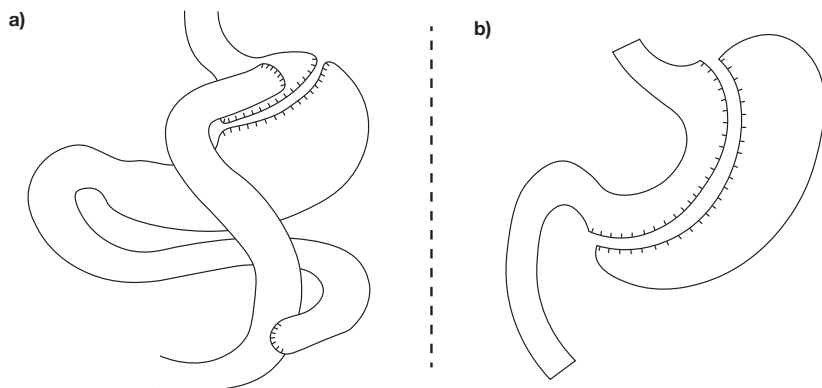


Figura 5. Cirugía bariátrica. Actualmente, las dos técnicas más comunes son el bypass gástrico (a) y la gastrectomía vertical laparoscópica (b).

Esta constatación fue recibida con sorpresa en el mundo de la cirugía bariátrica, donde se creía que era el componente malabsortivo el que realmente inducía la pérdida de peso^[81]. El hecho de que la resección del fundus pueda, por sí sola, mejorar el estado inmunometabólico de los pacientes obesos pone de manifiesto que mucho queda aún por descubrir respecto al mecanismo de acción molecular de la cirugía bariátrica.

Actualmente, las indicaciones para la GVL son similares a las del BPGL, aunque la tendencia en la práctica clínica suele ser la de proponer la GVL a los pacientes con menor exceso de peso o menos comorbilidades asociadas a la obesidad^[88]. En cambio, al tratarse de una técnica más rápida, la GVL podría seguir siendo considerada una opción mejor que el BPGL en pacientes con alto riesgo quirúrgico^[89]. La única diferencia importante es que la GVL mantiene el píloro intacto, y por tanto un sistema de alta presión intragástrica, haciendo que la enfermedad por reflujo gastroesofágico se considere una contraindicación relativa y la presencia de un esófago de Barret una contraindicación absoluta para la GVL^[90,91].

En todo caso, desde hace unos 15 años, la GVL se considera una técnica aceptable como procedimiento único y su popularidad ha ido creciendo hasta representar en el momento actual más del 45% de todas las cirugías bariátricas realizadas en el mundo^[85,92] (Figura 6).

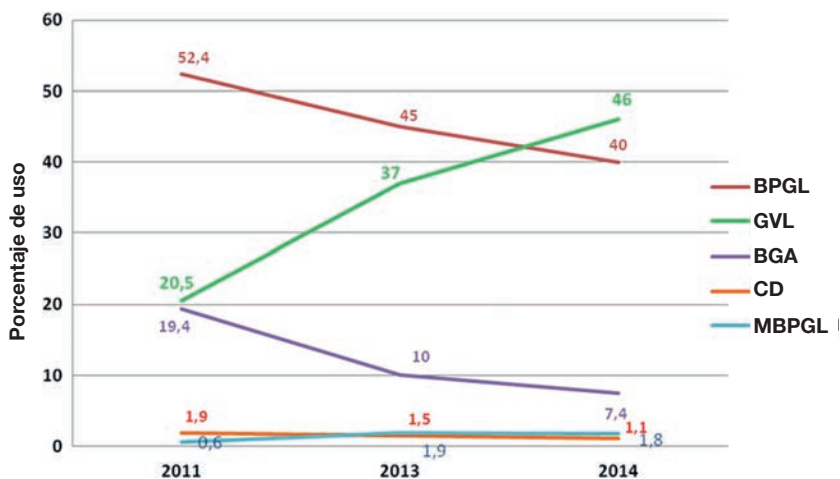


Figura 6. Tendencias en cirugía bariátrica. Porcentaje de uso de las diferentes técnicas quirúrgicas bariátricas a nivel mundial, según la encuesta realizada por la International Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders (IFSO) en 2014. BPGL: Bypass gástrico laparoscópico; GVL: Gastrectomía vertical laparoscópica; BGA: Banda gástrica ajustable; CD: Cruce duodenal; MBPGL: Mini-bypass gástrico laparoscópico. Adaptada de Angrisani et al., *Obesity Surgery*, 2017 ^[92].

Generalmente, durante las semanas previas a la realización de cualquiera de estas dos intervenciones, se insta al paciente a realizar una dieta de muy bajas calorías (DMBC) ^[93-96]. Aunque sus ≤ 900 kcal las hacen insuficientes para cubrir las necesidades diarias y no serían sostenibles a largo plazo, este tipo de dietas son bien toleradas durante periodos cortos de tiempo ^[94]. En su origen, la introducción de esta medida tenía el objetivo de concienciar al paciente del cambio vital que le supondría la cirugía, así como reducir las complicaciones quirúrgicas y aumentar la adherencia al seguimiento postoperatorio ^[93]. La realidad es que los datos publicados posteriormente muestran resultados contradictorios, aunque algunos estudios señalan que podría asociarse a una disminución de la estancia hospitalaria y una mayor pérdida de peso post-operatorio ^[93-97]. En todo caso, esta DMBC prequirúrgica se sigue utilizando de rutina en la

mayoría de centros, porque sí provoca una disminución del tamaño del hígado y de la cantidad de grasa intrabdominal, facilitando técnicamente los procedimientos ^[93,94,98].

2.2.3 Resultados de la cirugía bariátrica

La cirugía bariátrica ha demostrado lograr una importante mejoría en términos de pérdida de peso y resolución de comorbilidades ^[77,78,88,99-101]. En 2004, un metaanálisis que incluía a más de 20.000 pacientes intervenidos mediante diferentes técnicas bariátricas informaba de una pérdida media de un 61% del exceso de peso, una resolución media de las comorbilidades en torno al 70% y una mortalidad menor al 0,5% ^[99]. Otro metaanálisis de estudios publicados entre 2003 y 2012, con más de 160.000 pacientes, obtenía resultados similares ^[102].

Debido a ser una técnica más antigua, se dispone de más experiencia clínica y, sobre todo, mucha más información básica acerca del BPGL que de la GVL. Sin embargo, existen al menos dos metaanálisis basados en estudios aleatorizados que apuntan a que los resultados clínicos del BPGL y la GVL serían equiparables ^[78,100]. Y, aunque otro metaanálisis más reciente encontró que el BPGL podría producir una mayor pérdida de peso a largo plazo, no encontró diferencias en términos de resolución de comorbilidades ^[103].

Además, las dos técnicas han demostrado disminuir la PCR plasmática postoperatoria, variable habitualmente usada como subrogada del estado proinflamatorio asociado a la obesidad ^[104,105]. Y ambas se asocian también en plasma a un aumento de la adiponectina ^[106-108], una disminución de la leptina ^[106,107,109] y una mejoría de los índices de resistencia a la insulina ^[110-112], traduciendo una reversión de la adiposopatía ^[113-115].

2.3 OBESIDAD Y EXPRESIÓN GÉNICA

2.3.1 Cambios en la expresión génica asociados a la obesidad

Tal y como se ha expuesto anteriormente, la obesidad altera completamente la homeostasis sistémica. Esta alteración, como sería esperable, se traduce en cambios en la expresión de múltiples genes relacionados con las vías de la inflamación y el metabolismo energético en diferentes tejidos [116,117].

En este sentido, el tejido adiposo ha sido el más estudiado. Por ejemplo, Merkestein *et al.* [118] compararon la expresión de diferentes rutas metabólicas entre ratones normales y ratones genéticamente manipulados para ser obesos mediante la adición de dos copias adicionales del gen *FTO*, hallando, en la grasa visceral de los ratones obesos, un incremento de la expresión de las vías anabólicas incluso antes de que se apreciara una diferencia de peso entre grupos. Pietiläinen *et al.* [119] comprobaron en un grupo de gemelos homocigotos como la obesidad adquirida aumentaba la expresión de *TNF* y leptina y disminuía la de *PPARG* en tejido adiposo subcutáneo. Comparando el tejido adiposo de personas obesas y con normopeso, Terra *et al.* [34] observaron un aumento de la expresión de visfatina y Lappalainen *et al.* [120] un aumento de la expresión de *FTO* en obesos. Por el contrario, otros dos trabajos [51,52] encontraron que la expresión de *FTO* en tejido adiposo se correlacionaba negativamente con el *IMC*.

Sin embargo, se han encontrado cambios en la expresión génica relacionados con la obesidad en muchos otros tejidos, entre los que se incluyen el músculo [118], el miocardio [121] o el estómago [122]. Además, un reciente estudio de asociación ha descrito que tanto el tejido adiposo como el esófago, el tejido nervioso, el páncreas, la glándula pituitaria y la piel presentan perfiles de expresión génica diferencial fuertemente relacionados con el *IMC* [123].

A pesar de no tener, a priori, un papel metabólicamente tan relevante, los leucocitos de sangre periférica (LSP) han sido también extensamente estudiados [63,117,120,124]. La estrecha relación existente entre el tejido adiposo y el sistema inmunitario, puesta de manifiesto en la

fisiopatología de la adiposopatía, apunta a que el análisis de la expresión génica en LSP podría jugar un papel importante en la valoración del estado metabólico de los pacientes obesos. Por ejemplo, en la sangre de pacientes obesos se ha detectado un aumento de la expresión de *PPARG*, así como de la apoptosis, de las vías ribosomales, de la fosforilación oxidativa y del metabolismo lipídico, que traducirían, respectivamente, un incremento de la muerte celular, de la síntesis proteica y de las demandas energéticas, presumiblemente en relación a estímulos lipotóxicos o proinflamatorios [117,124]. Además, en las células mononucleadas sanguíneas de personas obesas se ha encontrado incrementada la transcripción de *IL-6*, *TNF* y otras citoquinas [63].

Por otra parte, y a diferencia de los demás tejidos, los LSP pueden obtenerse de forma sencilla, económica y con apenas morbilidad, incluso de forma seriada. Estas características les convierten en candidatos perfectos para el desarrollo de biomarcadores que permitan predecir la respuesta clínica a los diferentes tratamientos propuestos para la obesidad [117,125]. Por el momento, Wang *et al.* [126] han encontrado que una baja expresión de miR-448 o una alta expresión de la proteína SIRT1 en sangre podría predecir la resolución de DM2 tras GVL. Además, Novais *et al.* [127] han descrito un SNP (rs3813929 genotipo TT) que podría permitir predecir una mayor pérdida de peso al año del BPGL.

2.3.2 Cambios en la expresión génica tras cirugía bariátrica

Dado que la pérdida de peso, incluso en porcentajes pequeños [128,129], permite paliar la mayoría de los efectos deletéreos de la obesidad a nivel clínico y bioquímico [77,78,99], cabe preguntarse si la mejoría clínica tras cirugía bariátrica se traduce en una normalización de los cambios en la expresión génica asociados a la obesidad. Y, en tal caso, si se logra reestablecer una situación equiparable a la de los sujetos delgados que nunca sufrieron de obesidad.

De nuevo, las células más estudiadas para intentar responder a esta cuestión han sido los adipocitos [115]. Y, efectivamente, se ha encontrado una expresión diferencial de ciertos genes entre antes y después de una cirugía bariátrica. Tras la intervención se ha encontrado un aumento de

la expresión de los genes involucrados en el metabolismo lipídico, un descenso de los genes relacionados con la inflamación y una disminución de la expresión de leptina ^[115,130]. Esto representaría un perfil de expresión más próximo al de los adipocitos de los sujetos delgados, aunque existen estudios que indican que continuaría sin normalizarse completamente incluso años después de la cirugía ^[130,131].

El perfil de expresión de LSP tras cirugía bariátrica también ha sido analizado, encontrándose, en términos generales, una mejoría postoperatoria ^[125,132-135]. En estudios realizados sobre pacientes obesos a los que se colocó una banda gástrica o se realizó un BPGL, y con muestra obtenidas entre 3 y 6 meses después de la intervención, se ha descrito un aumento de la expresión del polipéptido inhibidor gástrico ^[136], una disminución de la expresión de leptina y resistina ^[133] y un incremento postoperatorio de la expresión de adiponectina que la situaba a niveles del grupo control ^[132]. Por otro lado, en un estudio de asociación de genoma completo con células mononucleadas antes y 6 meses después de un BPGL, se encontró una expresión diferencial de más de 1.300 genes que abarcaban una multitud de funciones celulares, incluidas el metabolismo lipídico y las vías inflamatorias, y concluyendo que el perfil postoperatorio era similar al de los controles delgados ^[134].

Sin embargo, solamente existen en la literatura dos trabajos que estudien la expresión en sangre tras una GVL, y lo hacen de forma parcial. En el primero, Berisha *et al.* ^[125] analizaron sangre obtenida de 11 sujetos obesos tributarios de cirugía bariátrica 2 semanas antes y entre 6 y 12 meses después de la intervención, habiendo recibido 7 de ellos un BPGL y 4 una GVL. Utilizando chips de ADN con más de 48.000 sondas, hallaron cambios en unos 200 genes implicados en el metabolismo lipídico, la expresión génica y el procesamiento de moléculas pequeñas (aquellas con peso molecular inferior a 900 daltons, como aminoácidos o monosacáridos). Desafortunadamente, para aumentar la potencia estadística, las muestras de los dos tipos de cirugías se analizaron conjuntamente, no siendo posible identificar los efectos exclusivamente atribuibles a la GVL. En el otro estudio, Trachta *et al.* ^[135] obtuvieron sangre de una cohorte de 13 mujeres obesas sin DM2 una semana antes y a los 6, 12 y 24 meses de una GVL,

con el objetivo de analizar 45 genes relacionados con la inflamación en monocitos CD14+. Encontraron un aumento de la expresión de *NAMPT* a los 6 meses de la cirugía y del ligando 1 de quimiocinas motivo C-C (*CCL1*) a los 12 meses. No obstante, la expresión de ambos genes volvió a niveles prequirúrgicos en las muestras obtenidas a los 24 meses de la intervención.

2.4 OBESIDAD Y EPIGENÉTICA

2.4.1 Regulación epigenética de la expresión génica

Por regulación epigenética se entienden todas aquellas modificaciones de la función celular, heredables por meiosis y/o mitosis, que no pueden ser explicadas por cambios en la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN). Una de las características más importantes de las modificaciones epigenéticas es que son reversibles, situándose en un punto intermedio entre la información contenida en el ADN, que es inalterable, y los factores de transcripción, que no pueden ser transmitidos durante la división celular ^[137-139]. A nivel del ADN, se han descrito tres grandes tipos de modificaciones epigenéticas ^[137,139,140]: las modificaciones de las histonas, la presencia de ARN no codificante y la metilación del ADN.

Modificaciones de las histonas

Las histonas son unos complejos proteicos que se unen al ADN para darle estabilidad, aunque su presencia genera un obstáculo para la transcripción génica. Estas proteínas pueden sufrir diferentes alteraciones, en forma de metilación, acetilación, fosforilación o sumoilación, modificando su capacidad de unión con diferentes regiones del ADN y, por tanto, la facilidad con la que los factores de transcripción podrán alcanzar estas regiones.

ARN no codificante

El ARN no codificante es ARN funcional, pero que no se traduce en una proteína. Puede ejecutar cambios epigenéticos al atraer conglomerados de proteínas sobre una porción concreta de ADN, formando heterocromatina e impidiendo su transcripción.

Metilación del ADN

Consiste en la unión covalente de un grupo metilo en la base de la citosina, el cual protruye hacia el surco de la doble hélice del ADN. Estos grupos metilo sólo pueden unirse a las citosinas si estas van seguidas de una guanina, de modo que generalmente se les refiere como "sitios CpG", donde la p representa la unión covalente de la citosina y la guanina con un fosfato. En caso de encontrarse en la región promotora del gen, esta modificación impediría la unión de los factores de transcripción, inhibiendo la expresión del gen (Figura 7). No obstante, la metilación de otras regiones podría tener un efecto contrario.

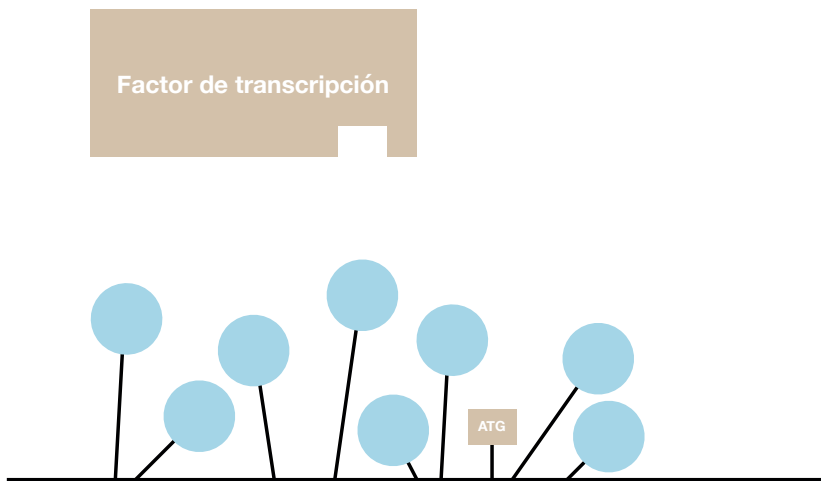


Figura 7. Metilación del ADN. Representación esquemática del efecto de la metilación del ADN en regiones promotoras. Los círculos azules representan los grupos metilo unidos a los sitios CpG, impidiendo la unión de los factores de transcripción a sus puntos de anclaje en el ADN (codón ATG).

2.4.2 Cambios de metilación del ADN asociados a la obesidad

Habiéndose descrito en la obesidad cambios clínicos y bioquímicos asociados a cambios de expresión génica, parece lógico preguntarse si la regulación a nivel epigenético juega también un papel en la fisiopatología de la obesidad. Y, a pesar de tratarse de un campo de investigación relativamente reciente, los resultados obtenidos hasta la fecha parecen indicar que sí podría existir dicha relación ^[140-142].

De los tres tipos de modificaciones epigenéticas expuestas previamente, la metilación del ADN es la que ha sido más ampliamente estudiada en la obesidad ^[140]. Inicialmente se realizaron estudios de metilación global del genoma sobre elementos repetitivos, como los *long interspersed nuclear elements* (LINE), donde, a diferencia de los trabajos realizados previamente en cáncer, no se obtuvieron resultados consistentes ^[140,141]. Una estrategia distinta, basada en analizar selectivamente la metilación del ADN en regiones promotoras de genes candidatos, ha dado más frutos ^[140,142]. Por ejemplo, Hermsdorff *et al.* ^[143] encontraron en LSP una hipometilación del promotor de *TNF* en mujeres con mayor adiposidad y Obermann-Borst *et al.* ^[144] describieron una menor metilación de leptina en sangre de niños con mayor IMC.

Sin embargo, el reciente desarrollo de técnicas para analizar simultáneamente el estado de metilación de grandes regiones específicas de ADN ha permitido llevar a cabo estudios de mayor envergadura, similares a los utilizados para investigar la expresión de genomas completos. Así, en un estudio de asociación en tejido adiposo se describió que diferentes perfiles de metilación del ADN se correlacionaban con el valor de diferentes índices fenotípicos de obesidad, como el IMC o el índice cintura /cadera ^[145]. En otro, se encontró que en la grasa subcutánea de mujeres obesas y no obesas existía una metilación diferencial de abundantes genes relacionados con la adipogénesis, la señalización insulínica y la lipólisis, y que la expresión de estos genes era congruente con su estado de metilación ^[146]. También se han realizado estudios de asociación en sangre, como el de Dick *et al.* ^[147] o el de Xu *et al.* ^[148]. En el primero se describieron, en LSP de una cohorte de descendencia europea, tres sitios CpG cuyo estado de metilación se correlacionaba con el IMC. En el segundo, que entre afroamericanos

obesos y delgados existía una metilación diferencial en el ADN de regiones promotoras de diversos genes asociados a la DM2, la HTA y la DLP.

El uso de la metilación del ADN en LSP como biomarcador con capacidad predictiva de la respuesta al tratamiento de la obesidad ha sido mucho menos estudiado. En su trabajo, Nicoletti *et al.* [149] encontraron que una hipometilación basal del gen *SERPINE-1* se asociaba a una mayor pérdida de peso a los 6 meses de un BPGL. En cambio, Coppedè *et al.* [150] analizaron el estado de metilación de los genes de la leptina, la ghrelina y el factor 2 de crecimiento de la insulina, sin encontrar que permitieran predecir la evolución tras BPGL.

2.4.3 Cambios de metilación del ADN tras cirugía bariátrica

Una de las características de la regulación epigenética es su reversibilidad [137]. No obstante, esto no significa automáticamente que el estado de metilación del ADN de una persona adulta se tenga que normalizar tras la pérdida de peso inducida por una cirugía bariátrica, por lo que diferentes estudios en múltiples tejidos se han realizado para intentar esclarecer este punto [140,142,149,151-156].

En sangre, un estudio de asociación describió una metilación diferencial en el ADN de 51 promotores entre antes y 6 meses después de la cirugía [151]. También se ha observado un aumento de la metilación del promotor de *IL-6* y *TNF* al año de la intervención [152], aunque, por el contrario, en otro estudio a los 6 meses postoperatorios la metilación de *IL-6* se encontró disminuida [149]. En tejido adiposo se ha descrito una disminución global de la metilación al año y medio de la cirugía [153]. En músculo, que a los 6 meses postoperatorios el patrón global de metilación se equiparaba al de un grupo de controles delgados [154]. En pacientes obesos con esteatosis hepática no alcohólica, que el perfil de metilación se normalizaba parcialmente en las biopsias hepáticas tomadas entre 5 y 9 meses tras la intervención [155]. Incluso en espermatozoides de pacientes obesos se ha descrito una remodelación postquirúrgica del perfil de metilación, sobre todo en regiones asociadas al control central de la ingesta [156]. En términos generales, pues, los resultados sí parecen evidenciar una mejoría postoperatoria del perfil de metilación del ADN.

Estos trabajos, sin embargo, se han realizado exclusivamente en BPGL. Hasta la fecha, únicamente un estudio ha investigado la evolución epigenética tras una GVL. Martin-Nuñez *et al.* ^[157] analizaron la sangre de 60 pacientes, 31 tras un BPGL y 29 tras una GVL, y compararon la metilación global del genoma en LINE-1 antes y a los 6 meses de la intervención, no hallando diferencias ni entre los dos tiempos ni entre los dos tipos de cirugía. También analizaron selectivamente la metilación del ADN del promotor de *TNF*, encontrándolo aumentada tras la GVL en el subgrupo de 14 pacientes diabéticos.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Tal y como se ha comentado anteriormente, la obesidad provoca cambios sistémicos a nivel molecular, potencialmente reversibles tras una cirugía bariátrica. Al ser una técnica relativamente nueva, poco se conoce del mecanismo de acción molecular subyacente a la GVL, que no tiene porqué ser necesariamente el mismo que en otras técnicas más estudiadas. Por otro lado, el análisis de LSP tiene ventajas respecto a otros tejidos, como la facilidad para obtener muestras seriadas, y, potencialmente, podría permitir monitorizar el estado inmunometabólico de los pacientes bariátricos y predecir su respuesta a la GVL.

Así, la hipótesis que se propone en este estudio es que en LSP de pacientes obesos con indicación de cirugía bariátrica, la realización de una GVL induce cambios detectables de expresión y metilación del ADN de regiones promotoras en genes relacionados con la inflamación y el metabolismo energético.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Estudiar, en LSP de pacientes obesos con indicación de cirugía bariátrica, los cambios inducidos por la realización de 2 semanas de DMBC seguida de una GVL en la expresión y la metilación del ADN de regiones promotoras de una serie de genes relacionados con la inflamación y el metabolismo energético, así como investigar su asociación con diferentes variables clínicas y bioquímicas.

3.3 OBJETIVOS PARTICULARES

El objetivo general se concreta en los siguientes objetivos particulares:

1. Valorar la calidad del proceso de pérdida de peso en términos de evolución ponderal, mejoría de parámetros bioquímicos y resolución de comorbilidades.
2. Analizar, en LSP de un grupo de pacientes bariátricos y en comparación con un grupo control, la evolución de la expresión de una serie de genes relacionados con la inflamación y el metabolismo energético (*GHRL*, *NAMPT*, *IRS1*, *FTO*, *LEP*, *PPARG*, *ADIPOQ*, *FASN*, *MCR4*, *FAS*, *TNF* y *CCL2*) a lo largo del proceso de pérdida de peso.
3. Analizar, en LSP de un grupo de pacientes bariátricos y en comparación con un grupo control, la evolución de la metilación del ADN de regiones promotoras de una serie de genes relacionados con la inflamación y el metabolismo energético (*GHRL*, *NAMPT* y *FAS*) a lo largo del proceso de pérdida de peso.
4. Investigar la asociación entre los niveles de expresión y metilación de los genes estudiados en LSP de pacientes bariátricos antes de cualquier intervención y diferentes perfiles basales de obesidad, así como su capacidad de predecir la evolución del peso y la resolución de comorbilidades al año de la GVL.



MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se diseñó un estudio descriptivo, prospectivo y unicéntrico en el *Hospital Universitari Germans Trias i Pujol* (Badalona, España) con una cohorte de voluntarios delgados y sanos (grupo control) y una cohorte de pacientes bariátricos (grupo PB) sometidos a un condicionamiento prequirúrgico con dos semanas de DMBC seguido de una GVL.

En el grupo PB se recogieron datos clínicos y antropométricos de forma prospectiva a lo largo de un periodo de seguimiento de un año, registrándose específicamente para el estudio en 4 puntos del tiempo (**Figura 8**). En este grupo, además de los controles analíticos rutinarios, se obtuvieron también muestras de sangre venosa periférica, específicas para el estudio, en 3 de estos 4 puntos del tiempo analizados. Estas muestras se utilizaron para las determinaciones bioquímicas, el estudio hormonal y la obtención de los ácidos nucleicos necesarios para el análisis molecular. En el grupo control, los datos clínicos y antropométricos se recogieron en el momento de la inclusión al estudio, junto a una única muestra de sangre específica para el estudio.

Puntos de tiempo estudiados:

- Tiempo 0 (t0): En el momento de la inclusión, antes de iniciar ninguna intervención médica o quirúrgica específica. Se obtuvo una muestra de sangre en consultas externas.
- Tiempo 1 (t1): Después de las 2 semanas de DMBC y antes de realizar la GVL. Se obtuvo una muestra de sangre en el antequirófono.
- Tiempo 2 (t2): Seis meses después de la GVL. Se obtuvo una muestra de sangre en consultas externas.
- Tiempo 3 (t3): Un año después de la GVL. No se acompañó de muestra de sangre específica.

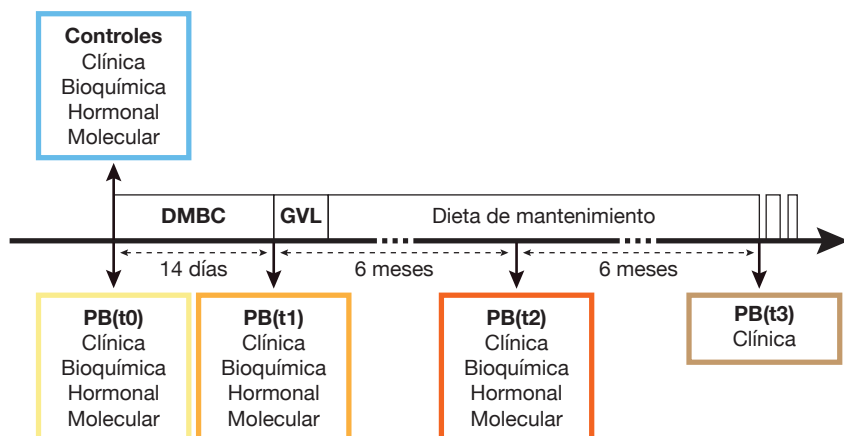


Figura 8. Diseño del estudio. Esquema del diseño general del estudio y el tipo de información recogida en cada punto del tiempo. DMBC: Dieta de muy bajas calorías; GVL: Gastrectomía vertical laparoscópica; PB(t0): Grupo de pacientes bariátricos antes de recibir ninguna intervención; PB(t1): Grupo de pacientes bariátricos después de la dieta y justo antes de la gastrectomía; PB(t2): Grupo de pacientes bariátricos 6 meses después de la gastrectomía; PB(t3): Grupo de pacientes bariátricos 1 año después de la gastrectomía.

Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del centro (referencia de la resolución: EO-12-048) y todos los participantes firmaron un consentimiento informado antes de ser incluidos.

4.1.1 Participantes

Durante un periodo de reclutamiento de un año (de julio de 2013 a junio 2014), se incluyeron de forma consecutiva todos aquellos pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y no presentaban criterios de exclusión. Durante el reclutamiento, a todos los participantes se les realizó una anamnesis completa, una exploración física exhaustiva y una analítica sanguínea. También se revisaron las historias clínicas electrónicas del *Hospital Universitari Germans Trias i Pujol* y el *Institut Català de la Salut*.

Los criterios de inclusión fueron:

1. Tener indicación para recibir una cirugía bariátrica según los criterios definidos en las guías internacionales ^[10,71,80]:
 - a) Tener un IMC ≥ 40 kg/m² ó IMC ≥ 35 kg/m² + comorbilidades asociadas a la obesidad (HTA, DM2, DLP, SAHOS, esteatohepatitis no alcohólica, cardiopatía isquémica, enfermedad por reflujo gastroesofágico, asma, enfermedad por éstasis venoso distal, incontinencia urinaria severa, artropatía severa y limitación severa de la calidad de vida por falta de movilidad).
 - b) Tener entre 18 y 60 años de edad.
 - c) Presentar obesidad de larga duración (> de 5 años).
 - d) Haber fracasado en un intento previo de control del peso mediante dieta y terapia conductual y no presentar otra causa reversible de obesidad.
 - e) Ser capaz de entender y firmar un consentimiento informado y estar motivado para mantener un control clínico y dietético periódico a largo plazo.
 - f) No presentar reflujo gastroesofágico severo demostrado por pHmetría, esofagitis grado C según la clasificación de Los Angeles ^[158] o esófago de Barret.
 - g) No presentar contraindicaciones mayores (riesgo quirúrgico inaceptable, expectativa de vida limitada por otra enfermedad, patología maligna activa, adicción activa a alcohol o drogas, etc).
2. Recibir la aprobación del caso por el Comité Multidisciplinar de Obesidad del centro y la aceptación por parte del paciente a recibir una GVL.

Los criterios de exclusión fueron:

1. Tener un antecedente personal de enfermedad neoplásica.

2. Presentar una enfermedad sistémica activa no relacionada con la obesidad. El hipotiroidismo no se consideró un criterio de exclusión dada la creciente evidencia de que la obesidad podría causar una elevación de la tirotrponina ^[88,159-161].

Durante el periodo de reclutamiento, 39 pacientes obesos cumplieron los criterios de inclusión. Cuatro fueron excluidos por presentar enfermedades sistémicas no relacionadas con la obesidad: uno por un síndrome de Rendu-Osler, otro por hipopituitarismo, otro por un síndrome de Cushing y otro por hiperparatiroidismo. Finalmente, el grupo PB fue de n=35. Asimismo, se reclutó como grupo control una cohorte controlada por edad y sexo de voluntarios delgados, sanos y no fumadores, con n=33.

4.1.2 Intervenciones

Dieta de muy bajas calorías (DMBC)

Siguiendo el protocolo estandarizado de la institución para cirugía bariátrica, los pacientes recibieron una DMBC durante las dos semanas previas a la intervención quirúrgica. Esta dieta consistía en la ingesta de 900 kcal al día repartidas en 4 batidos de 225 kcal cada uno (22,5 gr de proteínas, 7,5 gr de lípidos y 16,8 gr de carbohidratos), para un volumen total de 1500 mL/día (Optifast, Nestle, Esplugues, España). Además, los pacientes estaban autorizados a masticar chicle sin azúcar y beber agua, té negro y refrescos sin azúcar a voluntad, así como a tomar al día una gelatina sin azúcar, pollo, ternera o caldo vegetal con menos de 10 kcal por porción.

Durante este periodo de dos semanas, los pacientes eran valorados presencialmente una vez y disponían además de un teléfono de contacto para resolver inmediatamente cualquier duda que pudiera aparecer.

Gastrectomía vertical laparoscópica (GVL)

La GVL consistió en la confección de una manga gástrica vertical a través de 5 puertos laparoscópicos. Con el paciente colocado en decúbito supino, se creó un neumoperitoneo de 12mmHg a través de una aguja

de Veress y se procedió a la colocación de los trócares. Tras la disección de la curvatura mayor y la coagulación de los vasos cortos, se introdujo por vía oral una sonda de Fouchet de 36 French (12mm) de diámetro, emplazada endoluminalmente a lo largo de la curvatura menor gástrica. A continuación, se identificó el píloro y se realizó la sección vertical del estómago utilizando una endograpadora quirúrgica laparoscópica. Se empezó la sección a unos 5 cm del píloro y se ascendió progresivamente hasta el ángulo de Hiss, logrando una banda gástrica remanente de unos 70cm³ de volumen (**Figura 5**). Se reforzó la línea de sección mediante una sutura continua manual y, finalmente, se extrajo el fundus gástrico por la incisión ampliada de uno de los trocares laparoscópicos.

Dieta de mantenimiento

Los pacientes fueron mantenidos con una dieta semilíquida durante las 2 primeras semanas postoperatorias, reintroduciéndose progresivamente una dieta equilibrada convencional de alrededor de 2.000 kcal/día ajustada a su peso real y actividad física, y acompañada de suplementos multivitamínicos. Además del control postoperatorio quirúrgico, todos los pacientes mantuvieron un control nutricional y endocrinológico periódico durante el transcurso del estudio.

4.2 VARIABLES CLÍNICAS Y BIOQUÍMICAS

4.2.1 Variables antropométricas

En el momento de la inclusión, se recogió el peso (en kilogramos) y la talla (en metros) de todos los sujetos. El peso de los pacientes se continuó recogiendo prospectivamente hasta completar el año de seguimiento postquirúrgico. A partir de estos datos antropométricos básicos, se calcularon las variables relacionadas con el peso corporal utilizadas en el estudio.

Índice de masa corporal (IMC)

Calculado según la siguiente fórmula: $IMC = \text{peso (kg)} / \text{talla (m)}^2$. A pesar de tratarse de uno de los primeros índices diseñados con el objetivo de relacionar el tamaño de una persona con su peso (fue descrito por A. Quetelet en 1832^[162]), se sigue considerando como uno de los más relevantes al tratarse de una variable sencilla, económica y bien correlacionada con el porcentaje de grasa corporal^[10]. Para facilitar el análisis de la evolución del peso durante el conjunto de intervenciones del estudio (DMBC y GVL), se decidió utilizar siempre como referencia el peso en el momento de la inclusión (t0), en lugar de, como defienden algunos grupos, utilizar el peso inmediatamente preoperatorio (t1) como referencia para calcular la evolución postoperatoria del peso.

Peso total perdido (PTP)

Calculado según la siguiente fórmula:

$$PTP_{(tx)} = \text{peso}_{(t0)} - \text{peso}_{(tx)}$$

Porcentaje de peso total perdido (%PTP)

Calculado según la siguiente fórmula:

$$\%PTP_{(tx)} = [(\text{peso}_{(t0)} - \text{peso}_{(tx)}) / \text{peso}_{(t0)}] \cdot 100.$$

Porcentaje de exceso de peso perdido (%EPP)

Siendo el "peso ideal" aquel que correspondería a un IMC de 25 para la talla del paciente, el %EPP fue calculado según la siguiente fórmula:

$$\%EPP_{(tx)} = [(\text{peso}_{(t0)} - \text{peso}_{(tx)}) / (\text{peso}_{(t0)} - \text{peso ideal})] \cdot 100$$

4.2.2 Variables bioquímicas generales

Todas las muestras de sangre utilizadas para el estudio bioquímico básico fueron obtenidas mediante venopunción periférica entre las 7:00 y las 8:00 de la mañana, tras una noche de ayuno, y recogidas en tubos tratados con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). En el grupo PB se

estudiaron 3 puntos del proceso de pérdida de peso (t0, t1 y t2), mientras que en el grupo control sólo uno (t0).

Según las técnicas estandarizadas del laboratorio del Servicio de Bioquímica Clínica del *Hospital Universitari Germans Trias i Pujol* (Badalona, España), se realizaron las siguientes determinaciones: glucosa, triglicéridos, colesterol, lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), transaminasa glutámico pirúvica (GPT), PCR, insulina y hemoglobina glucosilada (HbA1c).

Los parámetros bioquímicos habituales se determinaron mediante el analizador automático Cobas c-711 Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). La glucosa mediante el método enzimático de la glucosa-hexoquinasa. Los triglicéridos mediante el método enzimático de lipasa/GPO/PAP (Glicerol fosfato/peroxidasa aminofenazona). El colesterol total mediante el método enzimático de la colesterol-esterasa / colesterol-oxidasa. El colesterol HDL mediante método directo inmuno-enzimático. El colesterol LDL mediante la fórmula de Friedewald (Colesterol LDL (mg/dL) = Colesterol Total - [Colesterol HDL + Triglicéridos/5]). Y, finalmente, la GPT se calculó mediante el método enzimático de alanina-oxoglutarato / lactato NAD.

La determinación de PCR se realizó mediante un ensayo inmuno-turbimétrico (Beckman Coulter AU, Beckman Coulter Ireland Inc., Maryfort, Irlanda), con un coeficiente de variación interensayo <1,7% y <4,9% a concentraciones de 59,3 mg/L y 0,2 mg/L, respectivamente, y una sensibilidad de 0,02 mg/L.

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

La HbA1c se determinó mediante la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento con un analizador completamente automatizado (Adams Menarini Hi-AUTO A1c 8160, Arkray, Kyoto, Japón), con un

coeficiente de variación interensayo de 1,8% y 1,5% a niveles de HbA1c de 4,8% y 9%, respectivamente (rango de referencia: 4-5,8%).

Por otro lado, la resistencia a la insulina fue valorada mediante el *homeostatic model assessment of insulin resistance* (HOMA-IR), calculado según la siguiente fórmula:

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

Ascaso *et al.* [163] estudiaron una cohorte de población española, de niendo que el percentil 90 de la subpoblación sin parámetros clínicos ni analíticos de síndrome de resistencia a la insulina se situaba en un HOMA-IR de 3,8, por lo que este fue el umbral usado para definir la resistencia insulínica. Excepcionalmente, se utilizaron también para este estudio los valores de HOMA-IR en el grupo PB al año de la GVL (t3). Estos datos fueron obtenidos de una analítica de rutina realizada fuera del marco de este estudio, pero analizada en el mismo laboratorio y mediante el mismo método.

4.2.3 Variables hormonales

Todas las muestras de sangre utilizadas en el análisis hormonal fueron obtenidas mediante venopunción periférica entre las 7:00 y las 8:00 de la mañana, tras una noche de ayuno, y recogidas en tubos tratados con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Las determinaciones se realizaron según las técnicas estandarizadas del Servicio de Bioquímica Clínica del *Hospital Universitari Germans Trias i Pujol* (Badalona, España). En el grupo PB se estudiaron 3 puntos del proceso de pérdida de peso (t0, t1 y t2), mientras que en el grupo control sólo uno (t0).

La concentración de ghrelina en plasma fue medida utilizando una técnica de radioinmunoensayo de doble anticuerpo (Ghrelin Total RIA, número #GHRT-89HK, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EE.UU.), con un coeficiente de variación intraensayo <10%, un coeficiente de variación interensayo <16% y una sensibilidad de 93 pg/mL.

La concentración de visfatina en plasma fue medida utilizando una técnica de inmunoensayo de enzima específica (NAMPT (Visfatin/PBEF) (human) ELISA Kit, número AG-45A-0006YPP-KI01, AdipoGen, Liestal, Suiza), con unos coeficientes de variación intra- e interensayo <10% y una sensibilidad de 0,03 ng/mL.

4.2.4 Comorbilidades

Se definieron e investigaron específicamente las comorbilidades incluidas en el denominado SM (DM2, HTA y DLP) [16,18]. El resto de comorbilidades se recogieron de acuerdo a la información obtenida en la valoración realizada durante el reclutamiento. Aparte de las analíticas, no se realizaron otras exploraciones complementarias específicas para este estudio. La resolución de las comorbilidades asociadas al SM se valoró al año de la GVL (t3), considerándose como resolución únicamente las remisiones completas.

Diabetes mellitus tipo 2

Siguiendo las recomendaciones de la *American Diabetes Association*, en el momento de la inclusión se definió la presencia de diabetes mellitus tipo II (DM2) como una glucemia en plasma tras 8 horas de ayuno superior a 126 mg/dL o una HbA1c superior al 6,5% en dos determinaciones diferentes, así como la necesidad de utilizar medicación antiglucemiante para mantener cifras inferiores a las descritas [164]. En caso de que el paciente estuviera tomando medicación, esta fue también registrada. También se recogió la glucemia alterada en ayunas, definida como una glucemia en plasma tras 8 horas de ayuno entre 100 y 125 mg/dL, aunque a efectos del estudio no se consideró una morbilidad.

La DM2 se consideró en remisión completa cuando la glucosa en plasma tras 8 horas de ayuno fue <100mg/dL y la HbA1c ≤6.5%, sin necesidad de medicación antiglucemiante y tras un año de seguimiento tras la GVL [165-167].

Hipertensión arterial

La presión arterial normal se define como una presión sistólica <120mmHg y una diastólica <80 mmHg ^[168]. En personas jóvenes por lo demás sanas, sólo se recomienda iniciar tratamiento farmacológico para la HTA cuando la presión arterial sistólica es >140 mmHg o la presión arterial diastólica >90 mmHg, en dos determinaciones diferentes tomadas en condiciones de reposo por profesionales sanitarios ^[168,169]. Sin embargo, en pacientes con un alto riesgo cardiovascular, el tratamiento farmacológico se recomienda a partir de cifras más bajas, 130/80 mmHg ^[168]. Se trata, pues, de una variable continua con una "zona gris" en la que la importancia de sobrepasar el límite teórico de la normalidad vendrá determinada no sólo por sus cifras absolutas sino también por las características del paciente. Esto dificulta su conversión a una variable de tipo dicotómico que permita establecer un corte claro entre aquellos pacientes que sufren de HTA y aquellos que no. La estrategia que adoptan actualmente las guías internacionales consiste en estratificar en primer lugar el riesgo cardiovascular específico del paciente, en función de la edad y la presencia de comorbilidades concomitantes y/o eventos cardiovasculares previos, y, una vez definido este riesgo, establecer unos objetivos de tratamiento más o menos estrictos. La estratificación del riesgo cardiovascular se puede realizar fácilmente mediante la herramienta web ofrecida por la *American Heart Association* (<http://static.heart.org/riskcalc/app/index.html#!/baseline-risk>).

Así, para este estudio, la presencia de hipertensión arterial en el momento de la inclusión no se definió únicamente mediante unos valores de presión arterial concretos, sino como la necesidad de utilizar fármacos para mantener la presión arterial por debajo del umbral recomendado por las guías internacionales en función del riesgo cardiovascular particular de cada paciente ^[168]. Paralelamente, la remisión completa de la hipertensión durante el proceso de pérdida de peso se definió como la suspensión del tratamiento farmacológico con posterior persistencia de las cifras de presión arterial por debajo del umbral de tratamiento recomendado para el paciente de acuerdo a dichas guías internacionales.

Dislipemia

De un modo similar a lo descrito previamente para la HTA, a pesar de que los valores normales de lípidos en plasma se sitúan habitualmente en triglicéridos <150 mg/dL, LDL <130 mg/dL y HDL >40 mg/dL en hombres y >50 mg/dL en mujeres ^[170,171], los valores de referencia por si solos no representan de forma fiable los objetivos de tratamiento, ya que estos deben establecerse en función del riesgo cardiovascular específico del paciente y pueden llegar a establecerse en puntos mucho más bajos. En pacientes con muy alto riesgo cardiovascular, por ejemplo, se recomienda que los valores de LDL sean inferiores a 70 mg/dL.

Para este estudio, la presencia de DLP en el momento de la inclusión no se definió únicamente mediante unos valores concretos de lípidos en plasma, sino como la necesidad de utilizar fármacos para lograr los objetivos recomendados por las guías internacionales en función del riesgo cardiovascular particular de cada paciente ^[170,171]. Así mismo, la remisión completa de la DLP durante el proceso de pérdida de peso se definió como la suspensión del tratamiento farmacológico con posterior persistencia de las cifras de colesterol y triglicéridos dentro de los límites recomendados para el paciente en las guías internacionales.

4.2.5 Perfiles de obesidad

En la literatura se describe la existencia de "obesos sanos", definidos como aquellos que a pesar del exceso de peso no presentan las comorbilidades típicamente asociadas al SM ^[67,172]. No obstante, en este grupo de "obesos sanos" también se han descrito alteraciones en diversos parámetros plasmáticos no presentes en individuos delgados ^[69].

Por otro lado, se ha descrito que los obesos con IMC >40 kg/m² (obesidad clase III) presentan una prevalencia mayor de comorbilidades que los pacientes con obesidades menos importantes ^[173], lo que a nivel molecular podría traducirse en diferentes perfiles de expresión génica.

Así pues, con el objetivo de analizar la asociación entre el estado molecular basal (t0) y los diferentes perfiles posibles de obesidad, los sujetos del grupo PB se clasificaron en subgrupos en función del IMC, la resistencia insulínica y la presencia o no de las comorbilidades asociadas al SM (DM2, HTA y DLP) en el momento de la inclusión (t0), así como la posterior evolución en términos de pérdida de peso y resolución de comorbilidades.

Concretamente, los subgrupos se definieron en función de los siguientes parámetros:

- IMC basal (t0), según fuera mayor o menor de 40 kg/m².
- HOMA-IR basal (t0), según fuera mayor o menor de 3,8.
- PCR basal (t0), según fuera mayor o menor de 5 mg/L
- Presencia de 1, 2 o 3 de las comorbilidades típicamente relacionadas con el SM (DM2, HTA y DLP) en el momento de la inclusión (t0).
- Evolución del %PTP, según fuera mayor o menor del 30% al año de la GVL (t3).
- Resolución o no de la DM2 al año de la GVL (t3)
- Resolución o no de la HTA al año de la GVL (t3)
- Resolución o no de la DLP al año de la GVL (t3)

4.3 ANÁLISIS MOLECULAR

Las muestras de sangre utilizadas en el estudio molecular fueron extraídas mediante venopunción periférica entre las 7:00 y las 8:00 de la mañana, tras una noche de ayuno. Fueron recogidas en tubos *PAXgene Blood RNA* (Qiagen, Hilden, Alemania) e inmediatamente congeladas a -80°C hasta el momento de su procesamiento. En el grupo PB se estudiaron 3 puntos del proceso de pérdida de peso (t0, t1 y t2), mientras que en el grupo control sólo uno (t0).

Todos los análisis moleculares se realizaron a partir del pellet celular obtenido mediante centrifugación de la sangre contenida en estos tubos. Este pellet celular seco no contenía plasma ni eritrocitos, y estaba formado

básicamente por leucocitos (mono y polimorfonucleados). Aunque la velocidad de centrifugación no permitiría descartar completamente la presencia de plaquetas, dado que las plaquetas no presentan núcleo celular y los ácidos nucleicos que de ellas pudieran obtenerse serían mitocondriales, y que las secuencias analizadas no se encuentran entre los ácidos nucleicos mitocondriales ^[174,175], puede afirmarse que el análisis se ha realizado sobre ADN y ARN de LSP.

A partir de estos ácidos nucleicos de LSP, se investigó la evolución de la expresión y la metilación del ADN de regiones promotoras de una serie de genes relacionados con el metabolismo energético y la inflamación. La expresión génica se analizó mediante transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (*quantitative polymerase chain reaction*, qRCP*). La metilación de ADN se analizó mediante pirosecuenciación por bisulfito. Los principios generales de estas técnicas están desarrollados en el **Anexo I**.

La conservación de las muestras y la extracción de ácidos nucleicos se realizó en el *Biobanc Institut de Recerca Germans Trias i Pujol - Hospital Universitari Germans Trias i Pujol* (Badalona, España). El análisis de expresión y la puesta a punto de las secuencias de pirosecuenciación se realizó en el *Institut de Medicina Predictiva i Personalitzada del Càncer del Institut de Recerca Germans Trias i Pujol* (IMPPC - IGTP, Badalona, España). El análisis de pirosecuenciación se realizó en el *Institut de Recerca Biomèdica de Bellvitge* (IDIBELL, L'Hospitalet del Llobregat, España).

4.3.1 Genes analizados

Para este estudio se analizaron un total de 12 genes, listados en la **Tabla 1**. La selección se realizó en base a los conocimientos actuales de la fisiopatología de la adiposopatía y a los cambios moleculares en relación a la cirugía bariátrica descritos previamente en la literatura ^[29,38,54,55,125,130,133,135,140-142,146,152,153,157,176].

*A pesar de que la abreviatura habitualmente usada para la reacción en cadena de la polimerasa es la que se deriva de su nombre inglés, PCR (de *Polimerase Chain Reaction*), en este texto se ha preferido usar la abreviatura basada en su nombre en castellano (RCP) para evitar la duplicidad de acrónimos con el de la proteína C-reactiva (PCR).

Tabla 1. Genes analizados.

Símbolo oficial	Nombre completo
<i>GHRL</i>	Ghrelina (<i>ghrelin and obestatin prepropeptide</i>)
<i>NAMPT</i>	Visfatina (<i>nicotinamide phosphoribosyltransferase</i>)
<i>IRS1</i>	Sustrato 1 del receptor de la insulina (<i>insulin receptor substrate 1</i>)
<i>FTO</i>	Gen relacionado con la grasa corporal y la obesidad (<i>fat mass and obesity related gen</i>)
<i>CCL2</i>	Ligando 2 de quimiocinas motivo C-C (<i>C-C motif chemokine ligand 2</i> , también conocido como <i>monocyte chemotactic protein 1, MCP1</i>)
<i>TNF</i>	Factor de necrosis tumoral alfa (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)
<i>FAS</i>	Receptor de apoptosis de superficie celular (<i>fas cell surface death receptor</i>)
<i>LEP</i>	Leptina (<i>leptin</i>)
<i>PPARG</i>	Receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma (<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>)
<i>ADIPOQ</i>	Adiponectina (<i>adiponectin, C1Q and collagen domain containing</i>)
<i>FASN</i>	Ácido graso sintasa (<i>fatty acid synthase</i>)
<i>MC4R</i>	Receptor de melanocortina 4 (<i>melanocortin 4 receptor</i>)

Como se ha expuesto anteriormente, 9 de los genes seleccionados en el presente estudio (*GHRL*, *NAMPT*, *IRS1*, *FTO*, *LEP*, *PPARG*, *ADIPOQ*, *FASN* y *MCR4*) están relacionados principalmente con el control del peso corporal y el metabolismo energético. Los otros 3 genes (*CCL2*, *TNF* y *FAS*) actúan mayoritariamente como moduladores de las vías de la inflamación. Sin embargo, dentro de la red de interacciones que conforman el metabolismo y la señalización celular, no es infrecuente que una misma proteína intervenga en múltiples reacciones, ni siquiera que de un mismo gen se obtengan diferentes proteínas a partir de variaciones en la combinación de sus exones u otras modificaciones postranscripcionales ^[177]. Así, no es conveniente identificar cada uno de estos genes con una sola función concreta. Además, no son pocos los casos en que la actividad atribuida a un gen, establecida a partir de estudios en rata u otros animales de experimentación, se ha demostrado posteriormente diferente en los humanos ^[178]. Una breve descripción de los ámbitos de influencia conocidos de cada uno de los genes estudiados se puede consultar en el **Anexo II**.

Adicionalmente, se analizaron otros 2 genes, *PSMC4* (ATPasa 4 de la subunidad proteosomal 26S) y *MRPL19* (la proteína de ribosoma mitocondrial L19). Ambos son genes constitutivos, es decir, encargados del mantenimiento de funciones celulares básicas y, por tanto, de expresión estable y conocida ^[179,180]. Se usaron como controles internos y como genes de referencia para el cálculo de la expresión relativa de los demás genes ^[181].

4.3.2 Análisis de la expresión génica

Para el estudio de la expresión génica, los 12 genes seleccionados (*GHRL*, *NAMPT*, *IRS1*, *FTO*, *LEP*, *PPARG*, *ADIPOQ*, *FASN*, *MC4R*, *FAS*, *TNF*, *CCL2*) se analizaron mediante transcripción inversa y qRCP (**Figura 9**) en todas las muestras de sangre obtenidas para el estudio: pacientes (n=35) en t0, t1 y t2 y controles (n=33) en t0.

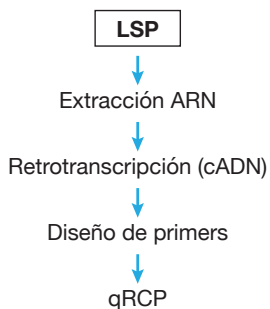


Figura 9. Pasos del análisis de expresión. LSP: Leucocitos de sangre periférica; cADN: ADN complementario; qRCP: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

En primer lugar, se extrajo el ARN de los leucocitos presentes en la sangre venosa periférica contenida en los tubos de *PAXgene* y mantenida a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Para esta operación se utilizaron el equipo y reactivos de separación magnética automatizada de ácidos nucleicos *chemagic Magnetic Separation Module I* y *chemagic Total RNA Blood Kit special* (PerkinElmer chemagen Technologie GmbH, Baesweiler, Alemania). Cada muestra fue cuantificada con el espectrofotómetro *Epoch* (BioTek, Winooski, VT, EE.UU.) y su integridad determinada mediante

electroforesis con el sistema *2200 TapeStation System* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.).

A continuación, se obtuvo ADN complementario a partir del ARN extraído de la sangre total. A tal efecto, se procedió a la transcripción inversa de 500 ng de ARN en un volumen final de 20 μL para cada reacción, usando cebadores aleatorios de 6 bases y la transcriptasa *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante.

Finalmente, se analizó la expresión génica mediante qRCP. Los cebadores para la qRCP se diseñaron intentando incluir el máximo número posible de transcritos de cada gen, utilizando las herramientas digitales *Genome Browser* de la *University of California - Santa Cruz* (<https://genome-euro.ucsc.edu/>) y *Realtime PCR* de *Integrated DNA Technologies* (IDT, <http://eu.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR>). Las secuencias y temperaturas de hibridación de los cebadores utilizados están expuestas en la **Tabla 6 (Anexo III)**.

Para realizar la qRCP se utilizó el sistema *LightCycler® 480 Real-Time PCR System* (Roche, Basel, Suiza) y placas blancas *Multiwell Plate 384* (Roche).

La qRCP se llevó a cabo por triplicado, en un volumen final de 10 μ L con la siguiente composición: 5 μ L de *LightCycler® 480 SYBR Green I Master* (Roche), 1 μ M de cebador directo, 1 μ M de cebador reverso y 1 μ L de ADN complementario (cADN) a una dilución de 1/10. Las condiciones de la qRCP fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización de 10 min a 95°C seguido de 40 ciclos consistentes en 10 s a 95°C, 20 s a la correspondiente temperatura de hibridación y 20 s a 72°C. El proceso terminó con un programa de curva de fusión (15 s a 95°C, 1 min a 70°C y luego de forma ascendente hasta los 96°C) mientras se monitorizaba la fluorescencia de forma continua. La normalización de los resultados se realizó utilizando los 2 genes independientes de referencia (*MRPL19* y *PSMC4*). La eficiencia de la qRCP para cada par de cebadores se determinó con la herramienta *CHAINY* (<http://maplab.imppc.org/chainy>) y la cuantificación relativa a los genes de referencia fue calculada utilizando el programa *LightCycler® 480 Software, v1.5* (Roche).

4.3.3 Análisis de metilación del ADN de regiones promotoras

La segunda parte del análisis molecular consistió en un estudio exploratorio en LSP de los cambios inducidos durante el proceso de pérdida de peso sobre la metilación del ADN de regiones promotoras en 3 genes candidatos (**Figura 10**). La selección de estos 3 genes (*GHRL*, *NAMPT* y *FAS*) se realizó basándose en su relevancia clínica y los cambios de expresión analizados previamente. No se analizaron todas las muestras, sino sólo las de 6 pacientes (en t0, t1 y t2) y 6 controles (en t0), seleccionados entre aquellos individuos en los que se habían detectado mayores cambios de expresión durante el proceso de pérdida de peso.

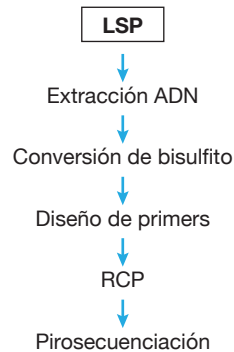


Figura 10. Pasos del análisis de metilación del ADN. LSP: Leucocitos de sangre periférica; RCP: Reacción en cadena de la polimerasa.

En primer lugar, se extrajo el ADN de los leucocitos presentes en la sangre venosa periférica contenida en los tubos de *PAXgene* y mantenida a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Para esta operación se utilizó el kit de purificación *Maxell 12 Genomic DNA Purification kit* (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.). Cada muestra fue cuantificada con el espectrofotómetro *Epoch* (BioTek) y su integridad determinada mediante electroforesis con el sistema *2200 TapeStation System* (Agilent Technologies). De cara al estudio de metilación, se realizó también una conversión por bisulfito de 300ng de DNA génico con el kit *EZ DNA Methylation-Gold kit* (Zymo Research, Irvine, California, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

A continuación, se analizó la metilación del ADN mediante pirosecuenciación por bisulfito. Dada la abundancia de sitios CpG presentes en los promotores de los genes seleccionados y la limitada longitud de lectura de la pirosecuenciación, así como la escasa información disponible en la literatura acerca de qué sitios CpG podrían verse específicamente afectados por el proceso de pérdida de peso, el diseño de los cebadores fue complejo. Por un lado, se recurrió a información relativa a patologías neoplásicas, donde la variabilidad del estado de metilación de sitios CpG específicos dentro de los promotores génicos está siendo más extensamente estudiada^[138,182]. Por otro lado, se evitaron los dinucleótidos CpG, ubicando los cebadores fuera de regiones CpG para asegurar que el estado de metilación no interfiriese con la amplificación de las secuencias. Durante este proceso se utilizaron las herramientas digitales *Genome Browser de la University of California - Santa Cruz* (<https://genome-euro.ucsc.edu/>) y *Wanderer* (<http://maplab.imppc.org/wanderer>). Finalmente, se diseñó un cebador de pirosecuenciación para el promotor de *GHRL* que permitiría estudiar 4 sitios CpG, otro para el promotor de *NAMPT* que permitiría estudiar 3 sitios CpG y 2 cebadores para el promotor de *FAS* que permitirían estudiar un total de 9 sitios CpG. Las secuencias de los promotores y la localización de los sitios CpG seleccionados para el análisis pueden consultarse en el **Anexo III**. Las secuencias y temperaturas de hibridación de los cebadores utilizados están expuestas en la **Tabla 7 (Anexo III)**.

Para cada secuencia, se realizaron independientemente dos reacciones en cadena de la polimerasa convencionales (RCP) a partir del ADN previamente convertido por bisulfito, utilizando la polimerasa *IMMOLASE™ hot-start DNA Polymerase* (Bioline, Londres, Reino Unido). Posteriormente el resultado de estas dos RCP fue mezclado para asegurar la representatividad del perfil de metilación del ADN. Un volumen final de 30 μ L para cada una de las RCP fue preparado según la siguiente fórmula: 1X *ImmoBuffer* (Bioline), 1,5 nM de $MgCl_2$, 200 μ M de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), 200 nM de cebador directo, 200 nM de cebador reverso biotinilado, 0,02 U/ μ L de *IMMOLASE™ DNA Polymerase* (Bioline) y 1 μ L de ADN convertido por bisulfito. Las condiciones de la RCP fueron las siguientes: 10 min a 95°C, seguidos de 50 ciclos consistentes en una desnaturalización de 30 s a 94°C, 30 s a la correspondiente temperatura de hibridación y una elongación de 30 s a 72°C y, finalmente, 1 ciclo de elongación de 8 min a 72°C. Se aisló la cadena biotinilada del producto de las RCP mediante el *Vacuum Prep Tool™* (Biotage, Stockholm, Suecia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de pirosecuenciación y la cuantificación de la metilación del ADN se realizaron con el equipo *PyroMark Q24 System v2.0.6* (Qiagen).

4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se muestran como media (\pm desviación estándar), excepto cuando se indica específicamente otra cosa. La expresión génica se indica en unidades relativas, en relación a la expresión de los genes constitutivos *MRPL19* y *PSMC4*. Los resultados de la metilación del ADN, estudiada mediante pirosecuenciación por bisulfito, se expresan en porcentaje: de 0% (sin metilación) a 100% (completamente metilado).

Según los cálculos realizados mediante la utilidad web de Fisterra (<https://www.fisterra.com/mbe/investiga/9muestras/9muestras2.asp>), para detectar cambios de expresión de como mínimo el 25% con una potencia del 80% y un error alfa de 0.05, se requería una muestra de $n=22$. Se asumió una pérdida de pacientes durante el seguimiento del 20% y un 20% de muestras perdidas por problemas técnicos en el laboratorio,

requiriéndose finalmente un tamaño muestral de $n=31$ por grupo. Este tamaño muestral fue logrado satisfactoriamente durante el año de reclutamiento planificado.

El cálculo estadístico se realizó con el programa SPSS v20 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Para los datos cuantitativos, la normalidad se comprobó mediante los test de Kolmorov-Smirnov y de Saphiro-Wilk en función de si la n era mayor o menor de 50, respectivamente. Cuando la normalidad de la distribución no pudo ser asumida o la n era inferior a 30, se usaron tests no paramétricos (U de Mann-Whitney y test de Wilcoxon). En caso contrario, se utilizaron tests paramétricos (T de Student para datos pareado o no pareados, en función de la variable). Los datos cualitativos fueron analizados mediante los test de McNemar y chi-cuadrado, para datos pareados y no pareados, respectivamente. La correlación entre variables se realizó mediante la prueba correlación de Pearson y la rho de Spearman, en función de si las variables cumplían o no criterios de normalidad, respectivamente. Todos los test fueron bilaterales y se consideraron como significativos los valores de $p<0,05$.



RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 RESULTADOS CLÍNICOS Y BIOQUÍMICOS

5.1.1 Datos clínicos y bioquímicos basales (t0)

La edad media del grupo PB fue de 49 años y estuvo compuesto por una mayoría de mujeres (n=25, 71%). Como era esperable, al tratarse estas dos de variables controladas, el grupo control presentó resultados similares. En el grupo control se observaron valores significativamente inferiores de IMC, glucosa, insulina, HbA1c, HOMA-IR, PCR, triglicéridos, colesterol y LDL, así como valores significativamente mayores de HDL. No se encontraron diferencias en los valores basales de GPT (**Tablas 2 y 3**).

Los integrantes del grupo PB presentaron una serie de comorbilidades que se recogen en la **Tabla 4**. Cabe destacar la presencia de 18 pacientes (51%) con DM2, 18 (51%) con HTA y 20 (57%) con DLP en el momento de la inclusión en el estudio. La agrupación de estas tres comorbilidades habituales en el SM fue la siguiente: 9 pacientes (26 %) no tenían ninguna de las tres comorbilidades, 6 (17%) sólo una, 10 (28,5%) dos y 10 (28,5%) pacientes padecían las tres.

Tabla 2. Datos clínicos y bioquímicos basales.

	Controles (n=33)	PB(t0) (n=35)	p-valor
Edad (años)	45 (±9)	49 (±10)	0,07
Sexo (H/M)	5 (15%) / 28 (85%)	10 (29%) / 25 (71%)	0,2
Glucosa (mg/dL)	87 (±7)	105 (±25)	<0,001 *
Insulina (mUI/L)	6 (±4)	15 (±9)	0,001 *
HbA1c (%)	5 (±0,2)	6 (±1)	<0,001 *
Triglicéridos (mg/dL)	69 (±40)	130 (±62)	<0,001 *
Colesterol (mg/dL)	148 (±30)	172 (±35)	0,004 *
HDL (mg/dL)	69 (±17)	45 (±12)	<0,001 *
LDL (mg/dL)	98 (±23)	103 (±35)	<0,001 *
GPT (U/L)	16 (±5)	24 (±11)	0,1

Datos expresados como media (± desviación estándar), excepto el sexo, expresado como n (porcentaje). PB(t0): Grupo de pacientes bariátricos antes de recibir ninguna intervención; HbA1c: Hemoglobina glucosilada; HDL: Lipoproteínas de alta densidad; LDL: Lipoproteínas de baja densidad; GPT: Transaminasa glutámico pirúvica.
* Diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 3. Datos basales y evolutivos del peso corporal, resistencia insulínica, PCR y hormonas plasmáticas.

	Controles (n=33)	PB(t0) (n=35)	PB(t1) (n=35)	PB(t2) (n=35)	PB(t3) (n=35)
Peso (kg)	61 (±9)	122 (±35) ^a	116 (±33) ^{a,b}	86 (±20) ^{a,b,c}	81 (±18) ^{a,b,c,d}
IMC (kg/m²)	22 (±3)	45 (±7) ^a	43 (±7) ^{a,b}	32 (±5) ^{a,b,c}	30 (±5) ^{a,b,c,d}
PTP (kg)	---	---	6 (±7,5)	36 (±19) ^c	40 (±24) ^{c,d}
%PTP (%)	---	---	4% (±4)	28% (±7) ^c	32% (±11) ^{c,d}
%EPP (%)	---	---	10% (±8)	67% (±18) ^c	75% (±24) ^{c,d}
HOMA-IR	1 (±1)	4 (±3) ^e	4,4 (±4,3) ^a	1,9 (±1,5) ^{f,g,c}	1,6 (±1,1) ^{h,c}
PCR (mg/L)	0,7 (±1,2)	7 (±7) ^a	8,2 (±5,7) ^{a,h}	4,5 (±6,2) ^{a,i,c}	---
Ghrelina (pg/mL)	2155 (±1303)	969 (±409) ^a	1070 (±400) ^{a,h}	596 (±118) ^{a,b,c}	---
Visfatina (ng/mL)	3,4 (±2,0)	2,8 (±1,6)	3,0 (±1,8)	2,6 (±1,6)	---

Datos expresados como media (± desviación estándar) y n (porcentaje). PB(t0): Grupo de pacientes bariátricos antes de recibir ninguna intervención; PB(t1): Grupo de pacientes bariátricos antes de la gastrectomía; PB(t2): Grupo de pacientes bariátricos 6 meses después de la gastrectomía; PB(t3): Grupo de pacientes bariátricos 1 año después de la gastrectomía; IMC: Índice de masa corporal; PTP: Peso total perdido; %PTP: Porcentaje de peso total perdido; %EPP: Porcentaje de exceso de peso perdido; HOMA-IR: *Homeostatic model assessment of insulin resistance*; PCR: Proteína C-reactiva.

Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas por letras en superíndice:

- a - diferencia significativa versus Controles (p<0,001)
- b - diferencia significativa versus PB(t0) (p<0,001)
- c - diferencia significativa versus PB(t1) (p<0,001)
- d - diferencia significativa versus PB(t2) (p<0,001)
- e - diferencia significativa versus Controles (p=0,001)
- f - diferencia significativa versus Controles (p=0,02)
- g - diferencia significativa versus PB(t0) (p=0,01)
- h - diferencia significativa versus PB(t0) (p=0,001)
- i - diferencia significativa versus PB(t0) (p=0,03)

Tabla 4. Principales comorbilidades basales en los sujetos del estudio.

	Controles (n=33)	PB(t0) (n=35)
Diabetes Mellitus	0 (0%)	18 (51%)
Insulinoterapia	0 (0%)	4 (11%)
AAO	0 (0%)	18 (51%)
Análogos de GLP1	0 (0%)	4 (11%)
GAA	0 (0%)	4 (11%)
Hipertensión arterial	0 (0%)	18 (51%)
Dislipemia	0 (0%)	20 (57%)
SAHOS	0 (0%)	11 (31%)
Hiperuricemia	0 (0%)	7 (20%)
Miocardiopatía	0 (0%)	2 (6%)
Cardiopatía isquémica	0 (0%)	0 (0%)
AVC	0 (0%)	1 (3%)
Hipotiroidismo	0 (0%)	5 (14%)
Artropatía severa	0 (0%)	11 (31%)
Esteatosis hepática	0 (0%)	27 (77%)

Datos expresados como n (porcentaje). PB(t0): Grupo de pacientes bariátricos antes de recibir ninguna intervención; AAO: Agentes antiglicémicos orales; GLP1: Péptido similar al glucagón 1; GAA: Glicemia alterada en ayunas; SAHOS: Síndrome de apnea hipoapnea obstructiva del sueño; AVC: Accidente cerebral vascular.

5.1.2 Resultados quirúrgicos

Todas las intervenciones quirúrgicas pudieron completarse satisfactoriamente por vía laparoscópica y no se registraron incidencias intraoperatorias. Tampoco hubo complicaciones postoperatorias ni necesidad de reintervenciones durante el tiempo de seguimiento. La estancia media postoperatoria fue de 3,5(±0,8) días.

5.1.3 Evolución del peso corporal

El grupo PB presentó un IMC significativamente mayor al del grupo control en todos los puntos del estudio (Tabla 3 y Figura 11). En el grupo PB se observó una disminución progresiva del peso, situándose en el 4% de %PTP tras la DMBC (t1) y alcanzando el 32% de %PTP un año después de la GVL (t3). Todas las variaciones del peso corporal resultaron estadísticamente significativas.

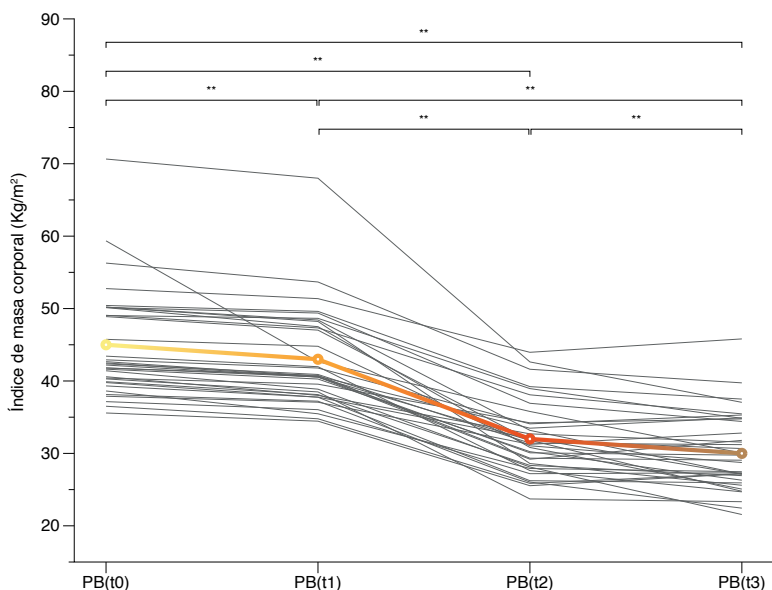


Figura 11. Evolución del índice de masa corporal entre los pacientes. *PB(t0): Grupo de pacientes bariátricos antes de recibir ninguna intervención; PB(t1): Grupo de pacientes bariátricos antes de la gastrectomía; PB(t2): Grupo de pacientes bariátricos 6 meses después de la gastrectomía; PB(t3): Grupo de pacientes bariátricos 1 año después de la gastrectomía; ** $p < 0,001$.*

5.1.4 Evolución de la resistencia insulínica

El grupo PB presentó un HOMA-IR significativamente mayor al del grupo control en todos los puntos del estudio excepto al año de la GVL (t3), donde no se hallaron diferencias (Tabla 3 y Figura 12). El valor de HOMA-IR disminuyó significativamente 6 meses después de la GVL (t2), siendo un 56% menor que su valor prequirúrgico (t1). Se mantuvo en valores similares al año de la intervención (t3), siendo un 64% menor que antes de la cirugía (t1).

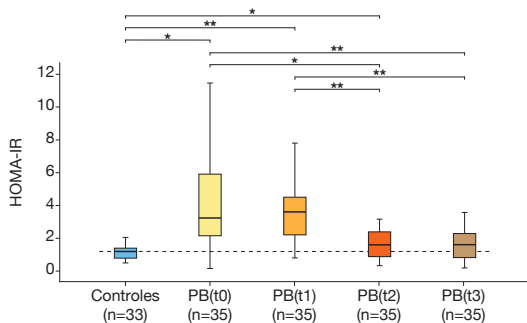


Figura 12. Evolución de la resistencia insulínica. PB(t0): Grupo de pacientes bariátricos antes de recibir ninguna intervención; PB(t1): Grupo de pacientes bariátricos antes de la gastrectomía; PB(t2): Grupo de pacientes bariátricos 6 meses después de la gastrectomía; PB(t3): Grupo de pacientes bariátricos 1 año después de la gastrectomía; HOMA-IR: homeostatic model assessment of insulin resistance. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

5.1.5 Evolución de la PCR

Los niveles de PCR en el grupo PB fueron significativamente mayores que en el grupo control en todos los puntos del estudio (Tabla 3 y Figura 13). En el grupo de obesos, la PCR aumentó tras la DMBC (t1) en comparación con su valor basal (t0). Sin embargo, seis meses después de la GVL (t2), la PCR había disminuido un 45% respecto al nivel prequirúrgico (t1), situándose un 36% por debajo del valor basal (t0) de su grupo. Todos estos cambios fueron estadísticamente significativos.

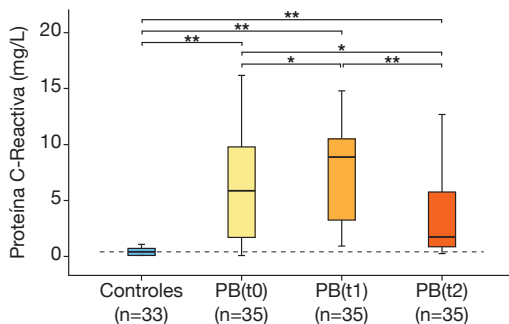


Figura 13. Evolución de la proteína C-reactiva. PB(t0): Grupo de pacientes bariátricos antes de recibir ninguna intervención; PB(t1): Grupo de pacientes bariátricos antes de la gastrectomía; PB(t2): Grupo de pacientes bariátricos 6 meses después de la gastrectomía; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

5.1.6 Evolución hormonal

Los valores de ghrelina plasmática del grupo PB fueron significativamente menores que los del grupo control en todos los puntos del estudio (Tabla 3 y Figura 14). En los pacientes obesos, la ghrelina aumentó tras la DMBC (t1) y descendió hasta aproximadamente la mitad de su valor prequirúrgico 6 meses después de la GVL (t2). Todas estas variaciones fueron estadísticamente significativas.

No se encontraron diferencias significativas en el valor plasmático de visfatina ni entre el grupo control y el grupo PB ni dentro del grupo PB a lo largo del proceso de pérdida de peso (Tabla 3 y Figura 14).

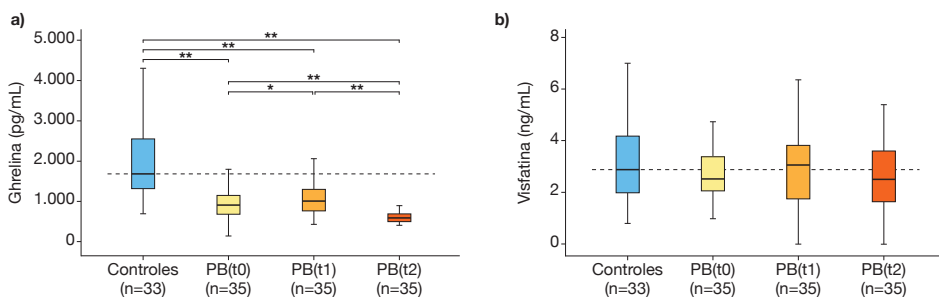


Figura 14. Evolución de la ghrelina (a) y visfatina (b) plasmáticas. PB(t0): Grupo de pacientes bariátricos antes de recibir ninguna intervención; PB(t1): Grupo de pacientes bariátricos antes de la gastrectomía; PB(t2): Grupo de pacientes bariátricos 6 meses después de la gastrectomía; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

5.1.7 Evolución de las comorbilidades

Al completar el año de seguimiento postquirúrgico (t3), la tasa de remisión completa de DM2 fue del 55% (10/18), la de HTA del 38% (7/18) y la de DLP del 40% (8/20) (**Figura 15**). En los tres casos, la mejoría fue estadísticamente significativa en comparación con el momento de la inclusión (t0) (DM2_(t0)=51% vs DM2_(t3)=23%, p=0,02; HTA_(t0)=51% vs HTA_(t3)=31%, p=0,01; DLP_(t0)=57% vs DLP_(t3)=34%, p=0,008).

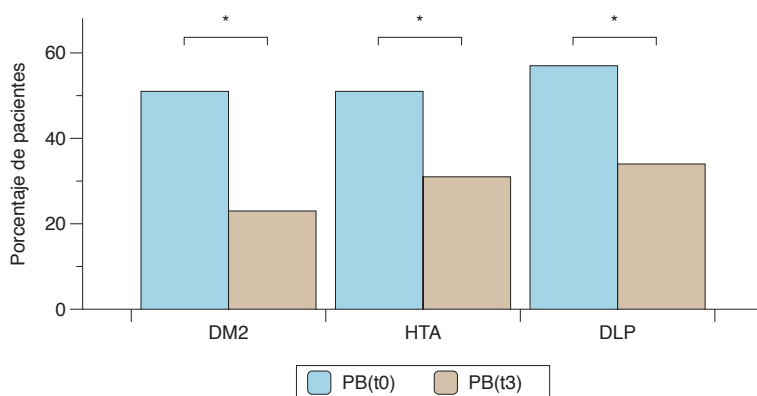


Figura 15. Evolución de las comorbilidades al año de seguimiento. PB(t0): Grupo de pacientes bariátricos antes de recibir ninguna intervención; PB(t3): Grupo de pacientes bariátricos 1 año después de la gastrectomía; DM2: Diabetes Mellitus; HTA: Hipertensión arterial; DLP: Dislipemia; * p<0,05.

5.2 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

De los 12 genes estudiados, 7 presentaron expresión detectable en LSP (*GHRL*, *NAMPT*, *IRS1*, *FTO*, *CCL2*, *TNF* y *FAS*), aunque no en todas las muestras analizadas. Los otros 5 no presentaron expresión detectable (*LEP*, *PPARG*, *ADIPOQ*, *FASN* y *MC4R*).

Los resultados del análisis de expresión génica se encuentran resumidos en la **Figura 16** y la **Tabla 5**.

5.2.1 Expresión génica basal

La expresión del gen *FTO* en el grupo PB antes de recibir ninguna intervención (t0) fue significativamente menor que en el grupo control ($FTO_{PB(t0)}=1,3$ versus $FTO_{Controles}=1,6$, $p=0,042$).

No se encontraron otros cambios significativos entre el grupo control y el grupo PB en la expresión basal de los otros genes analizados (*GHRL*, *NAMPT*, *IRS1*, *FAS*, *TNF* y *CCL2*).

5.2.2 Cambios en la expresión génica tras DMBC

La expresión del gen *FTO* en el grupo PB después de la DMBC (t1) no presentó diferencias respecto al valor basal (t0) de su grupo y se mantuvo significativamente más baja que en el grupo control ($FTO_{PB(t1)}=1,2$ versus $FTO_{Controles}=1,6$, $p=0,026$).

La expresión del gen *TNF* en el grupo PB después de la DMBC (t1) no presentó diferencias respecto al valor basal (t0) de su grupo, aunque fue significativamente mayor que la del grupo control ($TNF_{PB(t1)}=1,4$ versus $TNF_{Controles}=0,9$, $p=0,049$).

La expresión del gen *FAS* en el grupo PB después de la DMBC (t1) disminuyó un 19% respecto al valor basal (t0) de su grupo, siendo esta disminución estadísticamente significativa ($FAS_{PB(t1)}=25,1$ versus $FAS_{PB(t0)}=31$, $p=0,01$). No se hallaron diferencias respecto al grupo control.

En el resto de genes analizados (*GHRL*, *NAMPT*, *IRS1* y *CCL2*), no se encontraron cambios significativos entre el grupo PB después de la DMBC (t1) y los valores basales (t0) de su grupo o el grupo control.

La expresión de *FTO* en el grupo PB 6 meses después de la GVL (t2) aumentó de forma no significativa en comparación con los valores previos de su grupo (t0 y t1), dejando de presentar diferencias respecto al grupo control ($FTO_{PB(t2)}=1,4$ versus $FTO_{Controles}=1,6$, $p=0,284$).

La expresión de *CCL2* en el grupo PB 6 meses después de la GVL (t2) disminuyó un 50% respecto a su valor prequirúrgico (t1) ($CCL2_{PB(t2)}=0,4$ versus $CCL2_{PB(t1)}=0,8$, $p=0,016$) y respecto al valor del grupo control ($CCL2_{PB(t2)}=0,4$ versus $CCL2_{Controles}=0,8$, $p=0,016$). Disminuyó también en comparación con el valor basal (t0) del grupo, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($CCL2_{PB(t2)}=0,4$ versus $CCL2_{PB(t0)}=0,7$, $p=0,114$).

La expresión de *FAS* en el grupo PB 6 meses después de la GVL (t2) no presentó diferencias en comparación con su valor prequirúrgico (t1), manteniéndose significativamente menor que en su grupo antes de recibir ninguna intervención (t0) ($FAS_{PB(t2)}=24,4$ versus $FAS_{PB(t0)}=31$, $p=0,015$) y sin diferencias respecto al grupo control.

En el resto de genes analizados (*GHRL*, *NAMPT*, *IRS1* y *TNF*), no se encontraron cambios significativos entre el grupo PB 6 meses después de la GVL (t2) y los valores basales (t0) o prequirúrgicos (t1) de su grupo o respecto al grupo control.

5.2.4 Estudio de correlación entre expresión génica y peso, HOMA-IR y PCR

Se investigó, en el grupo PB, la existencia de correlaciones entre los valores de expresión de los genes estudiados y el IMC, el HOMA-IR y la PCR en plasma en los diferentes tiempos. No se encontraron correlaciones significativas.

También se investigó la existencia de correlaciones entre los cambios en la expresión génica que habían resultado estadísticamente significativos en el grupo PB y los cambios del peso, la resistencia insulínica y la PCR en plasma a lo largo del proceso de pérdida de peso. No se encontraron correlaciones significativas entre los cambios de *FTO*, *FAS* y *CCL2* previamente descritos y los cambios en el IMC, el HOMA-IR ni la PCR.

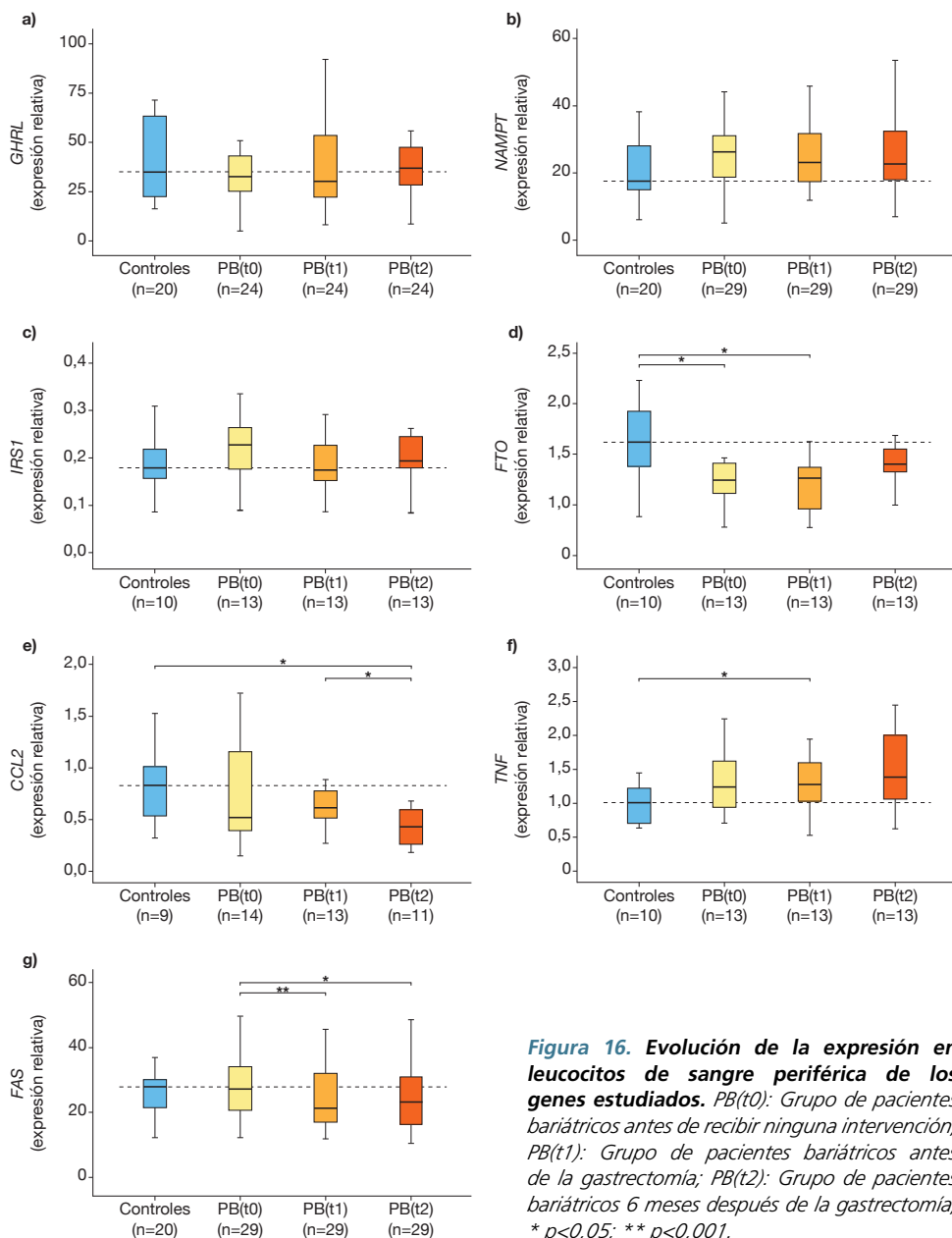


Figura 16. Evolución de la expresión en leucocitos de sangre periférica de los genes estudiados. PB(t0): Grupo de pacientes bariátricos antes de recibir ninguna intervención; PB(t1): Grupo de pacientes bariátricos antes de la gastrectomía; PB(t2): Grupo de pacientes bariátricos 6 meses después de la gastrectomía; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Tabla 5. Expresión en leucocitos de sangre periférica de los genes estudiados.

	Controles (n=33)	PB(t0) (n=35)	PB(t1) (n=35)	PB(t2) (n=35)
<i>GHRL</i>	45,2 (\pm 27,9) / 20	38,9 (\pm 22,4) / 24	38,1 (\pm 20,2) / 24	42,6 (\pm 25,6) / 24
<i>NAMPT</i>	22,9 (\pm 14,3) / 20	26,6 (\pm 11,4) / 29	24,4 (\pm 9,6) / 29	26,9 (\pm 14,3) / 29
<i>IRS1</i>	0,2 (\pm 0,1) / 10	0,2 (\pm 0,1) / 13	0,2 (\pm 0,1) / 13	0,2 (\pm 0,1) / 13
<i>FTO</i>	1,6 (\pm 0,4) / 10	1,3 (\pm 0,3) / 13 ^a	1,2 (\pm 0,3) / 13 ^b	1,4 (\pm 0,5) / 13
<i>FAS</i>	25,75 (\pm 6,2) / 20	31,0 (\pm 17,5) / 29	25,1 (\pm 10,8) / 29 ^c	24,4 (\pm 10,0) / 29 ^d
<i>TNF</i>	0,9 (\pm 0,3) / 10	1,3 (\pm 0,5) / 13	1,4 (\pm 0,6) / 13 ^e	1,4 (\pm 0,6) / 13
<i>CCL2</i>	0,8 (\pm 0,4) / 9	0,7 (\pm 0,5) / 14	0,8 (\pm 0,5) / 13	0,4 (\pm 0,2) / 11 ^{f, g}

Datos expresados como: media (\pm desviación estándar) / n. Todos los valores representan expresión en unidades relativas.

PB(t0): Grupo de pacientes bariátricos antes de recibir ninguna intervención; PB(t1): Grupo de pacientes bariátricos antes de la gastrectomía; PB(t2): Grupo de pacientes bariátricos 6 meses después de la gastrectomía.

Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas por letras en superíndice:

^a - diferencia significativa versus Controles ($p=0,042$)

^b - diferencia significativa versus Controles ($p=0,026$)

^c - diferencia significativa versus PB(t0) ($p=0,01$)

^d - diferencia significativa versus PB(t0) ($p=0,015$)

^e - diferencia significativa versus Controles ($p=0,049$)

^f - diferencia significativa versus Controles ($p=0,016$)

^g - diferencia significativa versus PB(t1) ($p=0,016$)

5.3 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL ADN DE REGIONES PROMOTORAS

Debido a la complejidad de la técnica de pirosecuenciación por bisulfito, algunas de las muestras no pudieron ser completamente analizadas. Al tratarse de una técnica secuencial, los resultados perdidos tendieron a estar en los sitios CpG más alejados del inicio del cebador de pirosecuenciación.

Los resultados del análisis de metilación del ADN de regiones promotoras de los 3 genes estudiados (*GHRL*, *NAMPT* y *FAS*) se encuentran resumidos en las **Figuras 17, 18, 19 y 20** y la **Tabla 6**.

5.3.1 Estado basal de metilación

La metilación del ADN del promotor de *FAS* en el grupo PB antes de recibir ninguna intervención (t0) fue significativamente menor que en el grupo control en 2 de los 9 sitios CpG estudiados, con diferencias de metilación del 2,4% en el caso de CpG1 y del 1,9% en el caso de CpG2 (CpG1_{PB(t0)}=1,8% versus CpG1_{Controles}=4,2%, p=0,029; y CpG2_{PB(t0)}=1,6% versus CpG2_{Controles}=3,5%, p=0,029). Cabe mencionar, sin embargo, que estos valores, quedan muy por debajo del nivel de sensibilidad del equipo utilizado para el análisis de metilación (5%), por lo que estos resultados podrían tratarse de un artefacto.

No se encontraron diferencias relevantes en el estado basal (t0) de metilación entre el grupo PB y el grupo control en ninguno de los sitios CpG estudiados en los genes *GHRL* y *NAMPT*.

5.3.2 Cambios de metilación tras DMBC

La metilación de los 4 sitios CpG estudiados en el promotor de *GHRL* en el grupo PB después de la DMBC (t1) aumentó en comparación con su valor basal (t0). Este incremento fue del 10,3% en CpG1, del 10,4% en CpG2, del 11,2% en CpG3 y del 13,3% en CpG4. Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas en CpG1 y CpG2 (CpG1_{PB(t1)}=26,5% versus CpG1_{PB(t0)}=16,2%, p=0,043; y CpG2_{PB(t1)}=28,4% versus CpG2_{PB(t0)}=18%, p=0,043).

No hubo diferencias significativas en el estado de metilación de los sitios CpG estudiados en los genes *NAMPT* y *FAS* después de la DMBC (t1), en comparación con antes de la DMBC (t0) y con el grupo control.

5.3.3 Cambios de metilación tras GVL

La metilación de los 4 sitios CpG estudiados en el promotor de *GHRL* en el grupo PB 6 meses después de la GVL (t2) descendió en comparación con su valor prequirúrgico (t1). Esta disminución fue del 8,3% en CpG1, del 8,6% en CpG2, del 8,5% en CpG3 y del 12% en CpG4. No obstante, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Este descenso situó la metilación de los 4 sitios CpG tras la GVL (t2) sólo discretamente por encima del valor basal (t0) de su grupo (un 2% en CpG1, un 1,8% en CpG2, un 2,7% en CpG3 y un 1,3% en CpG4).

No se encontraron cambios relevantes en el estado de metilación de los sitios CpG estudiados en los genes *NAMPT* y *FAS* después de la GVL (t2), en comparación con antes de la GVL (t1) y con el grupo control.

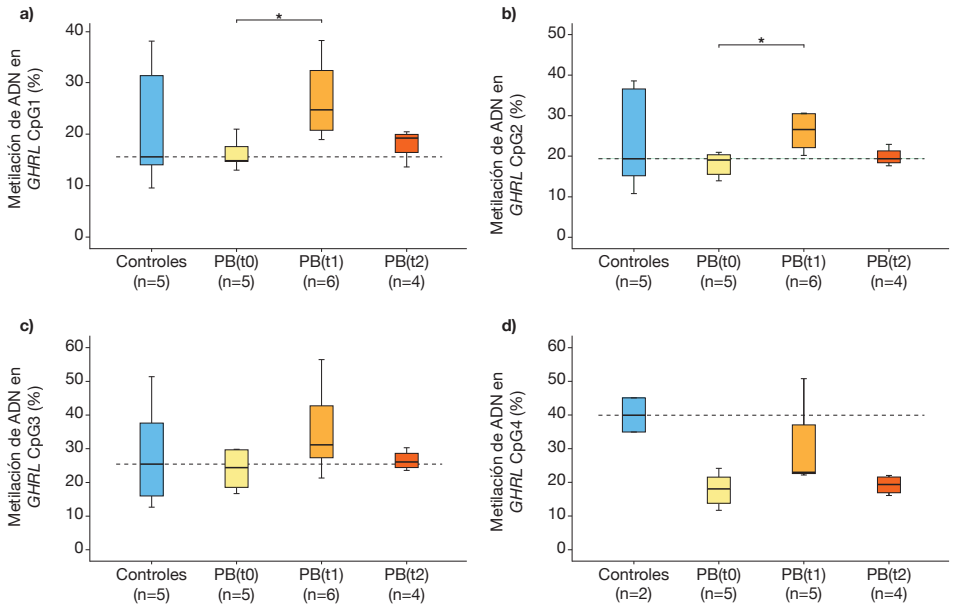


Figura 17. Evolución de la metilación del ADN del promotor de GHRL en leucocitos de sangre periférica. PB(t0): Grupo de pacientes bariátricos antes de recibir ninguna intervención; PB(t1): Grupo de pacientes bariátricos antes de la gastrectomía; PB(t2): Grupo de pacientes bariátricos 6 meses después de la gastrectomía; * $p < 0,05$.

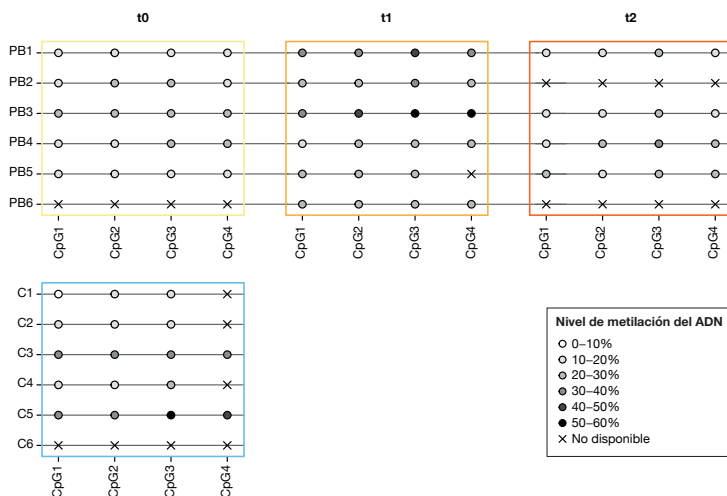


Figura 18. Lollipop del análisis de metilación de ADN del promotor de GHRL. El gráfico tipo lollipop muestra la evolución individual del nivel de metilación de los 4 sitios CpG estudiados durante el proceso de pérdida de peso en cada integrante del grupo de pacientes obesos (línea superior, PB del 1 a 6) y del grupo control (línea inferior, C del 1 a 6). Notar la hipermetilación después de la dieta (t1). t0: antes de iniciar la dieta; t1: después de la dieta y antes de la cirugía; t2: 6 meses después de la cirugía.

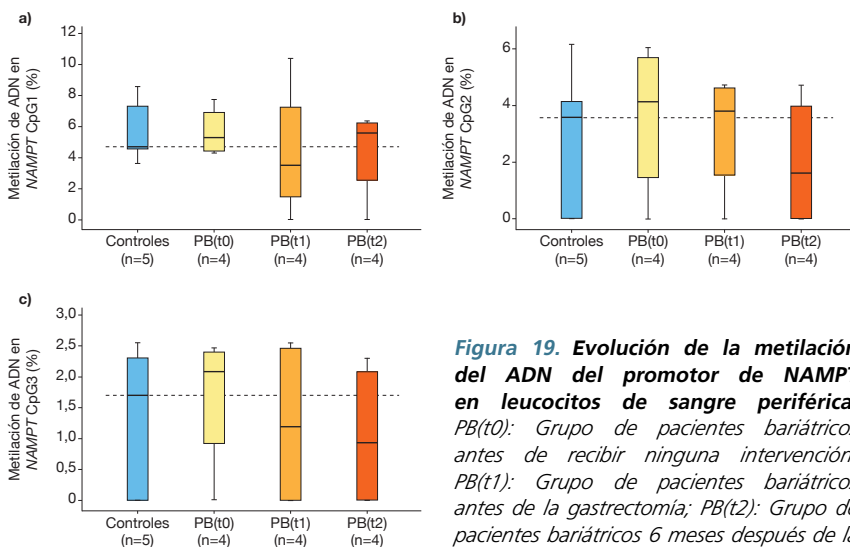
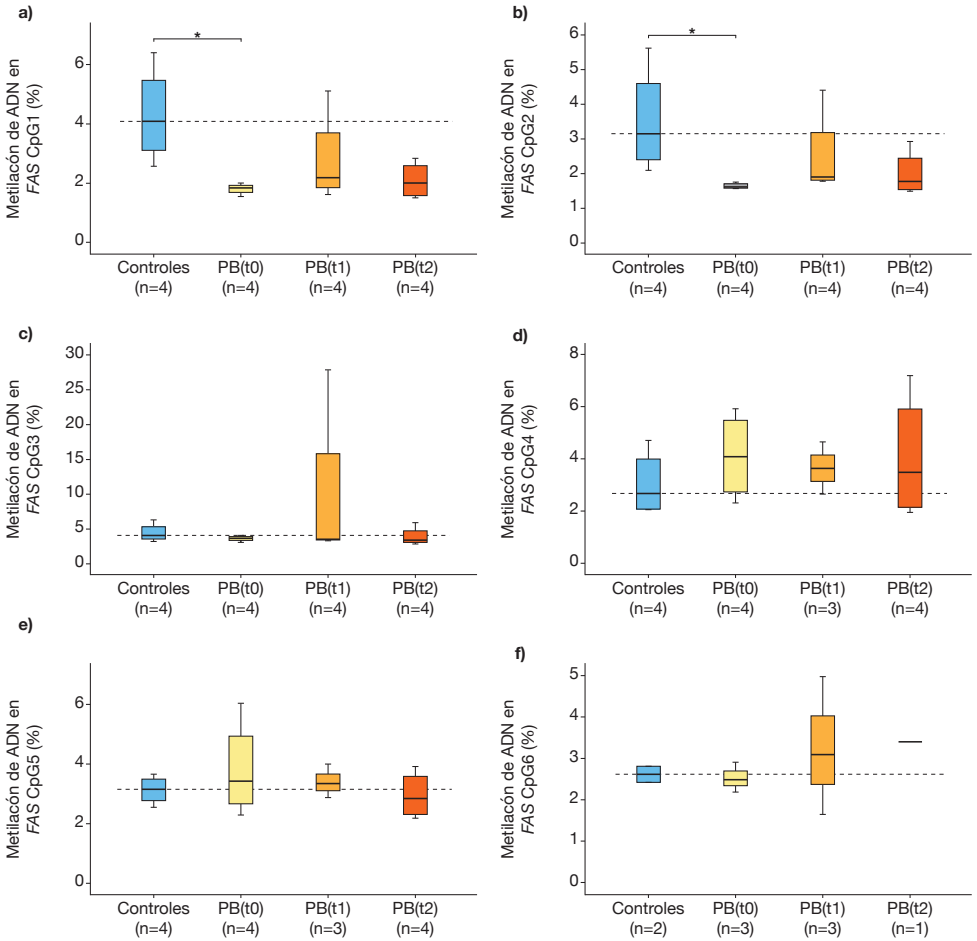


Figura 19. Evolución de la metilación del ADN del promotor de NAMPT en leucocitos de sangre periférica. PB(t0): Grupo de pacientes bariátricos antes de recibir ninguna intervención; PB(t1): Grupo de pacientes bariátricos antes de la gastrectomía; PB(t2): Grupo de pacientes bariátricos 6 meses después de la gastrectomía.



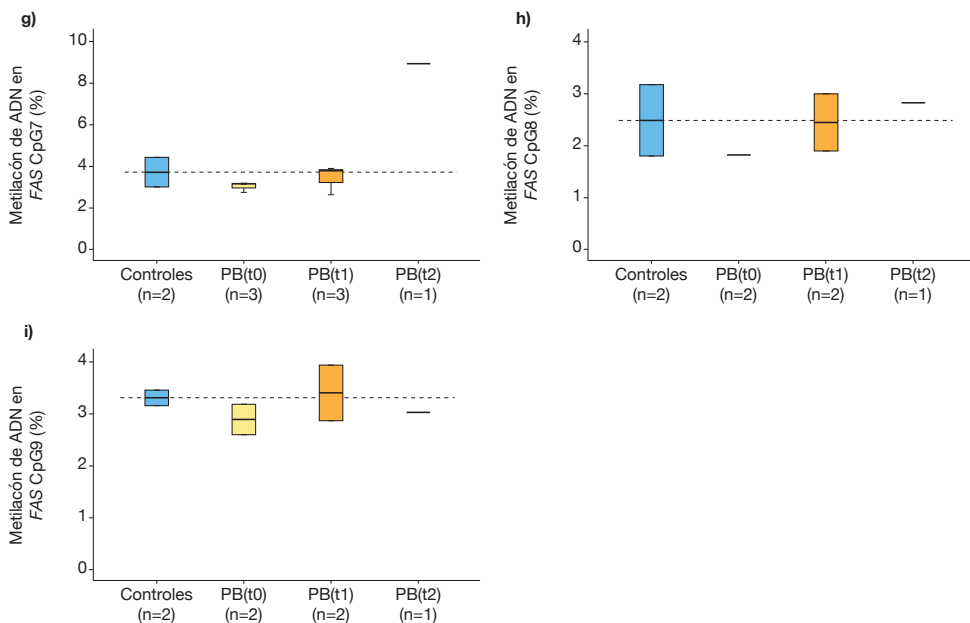


Figura 20. Evolución de la metilación del ADN del promotor de FAS en leucocitos de sangre periférica. PB(t0): Grupo de pacientes bariátricos antes de recibir ninguna intervención; PB(t1): Grupo de pacientes bariátricos antes de la gastrectomía; PB(t2): Grupo de pacientes bariátricos 6 meses después de la gastrectomía; * $p < 0,05$.

Tabla 6. Estado de metilación del ADN de regiones promotoras en los genes estudiados.

	Controles	PB(t0)	PB(t1)	PB(t2)
GHRL CpG1	21,7% ($\pm 12,2$) / 5	16,2% ($\pm 3,1$) / 5	26,5% ($\pm 7,3$) / 6 ^a	18,2% ($\pm 3,1$) / 4
GHRL CpG2	24,1% ($\pm 12,7$) / 5	18,0% ($\pm 3,0$) / 5	28,4% ($\pm 8,7$) / 6 ^b	19,8% ($\pm 2,2$) / 4
GHRL CpG3	28,6% ($\pm 15,9$) / 5	23,8% ($\pm 6,1$) / 5	35,0% ($\pm 12,6$) / 6	26,5% ($\pm 2,8$) / 4
GHRL CpG4	40,0% ($\pm 7,2$) / 2	17,9% ($\pm 5,2$) / 5	31,2% ($\pm 12,6$) / 5	19,2% ($\pm 2,8$) / 4
NAMPT CpG1	5,7% ($\pm 2,1$) / 5	5,7% ($\pm 1,6$) / 4	4,3% ($\pm 4,3$) / 4	4,3% ($\pm 2,9$) / 4
NAMPT CpG2	2,8% ($\pm 2,7$) / 5	3,6% ($\pm 2,7$) / 4	3,1% ($\pm 2,1$) / 4	1,9% ($\pm 2,3$) / 4
NAMPT CpG3	1,3% ($\pm 1,2$) / 5	1,6% ($\pm 1,1$) / 4	1,2% ($\pm 1,4$) / 4	1,0% ($\pm 1,2$) / 4
FAS CpG1	4,2% ($\pm 1,6$) / 4	1,8% ($\pm 0,2$) / 4 ^c	2,7% ($\pm 1,6$) / 4	2,1% ($\pm 0,6$) / 4
FAS CpG2	3,5% ($\pm 1,5$) / 4	1,6% ($\pm 0,8$) / 4 ^d	2,5% ($\pm 1,3$) / 4	1,9% ($\pm 0,6$) / 4
FAS CpG3	4,4% ($\pm 1,3$) / 4	3,6% ($\pm 0,4$) / 4	9,5% ($\pm 12,2$) / 4	3,9% ($\pm 1,4$) / 4
FAS CpG4	3,0% ($\pm 1,2$) / 4	4,1% ($\pm 1,7$) / 4	3,6% ($\pm 1,0$) / 3	4,0% ($\pm 2,4$) / 4
FAS CpG5	3,1% ($\pm 0,5$) / 4	3,8% ($\pm 1,6$) / 4	3,4% ($\pm 0,6$) / 3	2,9% ($\pm 0,8$) / 4
FAS CpG6	2,6% ($\pm 0,3$) / 2	2,5% ($\pm 0,4$) / 3	3,2% ($\pm 1,7$) / 3	3,4% ($\pm 0,0$) / 1
FAS CpG7	3,7% ($\pm 1,0$) / 2	3,0% ($\pm 0,2$) / 3	3,4% ($\pm 0,7$) / 3	8,9% ($\pm 0,0$) / 1
FAS CpG8	2,5% ($\pm 0,9$) / 2	1,8% ($\pm 0,1$) / 2	2,4% ($\pm 0,8$) / 2	2,8% ($\pm 0,0$) / 1
FAS CpG9	3,3% ($\pm 0,2$) / 2	2,9% ($\pm 0,4$) / 2	3,4% ($\pm 0,7$) / 2	3,0% ($\pm 0,0$) / 1

Datos expresados en porcentaje, como media (\pm desviación estándar) / n. PB(t0): Grupo de pacientes bariátricos antes de recibir ninguna intervención; PB(t1): Grupo de pacientes bariátricos antes de la gastrectomía; PB(t2): Grupo de pacientes bariátricos 6 meses después de la gastrectomía.

Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas por letras en superíndice:

^a - diferencia significativa versus SG(t0) (p=0,043)

^b - diferencia significativa versus SG(t0) (p=0,043)

^c - diferencia significativa versus Controles (p=0,029)

^d - diferencia significativa versus Controles (p=0,029)

5.4 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE SUBGRUPOS

Se exploró la posible asociación entre la expresión basal (t0) de los genes estudiados en el grupo PB y la serie de subgrupos estudiados (ver 4.2.4 Perfiles de obesidad).

El subgrupo de pacientes con IMC ≥ 40 kg/m² en el momento de la inclusión (t0) presentó una mayor expresión de IRS1 que aquellos con IMC < 40 kg/m² (IRS1_(t0)=0,27 ($\pm 0,08$) versus IRS1_(t0)=0,17 ($\pm 0,06$), $p=0,03$). Sin embargo, en nuestra cohorte de pacientes obesos, el subgrupo con IMC ≥ 40 no presentó más comorbilidades que el grupo con IMC < 40 ni una mayor índice HOMA-IR. El subgrupo de pacientes con PCR ≥ 5 mg/L en el momento de la inclusión (t0) presentó una mayor expresión de *NAMPT* que aquellos con PCR < 5 mg/L (NAMPT_(t0)=30,5 (± 12) versus NAMPT_(t0)= 20,9 (± 8), $p=0,021$) (Figura 21).

No se hallaron otras asociaciones estadísticamente significativas entre el resultado del análisis molecular y los diferentes perfiles de obesidad previamente descritos, ni tampoco con la evolución del peso o la resolución de comorbilidades a lo largo del proceso de pérdida de peso.

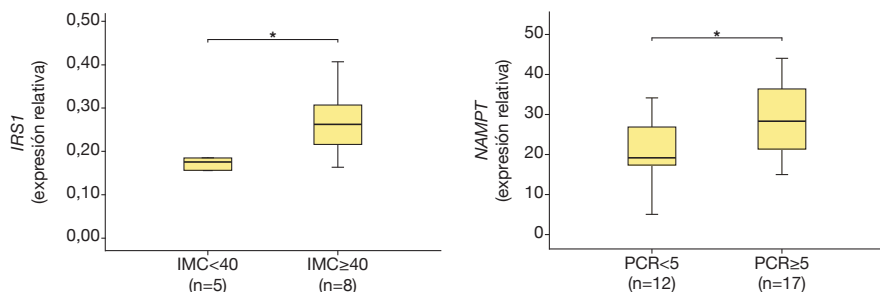


Figura 21. Estudio de subgrupos a nivel basal. IMC: Índice de masa corporal; PCR: Proteína C-Reactiva; * $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Como se ha expuesto anteriormente, las alteraciones del metabolismo energético y las alteraciones inflamatorias observadas en la obesidad están íntimamente relacionadas [19,20,22,27,43,53,54,61,63]. Si bien la mayoría de los fenómenos tiene lugar a nivel local, especialmente en el tejido adiposo, el músculo y el hígado, estos afectan a todos los tejidos del organismo y condicionan un estado proinflamatorio sistémico [19,53,54,63]. Además, aunque los artífices de estas modificaciones del inmunometabolismo parecen ser los tejidos sólidos involucradas, no puede descartarse un papel importante de los LSP, dado que en ellos también se han descrito cambios asociados a la obesidad y a la pérdida de peso [63,117,120,124,125,132-135]. El estudio de los LSP no sólo podría aportar una mejor comprensión de las alteraciones subyacentes a la adiposopatía, sino, potencialmente, también permitir la identificación de biomarcadores con capacidad para predecir la respuesta clínica a los diferentes tratamientos propuestos [117,125-127,150].

Así, el presente estudio tuvo como objetivo analizar, en LSP de una cohorte de pacientes bariátricos, los efectos de la GVL sobre la expresión y la metilación del ADN de una serie de genes relacionados con la inflamación y el metabolismo energético. También se investigó la existencia de asociaciones entre el estado molecular basal y determinadas características clínicas y bioquímicas de los pacientes, antes de recibir ningún tratamiento y a lo largo del proceso de pérdida de peso. Con este fin, se obtuvieron muestras de un grupo de pacientes obesos con indicación de cirugía bariátrica (n=35) en 3 puntos del proceso de pérdida de peso: antes de recibir ninguna intervención (t0), después de dos semanas de DMBC (t1) y a los 6 meses de recibir una GVL (t2). Se extrajo también una muestra de sangre de un grupo control (n=33), compuesto por sujetos delgados y sanos. Siete de los 12 genes analizados presentaron expresión detectable en LSP (*GHRL*, *NAMPT*, *IRS1*, *FTO*, *CCL2*, *TNF* y *FAS*). A los 6 meses de la GVL, se observó un aumento de la expresión de *FTO* y un descenso de la expresión de *FAS* y *CCL2*. El estado de metilación del ADN del promotor de *GHRL* varió de forma armónica en los 4 sitios CpG explorados, aumentando tras la DMBC y disminuyendo a los 6 meses de la GVL. *IRS1* y *NAMPT* presentaron mayor expresión basal en aquellos pacientes que antes de recibir ningún tratamiento tenían un IMC ≥ 40 kg/m² y una PCR ≥ 5 mg/L, respectivamente.

No se encontró ningún gen cuya expresión o metilación basal permitiera predecir la evolución del peso ni la resolución de comorbilidades al año de seguimiento tras la GVL.

Hasta la fecha, únicamente 2 trabajos han investigado el efecto de la GVL sobre la expresión génica en sangre. En uno, Berisha *et al.* [125] analizaron una cohorte de 11 pacientes sometidos a cirugía bariátrica, de los cuales 4 recibieron una GVL. Encontraron cambios postoperatorios en la expresión de 200 genes, pero, desafortunadamente, no se estudió de forma independiente al subgrupo de GVL, de modo que no se identificaron los efectos atribuibles a esta técnica en particular. En el otro, Trachta *et al.* [135] analizaron los cambios de expresión tras GVL en los monocitos CD14+ de mujeres obesas sin DM2. Inicialmente encontraron un aumento de *NAMPT* y *CCL1*, aunque las diferencias desaparecieron a los 24 meses de la intervención. Por otro lado, un único estudio ha investigado los cambios epigenéticos tras GVL. En este, Martín-Nuñez *et al.* [157] analizaron la sangre obtenida antes y a los 6 meses de una GVL, buscando cambios en la metilación global de LINE-1 y, selectivamente, en la metilación del ADN del promotor de *TNF*. No encontraron cambios en la metilación global, pero sí un aumento postoperatorio de la metilación de *TNF* en el subgrupo de pacientes diabéticos.

A diferencia del trabajo de Trachta *et al.* [135], en el que se estudió una cohorte de pacientes obesos muy restringida, compuesta únicamente por mujeres sin DM2, en nuestro trabajo se estudió una cohorte más representativa del conjunto de pacientes obesos con criterios de GVL. Los criterios de inclusión en el estudio fueron los mismos que se requerirían a cualquier paciente que fuera a recibir una GVL sin objetivos científicos, y los criterios de exclusión intencionadamente limitados. Estos sólo condicionaron la pérdida de 4 individuos (un 10%), ya que, debido a la juventud que presentan habitualmente estos pacientes, la presencia de antecedentes neoplásicos o enfermedades sistémicas no relacionadas con la obesidad es poco frecuente. A pesar de incluir cierta variabilidad, este enfoque amplio aporta mucha más validez externa a los resultados del estudio.

Cabe mencionar que se decidió no considerar el hipotiroidismo como una enfermedad sistémica tributaria de exclusión por la creciente evidencia de que, en estos pacientes, la obesidad sí podría estar jugando un papel en la elevación de la tirotrponina [88,159-161]. Por ejemplo, Reinehr *et al.* [160] encontraron que la hipertirotrponemia se revertía en niños obesos tras la pérdida de peso, Garg *et al.* [88] que, en su serie, 13 de los 18 pacientes con hipotiroidismo presentaban mejoría tras una cirugía bariátrica y, Ruiz-Tovar *et al.* [161], que la prevalencia de hipotiroidismo subclínico disminuía de 17% a 2% al año de una GVL.

El grupo PB estuvo compuesta por un 29% de hombres, tuvo una edad media de 49 años y un IMC medio en el momento de la inclusión de 45 kg/m². La presencia de comorbilidades asociadas al SM fue de un 51% de DM2 y HTA y un 57% de DLP. Así pues, la cohorte de pacientes bariátricos presentó, en estas variables clave, unas características basales similares a las descritas previamente por otros grupos [77,88,99-102,108]. Sin embargo, el valor medio de HOMA-IR en el grupo PB fue de 4, traduciendo un muy satisfactorio control glucémico basal. Este valor es similar al descrito en algunos trabajos [63,112,183], pero menor que el valor cercano a 7 que refieren otros grupos [105,108,111] en los que, probablemente, la glucemia preoperatoria se controla de forma más laxa.

Como era previsible, en comparación con el grupo control, en el grupo PB se encontró una alteración de todos los parámetros bioquímicos analizados, con la excepción de GPT. Este dato llama discretamente la atención, ya que un 77% de los pacientes había sido previamente diagnosticado ecográfica o histológicamente de esteatosis hepática, que según la literatura suele asociarse a una elevación de GPT en un 50% de casos [184], por lo que se hubiera esperado que estuviera también alterado en nuestra cohorte.

Con una mortalidad descrita de <0,5% y una morbilidad de <10%, siendo la mayoría de las complicaciones de carácter leve [88,99,101,102], la GVL se puede considerar una intervención relativamente segura. Si bien la necesidad de reintervenciones no es despreciable, situándose cerca del 4%, la mayoría de ellas son cirugías de revisión por una pérdida insuficiente de peso, y se plantean sólo varios meses, incluso años después

de la primera intervención [88,101,102]. Afortunadamente, en nuestra serie no hubo mortalidad, complicaciones postoperatorias graves ni necesidad de reintervenir a ningún paciente durante el tiempo de seguimiento.

A los 6 meses de la inclusión, el IMC medio se redujo en 13 kg/m², con un %PTP del 28% y un %EPP del 67%. Al año, el IMC medio había disminuido en 15 kg/m², el %PTP era del 32% y el %EPP del 75%. Por poner estos datos en perspectiva, mencionar que Chang *et al.* [102] encontraron, en su revisión sistemática de los estudios observacionales que describían la evolución del peso al año de una GVL, una reducción media del IMC de 12 kg/m² y un %EPP del 51%, y Kang *et al.* [100], en un trabajo más reciente de características similares, hallaron una reducción media del IMC de 14,5 kg/m² y un %EPP del 71%. No obstante, debe tenerse en cuenta que, para facilitar la interpretación evolutiva de los datos, en nuestro estudio se tomó como valor basal el peso que presentaban los pacientes antes de iniciar la DMBC (t0), y no el peso del día de la intervención (t1). Podría criticarse, con razón, que así se exageran artificialmente los efectos de la cirugía, al incluirse la pérdida de peso inducida por la DMBC. Si el cálculo de la reducción del IMC, del %PTP y del %EPP se realiza utilizando el peso estrictamente preoperatorio como valor basal, al año de la GVL el resultado sería de -13 kg/m², 28% y 72%. Así, sigue pudiéndose afirmar que, al año de la cirugía, en nuestra cohorte se produjo una pérdida de peso significativa y de una magnitud similar a la descrita en la literatura para el mismo periodo de seguimiento [88,100-102].

Sorprendentemente, tanto la PCR como el HOMA-IR aumentaron tras la DMBC. El incremento de HOMA-IR fue pequeño, de sólo 0,4, y no presento significación estadística, por lo que puede atribuirse al azar. La PCR aumentó también de forma discreta, en 1,2 mg/L, pero sí presentó significación (p=0,001). En otros contextos, con periodos de seguimiento más largos y durante los cuales los pacientes presentaban una pérdida de peso más importante [185,186], la DMBC se ha asociado a una disminución de la PCR. Sin embargo, no se encuentra en la literatura ningún trabajo que haga referencia a la evolución de la PCR tras la DMBC previa a una cirugía bariátrica, de sólo dos semanas y con una pérdida de peso escasa. A falta de una explicación satisfactoria, sería recomendable analizar en el futuro

otras cohortes de pacientes bariátricos para observar si se reproducen los resultados.

Tras la GVL, como era esperable, ambos valores disminuyeron de forma significativa. En dos trabajos ^[104,105] donde se analizaron los cambios inducidos por la GVL en diferentes marcadores inflamatorios, se describió una reducción del 50% en la PCR a los 6 meses de la intervención. Este resultado coincide con el observado en nuestro estudio, donde la PCR disminuyó un 45%. Por otro lado, en un metaanálisis ^[110] sobre la evolución del HOMA-IR tras GVL, este presentó una reducción media del 73% a los 6 meses de la intervención. En otros dos trabajos^[111,112] donde se calculaba el valor de HOMA-IR a los 6 y 12 meses de la GVL, este disminuía aproximadamente un 65% y un 75%, respectivamente. Estos cambios son porcentualmente de mayor magnitud que el descenso observado en nuestra serie, donde HOMA-IR descendió un 56% y un 64% a los 6 y 12 meses de la GVL. Sin embargo, el valor absoluto final fue similar, entorno 1,5, y las diferencias radican, probablemente, en que, como se ha comentado, el valor inicial de HOMA-IR en nuestra cohorte fue más bajo que en otros estudios.

La mejoría bioquímica se tradujo en que, al año de la GVL, la DM2, la HTA y la DLP habían remitido completamente en un 55%, un 38% y un 40% de pacientes, respectivamente. No es fácil comparar estos resultados clínicos con los descritos en la literatura debido a las múltiples definiciones de remisión utilizadas por los diferentes grupos. En nuestro estudio, la remisión de las comorbilidades se definió de acuerdo con guías nacionales e internacionales actualizadas ^[165-168,170,171], pero este punto no siempre se detalla en las publicaciones encontradas ^[78,187]. Además, se ha visto que, incluso tras una remisión completa, el relapso postoperatorio no es infrecuente. Por ejemplo, en una revisión a largo plazo del registro sueco, el porcentaje de remisión de DM2 tras cirugía bariátrica pasaba de ser del 72% a los dos años a sólo el 30% quince años después de la intervención ^[188]. Así, el periodo de seguimiento es otro dato fundamental para poder comparar resultados.

En algunas revisiones donde se describen datos específicos para GVL, como la de Chang *et al.* ^[102], se habla de una media de curación del 85%, 82%

y 83% para DM2, HTA y DLP, respectivamente, aunque no se especifica ni el tiempo de seguimiento medio ni la definición utilizada en los diferentes estudios incluidos. Otros trabajos describen mejorías más modestas. Por ejemplo, Kowalewski *et al.* [189], en su serie de GVL publicada en 2018, describen una remisión de DM2 y HTA del 37% y 28%, respectivamente, aunque con un seguimiento medio largo, de 8 años.

Al año de la GVL, van Rutte *et al.* [101] describen, en su serie con más de 800 pacientes, una remisión de DM2, HTA y DLP del 60%, 51% y 40%, respectivamente. Y, Peterli *et al.* [190], en un estudio multicéntrico suizo con más de 100 pacientes, describieron al año de la GVL una remisión completa del 57%, 32% y 25% en DM2, HTA y DLP, respectivamente. En estos estudios, como en el nuestro, la remisión se describe como el abandono del tratamiento farmacológico, aunque no se especifica qué criterios se utilizaron para tomar esta decisión. En resumen, aunque es difícil de afirmar, los porcentajes de remisión de las comorbilidades obtenidos en nuestro estudio parecen equiparables a los publicados por otros grupos tras el mismo tiempo de seguimiento [101,190].

La concentración plasmática basal de ghrelina también se comportó de acuerdo a lo descrito previamente. Fue significativamente mayor en el grupo control que en el grupo PB, como ya había sido observado anteriormente por otros grupos [40,105], en concordancia con el concepto de que la secreción de ghrelina disminuye en situaciones de balance energético positivo [39,40]. Siguiendo este planteamiento, no es de extrañar que aumentara en relación al balance energético negativo asociado a la DMBC, pero en un primer momento puede parecer paradójico que la ghrelina plasmática disminuyera tras la pérdida de peso inducida por la GVL. No obstante, si se tiene en cuenta que el fundus gástrico es, con diferencia, el sitio más activo de secreción de ghrelina [36,37], y que este, a diferencia de lo que ocurre en otros tipos de cirugía bariátrica, es seccionado y extraído del abdomen durante la GVL, parece plausible que no se observe un aumento plasmático de ghrelina a pesar de la existencia de un balance energético negativo [191], sino precisamente lo contrario. Este efecto postoperatorio ha sido repetidamente descrito tras GVL [105,111,191,192] y motivó un metaanálisis en el que se confirmaron los resultados [193].

La ausencia de fundus gástrico parece el razonamiento más sencillo para explicar la evolución de la ghrelina plasmática tras una GVL, y, dado que esta técnica ha demostrado buenos resultados clínicos, implicaría que el aumento de ghrelina no sería imprescindible para volver a un estado metabólico saludable. Sin embargo, dada la intensa relación encontrada entre los cambios de ghrelina y el estado energético del organismo, es tentador buscar otras explicaciones que mantengan esta hormona en la ecuación.

Así, otra línea argumental podría explotar el hecho de que la ghrelina circula en dos formas distintas: aproximadamente un 10% se encuentra acilada, y parece que esta sería la fracción activa, mientras que el 90% restante no lo está, desconociéndose hasta la fecha si esta forma tiene alguna función biológica [38]. Se podría plantear, pues, que un cambio en la proporción de acil-ghrelina/des-acil-ghrelina permitiría compensar funcionalmente el descenso de su valor absoluto. Los principales obstáculos de esta línea de investigación son la complejidad técnica de la determinación de las diferentes formas de ghrelina [194] y las oscilaciones plasmáticas en relación a la ingesta y el ayuno, que obligan a una recogida de muestras muy escrupulosa [40]. A pesar de esto, se ha comprobado que la proporción plasmática de las dos formas de ghrelina se modifica en diferentes situaciones metabólicas [38], y, aunque no se ha encontrado aún un receptor para la forma des-acilada, estudios recientes apuntan a que tendría un papel independiente en la regulación glucémica, entre otros posibles efectos [39,41,64]. No obstante, también existe al menos un estudio en el que la supresión de la expresión del gen *GHRL* en un grupo de ratones sometidos a una GVL no provocaba resultados diferentes a los obtenidos en ratones no modificados [195], reforzando la idea de que los efectos de la GVL serían completamente independientes de la ghrelina. Desafortunadamente, nuestro trabajo no analizó la proporción de acil-ghrelina/des-acil-ghrelina, de modo que no puede contribuir a este complejo y apasionante debate.

En cambio, nuestro trabajo se centró en el estudio de la evolución de la expresión génica y, en este sentido, las modificaciones observadas a lo largo del proceso de pérdida de peso en la concentración de ghrelina plasmática no se tradujeron en cambios de expresión en LSP. Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que la ghrelina se sintetiza

principalmente en el fundus gástrico, como se ha mencionado, y también en el resto del tubo digestivo y el cerebro, pero no de forma importante en LSP [36]. Al no encontrarse en la literatura estudios previos que hayan analizado la expresión de *GHRL* en LSP tras GVL, aun siendo negativos, estos resultados no carecen de interés.

La otra hormona analizada, la visfatina, no se comportó en nuestro estudio como había sido previamente descrito en la literatura, pues no se encontraron diferencias en su concentración plasmática entre el grupo control y el grupo PB. Esto contrasta con algunas publicaciones, donde se había descrito una correlación entre visfatina e IMC [33,35,65] y entre visfatina y algunas citoquinas pro-inflamatorias, como *IL-6* y *PCR* [34], factores que sí se encontraron elevados en el grupo PB. Además, en estos estudios la elevación de visfatina hallada en obesos revertía tras la cirugía bariátrica [33,34,196], mientras que, en nuestro estudio, no se encontraron cambios a lo largo del proceso de pérdida de peso.

Consecuentemente, en LSP tampoco se encontraron cambios en la expresión de *NAMPT*, el gen que sintetiza la visfatina. En cambio, Trachta *et al.* [135] sí describieron un aumento de la expresión de *NAMPT* a los 6 meses de una GVL. Hay dos razones que podrían justificar estas diferencias. En primer lugar, como se ha comentado anteriormente, nuestro estudio no sólo incluyó mujeres no diabéticas, sino una muestra más representativa de la práctica clínica habitual. Y, en segundo lugar, su estudio se realizó sobre monocitos CD14+ mientras que nuestro análisis se hizo sobre todas las poblaciones de leucocitos presentes en sangre periférica. Si bien el estudio de líneas celulares específicas permite eliminar variabilidad y aporta una información muy valiosa respecto a la fisiopatología fina de la obesidad, el estudio de LSP, al abarcar más tipos celulares, es más sensible y quizá más interesante en un estado tan inicial de la investigación como es actualmente el de los efectos de la GVL sobre la expresión en sangre [117,125]. Además, es más realista desde el punto de vista clínico, ya que es mucho más barato y técnicamente más sencillo, lo que lo hace más adecuado de cara a identificar biomarcadores con aplicación práctica [125].

Hasta donde sabemos, la expresión de *IRS1*, un gen fundamental para el control intracelular del metabolismo energético, no había sido antes

explorada en LSP de sujetos con indicación de cirugía bariátrica. Existe, eso sí, un estudio realizado en niños ^[176] donde aquellos con obesidad, pero sin resistencia insulínica asociada, presentaban una mayor expresión de *IRS1* en LSP que aquellos con resistencia insulínica o que el grupo control. En nuestra cohorte, sin embargo, no se hallaron diferencias entre los diferentes grupos y tiempos analizados, y la expresión de *IRS1* tampoco se modificó en relación a la resistencia insulínica. Las importantes diferencias basales de edad, IMC y comorbilidades entre la cohorte de niños obesos y la de pacientes bariátricos podrían explicar la divergencia de las observaciones.

También se investigó *FTO*, un gen de acción eminentemente cerebral ^[49,50] pero cuya expresión se ha detectado asimismo en tejidos periféricos, en relación con el metabolismo energético ^[51,52]. En el trabajo de Lappalainen *et al.* ^[120], la expresión de *FTO* en tejido adiposo fue mayor en personas obesas, pero en células mononucleadas sanguíneas no presentó diferencias entre grupos. En cambio, Klötting *et al.* ^[52] y Bravard *et al.* ^[51] hallaron en tejido adiposo una relación inversa entre la expresión de *FTO* y el IMC. En la línea de estos dos últimos trabajos, y a diferencia de lo descrito por Lappalainen en células mononucleadas, en LSP la expresión basal de *FTO* fue significativamente menor en el grupo PB que en grupo control, incrementándose tras la GVL hasta perder la significación estadística con el grupo control. Sin embargo, los cambios a lo largo del proceso de pérdida de peso no alcanzaron la significación, puede que debido al reducido tamaño de los grupos. Aunque el papel de *FTO* a nivel periférico continua sin estar completamente establecido, su importancia se ve reforzada por el repetido hallazgo de diferencias entre sujetos obesos y delgado, incluso en LSP.

Otra consideración importante es el papel de los SNP en la expresión de *FTO*. Si bien las mutaciones puntuales en las regiones codificantes del genoma podrían provocar un cambio de función en la proteína final, los SNP ubicados en el promotor del gen podrían tener un efecto a nivel de su transcripción ^[197]. De hecho, la mayoría de SNP asociados a la obesidad en *FTO* se encuentran en el primer intrón, que corresponde a una porción de ADN no codificante involucrada en su expresión ^[49,197], y ya se ha descrito el efecto inhibitor de algunos de ellos ^[197,198]. Desafortunadamente, no se determinó la presencia de estas mutaciones en nuestra cohorte, por lo que

no podemos valorar el efecto que hayan podido ejercer sobre el análisis de expresión.

De entre los múltiples genes proinflamatorios relacionados con la obesidad, se decidió investigar en LSP la expresión de los dos más representativos, *CCL2* y *TNF* ^[53,54], y también explorar el papel de *FAS*, que, si bien hasta ahora no se ha involucrado directamente con la obesidad ^[53], podría tener, entre otros, un papel en los fenómenos de apoptosis observados en la adiposopatía ^[199].

Una de las citoquinas más habitualmente asociadas a la obesidad es *CCL-2* ^[53,54]. Se cree que sería una de las principales señales quimiotácticas liberadas por adipocitos y hepatocitos para inducir la infiltración tisular de los monocitos que, una vez diferenciados en macrófagos activados, generarían el estado proinflamatorio local ^[43,53,54]. Más discutida es su importancia a nivel sistémico. Según algunos estudios, la concentración de *CCL2* en plasma estaría elevada en los pacientes bariátricos ^[200] y disminuiría tras la cirugía ^[200-202], aunque no todos obtienen los mismos resultados. Por ejemplo, Montecucco *et al.* ^[201] no encontraron diferencias pre-operatorias entre el grupo de obesos y el grupo control, aunque sí una disminución significativa al año de un BPGL, mientras que Shimizu *et al.* ^[106] no encontraron diferencias postoperatorias tras una GVL.

Por lo que respecta a su expresión, en el tejido adiposo de un modelo murino de BPGL se describió, a los cuatro meses de la intervención, una disminución de la expresión de *CCL2* ^[203]. En cambio, en el citado estudio de Trachta *et al.* ^[135], donde además de *NAMPT* se analizaron también en monocitos CD14+ varias citoquinas de la subfamilia CC, no se encontraron cambios en la expresión de *CCL2*. En nuestro estudio no se analizó la concentración de *CCL2* en plasma, pero, siguiendo el mismo patrón descrito por Montecucco *et al.* ^[201], la expresión en LSP no fue diferente entre pacientes y controles, ni se modificó tras DMBC, pero tras la GVL disminuyó un 50% respecto a su valor prequirúrgico, siendo estas diferencias significativas respecto al valor preoperatorio y respecto al grupo control. Las razones de la disparidad con las observaciones de Trachta *et al.* ^[135] podrían ser las mismas que respecto al análisis de la expresión de *NAMPT*, las células estudiadas y la composición de la cohorte.

Cabe mencionar que, al ser CCL2 una citoquina de acción fundamentalmente local [53,54], esta disminución de su expresión en LSP podría no tener un papel fisiopatológico real, sino únicamente traducir de forma indirecta la menor inflamación tisular. En todo caso, este hallazgo es consistente con la reducción de la PCR y la mejoría del estado proinflamatorio descrito repetidamente tras la pérdida de peso [104,105], y podría ser interesante explorar con más profundidad su papel como indicador del estado inmunometabólico de los pacientes bariátricos.

Otra de las citoquinas clásicamente asociadas a la adiposopatía es TNF, en tanto que el descubrimiento de su liberación por parte de los macrófagos residentes en el tejido adiposo fue la primera evidencia de una conexión directa entre el metabolismo energético y las vías de la inflamación [43,61]. Además, también se sintetiza de forma abundante en hígado y músculo, donde a través de la inhibición de la fosforilación de IRS1 generaría una resistencia a la insulina de forma directa [53,54]. Aunque su efecto es principalmente paracrino, se ha descrito también una elevación de su concentración plasmática en obesos [63,183,196], reversible tras la pérdida de peso asociada a una cirugía bariátrica [183,196,204].

Como sería esperable, la expresión de *TNF* se ha encontrado basalmente elevada en diferentes tejidos de pacientes obesos [116,119,122], incluidas las células mononucleares periféricas [63]. En cambio, el estudio de la expresión de *TNF* tras cirugía bariátrica, sobre todo en tejido adiposo, ha tenido resultados controvertidos. Algunos grupos han descrito un descenso de su expresión [205], mientras que otros no han encontrado cambios [105] e incluso uno, sorprendentemente, halló un importante aumento [204]. Todos estos estudios han sido realizados en BPGI u otras técnicas bariátricas, pero no en GVL, y nunca en LSP. En nuestra cohorte, la expresión de *TNF* en LSP no evidenció cambios importantes. El grupo PB presentó valores discretamente mayores al grupo control, pero únicamente presentaron significación tras la DMBC. Además, dentro del grupo PB no se registraron cambios entre antes y después de la cirugía, de forma similar a lo encontrado en tejido adiposo por algunos de los estudios mencionados [105]. La falta de concordancia entre nuestros resultados basales y las diferencias descritas previamente en células mononucleadas [63] puede deberse al tipo de células estudiadas, o, también, a que en nuestro estudio ha faltado potencia para

detectar diferencias entre obesos y delgados, ya que la tendencia general sí ha sido hacia una mayor expresión en obesos.

El último gen con expresión detectable en LSP fue *FAS*. *FAS* ha sido hasta el momento exhaustivamente estudiado como promotor de la apoptosis, pero recientemente se ha relacionado también con otros muchos fenómenos inflamatorios, por lo que, dada su estrecha relación fisiológica con TNF, podría jugar un papel en la adiposopatía [199]. En nuestra cohorte, la expresión basal de *FAS* no fue distinta entre el grupo PB y el grupo control, pero tras DMBC se observó un descenso significativo de su expresión que se mantuvo a los 6 meses de la GVL. La importancia de este hallazgo es difícil de definir, pero es coherente con la disminución del estado proinflamatorio sistémico observada tras la cirugía. En todo caso, sugiere que *FAS* debería ser quizá más ampliamente estudiado en el contexto de la obesidad.

Desafortunadamente, hubo 5 genes importantes (*LEP*, *PPARG*, *ADIPOQ*, *FASN* y *MC4R*) que, en nuestra cohorte, no presentaron expresión detectable. Entre estos, la expresión en LSP de al menos 3 (*LEP*[133], *PPARG*[124] y *ADIPOQ*[132]) había sido previamente descrita por otros grupos utilizando un método similar al nuestro, por lo que no puede descartarse completamente un error técnico durante el análisis de expresión. No obstante, el proceso fue ensayado satisfactoriamente en otras líneas celulares con expresión conocida de dichos genes, por lo que parece improbable que la ausencia de expresión sea debida a un error metodológico.

En general, es complicado discernir si los cambios de expresión encontrados tras una cirugía bariátrica son debidos a los cambios anatómicos realizados durante la intervención o únicamente secundarios a la pérdida de peso. Si asumimos que la adiposopatía se genera por una hipertrofia de los adipocitos viscerales, el papel de la pérdida de peso es incuestionable [19]. No obstante, algunas observaciones, como que los pacientes presenten una resolución de sus comorbilidades antes de perder efectivamente el exceso de peso, hace sospechar que los cambios anatómicos sí podrían modificar directamente las interacciones entre los diferentes actores moleculares implicados en la adiposopatía, incluso de forma independiente al peso.

En este sentido, se analizó la correlación entre los cambios de expresión encontrados en *FTO*, *CCL2* y *FAS* y la evolución de IMC, HOMA-IR y PCR, para investigar si estos cambios de expresión podían ser secundarios a la mejoría específica del peso, la resistencia insulínica o el estado proinflamatorio. Aunque no se encontraron correlaciones estadísticamente significativas, el pequeño tamaño de los grupos no permite concluir que los cambios de expresión sean verdaderamente independientes de la mejoría de estos parámetros.

La segunda parte del estudio molecular consistió en un análisis del estado de metilación del ADN de las regiones promotoras de 3 genes candidatos: *GHRL*, *NAMPT* y *FAS*. A pesar de no haber encontrado cambios en la expresión de *GHRL* en LSP, y de que la ghrelina no sea secretada habitualmente por estas células, *GHRL* se seleccionó para explorar la posibilidad de que los LSP pudieran servir como marcadores del estado de metilación de otros tejidos, como el tubo digestivo o el cerebro, en los que sí se secreta pero no son accesibles en el humano sin causar una morbilidad prohibitiva. *NAMPT* fue seleccionado porque los leucocitos se han propuesto como una fuente importante de visfatina ^[35] y, a pesar de que en nuestra cohorte no se observaron cambios de expresión a lo largo del proceso de pérdida de peso, se consideró oportuno explorar si podían detectarse en LSP modificaciones en su estado de metilación. Por último, el desconocimiento del papel de *FAS* en la obesidad, junto con los interesantes hallazgos del análisis de expresión, motivaron el estudio más detallado de sus vías de regulación.

En los 4 sitios CpG estudiados en el promotor de *GHRL* se detectó un aumento de metilación tras DMBC, siendo estos cambios estadísticamente significativos en 2 de ellos (CpG1 y CpG2). Y, a los 6 meses de la GVL, el estado de metilación de los 4 sitios estudiados había descendido de forma evidente hasta situarse en niveles próximos a los basales, aunque no se alcanzó la significación en ningún de ellos.

Por un lado, los cambios encontrados fueron consistentes entre los diferentes sitios CpG estudiados, lo que aporta solidez a la observación ^[140]. Por otro, estos cambios fueron de una magnitud importante, de alrededor del 10%, algo observado poco frecuentemente en patología no neoplásica

[140,206]. Por ejemplo, en los estudios de Hermsdorff *et al.* [143], donde se describía una hipometilación del promotor de *TNF* en LSP de mujeres obesas, o el de Obermann-Borst *et al.* [144], donde se encontró una hipometilación de leptina en sangre de niños obesos, los cambios descritos no superaron el 3%. Estos resultados, a pesar de ser interesantes, están dentro del margen de error del 5% que presentan habitualmente los equipos utilizados para la realización de estas determinaciones, por lo que el hallazgo de diferencias tan pequeñas debe ser asumido con precaución.

Nuestros datos también deben ser interpretados con cautela, por tres razones. La primera es que el número de muestras estudiadas es pequeño. La segunda, el hecho de que tres de los pacientes fumaron durante el estudio, lo que podría influir en el estado de metilación de los LSP [207]. Y, la tercera, que los resultados no se corrigieron por las proporciones de las diferentes poblaciones celulares presentes en cada muestra [141]. Recientemente se ha comprobado el efecto confusor de no considerar esta variable en un trabajo exhaustivo sobre los perfiles de metilación de las diferentes líneas celulares en sangre [207]. Se observó como, efectivamente, las células mononucleadas y polimorfonucleadas, incluso los subtipos de estas, mostraban perfiles diferenciados de metilación. Así, consideradas globalmente, las muestras de sangre mostraban divergencias aparentes en el perfil de metilación de los sujetos cuando, en realidad, analizadas las líneas individualmente, estas no existían o, al contrario, se encontraban otras nuevas que habían quedado camufladas por la diferente representación celular de las muestras. Este podría ser un factor relevante en nuestro caso, ya que se sabe que el IMC puede afectar al índice neutrófilos/linfocitos [208] y modificarse tras la pérdida de peso [186].

Además, otra crítica posible es que, incluso justificando la falta de elevación de la ghrelina plasmática tras GVL por la ausencia de fundus gástrico, el modelo actual, como se ha expuesto anteriormente, sugeriría que el balance energético negativo debería provocar, en todo caso, un aumento de su expresión [39]. Y, considerando la metilación del ADN de la región promotora de un gen como una señal inhibitoria de su expresión [137], se esperaría que la metilación disminuyera en el contexto de un aumento de expresión, al menos en el tejido secretor. Los cambios de metilación observados en LSP, en cambio, no siguen este patrón. No obstante, no sólo

no está claro que la ghrelina plasmática deba aumentar tras una cirugía bariátrica, como muestran los resultados contradictorios encontrados tras BPGL [39,40], sino que las interacciones entre los diferentes tejidos involucrados en el control metabólico de la obesidad han demostrado ser muy complejas [26,38,40,64], y es difícil asumir *a priori* cual debería ser el comportamiento de cada uno de ellos.

Así, no existiendo estudios previos que hayan analizado, ni en LSP ni en otros tejidos [140,142], los cambios en la metilación del ADN del promotor de *GHRL* a lo largo de un proceso de pérdida de peso inducido por cirugía bariátrica, la consistencia y magnitud de nuestros resultados, a pesar de las posibles crítica, merecerían una mayor investigación en el futuro.

Al contrario, el estado de metilación de los tres sitios CpG estudiados en el promotor de *NAMPT* fue similar entre obesos y delgados. Y, a diferencia de *GHRL*, no se modificó a lo largo del proceso de pérdida de peso. Del mismo modo, el análisis de la metilación del promotor de *FAS* no mostró resultados demasiado interesantes. Si bien en dos de los sitios CpG estudiados la metilación en el grupo control fue significativamente mayor que en el grupo PB, esta diferencia fue de pequeña magnitud (<3%) y no se reprodujo en los otros 7 sitios CpG analizados. Además, tampoco se encontraron otros cambios a lo largo del proceso de pérdida de peso.

Los cebadores del análisis de metilación fueron diseñados para incluir los sitios CpG que habían mostrado previamente variabilidad en otras patologías, sobre todo en cáncer. No obstante, las regiones promotoras de *NAMPT* y *FAS* son de una longitud importante, y contienen muchos más sitios CpG de los que ha sido posible estudiar. Dado que se conoce muy poco sobre la regulación epigenética en la obesidad [140-142], cabe decir que no se puede descartar completamente que estos genes presenten efectivamente cambios de metilación del ADN, pero estos hayan pasado desapercibidos en nuestro análisis por encontrarse en regiones distantes a las estudiadas.

Finalmente, se realizó un análisis de subgrupos. Se investigó la asociación entre los resultados del análisis molecular y diferentes variables clínicas y bioquímica con el objetivo de identificar la existencia de perfiles moleculares diferenciados. A nivel basal, un IMC ≥ 40 kg/m² se asoció con

una mayor expresión de *IRS1*, apuntando hacia un perfil de alteraciones moleculares diferenciado en los pacientes con mayor obesidad. Sin embargo, nuestra cohorte de pacientes con $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$ no presentó más comorbilidades ni un mayor índice HOMA-IR, como se ha encontrado en otras series ^[173].

También existió una asociación entre la presencia de una $PCR \geq 5 \text{ mg/L}$ y una mayor expresión de *NAMPT*. A pesar de que en nuestra cohorte no se encontró una correlación entre la visfatina plasmática y la PCR, como sí describen otros equipos ^[34], este resultado es coherente con la idea de que la expresión extracelular de *NAMPT* está relacionada con los estados proinflamatorios ^[33].

Sin embargo, la expresión de ninguno de los genes detectados en LSP se asoció con una mayor pérdida de peso ni una mayor resolución de comorbilidades, lo que hubiera sido muy interesante de cara a mejorar la selección de pacientes tributarios de GVL.

Como ya se ha mencionado, el conocimiento de los efectos moleculares de la GVL en LSP es muy escaso. Una de las fortalezas de este estudio ha sido la inclusión de una cohorte representativa del conjunto de pacientes obesos con criterios de GVL. Otra, el analizar el tiempo intermedio que supone la DMBC en la evolución metabólica de los pacientes, ya que esto ha permitido tener una imagen más completa de los cambios encontrados.

Por contra, visto en retrospectiva, quizá se hubiera debido ampliar el análisis de metilación del ADN a *FTO* y *CCL2*, ya que estos mostraron cambios significativos de expresión tras la GVL. Además, se hubiera debido seleccionar pacientes no fumadores y corregir los resultados de metilación con las proporciones de las diferentes líneas celulares presentes en cada muestra. Sin embargo, en el momento en que se realizó el análisis se disponía de menor información sobre la relevancia de estos aspectos.

Por otro lado, hubiera sido interesante obtener muestras para análisis molecular durante un periodo de tiempo postoperatorio más prolongado. A los 6 meses de la GVL los pacientes aún estaban perdiendo

peso, y, a nivel metabólico, podría ser más importante el signo del balance energético que no el peso en un momento determinado^[130]. Así pues, no puede descartarse que, al cabo de unos años, ya en la fase de estabilidad energética, los cambios encontrados se normalicen, como, de hecho, ocurrió en el repetidamente citado trabajo de Trachta *et al.*^[135].

En resumen, este estudio representa la primera investigación realizada sobre los efectos moleculares en LSP de la pérdida de peso inducida por una DMBC seguida de una GVL en una población de pacientes bariátricos representativa de la práctica clínica habitual. Los hallazgos descritos permiten afirmar que en LSP tienen lugar modificaciones en la expresión y, posiblemente, también en la metilación del ADN de genes relacionados con la inflamación y el metabolismo energético. Las implicaciones fisiopatológicas de estos cambios no son fáciles de establecer, dado que aún se está lejos de tener un modelo completo de las alteraciones moleculares asociadas a la obesidad. Sin embargo, los resultados aportan, como mínimo, nueva evidencia de que los LSP podrían representar una ventana válida para monitorizar el estado inmunometabólico de los pacientes bariátricos.



CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. En la cohorte de pacientes bariátricos del estudio, el proceso de pérdida de peso compuesto por una DMBC seguida de una GVL presentó resultados equiparables a los previamente descritos en la literatura en términos de pérdida de peso, mejoría de parámetros bioquímicos y resolución de comorbilidades.
2. Sólo 7 de los 12 genes analizados presentaron expresión detectable en LSP (*GHRL*, *NAMPT*, *IRS1*, *FTO*, *FAS*, *TNF* y *CCL2*). Entre estos, se encontraron algunos cambios de expresión durante el proceso de pérdida de peso. La expresión de *FTO* fue menor en el grupo PB que en el grupo control antes de recibir ninguna intervención y después de la DMBC, normalizándose a los 6 meses de la GVL. La expresión de *FAS* en el grupo PB disminuyó después de la DMBC, manteniéndose baja 6 meses después de la GVL. La expresión de *CCL2* se disminuyó a los 6 meses de la GVL en comparación con su valor prequirúrgico. No se encontraron cambios relevantes en la expresión de *GHRL*, *NAMPT*, *IRS1* ni *TNF*.
3. El estado de metilación del ADN de la región promotora del gen *GHRL* siguió un patrón similar en los 4 sitios CpG estudiados, aumentando tras la DMBC y disminuyendo 6 meses después de la GVL, si bien estos cambios no fueron significativos más que en CpG1 y CpG2. La metilación del ADN de las regiones promotoras de *NAMPT* y *FAS* no presentaron cambios relevantes a lo largo del proceso de pérdida de peso ni en comparación con el grupo control.
4. Los integrantes del grupo PB con IMC ≥ 40 kg/m² en el momento de la inclusión en el estudio presentaron una mayor expresión basal de *IRS1*. Y aquellos con PCR ≥ 5 mg/L presentaron una mayor expresión basal de *NAMPT*. No se encontraron asociaciones entre el perfil molecular basal y la evolución ponderal ni la resolución de comorbilidades al año de la GVL.



ANEXOS

ANEXO I: TÉCNICAS DE ANÁLISIS MOLECULAR

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qRCP)

Existen diferentes técnicas de laboratorio utilizadas para analizar la expresión génica. La mayoría de ellas se basan en el estudio del ARN mensajero, que representa el paso intermedio entre la información contenida en el núcleo celular como ADN y las proteínas producto de dicha información ^[18,19].

La qRCP es una variante de la RCP en la que, además de amplificar el ADN, este puede ser cuantificado en tiempo real gracias a técnicas de detección de fluorescencia ^[21,212].

Para la realización de una RCP se requiere:

- Una secuencia molde de ADN, que puede ser de cadena simple o doble, en la que esté incluida la secuencia específica que se quiere amplificar. En caso de partir de ARN, este puede ser previamente convertido a su ADN complementario mediante una transcripción inversa.
- Dos cebadores, uno directo y otro reverso. Son secuencias cortas de nucleótidos, de unos 20 pares de bases, aproximadamente, complementarias al inicio y al final de la secuencia diana que se quiere amplificar, delimitándola dentro del molde de ADN.
- Abundantes desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) de los cuatro tipos que conforman el ADN (adenosina, guanina, citosina y timina).
- Una polimerasa estable a altas temperaturas, la enzima encargada de incorporar los nucleótidos a los nuevos duplicados de la secuencia diana.
- Una solución buffer rica en magnesio y libre de potasio. El magnesio actúa como cofactor de la polimerasa, por lo que es imprescindible. El potasio, en cambio, propicia la formación de superestructuras en la cadena de nucleótidos que dificultan la acción de la polimerasa.

La reacción tiene lugar gracias a cambios cíclicos de temperatura (**Figura 22**). Primero se aplica una temperatura elevada (generalmente alrededor de 95°C) que propicia la desnaturalización del ADN en cadenas simples. A continuación, la temperatura desciende al punto óptimo de hibridación de los cebadores seleccionados, para que estos se unan al molde de ADN delimitando el segmento a duplicar. Finalmente, la reacción se estabiliza a la temperatura óptima de trabajo de la polimerasa (generalmente 72°C), para que se produzca la incorporación de nucleótidos a las secuencias de nueva formación, llamadas amplicones, a partir de los cebadores. Esto conforma un ciclo, que puede ser repetido múltiples veces. En teoría, la cantidad de ADN al finalizar un ciclo debería ser el doble que la inicial. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, en realidad, e incluso en condiciones óptimas, la eficiencia de la reacción nunca alcanza el 100%.

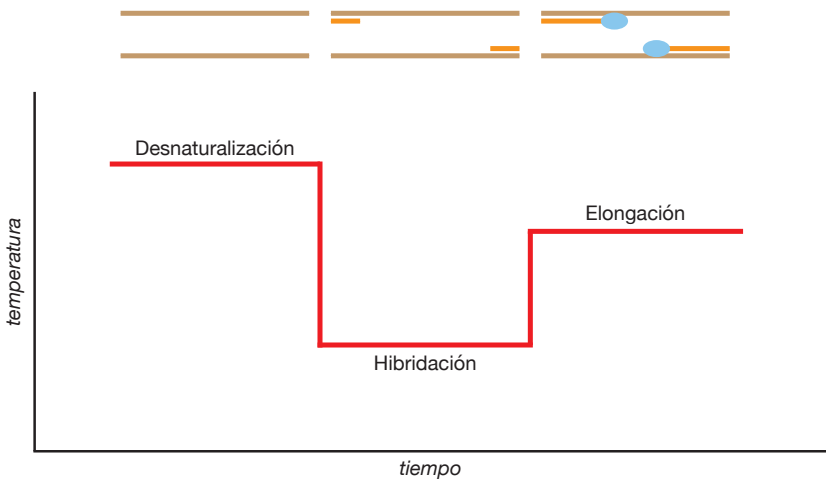


Figura 22. Cambios de temperatura durante una reacción en cadena de la polimerasa.

Para la realización de una qRCP es necesario añadir, además, un marcador fluorescente que se una al producto de la RCP y revele su presencia de un modo cuantificable y proporcional al número de copias realizadas. Existen diferentes tipos de sondas y tintes que pueden usarse con esta finalidad. Durante los primeros ciclos de la qRCP, la señal de fluorescencia es baja y se confunde con el ruido ambiente. Sin embargo, a medida que aumenta el producto de la qRCP, es decir, el número de copias de la secuencia de ADN delimitada por los cebadores, la señal de fluorescencia aumenta hasta volverse claramente distinguible. Este crecimiento es exponencial hasta que la reacción se satura, ya sea porque se agotan los cebadores, los nucleótidos o el marcador fluorescente, entrando en una fase de meseta. La amplificación también puede perder su carácter exponencial si el factor limitante es la concentración de polimerasa, entrando en una fase de crecimiento lineal.

Es importante resaltar que, en una qRCP estándar, todas las curvas de fluorescencia se saturarán en el mismo nivel, dado que partirán de concentraciones controladas e iguales de los reactivos antes descritos. Así pues, la información cuantitativa no vendrá determinada por el punto final de la reacción, sino por el número de ciclos requeridos para que la fluorescencia alcance cierto nivel intermedio previamente definido por el investigador. A este número de ciclos se le llama CT, del inglés *cycle threshold*, umbral de ciclo (**Figura 23**). A mayor concentración inicial de la secuencia de ADN diana, menos ciclos serán requeridos para que la fluorescencia supere dicho umbral, y, por tanto, menor será el CT.

De este modo, añadiendo una misma secuencia control a la qRCP de diferentes secuencias diana, se pueden calcular de forma relativa las concentraciones iniciales de las diferentes secuencias diana a partir de sus diferentes CTs, una vez normalizados por el CT de la secuencia control para excluir posibles variaciones procedimentales.

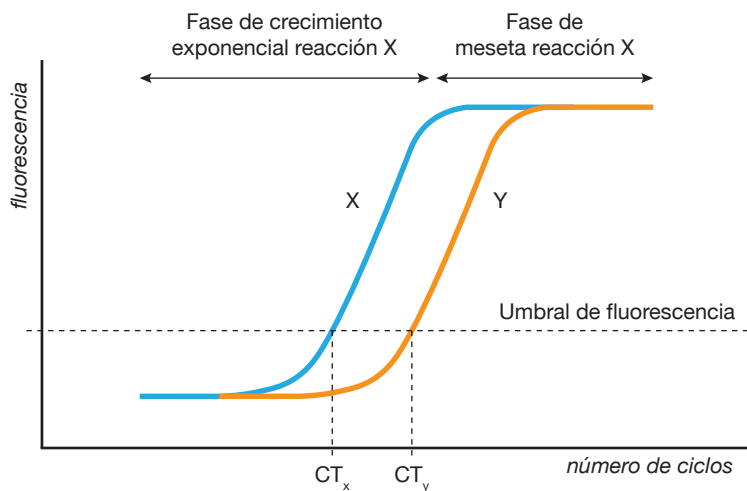


Figura 23. Ejemplo de curvas de respuesta de una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de dos secuencias diferentes (X y Y). CT: umbral de ciclo.

Pirosecuenciación por bisulfito

El estudio del estado de metilación del ADN se realiza, principalmente, mediante dos técnicas: la técnica de Sanger y la pirosecuenciación [213]. La técnica de Sanger permite analizar secuencias de ADN muy largas (>500 nucleótidos) pero es semicuantitativa y poco sensible para cambios pequeños, como se esperaba encontrar en la obesidad. Así, se decidió estudiar el estado de metilación del ADN mediante la pirosecuenciación.

La pirosecuenciación genera resultados cuantitativos de alta precisión, aunque, debido a que provoca una degeneración mayor del ADN, sólo permite analizar secuencias relativamente cortas (de unos 50 nucleótidos para cada cebador). La técnica está compuesta de dos pasos, primero la conversión de la secuencia a analizar mediante bisulfito y después la detección en tiempo real de la energía liberada durante la secuenciación de esta cadena previamente convertida [213-214].

Después de aislar el ADN que se quiere analizar, este se incuba en presencia de bisulfito (NaHSO_3). El bisulfito provoca una desaminación de las citosinas del ADN, convirtiéndolas en uracilo. Sin embargo, el bisulfito no actúa sobre las citosinas que se encuentran metiladas. A continuación, esta nueva secuencia es amplificada mediante RCP, obteniéndose una cadena convertida en la que las citosinas originariamente no metiladas se han convertido en timinas mientras que las que sí estaban metiladas continúan siendo citosinas (**Figura 24**).

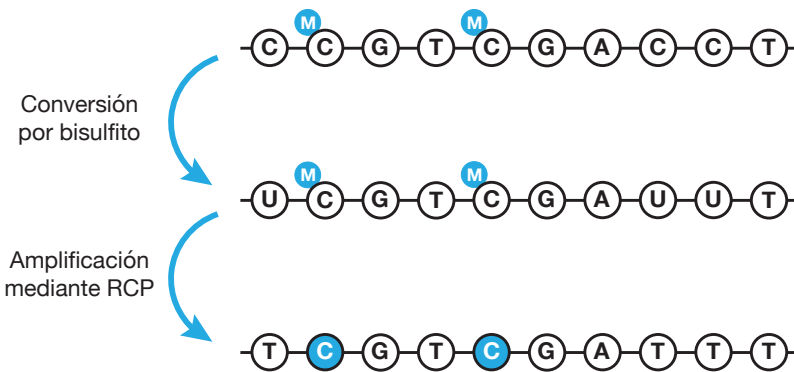


Figura 24. Conversión por bisulfito. Las citosinas metiladas (marcadas con una "M") no se convierten a uracilo, y, por tanto, no se modifican tras la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (RCP).

Tras este primer paso, se puede realizar propiamente el análisis de pirosecuenciación. Este consiste en la secuenciación progresiva, nucleótido a nucleótido, de la cadena complementaria a la cadena previamente convertida y ampliada mediante RCP. El elongamiento de la nueva cadena por la acción de la ADN polimerasa se controla mediante la adición de cada uno de los 4 dNTP por separado, uno a uno. Cuando el dNTP complementario correcto es introducido en la reacción, la polimerasa lo incorpora a la nueva cadena, liberando un pirofosfato (PPi). Este PPi origina un adenosín trifosfato (ATP) gracias a la enzima sufurilasa y, entonces, una enzima llamada luciferasa consume este ATP generando luz, que puede ser detectada y cuantificada (**Figura 25**). En cambio, si el dNTP introducido no es el adecuado, es degradado por la apirasa sin emitir energía.

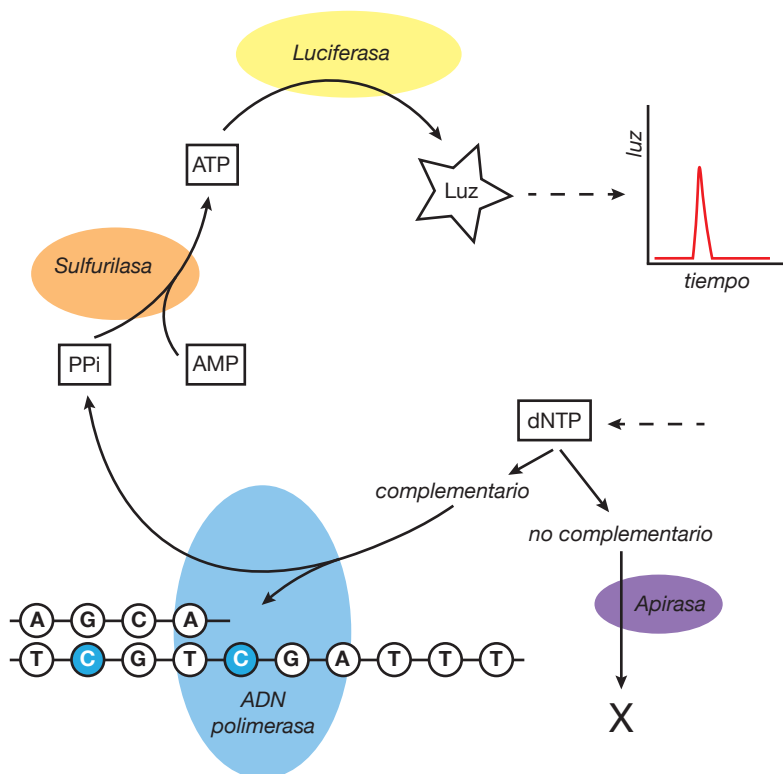


Figura 25. Análisis de pirosecuenciación. dNTP: desoxinucleotido trifosfato; PPi: pirofosfato; AMP: Adenosín monofosfato; ATP: Adenosín trifosfato.

De este modo, se puede secuenciar nucleótido a nucleótido la cadena convertida por bisulfito, sabiendo que cuando en la cadena complementaria se introduzca una guanina, esto significará que en la cadena convertida había una citosina y, por tanto, correspondería a una citosina metilada en la cadena original ^[214].

Para una posición determinada en una célula concreta, el estado de metilación de un sitio CpG es una variable dicotómica (sí/no). Sin embargo, no se suelen analizar células individuales, sino tejidos, compuestos por muchas células y por tanto muchas copias de la misma secuencia, no todas necesariamente en el mismo estado de metilación. Así, el resultado final es cuantitativo, pues representa el porcentaje de células del tejido que están metiladas en un sitio CpG concreto, donde un 0% significaría que ninguna de las copias de la secuencia estaba metilada y un 100% que todas lo estaban. Esta cuantificación, no obstante, tiene un margen de error de alrededor de un 5%, aproximadamente, por lo que generalmente, en lugar de utilizar el número exacto, se prefiere hablar de forma semicuantitativa ("poco metilado" cuando es menor del 25% o "muy metilado" cuando es mayor del 75%, por ejemplo, aunque estos umbrales no están establecidos).

ANEXO II: GENES ANALIZADOS

Fuente: *Gene Database del National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov)

GHRL

Nombre completo oficial: *ghrelin and obestatin prepropeptide*. También conocido como: *MTLRP*. Ubicación: Cromosoma 3 (3p25.3). Numero de exones: 3.

Codifica una preproteína (una preproteína, por tener una pequeña secuencia peptídica en el extremo amino-terminal que permitirá su translocación y, a la vez, una proteína, al no ser funcional hasta que una secuencia inhibidora es escindida mediante proteólisis) que contiene dos péptidos activos: la ghrelina y la obstatina. La secreción de ghrelina se inicia cuando el estómago está vacío, lo que encajaría con su papel de estimulante del apetito. También interviene en la homeostasis energética, la motilidad gastrointestinal, la liberación de insulina, el control de la ansiedad y las conductas de búsqueda de recompensa. Parece que a nivel hipotalámico estimularía la liberación de hormona de crecimiento. La obstatina interviene en el metabolismo glucídico y la regulación metabólica de los adipocitos, pudiendo tener un papel en la generación de la sensación de saciedad.

NAMPT

Nombre completo oficial: *nicotinamide phosphoribosyltransferase*. También conocido como: *VF*; *PBEF*, *PBEF1*, *VISFATIN* y *1110035014Rik*. Ubicación: Cromosoma 7 (7q22.3). Numero de exones: 12.

Codifica una enzima de la vía de síntesis de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺/NADH), una coenzima involucrada en reacciones de reducción-oxidación presente en todas las células vivas. Interviene, además, en procesos de respuesta al estrés y de envejecimiento celular.

IRS1

Nombre completo oficial: *insulin receptor substrate 1*. También conocido como: *HIRS-1*. Ubicación: Cromosoma 2 (2q36.3). Número de exones: 2.

Codifica una proteína que es fosforilada por la tirosina quinasa del receptor de insulina. Su mutación se ha relacionado con la aparición de resistencia insulínica y DM2.

FTO

Nombre completo oficial: *alpha-ketoglutarate dependent dioxygenase*. También conocido como: *GDFD*, *ALKBH9*, *BMIQ14* y fat mass and obesity related gen. Ubicación: Cromosoma 16 (16q12.2). Número de exones: 14.

Codifica una proteína nuclear relacionada con la superfamilia AlkB, involucrada en la reparación de ADN y ARN. Podría jugar un papel en los sistemas nervioso y cardiovascular y algunos alelos se han asociado con el riesgo de obesidad y DM2.

CCL2

Nombre completo oficial: *C-C motif chemokine ligand 2*. También conocido como: *HC11*, *MCAF*, *MCP1*, *MCP-1*, *SCYA2*, *GDCF-2*, *SMC-CF* y *HSMCR30*. Ubicación: Cromosoma 17 (17q12). Número de exones: 3.

Codifica una quimioquina de la subfamilia CC, caracterizada por la presencia de dos residuos adyacentes de cisteína. Las quimioquinas son citoquinas con capacidad para atraer a leucocitos, por lo que juegan un papel fundamental en los procesos inflamatorios y de inmunoregulación. CCL2, en particular, tiene un rol quimiotáctico específico para monocitos y basófilos, pero no para neutrófilos ni eosinófilos. Se ha involucrado en enfermedades como la psoriasis, la artritis reumatoide y la aterosclerosis, todas ellas mediadas por infiltrados de monocitos.

TNF

Nombre completo oficial: *tumor necrosis factor*. También conocido como: *DIF*, *TNFA*, *TNFSF2*, *TNLTG1F* y *TNF-alpha*. Ubicación: Cromosoma 6 (6p21.33). Numero de exones: 4.

Codifica una citoquina (es decir, una proteína con capacidad de influir en el comportamiento de otras células) secretada principalmente por los macrófagos. Interviene en una gran cantidad de procesos biológicos, como la proliferación y diferenciación celular, la apoptosis, la cascada de la coagulación o el metabolismo lipídico. Las alteraciones de esta proteína se han relacionado con patologías autoinmunes y neoplásicas, así como con la aparición de resistencia a la insulina.

FAS

Nombre completo oficial: *fas cell surface death receptor*. También conocido como: *APT1*, *CD95*, *FAS1*, *APO-1*, *FASTM*, *ALPS1A* y *TNFRSF6*. Ubicación: Cromosoma 10 (10q23.31). Numero de exones: 15.

Codifica una proteína de la familia de los receptores TNF que juega un papel fundamental en la activación de la apoptosis celular, aunque también interviene en procesos inflamatorios. Diferentes disfunciones de FAS se han relacionado con la proliferación de células neoplásicas y alteraciones del sistema inmunitario.

LEP

Nombre completo oficial: *leptin*. También conocido como: *OB*, *OBS* y *LEPD*. Ubicación: Cromosoma 7 (7q32.1). Numero de exones: 3.

Codifica una proteína, secretada por los adipocitos, que se une a receptores cerebrales que inhiben la sensación de hambre y promueven el gasto de energía. También está involucrada en la regulación del sistema inmunitario, la hematopoyesis, la angiogénesis, la formación de hueso, los procesos de cicatrización y la reproducción. Las mutaciones de este gen o sus receptores han sido relacionadas con obesidad severa, hipogonadismo y DM2.

PPARG

Nombre completo oficial: *peroxisome proliferator activated receptor gamma*. También conocido como: *GLM1*, *CIMT1*, *NR1C3*, *PPARG1*, *PPARG2* y *PPARGgamma*. Ubicación: Cromosoma 3 (3p25.2). Numero de exones: 11.

Codifica una proteína reguladora de la diferenciación de los adipocitos. También se ha relacionado con la obesidad, la DM2, la aterosclerosis y el cáncer a través de diferentes variantes de su transcripción.

ADIPOQ

Nombre completo oficial: *adiponectin, C1Q and collagen domain containing*. También conocido como: *ACDC*, *ADPN*, *APM1*, *APM-1*, *GBP28*, *ACRP30* y *ADIPQTL1*. Ubicación: Cromosoma 3 (3q27.3). Numero de exones: 4.

Codifica una hormona similar al colágeno VIII y X y al factor C1q del complemento, conocida como adiponectina, que participa en el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos. Se expresa prácticamente de forma exclusivamente en el tejido adiposo.

FASN

Nombre completo oficial: *fatty acid synthase*. También conocido como: *FAS*, *OA-519* y *SDR27X1*. Ubicación: Cromosoma 17 (17q25.3). Numero de exones: 43.

Codifica una enzima involucrada en la confección de ácidos grasos, al catalizar, en presencia de NADPH, la síntesis de ácido palmítico a partir de acetyl-CoA y malonil-CoA. Alteraciones de esta proteína se han relacionado con algunas estirpes neoplásicas.

MC4R

Nombre completo oficial: *melanocortin 4 receptor*. Ubicación: Cromosoma 18 (18q21.32). Numero de exones: 1.

Codifica un receptor transmembrana que interacciona con la familia de las melanocortinas (que incluye, entre otras, la hormona adrenocorticotropa y la hormona estimulante de los melanocitos). Interviene en las diferentes vías hipotalámicas de regulación del metabolismo energético. Una mutación de este gen es responsable de una obesidad hereditaria de carácter dominante.

ANEXO III: CARACTERÍSTICAS DEL ANÁLISIS MOLECULAR

Tabla 7. Cebadores utilizados para el análisis de la expresión génica.

Gen	Nombre del cebador	Secuencia del cebador	TH (°C)	Tamaño del amplicón (pb)
GHRL	GHRL FW	AAGATGGAGGTCAAGCAGAAG	60	89
	GHRL RV	AACCCCTGACAGCTTGATTC		
NAMPT	NAMPT FW	GGCCGATTATCTTTACATAGGACG	62	122
	NAMPT RV	GTCACCTTGCCATTCTTGAAG		
IRS1	IRS1 FW	CAGCATCAGTTTCCAGAAGC	64	150
	IRS1 RV	TGAGGTCCTAGTTGTGAATCATG		
FTO	FTO FW	CCGTGGAACAAAGGAATGAAATC	64	140
	FTO RV	CCGACATTCTGGCTTCTGATC		
LEP	Leptin FW	CAAGATGACACAAAACCCCTC	64	141
	Leptin RV	CTTGGATAAGGTCAGGATGGG		
PPARG	PPARG 1 FW	GAGCCCAAGTTTGAGTTTGC	64	148
	PPARG 1 RV	GCAGGTTGTCTTGAATGCTTC		
ADIPOQ	ADIPOQ FW	GTGAGAAGGGTGAGAAAGGAG	62	149
	ADIPOQ RV	GCGGTATACATAGGCACCTTC		
FASN	FASNFV	CTGAGCAGTACACCCCAAG	60	130
	FASN RV	GATACTTTCCCGTCGCATACC		
MC4R	MC4R FW	TGACAGTTAAGCGGGTTGG	60	72
	MC4R RV	TGAACAAAATGCCTGAAACCG		
FAS	FAS FW	ATTCTGCCATAAGCCCTGTC	64	113
	FAS RV	CTTTGTCTGTGTACTCCTTCCC		
TNF	TNF FW	ACTTTGGAGTGATCGGCC	64	143
	TNF RV	CTCAGCTTGAGGGTTTGCTA		
CCL2	CCL2 FW	TGTCCCAAAGAAGCTGTGATC	60	150
	CCL2 RV	ATTCTTGGGTTGTGGAGTGAG		
PSMC4	PSMC4 FW	TGTTGGCAAAGGCGGTGGCA	60	121
	PSMC4 RV	TCTCTTGGTGGCGATGGCAT		
MRPL19	MRPL19 FW	CAGTTTCTGGGGATTGTCAT	60	197
	MRPL19 RV	TATTCAGGAAGGGCATCTCG		

No se muestran los cebadores diseñados para RETN, al no haberse logrado una qPCR efectiva. FW: Forward (cebador directo); RV: Reverse (cebador reverso); TH: Temperatura de hibridación; pb: Pares de bases.

Tabla 8. Cebadores utilizados en el análisis de metilación del ADN.

Gen	Nombre del cebador	Secuencia del cebador	TH (°C)	Temperatura de hibridación (°C)	Tamaño del amplicón (pb)
GHRL	GHRL FW	GAGTTGAGGAAGGAAGAGTT	64	176	chr3:10,334,677-10,334,852
	GHRL RV bio [§]	CAACCAATCCCTCCAAAT			
	GHRL SEQ FW	GAGTTGAGGAAGGAAGAGTT	CP		
FAS *	FAS-R1 FW	ATAGGAATGTTATTGTG	58	381	chr10:90,750,227-90,750,607
	FAS-R1 RV bio [§]	AAAAACTCCCAACTCC			
	FAS-R1 SEQ FW	AATGGAGTTTTTTTAAAT	CP		
	FAS-R2.1 FW	GGAGTTGGGGAAGTTTTT	58	507	chr10:90,750,590-90,751,096
	FAS-R2.1 RV	AACCTTTAACTTAACCTTAT			
NAMPT	FAS-R2.2 FW	GGAGGATGTTTAAATAAT	54	407	chr10:90,750,615-90,751,021
	FAS-R2.2 RV bio [§]	CCTAAAACCTCCCAAACCT			
	FAS -R2 SEQ FW	TTGGAGGATTTGTTTTT	CP		
NAMPT	NAMPT FW	GTTTGGATTAAGGATTTA	49	329	chr7:105,925,998-105,926,326
	NAMPT RV bio [§]	ACCCATCAAAAACCTTAA			
	NAMPT SEQ FW	AATGAGGGGATAAGATTT	CP		

TH: temperatura de hibridación; FW: forward (cebador directo); RV: reverse (cebador reverso); SEQ: secuencia; pb: pares de bases; CP: cebador de prosequenciación.

* Se analizaron dos regiones de FAS: FAS-R1 y FAS-R2. El amplicón de FAS-R2 se obtuvo mediante una PCR anidada (FAS-R2.1 y FAS-R2.2).

** Datos basados en la Consorcio de Referencia Genómica GRCh37/hg19.

[§] Cebador biotinilado.

Sitios CpG analizados en el promotor de GHRL

TTAATTTATAAAAAAAAAAATTTTTAAATAGAAAAATTTAATTGTGGTGATTAGGTATTTT
 TTGAGATATGAAGTTTT**TATTTATTTGGATTTTGGAGG**TTTTTTCGGGTATAGTTGTTAATG
 TTGATTTTAGATAAGATTATTAGTAAGTAAATATTTATTGTGTAAAGTTGTGTTATTTTGG
 GGAATTGAAATGTTTTTTGGGAGTTGGAAATTTTTTTAGTTATATATTATA**GAGTTGAGGAA**
GGAAGAGTT (*) GATGGACG⁽¹⁾ GAAGAATTATGGCG⁽²⁾ GGAGGAGTTATT**CG**⁽³⁾ GAAGTTATT
TCG****⁽⁴⁾ TTGTTTTGTTAGTT**CG**GAATAGAGGAGAGATGT**CGGTTGGAGGATATAGTAA**TTT
 GAATTAAGAGGAGTTTGGAGGAAGTT**CGAGCGATTTGGAGGGGATGGTTG**ATTTTTTTTTAT
 TTTTTTTAAGTGTGAATAATAATTAAGTTTAGTTTGGTAATTTTTTTGAGGGTGAGGAC**CG**AAG
 TTTTATTTTTTTTTTTGGAAATTTGGT**GGGGTTTAGGAAGTAGGTT**TTTTTTAGT**CGGTGGTT**
 TTTTTTTTGT**CG**GGTTTTTTGAGGGTTTTGTTTTTATGAAGGTATATGA

Figura 26. Secuencia de la región promotora de GHRL después de la conversión por bisulfito. Los cebadores utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa y la pirosecuenciación se muestran en azul, este último señalado con un asterisco entre paréntesis (en este caso, coincide con uno de los cebadores utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa). Los sitios CpG se muestran en negrita, excepto los 4 sitios CpG analizados que se muestran en azul e identificados con un número en superíndice. Los sitios CpG3 y CpG4 presentan alteraciones de la metilación en diversas neoplasias.

Sitios CpG analizados en el promotor de NAMPT

TATTTATATAAGTGTTTAATGGGTATGTGAAC**CGTAA****CG**TTGTGTTATTTTTTTTTTTATATGTTTTTT
AGGGTTAAAATTATAGTTTTTTTAAATTTT**CG**TGTTTTATTTTTTTTTTTATAGAAATTTTGTAAATGA
TTTTAAAGTAGATAAGAGTAGAG**CGG**TTTTTATATTTAGGGATAAGGAGT**ACG**AGTAATTATTAGGTG
TTAAGGAGTTTTGAAA**CGG**AGTT**CGGCGG**AGTGGGATAGGGGAATTTATTA**CGG**TTAT**CGGG**TTAGGC
GAGTGTTTTTT**CGCG**T**CGG**AGT**CG**TAGAGGAT**CGCG**TTGTTTT**CGGCG**TT**CGCG**TTAGGATTTTTTTTA
TTT**CGCG**TTTT**CGG**GAGATTTATTTGTTTAGTTAGGG**CGAG****CGCG**T**CGG**TTGTT**CGGG**GAAGTT
T**CG**TTTTTTTTT**CGG**GT**CG**TTTT**CGGG**GT**CG**TTATTTAAATTTGGTTTTAGTTTTAGGTTAAGAGG**TC**
CGTTTTTAGGGAAAGGGTAT**CGG**TT**CG**T**CGGCG**AGTTTTAAAGTTTT**CG**AGTT**CG**AGTT**CGG**AT**CGG**
CGTT**CGG**GAGTT**CG**TTGGGGTT**CG**TTTTAGTTTT**CG**T**CGCG**T**CG**T**CG**T**CGCG**TTTTTAGGTT
T**CG**TTTTTAT**CG**TTTAGTTTTTATTTTTTTTTAAAGTTATTTTTGTTTTAT**CGCG**TTTTTTTTATTT
GTTTTAGT**CG**T**CG**T**CG**TT**CGCG**TTTTTTTT**CGGG**TTTTTT**CGCG**T**CGCG**ATTTTAGTTTTAGTTTTAGT
TTTTAATTTTAGTTTTAGT**CG**TTTTT**CG**TTTTTTTTGTT**CGCG**TTTT**CG**TTTTTAG**CGCG**TTTT**CG**
TTTTTTTATTTT**CGGG**TTTT**CG**AGTTTTATTTTGTAGGAGT**CGG**TGTTTAGGAGATGTTGAAT**CG**TTTT
TGT**CG**TAGGATTTATTT**CGGG**T**CG**GAGGATAGGGGT**CGCG**T**CGCG**AGTTTTTTGG**CGCG**TT**CGA**
GGAAGGAAAAATGAGTTTTT**CGCG**TTTT**CG**TTGTTTAAAGTTATTT**CG**T**CGCG**GAGGAGGGGG
AGAGGGGAAA**CG**GAGAGAGGGGAGGGGTTAGAGAGGGCGGGTT**CGG**AGT**CG**T**GA****CGCGCGCGCGG**
TG**ACG**TTG**CGCG**GT**CGCG**TGTT**CG**TAGTTGGGAGTTTTGG**CGG**ATTTTTTATTT**CGG**TTTTTT**CG**
GTTTTTATTT**CG**TTATTTTT**CGGG**GT**CG**AGAAAGGG**CGGG****CGCG**TAG**CGCG**T**CG**TAGT**CGCG**
GAG**CGGG****CGGG**GAGGAG**CGT**GATGT**ACCG**TTTTTTTTTTTAG**ACG**TTAGTTTTGGGAAGTTGG
AGGTAG**CGGG**TAGTTTT**CGCGCG**TGATTT**CGGG**CTTTATTTTAAAGTT**CG**AGTTTT**CGGT****ACGGCGCG**
GGAGGG**CGGG**TTTTGGAGGGGG**CG**TTTTTAGTTTTGTTAGTGT**ACG**AGGAGT**CGG**TT**CG**TT**CG**TT**CG**
GTTTTGGATTTTT**CG**TTTTATTTAGTTTTGGT**CGG**TTTTTTGGGTTTTTTTTGAAGTT**ACG**TTATTT**CG**
TTAGGGGG**CGAGG**AGTTTTTATTTGTTTTATTTTTTT**CG**TTTTAT**ACCG**TAGTTATTT**CGTTTT**
CGGTTGGATTAAGGATTTAGTTTTT**CG**TTTTTATTTTTTTTTGTTTTTTTTGATTTTTTTGATTTTGT
TTTTAAGATTTTAGGAGTT**CGCG**TGAGGAGT**CGG**TTGAGGGTTTTTTTTTATTTGATGTAG**CG**ATTT
CGTTTTTTTT**CGCG**TTTTTTGTTTATGGTTGAGTTTTTTGATTTTTTTGAGAGATGGTTTGATTTTTTT
CGAGTAAAGAGTTTT**CG**TTGAAAAG**CGGG**GTGGAAATTTAGTTTTTATAGAT**AA**TAGGGG**ATAAGAT**
TT^(*) AATTGAAT**CG**⁽¹⁾ AGTATTGT**CG**⁽²⁾ GGAAGGAAAAGGTA**CG**⁽³⁾ GGTTAAGTTTTT**GATAGGG**TG
CGATATTGATTTTTATTAT**CG**TTATAGTTTTTAAATTTGGGAAA**CG**AGTTGGTAATTTTAA**ATAAA**
GAAGTGAATGACGTTTGATGATTTTATTTAAATATAGATTATTTAAGAAAGATTT**CG**TAGTTTTT
AT**CG**TTGGTT**CG**TTTTTTGTATAAAAATTAAGATTTTTTTTTGTT**CG**TATGTTTAAAGTTTAAAAATAA
ATTGAGTTTTTAT**CG**GATAAAAG

Figura 27. Secuencia de la región promotora de GHRL después de la conversión por bisulfito. Los cebadores utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa y la pirosecuenciación se muestran en azul, este último señalado con un asterisco entre paréntesis (en este caso, coincide con uno de los cebadores utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa). Los sitios CpG se muestran en negra, excepto los 4 sitios CpG analizados que se muestran en azul e identificados con un número en superíndice. Los sitios CpG3 y CpG4 presentan alteraciones de la metilación en diversas neoplasias.

Sitios CpG analizados en el promotor de FAS

GTTAAGGTTTTTGTATTTAGGTAGGATTTTTTC**CG**TTTTGAGTTTTATTTTTTTTTAAAGATTTTTTTAA
 TTTTTTAGTGTGAATTATAGTAGAAGTTTTTAGAAAGGGTAGGAGGT**CG**GTTTT**CG**AGGTTTTTATTT
 GAAGTGAGTATGTTAGTTATTTAGTAGAA**CG**TTTT**CG**GG**ATAGGAATGTTTTATTTGTTAA**CGAAATTTTG
 ATTTTTTTTTTATTTTGATTTTTTTTTTTTTTATTT**CGCGCG**TAGGTTAAGTTGTTGAATTT**ATGGAG**
TTTTTTTTAA^(*) **TCG**⁽¹⁾ **GGCG**⁽²⁾ TTTTTTAG**CG**⁽³⁾ AGGTTTTTTTTTATTTTTTTGATTAT**CG**GGG
 TTTTT**CG**TGAGTT**CG**TTTTTGATTT**CGCG**TAAGAGTGATATATAGGTGTTAAAGAC**CG****TTTTGGGGA**
GTGAGGGAA**CG**CGTTT**CG**AGTGATTTGGTTGGAGTTT**AGGGGCG**GGTATTGGTACGGAATATATTT
 TGAGGTTAGTTTTGGTTGTTTAG**CG**AGTTGTTTTTTTTTT**CGCG**GGTGGTGGATT**CG**TTTAGTAC
GGATTTGGGGAAGTTTTTATTT**CGGAGGATGTTAATAAT**TAT**GTGGGATTTGGATTTTT**TA
 TTTTTGGTGAGTTTTTTTTTGGTT**CGGG**TGGAGGTTATTT**CG**TTTTAGTTT**CGGGATAGGTA**AGT**G**
GGCGGGCGCGGACCGTT**CG**GGGATT**CGCGCG**TAG**CGCG**TAC**CGGG**TATTTGGAG**CGCGGG**T
 TGT**TCGGGAGCG**CGTTGGAGATTGGTTTT**CGGGGG**TGTTAGGATTTTTTTTTAGGTT**CGGG**TGTTA
 GA**CGTTGGAGGATTTGTTTT**^(*) TGGGTTTTGAT**CG**⁽⁴⁾ AAGTTGATT**CG**⁽⁵⁾ TGGGTAG**CG**
G⁽⁶⁾ GGGTAGTT**CG**⁽⁷⁾ **CG**⁽⁸⁾ TTTTT**CG**⁽⁹⁾ GAGATTAT**CG**TTTTAC**CG**TTGAGGTGG**CGGGGG**T
CGGATAGGAATTAAGCGGAAGTTTGGGAAGTTTTAGGT**CG**TTGGAGGGGATTT**CG**GTTGGAGAGA
 GGAG**CG**GAATTTTTGGATAAGTTTT**GATAAGTTAAGTTAAAGGTT****CG**TTTT**CGCGCG**GGTGGGTGAGT
CGCGT**CG**TTTT**CGCGGGGGCGGG**GAGAGAGTTTGTAGTTTTTGAATAGATATTTGTTTTTTTTGGT
 AGTTTTTAG**CG**TAGGAAATAAGTTAGTAT**CGAAG**TAGTGGTTAAGT**CGGAGGG**T**CGGAAGAACG**T
 ATTTTTTTTTTT**CG**AAAAAGTTATATGGGGTGAATGAGTTTTTGGAGGTTTGTAT**CG**TTTTTT
 ATTTGTTATATAGAAAAAGAAATTTGTTTTGTTTTTTTT**CG**GAAATTTTTTTTTTAAAGATTGAAT**CG**
 TTGTTGAGTGGTTTTTATTTTGGTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGT
 TGTATTTTTATGGTGATTTTTGTTTGGTTTTTTTGGTGGGTTGGTGGTATT**CG**TTTTTAT**CG**TATAGA
 ATT**CGCG**TTTTATTGGTTAAGAAATTTGAGTAGTTTGTTTTGAAGTTTT**CG**TTTGAAGATG
 TAGTTTGTAGATGGTTAATTAAGAGAG**CG**TGGATTTAGGAGGTTTATTGAGTAT**CGGAG**TTTTTAGAG
 AGTTTATGGATTTTTTATTTTATTTGGTTTTTAAATAAGTGTAGGTATAG**CGGAGAGA**AGTGTTTATAA
 TGTGATTT**CGCG**GATTTTT**ACG**AGAGTTATGTAGTGGGAAGATAAATATATTTTTATTTTTATAGAT
 GG**CGA**AATGAGGTTTAGAGAGTTTTAGTAATTTAGTTAAGATTATATAGTTAGTAAATGGGAGATATG
 GGATTGAATTTAGATTTAAATTTAAATTTAGGTTGTT**CG**TTGATTGTATTGATATTTAGATATAT
 TAAGAGTTGAGATGTTTGGTTTTATTTTATGATTAGAAAAAAATTTTGTTTTTTTTAGAAATAGT
 GTGATTTATTTGGGATTTTTTAGAAATTTTTTTGGAGAAAATTAATGATTTAAGATTGAGAAAATATT
 TATAATAATTTAGGTTATATTTTTTTTTTTTTTTGTTATTAATTTATGTAATTTGTAATGTTGGTTGT
 TTTGAAAATTTTTATAGTTTTTGGATAGTAGTATTAGTAAAGTGAAGAAAATTTGTTAAAGTTTGGAG
 TATGTTTTGTTGAATTTTTTGTATAATAGTATTTTTTATTAGAGTT**CG**GTTTTAAAGTT**CGA**AGAAA
 TTTTGTTTTTTTGAAGAATATATATATAT**CG**TATATGTAATATTTATATATTTATGATATATAT
 ATATTATAATATTTATAAGTTAGGTAATTTATATTTGATATAGATATAGTTTTAGGAAATTAAGG
 TTTATAAATAAAATTTATAAATGAGTATAGTTAAATATAAAGATTAGATATAATTTTTATTTAA
 GTAATTTATGTTT**CG**TTTTGTTAGTTTATTTTTTATTTTTTTTTTTTAAATATGATTTTTTAAATTTA
 GTTATATAGAAATTTGGTTTT**CG**TTTT**CG**GATATGTTAATATTAGGTTTTTATTTTTTAAAGAGTTTT
 AATATTTTTGTTTATTTATGTTTATAGTTTTATAGAAAATGTTTGTTTTTTATGTTTTT**CG**GTTATGTTTT
 TTAGTAGTAGTAAATAAATAAATAGATGTAAGTGAAGTGAATTTTGAATATAGAAAGTAAATTTAA
 TTTATTAATGGGTTGGATATAGATGGGTGGGAGTTGTTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGTTTT
 TTGATTTTGGTGATAATATAGTTAATAAGATTTTTTATTTTTTAAATTTTTTTGTTTTTTTTTTTT
 TTTTTTTTTTAAATTTTTTGGTGTAGTTTTTTTTTTTTTATTTTTTGGAGTGTTTTTTATTT**CG**ATTTT
 ATAATAAAAAAGTTTTGAAATTTTAAAGTTGATAAAATTTTTTAAAGGAGATAGAAAAAGAGTTAAAT
 TATTTTATAAATTAATTTGAGAAATAGTTGTGGGTTGATTTTTTTTTTTTTTATTTGTTAGATTTTTGT
 TATTTGGTTAAGAAATTTGAGTAGTTTGTTTTGGAAAGTTTT**CG**TTTGAAGATGTTAGTTTGTAAAT
 GAAGGGATGTTGATTTAGAGGTTATTTGAATTT**CGA**AGTTTTTAAAGGTTTATGGATTTTTATTT
 ATTGGGTTTTAATAGGTTTTGTTTTGATTATTTTAGGAT

Figura 28. Secuencia de la región promotora de FAS después de la conversión por bisulfito. Los cebadores utilizados para la PCR y la pirosecuenciación se muestran en azul, estos últimos señalados con un asterisco entre paréntesis. Los sitios CpG se muestran en negrita, excepto los 9 sitios CpG analizados que se muestran en azul e identificados con un número en superíndice. Los sitios CpG1 a CpG3 se encuentran en la región FAS-R1 y los sitios CpG4 a CpG9 en la región FAS-R2. El sitio CpG4 presenta alteraciones de la metilación en diversas neoplasias.



BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFIA

1. Gutiérrez-Fisac JL, Guallar-Castillón P, León-Muñoz LM, Graciani A, Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F. Prevalence of general and abdominal obesity in the adult population of Spain, 2008-2010: the ENRICA study. *Obes Rev*. 2012;13:388-92.
2. Aranceta-Bartrina J, Pérez-Rodrigo C, Alberdi-Aresti G, Ramos-Carrera N, Lázaro-Masedo S. Prevalence of General Obesity and Abdominal Obesity in the Spanish Adult Population (Aged 25-64 Years) 2014-2015: The ENPE Study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2016;69:579-87.
3. Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA*. 2006;295:1549-55.
4. Berghöfer A, Pischon T, Reinhold T, Apovian CM, Sharma AM, Willich SN. Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BMC Public Health*. 2008;8:200.
5. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, *et al*. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*. 2011;377:557-67.
6. Hossain P, Kawar B, Nahas El M. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N Engl J Med*. 2007;356:213-5.
7. Taylor VH, Forhan M, Vigod SN, McIntyre RS, Morrison KM. The impact of obesity on quality of life. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab*. 2013;27:139-46.
8. Bays H. Adiposopathy, "sick fat," Ockham's razor, and resolution of the obesity paradox. *Curr Atheroscler Rep*. 2014;16:409.
9. Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 2009;9:88.
10. De Luca M, Angrisani L, Himpens J, Busetto L, Scopinaro N, Weiner R, *et al*. Indications for Surgery for Obesity and Weight-Related Diseases: Position Statements from the International Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders (IFSO). *Obes Surg*. 2016;26:1659-96.
11. Lecube A, Monereo S, Rubio MÁ, Martínez-de-Icaya P, Martí A, Salvador J, *et al*. Prevention, diagnosis, and treatment of obesity. 2016 position statement of the Spanish Society for the Study of Obesity. *Endocrinol Diabetes Nutr*. 2017;64 Suppl 1:15-22.

12. Abdullah A, Peeters A, de Courten M, Stoelwinder J. The magnitude of association between overweight and obesity and the risk of diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2010;89:309–19.

13. Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA: the journal of the American Medical Association.* 1999;282:1523–9.

14. Bays HE, Chapman RH, Grandy S, SHIELD Investigators' Group. The relationship of body mass index to diabetes mellitus, hypertension and dyslipidaemia: comparison of data from two national surveys. *Int. J. Clin. Pract.* 2007;61:737–47.

15. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2011;34:274–85.

16. Samson SL, Garber AJ. Metabolic syndrome. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2014;43:1–23.

17. Gao W, DECODE Study Group. Does the constellation of risk factors with and without abdominal adiposity associate with different cardiovascular mortality risk? *Int J Obes (Lond).* 2008;32:757–62.

18. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, *et al.* Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 2009. pp. 1640–5.

19. Bays HE. “Sick fat,” metabolic disease, and atherosclerosis. *Am. J. Med.* 2009;122:S26–37.

20. Bastard J-P, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, *et al.* Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw.* 2006;17:4–12.

21. Thomas NE, Rowe DA, Murtagh EM, Stephens JW, Williams R. Associations between metabolic syndrome components and markers of inflammation in Welsh school children. *Eur. J. Pediatr.* 2017.

22. Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2003;27 Suppl 3:S53–5.

23. Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L'Italien GJ, Pio JR, *et al.* Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation.* 2004;110:1245–50.

24. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* 2003;348:1625–38.
25. Peeters A, Barendregt JJ, Willekens F, Mackenbach JP, Mamun Al A, Bonneux L, *et al.* Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann. Intern. Med.* 2003;138:24–32.
26. Czech MP, Tencerova M, Pedersen DJ, Aouadi M. Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia.* 2013;56:949–64.
27. Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J. Clin. Invest.* 2016;126:12–22.
28. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* 2006;444:847–53.
29. Lodhi IJ, Yin L, Jensen-Urstad APL, Funai K, Coleman T, Baird JH, *et al.* Inhibiting Adipose Tissue Lipogenesis Reprograms Thermogenesis and PPAR γ Activation to Decrease Diet-Induced Obesity. *Cell Metabolism.* 2012;16:189–201.
30. Lavin DP, White MF, Brazil DP. IRS proteins and diabetic complications. *Diabetologia.* 2016;59:2280–91.
31. Reiss K, Del Valle L, Lassak A, Trojanek J. Nuclear IRS-1 and cancer. *J. Cell. Physiol.* 2012;227:2992–3000.
32. Derosa G, Sahebkar A, Maffioli P. The role of various peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands in clinical practice. *J. Cell. Physiol.* 2018;233:153–61.
33. Carbone F, Liberale L, Bonaventura A, Vecchiè A, Casula M, Cea M, *et al.* Regulation and Function of Extracellular Nicotinamide Phosphoribosyltransferase/Visfatin. *Compr Physiol.* 2017;7:603–21.
34. Terra X, Auguet T, Quesada I, Aguilar C, Luna AM, Hernández M, *et al.* Increased levels and adipose tissue expression of visfatin in morbidly obese women: the relationship with pro-inflammatory cytokines. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 2012;77:691–8.
35. Friebe D, Neef M, Kratzsch J, Erbs S, Dittrich K, Garten A, *et al.* Leucocytes are a major source of circulating nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)/pre-B cell colony (PBEF)/visfatin linking obesity and inflammation in humans. *Diabetologia.* 2011;54:1200–11.
36. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, *et al.* The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87:2988.

37. Goitein D, Lederfein D, Tzioni R, Berkenstadt H, Venturero M, Rubin M. Mapping of ghrelin gene expression and cell distribution in the stomach of morbidly obese patients--a possible guide for efficient sleeve gastrectomy construction. *Obes Surg.* 2012;22:617–22.

38. Cui H, López M, Rahmouni K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13:338–51.

39. Zigman JM, Bouret SG, Andrews ZB. Obesity Impairs the Action of the Neuroendocrine Ghrelin System. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2016;27:54–63.

40. Steinert RE, Feinle-Bisset C, Asarian L, Horowitz M, Beglinger C, Geary N. Ghrelin, CCK, GLP-1, and PYY(3-36): Secretory Controls and Physiological Roles in Eating and Glycemia in Health, Obesity, and After RYGB. *Physiological Reviews.* 2017;97:411–63.

41. Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, *et al.* Ghrelin. *Mol Metab.* 2015;4:437–60.

42. Chuang J-C, Sakata I, Kohno D, Perello M, Osborne-Lawrence S, Repa JJ, *et al.* Ghrelin directly stimulates glucagon secretion from pancreatic alpha-cells. *Mol. Endocrinol.* 2011;25:1600–11.

43. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010;316:129–39.

44. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372:425–32.

45. Rodríguez A, Ezquerro S, Méndez-Giménez L, Becerril S, Frühbeck G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *AJP: Endocrinology and Metabolism.* 2015;309:E691–714.

46. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 1995;270:26746–9.

47. Shen W-J, Yao T, Kong X, Williams KW, Liu T. Melanocortin neurons: Multiple routes to regulation of metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 2017;1863:2477–85.

48. Zhou Y, Hambly BD, McLachlan CS. FTO associations with obesity and telomere length. *Journal of Biomedical Science;* 2017;:1–7.

49. Loos RJF, Yeo GSH. The bigger picture of FTO: the first GWAS-identified obesity gene. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10:51–61.

50. Speakman JR. The “Fat Mass and Obesity Related” (FTO) gene: Mechanisms of Impact on Obesity and Energy Balance. *Curr Obes Rep.* 2015;4:73–91.
51. Bravard A, Veilleux A, Disse E, Laville M, Vidal H, Tchernof A, *et al.* The expression of FTO in human adipose tissue is influenced by fat depot, adiposity, and insulin sensitivity. *Obesity (Silver Spring).* 2013;21:1165–73.
52. Klötting N, Schleinitz D, Ruschke K, Berndt J, Fasshauer M, Tönjes A, *et al.* Inverse relationship between obesity and FTO gene expression in visceral adipose tissue in humans. *Diabetologia.* 2008;51:641–7.
53. Lee YS, Wollam J, Olefsky JM. An Integrated View of Immunometabolism. *Cell.* 2018;172:22–40.
54. Ray I, Mahata SK, De RK. Obesity: An Immunometabolic Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7:157.
55. Trayhurn P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiological Reviews.* 2013;93:1–21.
56. Rydén M, Andersson DP, Bergström IB, Arner P. Adipose tissue and metabolic alterations: regional differences in fat cell size and number matter, but differently: a cross-sectional study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014;99:E1870–6.
57. Heinonen S, Saarinen L, Naukkarinen J, Rodríguez A, Frühbeck G, Hakkarainen A, *et al.* Adipocyte morphology and implications for metabolic derangements in acquired obesity. *Int J Obes (Lond).* 2014;38:1423–31.
58. Chen B, Lam KSL, Wang Y, Wu D, Lam MC, Shen J, *et al.* Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;341:549–56.
59. Lolmède K, Durand de Saint Front V, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumié A. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2003;27:1187–95.
60. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, *et al.* Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.* 2005;46:2347–55.
61. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993;259:87–91.
62. Wu H, Ghosh S, Perrard XD, Feng L, Garcia GE, Perrard JL, *et al.* T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation.* 2007;115:1029–38.

63. Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation*. 2004;110:1564–71.

64. Verhulst P-J, Depoortere I. Ghrelin's second life: from appetite stimulator to glucose regulator. *World J. Gastroenterol*. 2012;18:3183–95.

65. Martos-Moreno GA, Kratzsch J, rner AKO, Barrios V, Hawkins F, Kiess W, *et al*. Serum visfatin and vaspin levels in prepubertal children: effect of obesity and weight loss after behavior modifications on their secretion and relationship with glucose metabolism. *Int J Obes (Lond)*. Nature Publishing Group; 2011;:1–8.

66. Terranova L, Busetto L, Vestri A, Zappa MA. Bariatric Surgery: Cost-Effectiveness and Budget Impact. *Obes Surg*. 2012;22:646–53.

67. Pataky Z, Bobbioni-Harsch E, Golay A. Open questions about metabolically normal obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34 Suppl 2:S18–23.

68. van Vliet-Ostaptchouk JV, Nuotio M-L, Slagter SN, Doiron D, Fischer K, Foco L, *et al*. The prevalence of metabolic syndrome and metabolically healthy obesity in Europe: a collaborative analysis of ten large cohort studies. *BMC Endocr Disord*. 2014;14:9.

69. Ferrer R, Pardina E, Rossell J, Oller L, Viñas A, Baena-Fustegueras JA, *et al*. Morbidly “Healthy” Obese Are Not Metabolically Healthy but Less Metabolically Imbalanced Than Those with Type 2 Diabetes or Dyslipidemia. *Obes Surg*. 2015;25:1380–91.

70. Roberson LL, Aneni EC, Maziak W, Agatston A, Feldman T, Rouseff M, *et al*. Beyond BMI: The “Metabolically healthy obese” phenotype & its association with clinical/subclinical cardiovascular disease and all-cause mortality -- a systematic review. *BMC Public Health*. 2014;14:14.

71. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, Obesity Expert Panel, 2013. Executive summary: Guidelines (2013) for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Obesity Society published by the Obesity Society and American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Based on a systematic review from the The Obesity Expert Panel, 2013. *Obesity* (Silver Spring). 2014. pp. S5–39.

72. Ryan DH, Kahan S. Guideline Recommendations for Obesity Management. *Med. Clin. North Am*. 2018;102:49–63.

73. Smethers AD, Rolls BJ. Dietary Management of Obesity: Cornerstones of Healthy Eating Patterns. *Med. Clin. North Am*. 2018;102:107–24.

74. Gudzone KA, Doshi RS, Mehta AK, Chaudhry ZW, Jacobs DK, Vakil RM, *et al*. Efficacy of commercial weight-loss programs: an updated systematic review. *Ann. Intern. Med.* 2015;162:501–12.
75. Gloy VL, Briel M, Bhatt DL, Kashyap SR, Schauer PR, Mingrone G, *et al*. Bariatric surgery versus non-surgical treatment for obesity: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ.* 2013;347:f5934.
76. Cheng J, Gao J, Shuai X, Wang G, Tao K. The comprehensive summary of surgical versus non-surgical treatment for obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncotarget.* 2016;7:39216–30.
77. Ribaric G, Buchwald JN, McGlennon TW. Diabetes and weight in comparative studies of bariatric surgery vs conventional medical therapy: a systematic review and meta-analysis. *Obes Surg.* 2014;24:437–55.
78. Colquitt JL, Pickett K, Loveman E, Frampton GK. Surgery for weight loss in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;:CD003641.
79. Picot J, Jones J, Colquitt JL, Gospodarevskaya E, Loveman E, Baxter L, *et al*. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of bariatric (weight loss) surgery for obesity: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2009;13:1–190–215–357–iii–iv.
80. Mechanick JI, Kushner RF, Sugerman HJ, Gonzalez-Campoy JM, Collazo-Clavell ML, Spitz AF, *et al*. American Association of Clinical Endocrinologists, The Obesity Society, and American Society for Metabolic & Bariatric Surgery medical guidelines for clinical practice for the perioperative nutritional, metabolic, and nonsurgical support of the bariatric surgery patient. *Obesity (Silver Spring).* 2009. pp. S1–70–v.
81. Faria GR. A brief history of bariatric surgery. *Porto Biomedical Journal. PBJ- Associação Porto Biomedical/Porto Biomedical Society;* 2017;2:90–2.
82. Adams TD, Davidson LE, Litwin SE, Kim J, Kolotkin RL, Nanjee MN, *et al*. Weight and Metabolic Outcomes 12 Years after Gastric Bypass. *N Engl J Med.* 2017;377:1143–55.
83. Berbiglia L, Zografakis JG, Dan AG. Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass: Surgical Technique and Perioperative Care. *Surg. Clin. North Am.* 2016;96:773–94.
84. Hayes K, Eid G. Laparoscopic Sleeve Gastrectomy: Surgical Technique and Perioperative Care. *Surg. Clin. North Am.* 2016;96:763–71.
85. Kueper MA, Kramer KM, Kirschniak A, Königsrainer A, Pointner R, Granderath FA. Laparoscopic sleeve gastrectomy: standardized technique of a potential stand-alone bariatric procedure in morbidly obese patients. *World J Surg.* 2008;32:1462–5.

86. Ferrer-Márquez M, García-Díaz JJ, Moreno-Serrano A, García-Díez JM, Ferrer-Ayza M, Alarcón-Rodríguez R, *et al.* Changes in Gastric Volume and Their Implications for Weight Loss after Laparoscopic Sleeve Gastrectomy. *Obes Surg.* 2017;27:303–9.

87. Cottam D, Qureshi FG, Mattar SG, Sharma S, Holover S, Bonanomi G, *et al.* Laparoscopic sleeve gastrectomy as an initial weight-loss procedure for high-risk patients with morbid obesity. *Surg Endosc.* 2006;20:859–63.

88. Garg H, Priyadarshini P, Aggarwal S, Agarwal S, Chaudhary R. Comparative study of outcomes following laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy in morbidly obese patients: A case control study. *World J Gastrointest Endosc.* 2017;9:162–70.

89. Borbély Y, Juilland O, Altmeier J, Kröll D, Nett PC. Perioperative outcome of laparoscopic sleeve gastrectomy for high-risk patients. *Surg Obes Relat Dis.* 2017;13:155–60.

90. Rosenthal RJ, International Sleeve Gastrectomy Expert Panel, Diaz AA, Arvidsson D, Baker RS, Basso N, *et al.* International Sleeve Gastrectomy Expert Panel Consensus Statement: best practice guidelines based on experience of >12,000 cases. *Surg Obes Relat Dis.* 2012. pp. 8–19.

91. Gagner M, Hutchinson C, Rosenthal R. Fifth International Consensus Conference: current status of sleeve gastrectomy. *Surg Obes Relat Dis.* 2016. pp. 750–6.

92. Angrisani L, Santonicola A, Iovino P, Vitiello A, Zundel N, Buchwald H, *et al.* Bariatric Surgery and Endoluminal Procedures: IFSO Worldwide Survey 2014. *Obes Surg.* 2017;27:2279–89.

93. Martínez-Ramos D, Salvador-Sanchis JL, Escrig-Sos J. [Preoperative weight loss in bariatric surgery candidate patients. evidence-based recommendations]. *Cir Esp.* 2012;90:147–55.

94. Holderbaum M, Casagrande DS, Sussenbach S, Buss C. Effects of very low calorie diets on liver size and weight loss in the preoperative period of bariatric surgery: A systematic review. *Surg Obes Relat Dis.* 2017.

95. Ochner CN, Dambkowski GL, Yeomans BL, Teixeira J, Xavier Pi-Sunyer F. Pre-bariatric surgery weight loss requirements and the effect of preoperative weight loss on postoperative outcome. *Int J Obes (Lond).* 2012;36:1380–7.

96. Hutcheon D, Hale A, Ewing JA, Miller M, Couto F, Bour ES, *et al.* Short-Term Preoperative Weight Loss and Postoperative Outcomes in Bariatric Surgery. *ACS. American College of Surgeons;* 2018;;1–11.

97. Anderin C, Gustafsson UO, Heijbel N, Thorell A. Weight loss before bariatric surgery and postoperative complications: data from the Scandinavian Obesity Registry (SOReg). *Annals of Surgery*. 2015;261:909–13.
98. Doyle A, Adeyi O, Khalili K, Fischer S, Dib M, Goldaracena N, *et al*. Treatment with Optifast reduces hepatic steatosis and increases candidacy rates for living donor liver transplantation. *Liver Transpl*. 2016;22:1295–300.
99. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrenbach K, *et al*. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2004;292:1724–37.
100. Kang JH, Le QA. Effectiveness of bariatric surgical procedures: A systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine*. 2017;96:e8632.
101. van Rutte PWJ, Smulders JF, de Zoete JP, Nienhuijs SW. Outcomes of sleeve gastrectomy as a primary bariatric procedure. *BJS*. 2014;21:305–9.
102. Chang S-H, Stoll CRT, Song J, Varela JE, Eagon CJ, Colditz GA. The effectiveness and risks of bariatric surgery: an updated systematic review and meta-analysis, 2003-2012. *JAMA Surg*. 2014;149:275–87.
103. Shoar S, Saber AA. Long-term and midterm outcomes of laparoscopic sleeve gastrectomy versus Roux-en-Y gastric bypass: a systematic review and meta-analysis of comparative studies. *Surg Obes Relat Dis*. 2017;13:170–80.
104. Randell EW, Twells LK, Gregory DM, Lester KK, Daneshtalab N, Dillon C, *et al*. Pre-operative and post-operative changes in CRP and other biomarkers sensitive to inflammatory status in patients with severe obesity undergoing laparoscopic sleeve gastrectomy. *Clin. Biochem*. 2017.
105. Pardina E, Ferrer R, Baena-Fustegueras JA, Rivero J, Lecube A, Fort JM, *et al*. Only C-reactive protein, but not TNF- α or IL6, reflects the improvement in inflammation after bariatric surgery. *Obes Surg*. 2012;22:131–9.
106. Shimizu H, Hatao F, Imamura K, Takanishi K, Tsujino M. Early Effects of Sleeve Gastrectomy on Obesity-Related Cytokines and Bile Acid Metabolism in Morbidly Obese Japanese Patients. *Obes Surg*. 2017;27:3223–9.
107. Bruna M, Gumbau V, Guaita M, Canelles E, Mulas C, Basés C, *et al*. [Prospective study of gluco-lipidic hormone and peptide levels in morbidly obese patients after sleeve gastrectomy]. *Cir Esp*. 2014;92:175–81.
108. Illán-Gómez F, González-Ortega M, Orea-Soler I, Alcaraz-Tafalla MS, Aragón-Alonso A, Pascual-Díaz M, *et al*. Obesity and inflammation: change in adiponectin, C-reactive protein, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 after bariatric surgery. *Obes Surg*. 2012;22:950–5.

109. Chen J, Pamuklar Z, Spagnoli A, Torquati A. Serum leptin levels are inversely correlated with omental gene expression of adiponectin and markedly decreased after gastric bypass surgery. *Surg Endosc.* 2012;26:1476–80.

110. Rao RS, Yanagisawa R, Kini S. Insulin resistance and bariatric surgery. *Obes Rev.* 2012;13:316–28.

111. Kalinowski P, Paluszkiwicz R, Wróblewski T, Remiszewski P, Grodzicki M, Bartoszewicz Z, *et al.* Ghrelin, leptin, and glycemic control after sleeve gastrectomy versus Roux-en-Y gastric bypass—results of a randomized clinical trial. *Surg Obes Relat Dis.* 2017;13:181–8.

112. Benaiges D, Flores Le-Roux JA, Pedro-Botet J, Chillarón JJ, Renard M, Parri A, *et al.* Sleeve gastrectomy and Roux-en-Y gastric bypass are equally effective in correcting insulin resistance. *Int J Surg.* 2013;11:309–13.

113. Adami GF, Scopinaro N, Cordera R. Adipokine Pattern After Bariatric Surgery: Beyond the Weight Loss. *Obes Surg.* 2016;26:2793–801.

114. Goktas Z, Moustaid-Moussa N, Shen C-L, Boylan M, Mo H, Wang S. Effects of bariatric surgery on adipokine-induced inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:69.

115. Frikke-Schmidt H, O'Rourke RW, Lumeng CN, Sandoval DA, Seeley RJ. Does bariatric surgery improve adipose tissue function? *Obesity Reviews.* 2016;17:795–809.

116. Gil A, María Aguilera C, Gil-Campos M, Cañete R. Altered signalling and gene expression associated with the immune system and the inflammatory response in obesity. *Br. J. Nutr.* 2007;98 Suppl 1:S121–6.

117. Ghosh S, Dent R, Harper M-E, Gorman SA, Stuart JS, McPherson R. Gene expression profiling in whole blood identifies distinct biological pathways associated with obesity. *BMC Med Genomics.* 2010;3:56.

118. Merkestein M, McTaggart JS, Lee S, Kramer HB, McMurray F, Lafond M, *et al.* Changes in gene expression associated with FTO overexpression in mice. *PLoS ONE.* 2014;9:e97162.

119. Pietiläinen KH, Kannisto K, Korsheninnikova E, Rissanen A, Kaprio J, Ehrenborg E, *et al.* Acquired Obesity Increases CD68 and Tumor Necrosis Factor- α and Decreases Adiponectin Gene Expression in Adipose Tissue: A Study in Monozygotic Twins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006;91:2776–81.

120. Lappalainen T, Kolehmainen M, Schwab U, Pulkkinen L, de Mello VDF, Vaittinen M, *et al.* Gene expression of FTO in human subcutaneous adipose tissue, peripheral blood mononuclear cells and adipocyte cell line. *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 2010;3:37–45.

121. Sletten AC, Peterson LR, Schaffer JE. Manifestations and mechanisms of myocardial lipotoxicity in obesity. *J. Intern. Med.* 2018.
122. Mehta R, Birerdinc A, Wang L, Younoszai Z, Moazzez A, Elariny H, *et al.* Expression of energy metabolism related genes in the gastric tissue of obese individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* 2014;14:72.
123. Hao R-H, Yang T-L, Rong Y, Yao S, Dong S-S, Chen H, *et al.* Gene expression profiles indicate tissue-specific obesity regulation changes and strong obesity relevant tissues. *Int J Obes (Lond).* 2017.
124. Hindle AK, Koury J, McCaffrey T, Fu SW, Brody F. Dysregulation of gene expression within the peroxisome proliferator activated receptor pathway in morbidly obese patients. *Surg Endosc.* 2009;23:1292–7.
125. Berisha SZ, Serre D, Schauer P, Kashyap SR, Smith JD. Changes in whole blood gene expression in obese subjects with type 2 diabetes following bariatric surgery: a pilot study. *PLoS ONE.* 2011;6:e16729.
126. Wang Y, Wang D-S, Cheng Y-S, Jia B-L, Yu G, Yin X-Q, *et al.* Expression of MicroRNA-448 and SIRT1 and Prognosis of Obese Type 2 Diabetic Mellitus Patients After Laparoscopic Bariatric Surgery. *Cell. Physiol. Biochem.* 2018;45:935–50.
127. Novais PFS, Weber TK, Lemke N, Verlengia R, Crisp AH, Rasera-Junior I, *et al.* Gene polymorphisms as a predictor of body weight loss after Roux-en-Y gastric bypass surgery among obese women. *Obesity Research & Clinical Practice. Asia Oceania Assoc. for the Study of Obesity;* 2016;10:724–7.
128. Wing RR, Lang W, Wadden TA, Safford M, Knowler WC, Bertoni AG, *et al.* Benefits of modest weight loss in improving cardiovascular risk factors in overweight and obese individuals with type 2 diabetes. *Dia Care.* 2011;34:1481–6.
129. Magkos F, Fraterrigo G, Yoshino J, Luecking C, Kirbach K, Kelly SC, *et al.* Effects of Moderate and Subsequent Progressive Weight Loss on Metabolic Function and Adipose Tissue Biology in Humans with Obesity. *Cell Metabolism.* Elsevier Inc; 2016;:1–12.
130. González-Plaza JJ, Gutiérrez-Repiso C, García-Serrano S, Rodríguez-Pacheco F, Garrido-Sánchez L, Santiago-Fernández C, *et al.* Effect of Roux-en-Y gastric bypass-induced weight loss on the transcriptomic profiling of subcutaneous adipose tissue. *Surg Obes Relat Dis.* 2016;12:257–63.
131. Canello R, Zulian A, Gentilini D, Mencarelli M, Barba Della A, Maffei M, *et al.* Permanence of molecular features of obesity in subcutaneous adipose tissue of ex-obese subjects. *Int J Obes (Lond).* 2013;37:867–73.

132. Hindle AK, Edwards C, McCaffrey T, Fu SW, Brody F. Reactivation of adiponectin expression in obese patients after bariatric surgery. *Surg Endosc.* 2010;24:1367–73.

133. Edwards C, Hindle AK, Fu S, Brody F. Downregulation of leptin and resistin expression in blood following bariatric surgery. *Surg Endosc.* 2010;25:1962–8.

134. Pinhel MA de S, Noronha NY, Nicoletti CF, de Oliveira BAP, Cortes-Oliveira C, Pinhanelli VC, *et al.* Changes in Global Transcriptional Profiling of Women Following Obesity Surgery Bypass. *Obes Surg.* 2017.

135. Trachta P, Dostálová I, Haluzíková D, Kasalický M, Kaválková P, Drápalová J, *et al.* Laparoscopic sleeve gastrectomy ameliorates mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue but not in peripheral monocytes of obese patients. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2014;383:96–102.

136. Moran-Atkin E, Brody F, Fu SW, Rojkind M. Changes in GIP gene expression following bariatric surgery. *Surg Endosc.* 2013;27:2492–7.

137. Youngson NA, Morris MJ. What obesity research tells us about epigenetic mechanisms. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 2013;368:20110337.

138. Iacobuzio-Donahue CA. Epigenetic changes in cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2009;4:229–49.

139. Herrera BM, Keildson S, Lindgren CM. Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas.* Elsevier Ireland Ltd; 2011;69:41–9.

140. van Dijk SJ, Molloy PL, Varinli H, Morrison JL, Muhlhausler BS, Members of EpiSCOPE. Epigenetics and human obesity. *Int J Obes (Lond).* 2015;39:85–97.

141. Bell CG. The Epigenomic Analysis of Human Obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2017;25:1471–81.

142. Sala P, de Miranda Torrinhas RSM, Fonseca DC, Ravacci GR, Waitzberg DL, Giannella-Neto D. Tissue-specific methylation profile in obese patients with type 2 diabetes before and after Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetol Metab Syndr.* 2017;9:15.

143. Hermsdorff HH, Mansago ML, Campion J, Milagro FI, Zulet MA, Martinez JA. TNF-alpha promoter methylation in peripheral white blood cells: relationship with circulating TNF α , truncal fat and n-6 PUFA intake in young women. *Cytokine.* 2013;64:265–71.

144. Obermann-Borst SA, Eilers PHC, Tobi EW, de Jong FH, Slagboom PE, Heijmans BT, *et al.* Duration of breastfeeding and gender are associated with methylation of the LEPTIN gene in very young children. *Pediatr. Res.* 2013;74:344–9.

145. Agha G, Houseman EA, Kelsey KT, Eaton CB, Buka SL, Loucks EB. Adiposity is associated with DNA methylation profile in adipose tissue. *Int J Epidemiol.* 2015;44:1277–87.

146. Arner P, Sinha I, Thorell A, Rydén M, Dahlman-Wright K, Dahlman I. The epigenetic signature of subcutaneous fat cells is linked to altered expression of genes implicated in lipid metabolism in obese women. *Clin Epigenetics*. 2015;7:93.
147. Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, Sandling JK, Aïssi D, Wahl S, *et al*. DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. *Lancet*. 2014;383:1990–8.
148. Xu X, Su S, Barnes VA, De Miguel C, Pollock J, Ownby D, *et al*. A genome-wide methylation study on obesity: differential variability and differential methylation. *Epigenetics*. 2013;8:522–33.
149. Nicoletti CF, Nonino CB, de Oliveira BAP, Pinhel MA de S, Mansego ML, Milagro FI, *et al*. DNA Methylation and Hydroxymethylation Levels in Relation to Two Weight Loss Strategies: Energy-Restricted Diet or Bariatric Surgery. *Obes Surg*. 2016;26:603–11.
150. Coppedè F, Seghieri M, Stoccoro A, Santini E, Giannini L, Rossi C, *et al*. DNA methylation of genes regulating appetite and prediction of weight loss after bariatric surgery in obese individuals. *J Endocrinol Invest*. 2018.
151. Nilsson EK, Ernst B, Voisin S, Almén MS, Benedict C, Mwinyi J, *et al*. Roux-en Y gastric bypass surgery induces genome-wide promoter-specific changes in DNA methylation in whole blood of obese patients. *PLoS ONE*. 2015;10:e0115186.
152. Kirchner H, Nylen C, Laber S, Barres R, Yan J, Krook A, *et al*. Altered promoter methylation of PDK4, IL1 B, IL6, and TNF after Roux-en Y gastric bypass. *Surgery for Obesity and Related Diseases*. Elsevier; 2014;:1–8.
153. Benton MC, Johnstone A, Eccles D, Harmon B, Hayes MT, Lea RA, *et al*. An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss. *Genome Biol*. 2015;16:8.
154. Barres R, Kirchner H, Rasmussen M, Yan J, Kantor FR, Krook A, *et al*. Weight Loss after Gastric Bypass Surgery in Human Obesity Remodels Promoter Methylation. *Cell Reports*. The Authors; 2013;3:1020–7.
155. Ahrens M, Ammerpohl O, Schönfels von W, Kolarova J, Bens S, Itzel T, *et al*. Short Article. *Cell Metabolism*. Elsevier Inc; 2013;18:296–302.
156. Donkin I, Versteyhe S, Ingerslev LR, Qian K, Mechta M, Nordkap L, *et al*. Obesity and Bariatric Surgery Drive Epigenetic Variation of Spermatozoa in Humans. *Cell Metabolism*. 2016;23:369–78.
157. Martín-Núñez GM, Cabrera-Mulero A, Alcaide-Torres J, García-Fuentes E, Tinahones FJ, Morcillo S. No effect of different bariatric surgery procedures on LINE-1 DNA methylation in diabetic and nondiabetic morbidly obese patients. *Surg Obes Relat Dis*. 2017;13:442–50.

158. Lundell LR, Dent J, Bennett JR, Blum AL, Armstrong D, Galmiche JP, *et al.* Endoscopic assessment of oesophagitis: clinical and functional correlates and further validation of the Los Angeles classification. *Gut.* 1999;45:172–80.

159. Rotondi M, Magri F, Chiovato L. Thyroid and obesity: not a one-way interaction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;96:344–6.

160. Reinehr T, de Sousa G, Andler W. Hyperthyrotropinemia in obese children is reversible after weight loss and is not related to lipids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006;91:3088–91.

161. Ruiz-Tovar J, Boix E, Galindo I, Zubiaga L, Diez M, Arroyo A, *et al.* Evolution of subclinical hypothyroidism and its relation with glucose and triglycerides levels in morbidly obese patients after undergoing sleeve gastrectomy as bariatric procedure. *Obes Surg.* 2014;24:791–5.

162. Eknoyan G. Adolphe Quetelet (1796-1874)--the average man and indices of obesity. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2008. pp. 47–51.

163. Ascaso JF, Romero P, Real JT, Priego A, Valdecabres C, Carmena R. [Insulin resistance quantification by fasting insulin plasma values and HOMA index in a non-diabetic population]. *Med Clin (Barc).* 2001;117:530–3.

164. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Dia Care.* 2018;41:S13–S27.

165. Buse JB, Caprio S, Cefalu WT, Ceriello A, Del Prato S, Inzucchi SE, *et al.* How do we define cure of diabetes? *Dia Care.* 2009;32:2133–5.

166. Rubio MA, Monereo S, Lecube A, Resa J, Masdevall C, la Cruz Vigo de F, *et al.* [Joint Position Statement of the SEEN-SECO-SEEDO-SED Societies on metabolic surgery for type 2 diabetes mellitus"]. *Endocrinol Nutr.* 2013;60:547–8.

167. American Diabetes Association. 6. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Dia Care.* 2018;41:S55–S64.

168. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, *et al.* 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2017.

169. James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison Himmelfarb C, Handler J, *et al.* 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA.* 2014. pp. 507–20.

170. Jellinger PS, Handelsman Y, Rosenblit PD, Bloomgarden ZT, Fonseca VA, Garber AJ, *et al.* American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology guidelines for management of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease - Executive summary - Complete Appendix to Guidelines available at <http://journals.aace.com>. *Endocr Pract.* 2017. pp. 479–97.
171. Graham IM, Catapano AL, Wong ND. Current guidelines on prevention with a focus on dyslipidemias. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2017;7:S4–S10.
172. Barbarroja N, López-Pedreira R, Mayas MD, García-Fuentes E, Garrido-Sánchez L, Macías-González M, *et al.* The obese healthy paradox: is inflammation the answer? *Biochem. J.* 2010;430:141–9.
173. Eggers S, Remington PL, Ryan K, Nieto J, Peppard P, Malecki K. Obesity Prevalence and Health Consequences: Findings From the Survey of the Health of Wisconsin, 2008–2013. *WMJ.* 2016;115:238–44.
174. Mazzi S, Lordier L, Debili N, Raslova H, Vainchenker W. Megakaryocyte and polyploidization. *Exp. Hematol.* 2018;57:1–13.
175. Lightowers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends Genet.* 1997;13:450–5.
176. Minchenko DO, Davydov VV, Budreiko OA, Moliavko OS, Kulieshova DK, Tiazhka OV, *et al.* The expression of CCN2, IQSEC, RSP01, DNAJC15, RIPK2, IL13RA2, IRS1, and IRS2 genes in blood of obese boys with insulin resistance. *Fiziol Zh.* 2015;61:10–8.
177. Van Schaftingen E, Veiga-da-Cunha M, Linster CL. Enzyme complexity in intermediary metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2015;38:721–7.
178. Arner P. Resistin: yet another adipokine tells us that men are not mice. *Diabetologia.* 2005;48:2203–5.
179. Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet.* 2013;29:569–74.
180. Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *J. Appl. Genet.* 2013;54:391–406.
181. Chapman JR, Waldenström J. With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. *PLoS ONE.* 2015;10:e0141853.
182. Pan Y, Liu G, Zhou F, Su B, Li Y. DNA methylation profiles in cancer diagnosis and therapeutics. *Clin. Exp. Med.* 2017.

183. Tirado R, Masdeu MJ, Vigil L, Rigla M, Luna A, Rebasa P, *et al.* Impact of Bariatric Surgery on Heme Oxygenase-1, Inflammation, and Insulin Resistance in Morbid Obesity with Obstructive Sleep Apnea. *Obesity Surgery*; 2017;:1-9.

184. Yki-Järvinen H. Diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Diabetologia*. 2016;59:1104-11.

185. Lips MA, van Klinken JB, Pijl H, Janssen I, Willems van Dijk K, Koning F, *et al.* Weight loss induced by very low calorie diet is associated with a more beneficial systemic inflammatory profile than by Roux-en-Y gastric bypass. *Metab. Clin. Exp.* 2016;65:1614-20.

186. Alemán JO, Iyengar NM, Walker JM, Milne GL, Da Rosa JC, Liang Y, *et al.* Effects of Rapid Weight Loss on Systemic and Adipose Tissue Inflammation and Metabolism in Obese Postmenopausal Women. *J Endocr Soc.* 2017;1:625-37.

187. Schauer PR, Mingrone G, Ikramuddin S, Wolfe B. Clinical Outcomes of Metabolic Surgery: Efficacy of Glycemic Control, Weight Loss, and Remission of Diabetes. *Dia Care.* 2016;39:902-11.

188. Sjöström L, Peltonen M, Jacobson P, Ahlin S, Andersson-Assarsson J, Anveden Å, *et al.* Association of bariatric surgery with long-term remission of type 2 diabetes and with microvascular and macrovascular complications. *JAMA.* 2014;311:2297-304.

189. Kowalewski PK, Olszewski R, Wałędzia MS, Janik MR, Kwiatkowski A, Gałązka-Świderek N, *et al.* Long-Term Outcomes of Laparoscopic Sleeve Gastrectomy-a Single-Center, Retrospective Study. *Obes Surg.* 2018;28:130-4.

190. Peterli R, Borbély Y, Kern B, Gass M, Peters T, Thurnheer M, *et al.* Early results of the Swiss Multicentre Bypass or Sleeve Study (SM-BOSS): a prospective randomized trial comparing laparoscopic sleeve gastrectomy and Roux-en-Y gastric bypass. *Annals of Surgery.* 2013;258:690-4-discussion695.

191. Yousseif A, Emmanuel J, Karra E, Millet Q, Elkalaawy M, Jenkinson AD, *et al.* Differential Effects of Laparoscopic Sleeve Gastrectomy and Laparoscopic Gastric Bypass on Appetite, Circulating Acyl-ghrelin, Peptide YY3-36 and Active GLP-1 Levels in Non-diabetic Humans. *Obes Surg.* 2013;24:241-52.

192. Lee W-J, Chen C-Y, Chong K, Lee Y-C, Chen S-C, Lee S-D. Changes in postprandial gut hormones after metabolic surgery: a comparison of gastric bypass and sleeve gastrectomy. *Surg Obes Relat Dis.* 2011;7:683-90.

193. Anderson B, Switzer NJ, Almamar A, Shi X, Birch DW, Karmali S. The impact of laparoscopic sleeve gastrectomy on plasma ghrelin levels: a systematic review. *Obes Surg.* 2013;23:1476-80.

194. Eslami Z, Ghassempour A, Aboul-Enein HY. Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry analyses of ghrelin and related peptides. *Biomed. Chromatogr.* 2017;31.
195. Chambers AP, Kirchner H, Wilson Perez HE, Willency JA, Hale JE, Gaylann BD, *et al.* The effects of vertical sleeve gastrectomy in rodents are ghrelin independent. *Gastroenterology.* 2013;144:50–5.
196. Auguet T, Terra X, Hernández M, Sabench F, Porras JA, Orellana-Gavaldà JM, *et al.* Clinical and adipocytokine changes after bariatric surgery in morbidly obese women. *Obesity.* 2013;22:188–94.
197. Fall T, Mendelson M, Speliotes EK. Recent Advances in Human Genetics and Epigenetics of Adiposity: Pathway to Precision Medicine? *Gastroenterology.* 2017;152:1695–706.
198. Rinkwitz S, Geng F-S, Manning E, Suster M, Kawakami K, Becker TS. BAC transgenic zebrafish reveal hypothalamic enhancer activity around obesity associated SNP rs9939609 within the human FTO gene. *Genesis.* 2015;53:640–51.
199. Cullen SP, Martin SJ. Fas and TRAIL “death receptors” as initiators of inflammation: Implications for cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2015;39:26–34.
200. Schernthaner G-H, Kopp H-P, Kriwanek S, Krzyzanowska K, Satler M, Koppensteiner R, *et al.* Effect of massive weight loss induced by bariatric surgery on serum levels of interleukin-18 and monocyte-chemoattractant-protein-1 in morbid obesity. *Obes Surg.* 2006;16:709–15.
201. Montecucco F, Lenglet S, Quercioli A, Burger F, Thomas A, Lauer E, *et al.* Gastric bypass in morbid obese patients is associated with reduction in adipose tissue inflammation via N-oleoylethanolamide (OEA)-mediated pathways. *Thromb. Haemost.* 2015;113:838–50.
202. Bonaventura A, Liberale L, Carbone F, Scopinaro N, Camerini G, Papadia FS, *et al.* High baseline C-reactive protein levels predict partial type 2 diabetes mellitus remission after biliopancreatic diversion. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2017;27:423–9.
203. Mocanu AO, Mulya A, Huang H, Dan O, Shimizu H, Batayyah E, *et al.* Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass on the NLRP3 Inflammasome in Adipose Tissue from Obese Rats. *PLoS ONE.* 2015;10:e0139764.
204. Jürets A, Itariu BK, Keindl M, Prager G, Langer F, Grablowitz V, *et al.* Upregulated TNF Expression 1 Year After Bariatric Surgery Reflects a Cachexia-Like State in Subcutaneous Adipose Tissue. *Obes Surg.* 2017;27:1514–23.
205. Moschen AR, Molnar C, Geiger S, Graziadei I, Ebenbichler CF, Weiss H, *et al.* Anti-inflammatory effects of excessive weight loss: potent suppression of adipose interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha expression. *Gut.* 2010;59:1259–64.

206. Kuang S-Q, Fang Z, Zweidler-McKay PA, Yang H, Wei Y, Gonzalez-Cervantes EA, *et al.* Epigenetic Inactivation of Notch-Hes Pathway in Human B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Tao Q, editor. PLoS ONE. 2013;8:e61807.

207. Su D, Wang X, Campbell MR, Porter DK, Pittman GS, Bennett BD, *et al.* Distinct Epigenetic Effects of Tobacco Smoking in Whole Blood and among Leukocyte Subtypes. PLoS ONE. 2016;11:e0166486.

208. Furuncuoğlu Y, Tulgar S, Dogan AN, Cakar S, Tulgar YK, Cakiroglu B. How obesity affects the neutrophil/lymphocyte and platelet/lymphocyte ratio, systemic immune-inflammatory index and platelet indices: a retrospective study. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2016;20:1300–6.

209. Roth CM. Quantifying gene expression. Curr Issues Mol Biol. 2002;4:93–100.

210. Bartlett JMS. Approaches to the analysis of gene expression using mRNA: a technical overview. Mol. Biotechnol. 2002;21:149–60.

211. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, *et al.* The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine. 2006;27:95–125.

212. Segundo-Val IS, Sanz-Lozano CS. Introduction to the Gene Expression Analysis. Methods Mol. Biol. 2016;1434:29–43.

213. Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of pyrosequencing. Arch. Pathol. Lab. Med. 2013;137:1296–303.

214. Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing. Nat Protoc. 2007;2:2265–75.

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona