

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE CIENCIAS



**Departamento de
Bioquímica y Biología
Molecular y Celular
Universidad Zaragoza**

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
ESTEROLES NO COLESTEROL EN TEJIDO
ADIPOSO**

Autor:

LUNA MAZAS CABETAS

Directores:

Dra. LUCÍA BAILA RUEDA

Dr. FERNANDO CIVEIRA

JULIO 2019

D. FERNANDO CIVEIRA MURILLO, Doctor en Medicina, Catedrático del Departamento de Medicina, Psiquiatría y Dermatología de la Universidad de Zaragoza, y

DÑA. LUCÍA BAILA RUEDA, Doctora en Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Investigadora Postdoctoral del Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón),

Codirectores de este Trabajo Fin de Grado,

CERTIFICAN

Que la Memoria del Trabajo Fin de Grado titulado: "Determinación y caracterización de esteroides en tejido adiposo de personas con diferentes grados de adiposidad", presentada por DÑA. LUNA MAZAS CABETAS, ha sido realizada en la Unidad Clínica y de Investigación en Lípidos y Arteriosclerosis del Hospital Universitario Miguel Servet bajo su dirección, de acuerdo a los objetivos del Trabajo Fin de Grado aprobados dentro del Grado de Biotecnología, reúne los requisitos para ser presentada por su autora para optar al Grado en Biotecnología por la Universidad de Zaragoza y autorizan su presentación.

Zaragoza, 28 de junio de 2019.



Fdo: Fernando Civeira Murillo



Fdo: Lucía Baila Rueda

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1 La obesidad | 3 |
| 1.1.1 Prevalencia y tendencias | 4 |
| 1.2 El tejido adiposo (TA)..... | 4 |
| 1.2.1 Cambios patológicos en el tejido adiposo..... | 5 |
| 1.3 La gota lipídica..... | 6 |
| 1.4. Determinación de colesterol y oxisteroles en tejido adiposo | 7 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 8 |
| 2.1. Hipótesis..... | 8 |
| 2.2. Objetivos..... | 8 |
| 2.2.1. Objetivo general | 8 |
| 2.2.2. Objetivos específicos..... | 8 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS | 8 |
| 3.1. Optimización del método | 8 |
| 3.1.1 Tejido adiposo control | 8 |
| 3.1.2 Extracción de los lípidos totales en tejido adiposo control | 9 |
| 3.2 Sujetos seleccionados | 11 |
| 3.5 Determinaciones bioquímicas en las muestras seleccionados..... | 11 |
| 3.6 Determinación de colesterol por colorimetría de las muestras seleccionadas...11 | |
| 3.7 Determinación de TGs en tejido adiposo | 12 |
| 3.8 Análisis estadístico | 12 |
| 4. RESULTADOS | 13 |
| 4.1 Correlación entre los métodos de determinación de colesterol por HPLC-MS/MS y por colorimetría | 13 |
| 4.2 Parámetros analíticos estudiados entre sujetos con $IMC \leq 31 \text{ kg/m}^2$ y con $IMC > 31$ kg/m^2 | 13 |
| 4.3. Correlaciones entre datos clínicos y parámetros bioquímicos en tejido adiposo | 16 |
| 5. DISCUSIÓN | 18 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 20 |
| BIBLIOGRAFÍA | 21 |

RESUMEN

En el mundo occidental, la obesidad, conocida como un peso corporal desproporcionado con respecto a la estatura, se ha convertido en la epidemia del siglo XXI. Como consecuencia del aumento calórico excesivo, se producen una serie de cambios metabólicos en los diferentes territorios adiposos, que podrían actuar como biomarcadores de sobrepeso u obesidad. El objetivo principal de este estudio fue optimizar un método analítico para determinar colesterol y oxisteroles en tejido adiposo por HPLC-MS/MS para estudiar posteriormente estos biomarcadores en mujeres con sobrepeso y obesidad. Se determinó colesterol y oxisteroles en tejido adiposo control y tejido adiposo subcutáneo y visceral de 38 mujeres mayores de edad con índices de masa corporal (IMC) comprendidos entre 23 y 40,1 kg/m². Se obtuvieron unas concentraciones de colesterol y oxisteroles en tejido adiposo subcutáneo mayores en mujeres con IMC ≤ 31 kg/m² que en mujeres con IMC > 31 kg/m². Sin embargo, en tejido adiposo visceral las mujeres con IMC > 31 kg/m² tuvieron concentraciones mayores de colesterol y oxisteroles. En tejido adiposo subcutáneo se encontró una relación inversa entre el colesterol y el IMC, al contrario que en tejido adiposo visceral donde la relación fue directa. Hubo una relación directa entre el colesterol y los oxisteroles tanto en tejido adiposo subcutáneo como en visceral, siendo estadísticamente significativa con el 27-hidroxicolesterol y con el 24S-hidroxicolesterol, respectivamente. En conclusión, el tejido adiposo subcutáneo y el visceral parecen comportarse de manera diferente a la hora de acumular colesterol y oxisteroles en función del IMC en las mujeres estudiadas. Los resultados obtenidos tienen una significación estadística muy baja en algunos casos, por lo que sería de interés continuar este trabajo con un mayor tamaño muestral. Futuros estudios de los oxisteroles en suero y en tejido adiposo, podrían ofrecer un análisis más global del metabolismo del colesterol en la obesidad.

ABSTRACT

In the western world, obesity, defined as an excessive body weight in relation to the height, has become the 21st century epidemic. Because of the increased caloric intake, a combination of metabolic changes take place in the different adipose sites, which could act as biomarkers of overweight or obesity. The main objective of this research was to develop an analytical method in order to define the concentrations of cholesterol and oxysterols in adipose tissue by HPLC-MS/MS to study afterwards these biomarkers in overweight and obese women. Cholesterol and oxysterols were determined in adipose tissue of a control subject and subcutaneous and visceral adipose tissue of 38 adult women with body mass index (BMI) between 23 and 40,1 kg/m². Higher concentrations of cholesterol and oxysterols were obtained in subcutaneous adipose tissue in women with BMI ≤ 31 kg/m² than in women with BMI > 31 kg/m². However, in visceral adipose tissue women with BMI > 31 kg/m² had higher concentrations of cholesterol and oxysterols. In subcutaneous adipose tissue, cholesterol and BMI had negative correlation, unlike in visceral adipose tissue where the correlation was positive. There was a positive correlation between cholesterol and oxysterols in subcutaneous adipose tissue and in visceral adipose tissue, being significant with the 27-hydroxycholesterol and with the 24S-hydroxycholesterol, respectively. In conclusion, subcutaneous and visceral adipose tissue seem to have different behaviour when accumulating cholesterol and oxysterols according to the BMI in the studied women. The obtained results have a very low statistical significance in some cases, so it would be necessary to continue this research with a higher sample size. Future studies about the oxysterols in serum and in adipose tissue could provide a more global analysis of the cholesterol metabolism in the obesity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La obesidad

La obesidad, considerada como la epidemia del siglo XXI, se define como un peso corporal desproporcionado respecto a la estatura, debido a una acumulación excesiva de tejido adiposo (TA) [1]. La obesidad junto con otros factores como la presión arterial elevada, los niveles elevados de triglicéridos (TGs), la disglucemia o los niveles bajos de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (cHDL), constituyen el comúnmente llamado síndrome metabólico [2]. Este es un claro factor de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y otras afecciones patológicas adversas, y tiene una prevalencia creciente en todo el mundo [2,3]. Algunas de las alteraciones que se han encontrado en el perfil de riesgo metabólico están relacionadas con la obesidad abdominal evaluada por antropometría y con el exceso de adiposidad visceral/ grasa ectópica evaluada por técnicas de imagen. Este conjunto de anomalías metabólicas aumenta el riesgo de diabetes mellitus tipo 2 y de enfermedad cardiovascular (Figura 1).

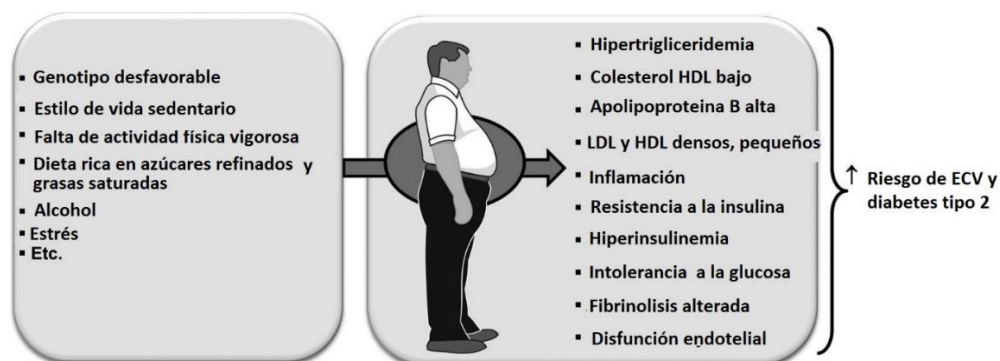


Figura 1. Alteraciones en el perfil metabólico relacionadas con la obesidad abdominal.

Adaptado de Deprés J-P [4]. Abreviaturas: ECV, enfermedad cardiovascular; HDL, lipoproteínas de alta densidad; LDL, lipoproteínas de baja densidad.

La obesidad surge fundamentalmente como resultado de un desequilibrio entre el gasto energético y la ingesta calórica, consecuencia de cambios en la composición de los alimentos y exacerbada por los estilos de vida sedentarios en las sociedades occidentales [1,3,5]. Sin embargo, la etiología de la obesidad es más compleja, y factores como el estatus socioeconómico, la genética, los cambios ambientales, la identidad cultural y las relaciones sociales han de tenerse en cuenta para entender la obesidad de una manera integral [3,6,7]. Todos estos factores contribuyen en menor o mayor medida a los procesos metabólicos celulares, que incluyen entre otros la termogénesis, la oxidación de ácidos grasos, la acumulación diferencial de grasa y el recambio metabólico, e inducen una remodelación compleja del tejido adiposo, que se expande para adaptarse a la ingesta calórica excesiva y cambia notablemente su estructura y composición celular [8–10].

Para cuantificar el exceso de adiposidad que caracteriza a la obesidad se han desarrollado diferentes métodos que tienen en cuenta la marcada heterogeneidad de la distribución de la grasa acumulada [11]. Estos métodos incluyen una evaluación basada en antropometría,

análisis de impedancia bioeléctrica, densitometría y métodos basados en imágenes [12–15]. Sin embargo, y a pesar de que el índice de masa corporal (IMC) es una herramienta imprecisa (no distingue entre masa magra y masa grasa) sigue siendo el indicador de adiposidad más utilizado en todo el mundo [16]. El IMC se calcula dividiendo el peso del individuo en kilogramos (kg) entre la altura en metros cuadrados (m^2). La clasificación del IMC según la OMS define la desnutrición como $<18,5 \text{ kg}/m^2$, el peso normal como $18,5\text{--}24,9 \text{ kg}/m^2$, el sobrepeso como $25\text{--}29,9 \text{ kg}/m^2$, la obesidad como $\geq 30 \text{ kg}/m^2$ y $\geq 40 \text{ kg}/m^2$ se considera obesidad mórbida [17].

1.1.1 Prevalencia y tendencias

Existen evidencias de que la prevalencia de sobrepeso y obesidad está aumentando en todo el mundo a un ritmo alarmante [18,19]. Desde 1975, la obesidad mundial se ha triplicado, siendo mayor en mujeres que en hombres, y en la actualidad, el 39% de los adultos tienen sobrepeso, y de esos, el 13% son obesos [5] (Figura 2).

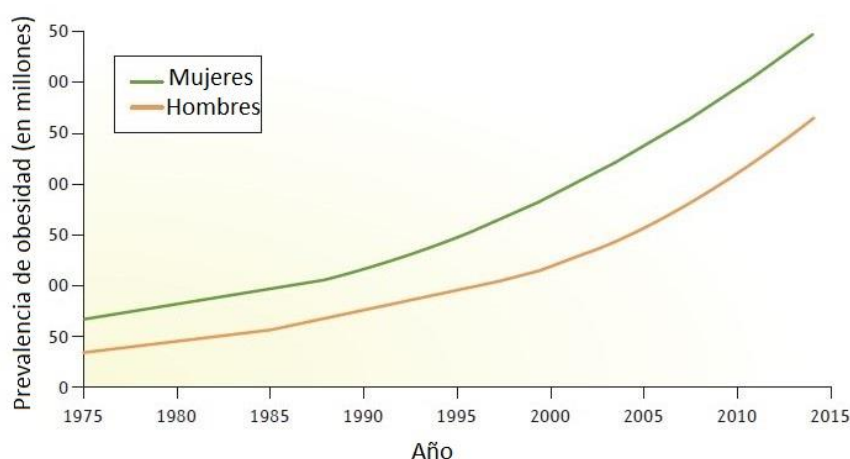


Figura 2. Evolución de la prevalencia de la obesidad. Adaptado de González-Muniesa P. [1].

Entre 1980 y 2008, la media global estandarizada por edad para el IMC aumentó $0,4 \text{ kg}/m^2$ en hombres y $0,5 \text{ kg}/m^2$ en mujeres por década, contribuyendo al aumento del IMC global normalizado por edad a $23,8 \text{ kg}/m^2$ para hombres y $24,1 \text{ kg}/m^2$ para mujeres en 2008. Durante este periodo de tiempo, la prevalencia de la obesidad también se duplicó pasando de $4,8\%$ a $9,8\%$ en hombres y de $7,9\%$ a $13,8\%$ en mujeres [20]. Si la prevalencia de la obesidad continúa en su trayectoria actual, el $57,8\%$ (3.300 millones de personas) de la población adulta mundial tendrá un IMC de $25 \text{ kg}/m^2$ o más para el 2030 [21].

1.2 El tejido adiposo (TA)

El tejido adiposo, considerado un tejido metabólicamente activo, es un componente importante en la homeostasis energética del organismo, que desempeña un papel fundamental en el depósito y amortiguación del colesterol [22]. Los tejidos adiposos se clasifican en tejido adiposo subcutáneo (TAS) y tejido adiposo visceral (TAV) en función de su ubicación en el organismo. El TAS está localizado bajo la piel, mientras que el TAV se sitúa

rodeando a los órganos, concretamente al mesenterio. Ambos tipos de tejidos muestran diferencias estructurales y funcionales, y por tanto, tienen diferente impacto en la desregulación del tejido adiposo, siendo el TAV un depósito más dañino de acumulación de grasa [23,24].

La mayoría de complicaciones asociadas a la obesidad parecen depender de un exceso de acumulación de grasa visceral, actuando como un marcador de disfunción en el tejido adiposo [4]. Se ha demostrado que la acumulación a largo tiempo de lípidos en localizaciones ectópicas lleva al desarrollo de adiposopatías, las cuales favorecen la resistencia a la insulina, y tienen un efecto profundo en el perfil de riesgo cardiometabólico de un individuo [10,25].

1.2.1 Cambios patológicos en el tejido adiposo

El tejido adiposo utiliza dos mecanismos de expansión diferentes en respuesta a la ingesta calórica excesiva. La hiperplasia del tejido adiposo es una forma de crecimiento beneficiosa mediada por la formación de nuevos adipocitos a partir de células progenitoras. Por el contrario, la hipertrofia consiste en el agrandamiento de los adipocitos debido a una sobrecarga lipídica, lo que produce la muerte celular y contribuye a la inflamación del tejido adiposo [10,23,24].

En función de la capacidad del organismo para responder al exceso de energía, el individuo tendrá mayor o menor susceptibilidad para desarrollar síndrome metabólico. Si la energía adicional se acumula en el TAS gracias a la hiperplasia de las células de grasa, el individuo estará protegido contra el desarrollo de síndrome metabólico. Sin embargo, si este TAS muestra un límite de expansión debido a una capacidad adipogénica deficiente, el exceso de TGs provocará una hipertrofia de los adipocitos subcutáneos y en última instancia, se depositará en sitios ectópicos, conllevando a la aparición de síndrome metabólico [4,26].

El tejido adiposo no solo está involucrado en el almacenamiento de energía, sino que también funciona como un órgano endocrino que secreta varias sustancias bioactivas. Por tanto, la disfunción de los adipocitos provoca también la desregulación de los niveles de adipoquinas (aumentando la liberación de adipoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 y resistina y disminuyendo la liberación de adipoquinas antiinflamatorias como la adiponectina) que contribuye al estado proinflamatorio propio de la obesidad y promueve la resistencia a la insulina en numerosos tejidos [24,25,27]. Así mismo, esta inflamación crónica del tejido adiposo en personas obesas promueve el reclutamiento de células del sistema inmune, un aumento de la fibrosis y una desregulación del sistema vascular [4,28]. El aumento de grasa subcutánea asociada a la obesidad no conlleva tanto riesgo cardiovascular en comparación con el aumento de grasa visceral. El TAS libera adipoquinas antiinflamatorias mientras que el TAV libera una mayor cantidad de adipoquinas proinflamatorias, creando así un ambiente de inflamación que contribuye al deterioro metabólico y cardiovascular sistémico asociado a trastornos relacionados con la obesidad (Figura 3).

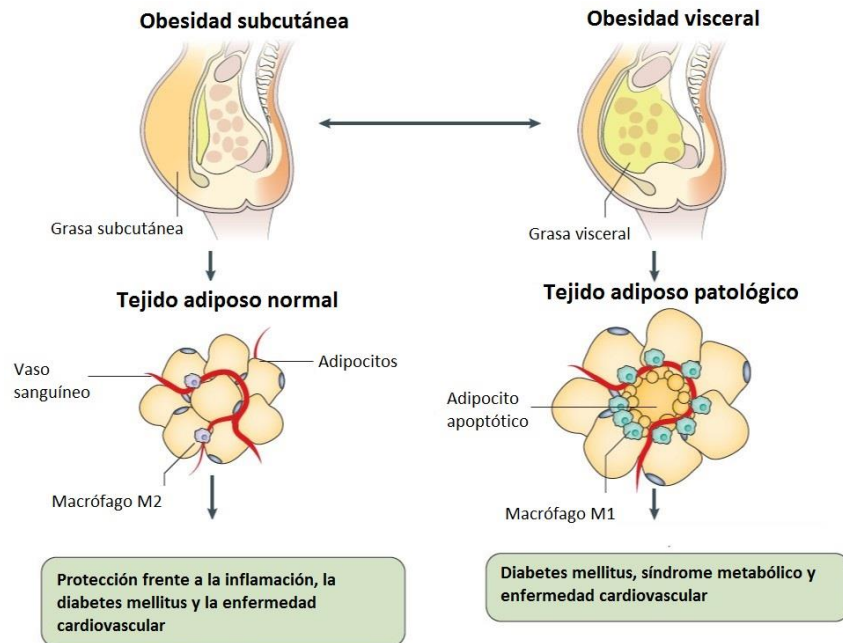


Figura 3. Cambios patológicos en el sistema adiposo. Adaptado de González-Muniesa P. [1]

1.3 La gota lipídica

Las gotas lipídicas (GLs) son compartimentos intracelulares de reserva lipídica, de gran importancia en el tejido adiposo. En cuanto a su estructura, estas GLs están formadas por un núcleo altamente hidrofóbico de lípidos neutros, principalmente TGs y ésteres de colesterol, rodeados por una monocapa externa de fosfolípidos y colesterol libre con proteínas asociadas [29,30]. Como se muestra en la sección de la figura 4, las gotas de lípidos (rodeadas) se amalgaman de múltiples capas de membrana, lo que las hace ideales para el almacenamiento libre de colesterol.

El 80 % del colesterol libre de las células está presente en las GLs. A diferencia de otros tejidos, la mayoría del colesterol en los adipocitos está en forma no esterificada y localizado dentro de las membranas de las GLs [23]. Sin embargo, a pesar de que los adipocitos son muy ricos en colesterol libre, este tipo celular no sufre los efectos tóxicos propios del mismo, debido a la capacidad de almacenamiento de colesterol libre por parte de las GLs. Además, diversos estudios realizados en obesos sugieren que la oxidación del colesterol en los adipocitos es un mecanismo de defensa para evitar la formación de nuevas células grasas, y la sobrecarga de colesterol intracelular [31].

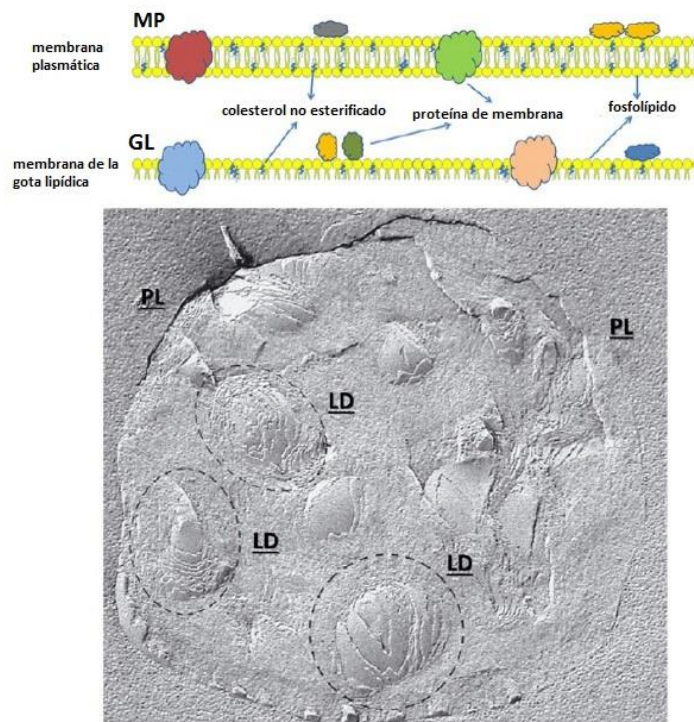


Figura 4. Gota lipídica. Abreviaturas: PL, membrana plasmática; LD, gota lipídica. Adaptado de Haczeyni F. [23].

1.4. Determinación de colesterol y oxisteroles en tejido adiposo

La síntesis de colesterol en la obesidad se ha estudiado extensamente [32] en cambio las vías que conducen al catabolismo del colesterol están menos documentadas. Este es el caso de la formación de derivados oxidados del colesterol, mejor conocidos como oxisteroles. Actualmente existen muchos métodos descritos para la determinación de colesterol y oxisteroles, metabolitos de la oxidación de colesterol que están relacionados con procesos de inflamación [33,34]. Las metodologías más utilizadas a día de hoy son la cromatografía gaseosa acoplada a la espectrometría de masas y la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) [35].

En el caso de la determinación de colesterol y oxisteroles en tejido adiposo no está tan extendida debido a la complejidad del tejido y a la falta de homogeneidad de la muestra. Se conocen estudios donde han determinado oxisteroles por HPLC-MS/MS en diferentes tipos de tejidos, como el hipotálamo, el hígado y el tejido adiposo, en ratones [36].

Para investigar los cambios metabólicos asociados a la obesidad en comparación con condiciones normales, utilizamos un enfoque metabólico para identificar biomarcadores. Para ello, en este estudio realizaremos la determinación del colesterol y oxisteroles por HPLC-MS/MS, tanto en tejido adiposo subcutáneo como visceral en distintos estadios del sobrepeso-obesidad.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Una persona obesa tiene concentraciones de colesterol plasmático inferiores a las esperadas en relación con el efecto del colesterol en el incremento de peso en una persona delgada. Esto es posiblemente debido a un almacenamiento de colesterol en el tejido adiposo o a un cambio funcional (o reclutamiento de regiones de tejido con funciones diferentes) que conlleva un almacenamiento de una mayor cantidad relativa de colesterol en el tejido.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Desarrollar un método analítico rápido y sensible para la determinación de colesterol y oxisteroles en tejido adiposo mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas (HPLC-MS/MS).

2.2.2. Objetivos específicos

- Estudiar la cantidad de colesterol y oxisteroles almacenada en el tejido adiposo subcutáneo y tejido adiposo visceral en sujetos con sobrepeso y obesidad.
- Correlacionar la concentración de colesterol plasmático con la cantidad de colesterol obtenida en ambos territorios de tejido adiposo de todos los sujetos estudiados.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Optimización del método

3.1.1 Tejido adiposo control

El tejido adiposo control se recogió de un sujeto control del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza. Esta muestra de tejido adiposo se fraccionó en tres fragmentos los cuales se utilizaron para optimizar el método de cuantificación de esteroides. En primer lugar, se realizó una extracción lipídica de cada fragmento (100 mg) del tejido adiposo control (Figura 5). Posteriormente, en cada uno de los fragmentos se realizaron dos extracciones de esteroides, una para determinar colesterol y otra para determinar los oxisteroides, 24S-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol.



Figura 5. Plan de trabajo para optimizar el método de cuantificación de esteroides.

3.1.2 Extracción de los lípidos totales en tejido adiposo control

La muestra de tejido adiposo control fue congelada tras su recogida. En cada proceso de extracción utilizamos aproximadamente 100 mg de tejido, que fue homogeneizado durante 20 min en cloroformo/metanol (2:1, 1,2 ml) haciendo uso de un Ultra-Turrax. Para asegurarnos la adecuada ruptura de las membranas celulares, las muestras fueron sonicadas durante 15 min. Después de esto, se añadió cloroformo-agua (1:1, 200 µl de cada), y las muestras se transfirieron a viales de vidrio con tapón de rosca para ser centrifugadas. Tras la centrifugación, las fases se separaron correctamente, y observamos una fase acuosa en la capa superior, una interfase proteica y la fase orgánica conteniendo los lípidos en la capa inferior. El extracto lipídico se transfirió a un vial de vidrio y se secó bajo atmósfera de nitrógeno y se reconstituyó en 200 µl de metanol. Los extractos se almacenaron a -80°C hasta su posterior extracción de colesterol y oxisteroides.

3.1.3 Extracción de colesterol y oxisteroides a partir del extracto lipídico control

El extracto de lípidos totales recogido en la primera extracción, se transfirió a un vial de vidrio con tapón de rosca. En el caso de la extracción de oxisteroides, se añadieron 2,6 µl de estándar interno (colesterol-6D 104,4 ppm), mientras que para la extracción de colesterol se añadieron 3,5 µl de estándar interno (colesterol-7D 2180,59 ppm). Después de la adición de 1 ml de disolución etanoica 0.71M de hidróxido de potasio, se llevó a cabo la hidrólisis alcalina durante 1 hora a 65°C en baño de ultrasonidos. Después de esto, se añadieron 500 µl de agua destilada. Se realizó una extracción de la muestra dos veces con 3 ml de hexano. El extracto se secó bajo atmósfera de nitrógeno y se reconstituyó en 200 µl de metanol. La muestra se

sometió a un proceso de purificación mediante extracción en fase sólida (SPE). Los cartuchos de C₁₈ (500mg, Discovery DSC-18, Supelco) se acondicionaron con 500 µl de metanol para facilitar la retención de los analitos. La muestra extraída fue aplicada al cartucho por gravedad. Posteriormente, se añadieron 1,5 ml de isopropanol para eluir los oxiesteroles y el colesterol. En la extracción de oxiesteroles el isopropanol se evaporó bajo atmósfera de nitrógeno y se reconstituyó con 100 µl de isopropanol. Sin embargo, en la extracción de colesterol, tomamos 50 µl de los 1,5 ml de isopropanol y los disolvimos en 450 µl de isopropanol. En este caso, no evaporamos ni llevamos a sequedad. En ambas extracciones, el extracto se guardó a -20°C hasta que se analizó mediante HPLC-MS/MS.

3.1.4 Determinación de colesterol y oxiesteroles por HPLC-MS/MS

Los esteroides se separaron usando una columna de C₁₈ de fase reversa (RP-HPLC). Una alícuota de 40 µl del extracto (100% 2-propanol) se cargó en la columna (Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 2.1 x 150 mm, 3,5 µm tamaño de partícula; Agilent) del HPLC equipada con una pre-columna (C₁₈, 4 x 2,5 mm). Después de este paso, los esteroides se separaron mediante un gradiente de elución. El gradiente utilizado para la ionización APCI fue 80% del solvente B desde el principio y durante un minuto. Después se hizo una rampa hasta el 100% del solvente B en un periodo de 4 minutos y se mantuvo durante 20 minutos. En un minuto el solvente B pasó a estar a la 80% y se mantuvo durante 9 minutos. Solvente A: 100% agua de HPLC. Solvente B: 100% metanol de HPLC-MS (Sigma-Aldrich, España).

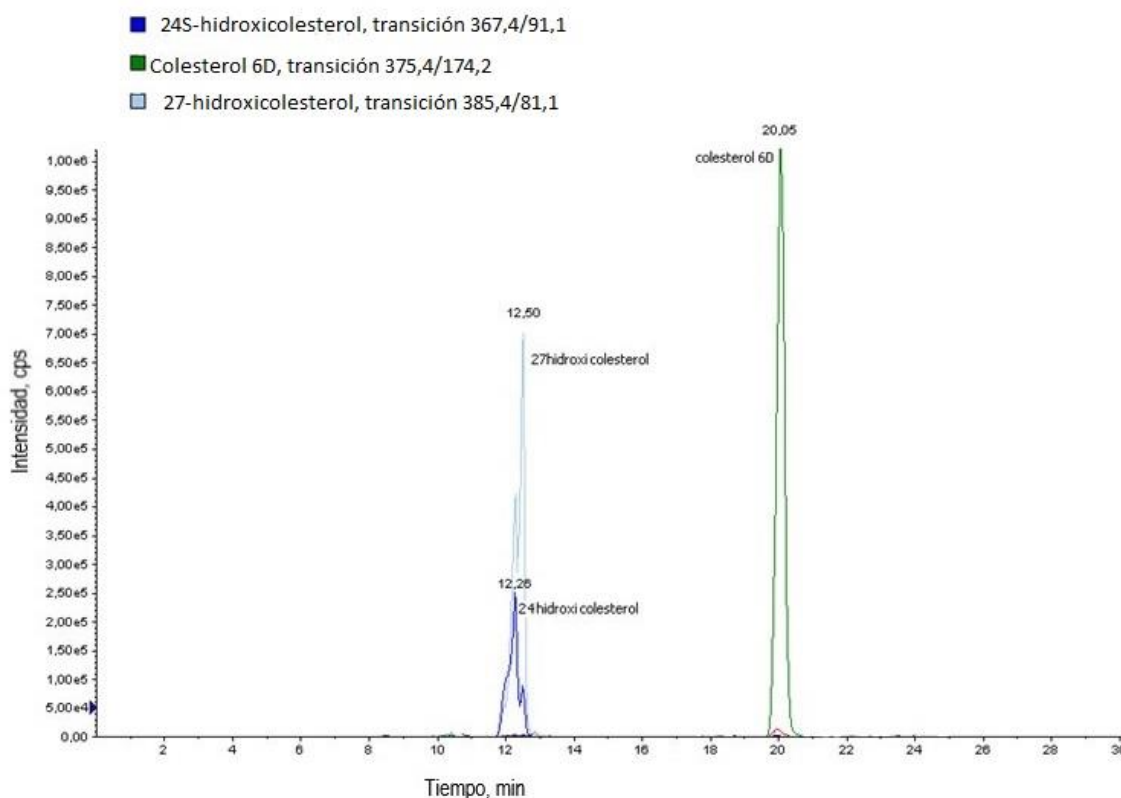


Figura 6. Cromatograma de los analitos 24S-hidroxicolesterol, colesterol-6D y el 27-hidroxicolesterol.

El equipo de HPLC (Agilent 1200RRLC) usado se acopló a un espectrómetro de masas (Applied Biosystems, Foster City, CA) dotado de un triple cuadruplo con trampa de iones 4000 QTrap con una sonda de ionización química a presión atmosférica (APCI). El 24S-hidroxicolesterol, el colesterol-6D y el 27-hidroxicolesterol fueron detectados con las transiciones 337,4/91,1, 375,4/174,2 y 385,4/81,1, respectivamente (Figura 6).

3.2 Sujetos seleccionados

Se seleccionaron 19 mujeres con edades comprendidas entre los 18 y los 40 años. De esas 19 mujeres, 9 presentaban un IMC comprendido entre 23 y 31 kg/m² (que denominaremos IMC≤31 kg/m²), y 10 tenían un IMC comprendido entre 31,1 y 40,1 kg/m² (que denominaremos IMC>31 kg/m²). Ninguna de las pacientes era diabética ni estaba en tratamiento para disminuir los niveles de lípidos. Las pacientes firmaron el consentimiento informado para participar en un protocolo aprobado por un comité de ética médica (Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón, España).

3.3 Obtención de la muestra

Se recogieron muestras de tejido adiposo subcutáneo (abdomen) y de tejido adiposo visceral (epiplón) de cada una de las mujeres sometidas a una operación programada en el caso de las mujeres con sobrepeso y a una cirugía bariátrica en el caso de las mujeres con obesidad.

3.4 Determinación de colesterol y oxisteroles en las muestras seleccionadas

Para determinar el colesterol y los oxisteroles en cada una de las muestras de tejido adiposo seleccionadas se aplicó el método optimizado descrito anteriormente en los apartados 3.1.2, 3.1.3 y 3.1.4. Estas muestras tenían una masa de alrededor de 100 mg, por lo que realizamos únicamente una extracción lipídica. El extracto obtenido para cada muestra de tejido fue dividido en dos fracciones: de una fracción extrajimos colesterol y de la otra extrajimos oxisteroles. Posteriormente, las concentraciones de colesterol y oxisteroles se determinaron por HPLC-MS/MS.

3.5 Determinaciones bioquímicas en las muestras seleccionadas

Se determinaron los lípidos a partir del suero de cada una de las pacientes. Entre los lípidos estudiados se encuentran el colesterol, colesterol LDL, colesterol HDL y TGs. Todas las determinaciones se llevaron a cabo en los laboratorios del Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza. Las concentraciones de colesterol y TGs fueron determinadas mediante métodos enzimáticos estandarizados. La concentración de colesterol HDL se determinó mediante un método enzimático directo.

3.6 Determinación de colesterol por colorimetría de las muestras seleccionadas

Realizamos una segunda determinación de colesterol, en este caso, por colorimetría, para confirmar la validez de nuestros resultados. Este ensayo colorimétrico se realizó

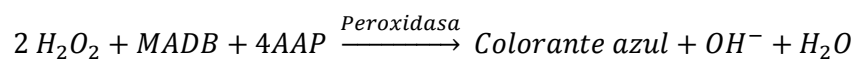
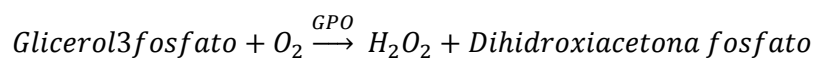
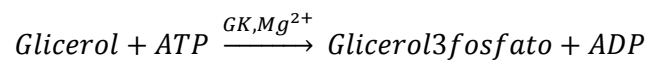
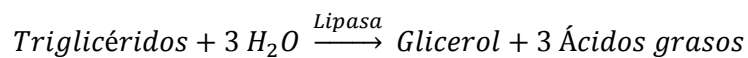
mediante el kit comercial ab65359 (Cholesterol/Cholesteryl Ester Quantitation Assay kit) de la casa comercial abcam®.

Este kit se basa en la hidrólisis de los ésteres de colesterol para la obtención de colesterol libre. Éste se oxida mediante la enzima colesterol oxidasa obteniéndose peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno, en presencia de la enzima peroxidasa de rábano, reacciona en proporción 1:1 con una sonda de colesterol estable y sensible para dicho peróxido de hidrógeno. La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 570 nm de longitud de onda en el lector Synergy™ HT (BioTek).

Se calcularon los resultados de concentración de colesterol mediante la interpolación en una recta de calibrado mediante el software Gen 5™, (BioTek).

3.7 Determinación de TGs en tejido adiposo

Para la determinación de TGs en tejido adiposo se utilizó un kit comercial (OSR60118, BECKMAN COULTER®) basado en una serie de reacciones enzimáticas acopladas. En primer lugar, los TGs son hidrolizados por una combinación de lipasas para dar glicerol y ácidos grasos. El glicerol es fosforilado en presencia de adenosina trifosfato (ATP) en presencia de glicerol quinasa para producir glicerol-3-fosfato. Éste es oxidado por una molécula de oxígeno en presencia de glicerol fosfato oxidasa para producir peróxido de hidrógeno y dihidroxiacetona fosfato. El peróxido de hidrógeno formado reacciona con 4-aminofenazona y sal disódica en presencia de peroxidasa para producir un cromóforo.



La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 630 nm de longitud de onda en el lector Synergy™ HT (BioTek).

Se calcularon los resultados de concentración de TGs mediante la interpolación en una recta de calibrado mediante el software Gen 5™, (BioTek).

3.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó por medio del programa informático SPSS, versión 20.0 (Chicago, Illinois, EEUU) tomando como nivel de significación estadístico valores de $p < 0,05$. Las variables con distribución no paramétricas se expresan como la media y percentiles 25 y 75 y se analizan con el test de *U de Mann-Whitney*. Las correlaciones se estudiaron mediante

un test de correlación de *Spearman* considerando nivel de significación estadístico valores $p < 0,05$ y $p < 0,01$.

4. RESULTADOS

4.1 Correlación entre los métodos de determinación de colesterol por HPLC-MS/MS y por colorimetría

Para validar la determinación de colesterol y oxisteroles por HPLC-MS/MS, se compararon los valores de colesterol de los 38 tejidos analizados por HPLC-MS/MS y por colorimetría. La asociación entre estas dos variables se estudió mediante el coeficiente de correlación de *Spearman*, obteniéndose un valor de 0,872 que fue estadísticamente significativo ($p < 0,001$). Como la correlación obtenida para ambos métodos fue buena, se utilizarán los datos obtenidos por HPLC-MS/MS para el resto del estudio.

4.2 Parámetros analíticos estudiados en sujetos con $IMC \leq 31 \text{ kg/m}^2$ y con $IMC > 31 \text{ kg/m}^2$

A continuación, se muestran los datos bioquímicos obtenidos a partir de suero (colesterol, TGs, colesterol HDL y colesterol LDL) para los sujetos en función de su IMC. Se calcularon las medias y los percentiles 25 y 75 para los sujetos con $IMC \leq 31 \text{ kg/m}^2$ y para sujetos con $IMC > 31 \text{ kg/m}^2$, calculándose también sus diferencias (Tabla 1).

Respecto a los valores obtenidos, es destacable que los sujetos con menor IMC tenían concentraciones significativamente superiores de colesterol en suero, en comparación con los sujetos con IMC más alto ($p = 0,030$). Esta tendencia se mantuvo igual para el colesterol HDL ($p < 0,001$). Sin embargo, en el caso del colesterol LDL, las concentraciones en suero fueron muy similares en ambos grupos de sujetos.

Tabla 1. Características bioquímicas de mujeres con $IMC < 31 \text{ kg/m}^2$ e $IMC > 31 \text{ kg/m}^2$

| | IMC $\leq 31 \text{ kg/m}^2$ (n=9) | | | IMC $> 31 \text{ kg/m}^2$ (n=10) | | | P |
|---------------------------------------|------------------------------------|------|-------|----------------------------------|-------|-------|--------|
| | Media | p25 | p75 | Media | p25 | p75 | |
| Triglicéridos en suero; mg/dL | 92,6 | 83,2 | 101,5 | 87 | 76,5 | 95,6 | 0,782 |
| Colesterol en suero; mg/dL | 222 | 180 | 234 | 190 | 169,2 | 207,5 | 0,030 |
| Colesterol HDL en suero; mg/dL | 61 | 59 | 62 | 52 | 49 | 55 | <0,001 |
| Colesterol LDL en suero; mg/dL | 111 | 106 | 153 | 110 | 101,7 | 124,2 | 0,244 |

Datos expresados como media y percentiles 25 y 75. Abreviaciones: IMC, índice de masa corporal; P-valor calculado mediante el test de *U-Mann Whitney*.

A continuación, se analizaron los datos de los tejidos juntos (sin separar por territorios) y también los resultados separando los datos por territorio subcutáneo y visceral.

En tejido adiposo, encontramos concentraciones significativamente más elevadas para el 24S-hidroxicolesterol en sujetos con $IMC > 31 \text{ kg/m}^2$, en comparación con los sujetos con $IMC \leq 31 \text{ kg/m}^2$ ($p=0,025$) (Tabla 2). Los TGs presentaron concentraciones mayores en sujetos con sobrepeso que en sujetos obesos ($p=0,029$). Al normalizar colesterol y oxiesteroles en tejido por TGs, obtuvimos diferencias significativas entre ambos grupos de sujetos. Tanto en colesterol como en el 27-hidroxicolesterol y en el 24S-hidroxicolesterol ajustados por TGs, los sujetos con $IMC > 31 \text{ kg/m}^2$ presentaron concentraciones significativamente más elevadas ($p=0,019$, $p=0,037$ y $p=0,018$, respectivamente)

Tabla 2. Datos analíticos de los tejidos adiposos de mujeres con $IMC \leq 31 \text{ kg/m}^2$ e $IMC > 31 \text{ kg/m}^2$

| | IMC \leq 31 kg/m ² (n=9) | | | IMC $>$ 31 kg/m ² (n=10) | | | P |
|--|---------------------------------------|--------|-------|-------------------------------------|--------|------|-------|
| | Media | p25 | p75 | Media | p25 | p75 | |
| Colesterol en TA; mg/g TA | 1,09 | 0,90 | 1,25 | 1,33 | 0,97 | 1,50 | 0,808 |
| 27-hidroxicolesterol en TA; mg/g TA | 0,073 | 0,044 | 0,086 | 0,098 | 0,062 | 0,15 | 0,378 |
| 24S-hidroxicolesterol en TA; mg/g TA | 0,11 | 0,077 | 0,14 | 0,18 | 0,11 | 0,21 | 0,025 |
| Triglicéridos en TA; mg/g TA | 9,74 | 0,87 | 13,38 | 4,53 | 0,31 | 7,86 | 0,029 |
| Colesterol en TA; mg/mg TGs | 0,74 | 0,067 | 1,03 | 2,25 | 0,18 | 3,32 | 0,018 |
| 27-hidroxicolesterol en TA; μg/mg TGs | 0,066 | 0,0025 | 0,082 | 0,21 | 0,0085 | 0,29 | 0,037 |
| 24S-hidroxicolesterol en TA; μg/mg TGs | 0,082 | 0,0068 | 0,13 | 0,31 | 0,014 | 0,55 | 0,019 |

Datos expresados como media y percentiles 25 y 75. Abreviaciones: IMC, índice de masa corporal; TGs, triglicéridos; TA, tejido adiposo. P-valor calculado mediante el test de U-Mann Whitney.

Cuando se analizaron los valores en los tejidos por separado, se observó que en tejido adiposo subcutáneo las medias obtenidas de colesterol y 27-hidroxicolesterol por gramo de tejido adiposo fueron mayores para sujetos con $IMC \leq 31 \text{ kg/m}^2$ (Tabla 3). Sin embargo, al ajustar por gramo de TGs estos parámetros, incluyendo el 24S-hidroxicolesterol, los sujetos con $IMC > 31 \text{ kg/m}^2$ presentaron concentraciones más elevadas. En este caso los TGs obtenidos en sujetos con $IMC \leq 31 \text{ kg/m}^2$ fueron mucho mayores que en sujetos con $IMC > 31 \text{ kg/m}^2$.

Tabla 3. Datos analíticos obtenidos de mujeres con $IMC \leq 31 \text{ kg/m}^2$ e $IMC > 31 \text{ kg/m}^2$ por territorio subcutáneo

| | IMC \leq 31 kg/m ² (n=9) | | | IMC $>$ 31 kg/m ² (n=10) | | | P |
|--|---------------------------------------|-------|-------|-------------------------------------|-------|-------|-------|
| | Media | p25 | p75 | Media | p25 | p75 | |
| Colesterol en TAS; mg/g TA | 1,10 | 0,98 | 1,36 | 0,99 | 0,79 | 1,25 | 0,402 |
| 27hidroxicolesterol en TAS; mg/g TA | 0,061 | 0,044 | 0,097 | 0,058 | 0,040 | 0,076 | 0,744 |
| 24hidroxicolesterol en TAS; mg/g TA | 0,10 | 0,096 | 0,14 | 0,13 | 0,098 | 0,19 | 0,221 |

| | | | | | | | |
|--|-------|--------|-------|------|--------|------|-------|
| Triglicéridos en TAS; mg/g TA | 6,15 | 1,57 | 10,52 | 3,08 | 0,38 | 5,67 | 0,094 |
| Colesterol en TAS; mg/mg TGs | 0,49 | 0,13 | 0,93 | 1,45 | 0,17 | 2,90 | 0,111 |
| 27-hidroxicolesterol en TAS; µg/mg TGs | 0,035 | 0,0058 | 0,060 | 0,12 | 0,0090 | 0,22 | 0,171 |
| 24S-hidroxicolesterol en TAS; µg/mg TGs | 0,053 | 0,010 | 0,089 | 0,23 | 0,022 | 0,48 | 0,070 |

Datos expresados como media y percentiles 25 y 75. Abreviaturas: IMC, índice de masa corporal; TGs, triglicéridos; TA, tejido adiposo; TAS, tejido adiposo subcutáneo. *P*-valor calculado mediante el test de U-Mann Whitney.

En tejido adiposo visceral, las medias obtenidas de colesterol, 27-hidroxicolesterol y 24S-hidroxicolesterol por gramo de tejido adiposo fueron mayores para sujetos con $IMC > 31 \text{ kg/m}^2$ (Tabla 4), siendo significativa en el caso de 24S-hidroxicolesterol ($p=0,047$), a diferencia de lo que ocurría en tejido adiposo subcutáneo (Tabla 3). En tejido adiposo visceral, al ajustar colesterol, 27-hidroxicolesterol y 24S-hidroxicolesterol por TGs, se obtuvieron concentraciones más altas en sujetos con $IMC > 31 \text{ kg/m}^2$ (Tabla 4), al igual que en tejido subcutáneo. En este caso los TGs fueron mucho mayores en sujetos con $IMC \leq 31 \text{ kg/m}^2$ que en sujetos con $IMC > 31 \text{ kg/m}^2$, como ocurrió en tejido subcutáneo.

Tabla 4. Datos analíticos obtenidos en mujeres con $IMC \leq 31 \text{ kg/m}^2$ e $IMC > 31 \text{ kg/m}^2$ por territorio visceral

| | IMC $\leq 31 \text{ kg/m}^2$ (n=9) | | | IMC $> 31 \text{ kg/m}^2$ (n=10) | | | <i>P</i> |
|--|------------------------------------|--------|-------|----------------------------------|--------|-------|----------|
| | Media | p25 | p75 | Media | p25 | p75 | |
| Colesterol en TAV; mg/g TA | 0,93 | 0,86 | 1,07 | 1,11 | 0,91 | 1,35 | 0,121 |
| 27-hidroxicolesterol en TAV; mg/g TA | 0,065 | 0,044 | 0,077 | 0,084 | 0,063 | 0,11 | 0,102 |
| 24S-hidroxicolesterol en TAV; mg/g TA | 0,089 | 0,074 | 0,12 | 0,13 | 0,095 | 0,15 | 0,047 |
| Triglicéridos en TAV; mg/g TA | 13,32 | 0,78 | 21,73 | 5,98 | 0,19 | 12,41 | 0,102 |
| Colesterol en TAV; mg/mg TGs | 0,99 | 0,047 | 1,41 | 3,05 | 0,13 | 6,63 | 0,086 |
| 27-hidroxicolesterol en TAV; µg/mg TGs | 0,098 | 0,0024 | 0,17 | 0,30 | 0,0076 | 0,64 | 0,122 |
| 24S-hidroxicolesterol en TAV; µg/mg TGs | 0,11 | 0,0046 | 0,19 | 0,38 | 0,012 | 0,73 | 0,085 |

Datos expresados como media y percentiles 25 y 75. Abreviaturas: IMC, índice de masa corporal; TGs, triglicéridos; TA, tejido adiposo; TAV, tejido adiposo visceral. *P*-valor calculado mediante el test de U-Mann Whitney.

4.3. Correlaciones entre datos clínicos y parámetros bioquímicos en tejido adiposo

Con el objetivo de estudiar la asociación existente entre las diferentes variables analizadas, utilizamos el coeficiente de correlación de *Spearman*, que nos da la relación entre dos variables aleatorias.

En la Tabla 5, el IMC se relaciona inversamente con los TGs en tejido adiposo, siendo esta correlación significativa ($p < 0,05$). En el caso del IMC y el colesterol en tejido adiposo la tendencia es también inversa, pero en este caso la correlación no es significativa. El colesterol y los TGs en TA se correlacionan positivamente y de manera significativa ($p < 0,05$). En la Tabla 5 podemos observar también una correlación positiva entre el colesterol y los oxiesteroles en tejido ($p < 0,01$). Por el contrario, los TGs en tejido adiposo se correlacionan inversamente con los oxiesteroles, siendo significativa en el caso del 27-hidroxicolesterol ($p < 0,05$). Además, existe una correlación positiva entre 27-hidroxicolesterol y 24S-hidroxicolesterol, lo que significa que ambos cambian en la misma dirección ($p < 0,01$).

Tabla 5. Correlaciones de Spearman entre los datos clínicos y los datos bioquímicos en tejido adiposo

| | | Colesterol total, mg/g TA | Triglicéridos, mg/g TA | 27-hidroxicolesterol, mg/g TA | 24S-hidroxicolesterol, mg/g TA |
|---|----------------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| IMC | Coeficiente de correlación | -0,117 | -0,384* | 0,075 | 0,241 |
| Colesterol total en suero; mg/dL | Coeficiente de correlación | -0,250 | 0,066 | -0,016 | 0,033 |
| Triglicéridos en suero; mg/dL | Coeficiente de correlación | 0,080 | 0,339 | -0,303 | -0,197 |
| Colesterol, mg/g TA, | Coeficiente de correlación | - | 0,353* | 0,438** | 0,428** |
| Triglicéridos, mg/g TA | Coeficiente de correlación | - | - | -0,365* | -0,162 |
| 27-hidroxicolesterol, mg/g TA | Coeficiente de correlación | - | - | - | 0,573** |

* Coeficiente de *Spearman* $p < 0,05$. ** Coeficiente de *Spearman* $p < 0,01$. Abreviaturas: TA, tejido adiposo; IMC, índice de masa corporal.

Cuando estudiamos los valores en los tejidos por separado, observamos que en tejido adiposo subcutáneo (Tabla 6), existe una correlación negativa entre IMC y TGs en TA ($p < 0,05$). Esta tendencia se observa también entre el IMC y el colesterol en TA. En este caso, entre los TGs y el colesterol en TAS tan sólo existe una correlación leve. Al igual que en TA total, el colesterol en TAS se correlaciona positivamente con oxiesteroles, siendo la correlación con 27-hidroxicolesterol significativa ($p < 0,05$). Por el contrario, los TGs en tejido adiposo subcutáneo presentan una tendencia negativa con respecto a los oxiesteroles. En tejido adiposo

subcutáneo, el 27-hidroxicolesterol y el 24S-hidroxicolesterol también se correlacionan positivamente ($p < 0,05$).

Tabla 6. Correlaciones de Spearman entre los datos clínicos y los datos bioquímicos en tejido adiposo subcutáneo

| | | Colesterol total, mg/g TA | Triglicéridos, mg/g TA | 27-hidroxicolesterol, mg/g TA | 24S-hidroxicolesterol, mg/g TA |
|---|-----------------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| IMC | Coefficiente de correlación | -0,385 | -0,540* | -0,100 | 0,284 |
| Colesterol total en suero; mg/dL | Coefficiente de correlación | -0,300 | -0,077 | -0,018 | 0,010 |
| Triglicéridos en suero; mg/dL | Coefficiente de correlación | 0,140 | 0,197 | -0,117 | -0,166 |
| Colesterol, mg/g TA, | Coefficiente de correlación | - | 0,366 | 0,552* | 0,298 |
| Triglicéridos, mg/g TA | Coefficiente de correlación | - | - | -0,346 | -0,224 |
| 27-hidroxicolesterol, mg/g TA | Coefficiente de correlación | - | - | - | 0,567* |

* Coeficiente de Spearman $p < 0,05$ ** Coeficiente de Spearman $p < 0,01$. Abreviaturas: TA, tejido adiposo; IMC, índice de masa corporal.

A diferencia de en tejido adiposo subcutáneo (Tabla 6), el IMC se correlacionó de manera positiva con el colesterol en tejido adiposo visceral (Tabla 7). Sin embargo, la relación entre el IMC y los TGs en TAV siguió siendo positiva. En este territorio, la correlación existente entre colesterol y TGs en tejido también fue positiva, aunque leve. La correlación del colesterol en tejido adiposo visceral con los oxiesteroles fue positiva, pero en tejido adiposo visceral, la relación fue sólo significativa entre el colesterol en tejido y el 24S-hidroxicolesterol ($p < 0,01$). En el TAV, la correlación entre los TGs en tejido y los oxiesteroles también fue negativa. La correlación entre el 27-hidroxicolesterol y el 24S-hidroxicolesterol en TAV como en TAS, fue positiva ($p < 0,01$).

Tabla 7. Correlaciones de Spearman entre los datos clínicos y los datos bioquímicos en tejido adiposo visceral

| | | Colesterol total, mg/g TA, | Triglicéridos, mg/g TA | 27-hidroxicolesterol, mg/g TA | 24S-hidroxicolesterol, mg/g TA |
|---|-----------------------------|----------------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| IMC | Coefficiente de correlación | 0,230 | -0,318 | 0,263 | 0,179 |
| Colesterol total en suero; mg/dL | Coefficiente de correlación | -0,216 | 0,171 | 0,062 | 0,060 |

| | | | | | |
|--------------------------------------|----------------------------|-------|-------|---------|---------|
| Triglicéridos en suero; mg/dL | Coeficiente de correlación | 0,093 | 0,388 | -0,555* | -0,197 |
| Colesterol, mg/g TA | Coeficiente de correlación | - | 0,321 | 0,383 | 0,653** |
| Triglicéridos, mg/g TA | Coeficiente de correlación | - | - | -0,418 | -0,094 |
| 27-hidroxicolesterol, mg/g TA | Coeficiente de correlación | - | - | - | 0,628** |

* Coeficiente de Spearman $p < 0,05$ ** Coeficiente de Spearman $p < 0,01$. Abreviaturas: TA, tejido adiposo; IMC, índice de masa corporal.

5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo hemos optimizado un método para determinar colesterol y oxiesteroles en tejido adiposo mediante la técnica HPLC-MS/MS. Existen numerosos estudios en los que se determina el colesterol en diferentes matrices, tales como el suero, el plasma, y numerosos tipos de tejidos (hepático, mamario, adiposo, etc.) [33,34,37]. Sin embargo, las técnicas que utilizan estos estudios no están extendidas para la determinación de oxiesteroles en tejido adiposo, metabolitos de la oxidación del colesterol que están relacionados con procesos de inflamación. Por esta razón, hemos querido optimizar el mismo método de determinación de oxiesteroles y colesterol para poder estudiar en conjunto ambos metabolitos en tejido adiposo humano. El método estandarizado para la determinación de colesterol es la colorimetría, así pues, determinamos colesterol en las mismas muestras por el método de colorimetría y por el método optimizado de HPLC-MS/MS. La correlación obtenida entre las concentraciones de colesterol en tejido adiposo por ambos métodos fue muy buena (0,872; $p < 0,001$) y la consideramos lo suficientemente aceptable para determinar oxiesteroles en tejido adiposo con la técnica de HPLC-MS/MS.

En el estudio de Laclaustra et al. [36], evaluaron la relación entre el IMC y la concentración de colesterol LDL en suero en dos cohortes poblacionales. Laclaustra et al. observaron que al aumentar el IMC aumentaba también la concentración de colesterol LDL en suero, pero cuando se llegaba a IMC de 27,1 dicha concentración de colesterol LDL disminuía significativamente. En la misma línea, en este estudio se observa de manera significativa una concentración de colesterol total en suero mayor en mujeres con $IMC \leq 31 \text{ kg/m}^2$ que en mujeres con $IMC > 31 \text{ kg/m}^2$. En este trabajo el número de muestras no es muy elevado, pero nos permite ver esta diferencia de manera significativa en las concentraciones de colesterol total.

La síntesis de colesterol en diferentes estadios de la obesidad ha sido extensamente estudiada, sin embargo; la oxidación del colesterol en oxiesteroles no lo ha sido tanto. Por ello, se consideró importante conocer las variaciones de estos metabolitos de oxidación, así como las del colesterol en tejido adiposo de mujeres con diferentes valores de IMC. El tejido adiposo se comporta como almacén y amortiguador del colesterol en los adipocitos. Existen dos tipos de tejido adiposo, el subcutáneo y el visceral, siendo este último un depósito más dañino para el colesterol. En el presente estudio se obtuvieron unas concentraciones mayores

de colesterol y oxisteroles en tejido adiposo en las mujeres con $IMC > 31 \text{ kg/m}^2$ siendo solo significativa esta diferencia para el 24S-hidroxicolesterol. El tamaño de muestra de este estudio no es muy elevado, por lo que consideramos que encontrar significación estadística en nuestros datos es complicado. Igualmente, podemos ver que la hipótesis formulada en este estudio sobre la función tamponante del tejido adiposo podría ser cierta, ya que observamos que en las mujeres obesas se acumula más colesterol en tejido adiposo, y este colesterol podría sufrir una degradación oxidativa a 24S-hidroxicolesterol. Debido a la gran cantidad de triglicéridos que hay en el tejido adiposo, se decidió normalizar las concentraciones de esteroides por cantidad de triglicéridos en dichos tejidos. En este caso, obtuvimos significativamente más triglicéridos en el tejido adiposo de las mujeres con sobrepeso que en el de las mujeres obesas. Por lo tanto, al hacer los ratios las diferencias entre ambos grupos estudiados aumentaron, llegando a ser en todos los casos significativas. Cuando estudiamos estos parámetros diferenciando entre ambos territorios, en el caso del tejido subcutáneo se obtuvieron unas concentraciones mayores de esteroides en mujeres con $IMC \leq 31 \text{ kg/m}^2$, mientras que en tejido visceral estas concentraciones de colesterol, 27-hidroxicolesterol y 24S-hidroxicolesterol fueron mayores en mujeres con $IMC > 31 \text{ kg/m}^2$. Estas diferencias podrían ser debidas a que el tejido adiposo visceral podría comportarse como medio tampón, pero no así el tejido adiposo subcutáneo.

En el caso del tejido subcutáneo, la relación entre el IMC y el colesterol y los TGs fue inversa; al aumentar el IMC, la cantidad de colesterol y TGs en tejido adiposo subcutáneo disminuyó. Esto mismo se encontró en el suero de las mujeres, pero no en el tejido adiposo visceral. En el caso del tejido adiposo visceral, considerado más perjudicial, la relación entre el IMC y el colesterol fue positiva, considerando así que a medida que aumenta el IMC también aumenta el acúmulo de colesterol en este tejido. Estos resultados parecen indicar que, en las mujeres estudiadas, su tejido adiposo subcutáneo se comporta de manera similar al suero, acumulando menos colesterol a medida que aumenta el IMC. Sin embargo, a medida que aumenta el IMC en estas mujeres, el tejido adiposo visceral se comporta de forma inversa, aumentando la concentración de colesterol. En el caso de los esteroides, se encontraron correlaciones positivas entre ellos en el tejido adiposo tanto subcutáneo como visceral. Para el caso del tejido adiposo subcutáneo, el colesterol se correlaciona significativamente con el 27-hidroxicolesterol mientras que en el tejido adiposo visceral la significación la encontramos con el 24S-hidroxicolesterol. Esto podría indicar que el colesterol en tejido adiposo subcutáneo se transforma mayoritariamente en 27-hidroxicolesterol y en tejido adiposo visceral en 24S-hidroxicolesterol.

Finalmente podemos concluir que el tejido adiposo subcutáneo y el visceral parecen comportarse de manera diferente a la hora de acumular colesterol y oxisteroles en función del IMC en las mujeres estudiadas. Los resultados obtenidos tienen una significación estadística muy baja en algunos casos, por lo que habría continuar este trabajo con un mayor tamaño muestral. Futuros estudios de los oxisteroles en suero y en tejido adiposo podrían ofrecer un conocimiento más profundo del metabolismo del colesterol en la obesidad.

6. CONCLUSIONES

- El tejido adiposo subcutáneo y el visceral parecen comportarse de manera diferente a la hora de acumular colesterol y oxisteroles en función del IMC en las mujeres estudiadas.
- El colesterol se correlaciona de manera inversa con el IMC en tejido adiposo subcutáneo, al igual que ocurre en suero, mientras que en tejido adiposo visceral se correlaciona de manera directa.
- Los resultados obtenidos tienen una significación estadística muy baja en algunos casos, por lo que habría que continuar este trabajo con un número mayor de muestras.

- Subcutaneous and visceral adipose tissue seem to have different behaviour when accumulating cholesterol and oxysterols according to BMI in the studied women.
- Cholesterol is negatively correlated with BMI in subcutaneous adipose tissue, as well as in serum. However, in visceral adipose tissue cholesterol is positively correlated with BMI.
- The obtained results have a very low statistical significance in some cases, so it would be necessary to continue this research with a higher sample size.

BIBLIOGRAFÍA

1. González-Muniesa P, Martínez-González M-A, Hu FB, Després J-P, Matsuzawa Y, Loos RJF, et al. Obesity. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Jun 15;3:17034.
2. 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 Oct 20;120(16):1640–5.
3. Williams EP, Mesidor M, Winters K, Dubbert PM, Wyatt SB. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. *Curr Obes Rep*. 2015 Sep 1;4(3):363–70.
4. Després J-P, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006 Dec;444(7121):881.
5. Obesity and overweight [Internet]. [cited 2019 May 23]. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
6. Sellayah D, Cagampang FR, Cox RD. On the Evolutionary Origins of Obesity: A New Hypothesis. *Endocrinology*. 2014 May 1;155(5):1573–88.
7. Bhupathiraju SN, Hu FB. Epidemiology of Obesity and Diabetes and Their Cardiovascular Complications. *Circulation Research*. 2016 May 27;118(11):1723–35.
8. Hammarstedt A, Gogg S, Hedjazifar S, Nerstedt A, Smith U. Impaired Adipogenesis and Dysfunctional Adipose Tissue in Human Hypertrophic Obesity. *Physiol Rev*. 2018 01;98(4):1911–41.
9. Taubes G. The science of obesity: what do we really know about what makes us fat? An essay by Gary Taubes. *BMJ*. 2013 Apr 15;346:f1050.
10. Fuster JJ, Ouchi N, Gokce N, Walsh K. Obesity-Induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 2016 May 27;118(11):1786–807.
11. Laso Guzmán FJ. Introducción a la medicina clínica: fisiopatología y semiología. *Ámsterdam ; Barcelona [etc.]: Elsevier Masson; 2011.*
12. Heymsfield SB, Ebbeling CB, Zheng J, Pietrobelli A, Strauss BJ, Silva AM, et al. Multi-Component Molecular-Level Body Composition Reference Methods: Evolving Concepts and Future Directions. *Obes Rev*. 2015 Apr;16(4):282–94.
13. Seabolt LA, Welch EB, Silver HJ. Imaging methods for analyzing body composition in human obesity and cardiometabolic disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015;1353(1):41–59.

14. Fosbøl MØ, Zerahn B. Contemporary methods of body composition measurement. *Clinical Physiology and Functional Imaging*. 2015;35(2):81–97.
15. Després J-P. Body Fat Distribution and Risk of Cardiovascular Disease: An Update. *Circulation*. 2012 Sep 4;126(10):1301–13.
16. Javed A, Jumean M, Murad MH, Okorodudu D, Kumar S, Somers VK, et al. Diagnostic performance of body mass index to identify obesity as defined by body adiposity in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis [Internet]. *Pediatric Obesity*. 2015 [cited 2019 Jun 24]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijpo.242>
17. WHO | Obesity: preventing and managing the global epidemic [Internet]. [cited 2019 May 27]. Available from: https://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_894/en/
18. The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators. *J Clin Epidemiol*. 1988;41(2):105–14.
19. Flegal K, Carroll M, Kuczmarski R, Johnson C. Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960–1994. *International Journal of Obesity*. 1998 Jan;22(1):39–47.
20. Finucane MM, Stevens GA, Cowan M, 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 Feb 12;377(9765):557–67.
21. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2014 Aug 30;384(9945):766–81.
22. Angel A, Farkas J. Regulation of cholesterol storage in adipose tissue. *J Lipid Res*. 1974 Sep;15(5):491–9.
23. Haczeyni F, Bell-Anderson KS, Farrell GC. Causes and mechanisms of adipocyte enlargement and adipose expansion. *Obes Rev*. 2018 Mar;19(3):406–20.
24. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014 Jan 16;156(1–2):20–44.
25. Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett*. 2006 May 22;580(12):2917–21.
26. Shulman GI. Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. *N Engl J Med*. 2014 Sep 18;371(12):1131–41.
27. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011 Feb;11(2):85–97.

28. de Heredia FP, Gómez-Martínez S, Marcos A. Obesity, inflammation and the immune system. *Proc Nutr Soc.* 2012 May;71(2):332–8.
29. Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem.* 2002 Nov 15;277(46):44507–12.
30. Zweytick D, Athenstaedt K, Daum G. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes.* 2000 Sep 18;1469(2):101–20.
31. Li J, Daly E, Campioli E, Wabitsch M, Papadopoulos V. De Novo Synthesis of Steroids and Oxysterols in Adipocytes. *J Biol Chem.* 2014 Jan 10;289(2):747–64.
32. Wang H, Peng D-Q. New insights into the mechanism of low high-density lipoprotein cholesterol in obesity. *Lipids Health Dis.* 2011 Oct 12;10:176.
33. Baila-Rueda L, Cenarro A, Cofan M, Orera I, Barcelo-Batllori S, Pocovi M, et al. Simultaneous determination of oxysterols, phytosterols and cholesterol precursors by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry in human serum. *Anal Methods.* 2013;5(9):2249–57.
34. Lütjohann D, Björkhem I, Friedrichs S, Kerksiek A, Geilenkeuser W-J, Lövgren-Sandblom A, et al. International descriptive and interventional survey for oxysterol determination by gas- and liquid-chromatographic methods. *Biochimie.* 2018 Oct;153:26–32.
35. Lütjohann D, Björkhem I, Friedrichs S, Kerksiek A, Lövgren-Sandblom A, Geilenkeuser W-J, et al. First international descriptive and interventional survey for cholesterol and non-cholesterol sterol determination by gas- and liquid-chromatography—Urgent need for harmonisation of analytical methods. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019 Jun;190:115–25.
36. Guillemot-Legris O, Mutemberezi V, Cani PD, Muccioli GG. Obesity is associated with changes in oxysterol metabolism and levels in mice liver, hypothalamus, adipose tissue and plasma. *Sci Rep [Internet].* 2016 Jan 22 [cited 2019 Jun 24];6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4726335/>
37. Errico TL, Méndez-Lara KA, Santos D, Cabrerizo N, Baila-Rueda L, Metso J, et al. LXR-dependent regulation of macrophage-specific reverse cholesterol transport is impaired in a model of genetic diabetes. *Translational Research.* 2017 Aug 1;186:19-35.e5.