



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Tamara
Camino Martínez

Tesis doctoral

PAPEL DE LAS VESÍCULAS
EXTRACELULARES
LIBERADAS POR EL TEJIDO
ADIPOSO HUMANO EN LA
OBESIDAD

Santiago de Compostela, 2022

Programa de doctorado en Endocrinología



TESIS DE DOCTORADO

**PAPEL DE LAS VESÍCULAS
EXTRACELULARES LIBERADAS
POR EL TEJIDO ADIPOSO
HUMANO EN LA OBESIDAD**

Tamara Camino Martínez

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2022



D/Dña. **Tamara Camino Martínez**

Título de la tesis: **Papel de las vesículas extracelulares liberadas por el tejido adiposo humano**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
- 4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En Santiago de Compostela, a 1 de julio de 2022.

Asdo. Tamara Camino Martínez



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Papel de las vesículas extracelulares liberadas por el tejido adiposo humano en la obesidad

D^{ra}. María Pardo Pérez

D. Felipe Casanueva Freijo

INFORMA/N:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/D^a. Tamara Camino Martínez, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación del doctorando/a fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, a 1 de julio de 2022.



Asdo. María Pardo Pérez

Asdo. Felipe Casanueva Freijo

“Todos os triunfos nacen cando nos atrevemos a comezar”

Eugene Fitch Ware

AGRADECIMIENTOS

Dende pequena sempre fun moi “curiosa”, gustábame saber o porqué das cousas, indagar nelas e marabillarme cando atopaba as respostas a eses enigmas. E creo que parte diso me levou ata aquí. Ademais, neste mundo científico cada día é distinto, estás nun continuo aprendizaxe, tanto a nivel profesional como persoal. Neste percorrido, son moitas as persoas que contribuíron e fixeron posible este traballo.

En primeiro lugar, quero agradecer aos meus dous directores de tese, Dra. María Pardo e o Dr. Felipe Casanueva Freijo, pola oportunidade de poder formar parte deste proxecto, e pola confianza depositada en min. A Felipe Casanueva Freijo gustaríame agradecerlle a súa accesibilidade e a súa axuda sempre que a necesitei.

A María Pardo, grazas non só por ensinarme o fascinante mundo das vesículas, se non por ser un exemplo e referente a seguir. Cando realicei as prácticas da carreira de Bioloxía no Grupo Obesidómica, souben que ese era o sitio onde quería iniciar a miña carreira científica. E iso foi en gran parte grazas a paixón, o rigor científico, e a proximidade que transmites María. Grazas por guiarme, pola túa dedicación, por valorar sempre o meu traballo e esforzo, por motivarme, por ensinarme a ver sempre o lado positivo, tanto a nivel profesional como persoal. Sinto unha enorme satisfacción e orgullo de pertencer a este equipo tan marabilloso!

Ao Servizo de Endocrinoloxía, ao Servizo de Cirurxía Xeral e Dixestivo e ao Servizo de Cirurxía Plástica; especialmente a Aurelio Martis Sueiro, a Francisco Santos, Javier Baltar e a Iván Couto. Grazas pola predisposición, compromiso e colaboración que nos ofrecestes neste proxecto, e por todo o coñecemento clínico que nos brindades cada día.

Ao servizo de Proteómica, en especial a Susana, Pili e María. Grazas pola vosa aportación neste traballo, por ensinarme un pouquiño do mundo da proteómica e pola vosa calidez.

Ao laboratorio de Tumores Intraoculares no Adulto. Grazas polo voso apoio, e en especial a Antonio, por ser un exemplo a seguir.

Ao laboratorio do Dr. Juan Manuel Pérez (Exosome Lab, CicBiogune). Grazas pola oportunidade, por acollerme tan ben e por todo o coñecemento e a experiencia que adquirín durante esta estancia.

A miña compañeira de labo/amiga, Nerea. Necesitaría máis dun parágrafo para poder explicar os lazos de amizade e compañeirismo destes anos. Grazas por ser a mellor compañeira de labo, e complementarnos tan ben que incluso parecemos un matrimonio ben emparellado. Grazas por facer que os días en cultivo fosen máis amenos, divagando sobre a vida mentres diferenciabamos 60 placas de multiwells. Grazas por todas as series que me recomendaches “princess”; por todas as nosas conversas; por apoiarme e animarme sempre, tanto no profesional como no persoal. Grazas por todo, pero sobre todo pola túa amizade chiqui!

Ao labo 11, mellor dito ao 3.11, por todas as risas e a axuda brindada durante estes anos. Grazas a Marta pola súa amizade, por o seu apoio constante nesta recta final, e por sempre ter algo novidoso e emocionante que contarnos. Grazas a Adri, por ensinarme o mundo das PCRs mentres falabamos do último capítulo de “Xogo de Tronos” ou de “baby Yoda”. A Ana por sempre estar disposta a axudarme, e polas nosas charlas sobre o mundo felino. A Laura por ter sempre un sorriso, e contaxiar esa dozura. A todo o labo por acollerme como unha máis!

A Gus, o meu mentor. Grazas por apoiarme e axudarme nos inicios, por ser un exemplo de constancia, dedicación e entrega neste traballo. A María Núñez, por ensinarme o mundo da experimentación con animais, e demostrarme que os soños si se cumpren. Ao laboratorio 2 e 14, en especial, a Andrea, Jesús, Maribel, Paula, Vero e Raquel. Grazas por estar sempre dispostos a axudar e colaborar. E en definitiva a todas aquelas persoas do IDIS que me acompañaron e axudaron durante esta etapa.

Quero agradecerllo especialmente a meus pais, Pancho e Mariluz. Grazas por todo o amor e o apoio incondicional, por sempre estar aí. Grazas polos valores inculcados, por ensinarme que con esforzo, dedicación e amor un pode alcanzar as súas metas. Grazas por facer que me emocione cada vez que vos miro os ollos, e vexo a vosa admiración e orgullo. Grazas por aconsellarme e guiarme, por ser simplemente os mellores pais! Tamén, a toda a miña familia, Vanesa, Iker, Fran, Nerea, Eva, Jose, Higinio, Sole e Alicia, e os que xa non están hoxe comigo, meus avós; grazas pola vosa confianza, cariño e apoio. E a todos os meus amigos, especialmente a Belén, Sara, Iago, Adri, Andrea, Isa, e Bea. Grazas polas risas, polas tardes de xogos, polas noites de picoteo, e charlas ata a madrugada. Grazas por animarme sempre.

E por último, a Abel, o meu compañeiro de aventuras. Grazas por animarme e impulsarme a alcanzar os meus soños, grazas por confiar en min máis do que eu o fago, grazas por apoiarme incondicionalmente, e por axudarme cada día a ser unha mellor versión de min. Es un pilar fundamental na miña vida. Simplemente grazas por ser como es!

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- ACC: Acetil-CoA carboxilasa
- ACN: Acetonitrilo
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ADSC: Células madre derivadas del tejido adiposo
- AG: Ácidos grasos
- AGO2: Proteína argonauta 2
- Alix: Proteína que interactúa con la proteína de la muerte celular programada 6
- AMPK: Proteína quinasa activada por AMP
- AO: Ácido oleico
- AP: Ácido palmítico
- ARC: núcleo arqueado
- ARF6: Factor de ADP-ribosilación 6
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARRDC1: Arrestin-1
- BMPs: Proteínas morfogenéticas del hueso (del inglés *Bone Morphogenetic Proteins*)
- BSA: Albúmina de suero bovino (del inglés *Bovine Serum Albumin*)
- C/EBP: *CCAAT/enhancer-binding protein beta* (proteína de unión al potenciador CCAAT/beta)
- CC: Circunferencia de la cintura
- CETP: Proteína de transferencia de éster de colesterol
- CRH: Hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa
- CT: Perímetro de la cintura/talla
- DAG: Diacilglicerol
- DAMP: Patrones moleculares asociados a los daños (del inglés *Damage-associated molecular patterns*)
- DDA: Adquisición dependiente de datos (del inglés *Data Dependent Acquisition*)
- DIA: Adquisición independiente de datos (del inglés *Data Independent acquisition*)
- DIO: Modelo de obesidad inducido por dieta (del inglés *Diet-Induced Obesity*)
- DM2: Diabetes mellitus tipo 2
- DXM: Dexametasona
- ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (del inglés *Enzyme-linked immunosorbent assay*)
- ENPA: Estudio Nutricional de la Población Española
- ERK: Proteína quinasa activada por mitógenos

ESCRT: Complejos de clasificación endosómica necesarios para la maquinaria de transporte (del inglés *Endosomal Sorting Complexes Required For Transport*)

FABP4: Proteína de unión a ácidos grasos 4 (*Fatty Acid Binding Protein 4*)

FAS: Sintetasa de ácidos grasos (del inglés *Fatty Acid Synthase*)

FBS: Suero fetal bovino (del inglés *Fetal Bovine Serum*)

FDR: Tasa de falsos descubrimientos (del inglés *False Discovery Rate*)

FGF: Factor de crecimiento del fibroblasto (del inglés *Fibroblast Growth Factor*)

FVS: Fracción vascular estromal

G6PD: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GW4869: Inhibidor neutro y no competitivo de la esfingomielinasa

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HFD: Dieta alta en grasa (del inglés *High Fat Diet*)

HG/HI: Alta glucosa e insulina (del inglés, *High Glucosa and High Insulin*)

HSP: Proteínas de choque térmico (del inglés *Heat Shock Proteins*)

IBMX: 3-isobutil-1metilxantina

IC: Índice Celular (del inglés *Cell Index*)

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1 (del inglés *Intercellular adhesion molecule*)

IFN: Interferón

IL: Interleuquina

IMC: Índice de Masa Corporal

IRS1: Receptor de insulina 1

ISEV: Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (del inglés *International Society for Extracellular Vesicles*)

LAMP: Glicoproteínas de membrana asociadas al lisosoma (del inglés *Lysosome-associated membrane glycoproteins*)

LBPA: Ácido lisobifosfatídico

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LEPR: Receptores de leptina

LFA-1: Antígeno asociado a la función de los linfocitos 1 (del inglés *Lymphocyte function-associated antigen 1*)

LFD: Dieta baja en grasa (del inglés *Low fat diet*)

LPS: Lipopolisacárido

m/IEVs: Vesículas extracelulares medianas/grandes (del inglés *medium/large Extracellular Vesicles*)

MBVs: Cuerpos multivesiculares (del inglés *Multivesicular Bodies*)

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos-1

MEC: Matriz extracelular

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés *Major histocompatibility complex*)

MMe: Macrófago de fenotipo metabólicamente activado
MMP: Metaloproteinasa de la matriz
MP: Membrana plasmática
MS: Espectrometría de masas (del inglés *Mass Spectrometry*)
MSC: Células madre mesenquimales
MVs: Microvesículas
NAFLD: Enfermedad del hígado graso no alcohólico (del inglés *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*)
NK: Célula asesina (del inglés *Natural Killer*)
NPY: Neuropeptido Y
NTA: Análisis de seguimiento de nanopartículas (del inglés *Nanoparticle Tracking Analysis*)
nSMasa 2: Esfingomileinasa neutra 2
OMS: Organización Mundial de la Salud
PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PAMP: Patrones moleculares asociados a los patógenos (del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*)
PAR1: Proteasa 1
PBS: Tampón fosfato salino (del inglés *Phosphate buffered saline*)
PCA: Análisis de componentes principales (del inglés *Principal Component Analysis*)
PD-L1: Ligando de muerte celular programada-1
PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PEG: Polietilglicol
PFA: Paraformaldehído
PHIC: Cóctel de inhibidores de fosfatasa (del inglés *Phosphatase Inhibitor Cocktail*)
PIC: Cóctel de inhibidores de proteasas (del inglés *Protein inhibitor cocktail*)
PKC: Proteína quinasa C
PLD: Fosfolipasa D
PP2A: Proteína fosfatasa 2A
PPAR: Receptores activados por proliferador de peroxisomas
PS: Fosfatidilserina
P/S: Penicilina/Estreptomina
RBP-4: Proteína transportadora de retinol tipo 4
RE: Retículo endoplásmico
RI: Resistencia a la insulina
RNPs: Ribonucleoproteínas
ROS: Especies reactivas de oxígeno (del inglés *Reactive Oxygen Species*)
SDS: Dodecil sulfato de sodio (del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate*)

SEC: Cromatografía de exclusión por tamaño (del inglés *Size Exclusion Chromatography*)

SEEDO: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad

sEVs: Vesículas extracelulares pequeñas (del inglés *small Extracellular Vesicles*)

SNARE: Receptor SNAP (del inglés *SNAP Receptor*)

SNC: Sistema nervioso central

SNS: Sistema nervioso simpático

SOCS: Supresor de la señalización de citoquinas (del inglés *Suppressor of Cytokine Signaling*)

STAM: Molécula adaptadora de transducción de señales (del inglés *Signal transducing adapter molecule*)

SWATH/MS: Adquisición de ventanas secuenciales de todos los espectros de iones de fragmentos teóricos por espectrometría de masas (del inglés *Sequential Window Acquisition of all Theoretical mass spectra/ Mass Spectrometry*)

TA: Tejido adiposo

TAB: Tejido adiposo blanco

TAP: Tejido adiposo pardo

TAS: Tejido adiposo subcutáneo

TAV: Tejido adiposo visceral

TEM: Microscopía electrónica de transmisión (del inglés *Transmission electronic microscopy*)

TfR: Receptor de transferrina

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta (del inglés *Transforming Growth Factor-beta*)

Th: Linfocitos T colaboradores (del inglés *T helper lymphocyte*)

TIMP: Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (del inglés *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*)

TLR2: Receptor tipo Toll 2

TNF: Factor de necrosis tumoral (del inglés *Tumor Necrosis Factor*)

TSG101: Proteína del gen susceptible de tumor 101 (del inglés *Tumor Susceptibility Gene 101 protein*)

UC: Ultracentrifugación

UCP1: Proteína desacopladora mitocondrial de la grasa parda 1

UF: Ultrafiltración

VAMP: Proteína de membrana asociada a vesículas 3

VEGF: Factor de crecimiento endotelio vascular (del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*)

VEs: Vesículas extracelulares

VEs AP, AO o HG/HI: vesículas extracelulares liberadas de adipocitos tratados con ácido palmítico, ácido oleico o alta glucosa e insulina, respectivamente.

VI: Vesículas intraluminales

Vps4: Proteína 4 asociada a la clasificación de proteínas vacuolares (del inglés *Vacuolar rotein sorting-associated protein 4*)

LISTA DE PUBLICACIONES

LISTA DE PUBLICACIONES

1. ARTÍCULOS INDEXADOS EN *PUBMED* REPRODUCIDOS EN LA TESIS

Título: HUMAN OBESE WHITE ADIPOSE TISSUE SHEDS DEPOT-SPECIFIC EXTRACELLULAR VESICLES AND REVEALS CANDIDATE BIOMARKERS FOR MONITORING OBESITY AND ITS COMORBIDITIES.

Revista: Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine (**Anexo I**)

Identificador: PMID: 33465489; DOI: 10.1016/j.trsl.2021.01.006

Fecha publicación: 01/01/2022

Autores: Tamara Camino¹, Nerea Lago-Baameiro¹, Susana Belén Bravo², Alberto Molaes-Vila³, Aurelio Sueiro⁴, Iván Couto⁵, Javier Baltar⁶, Felipe F Casanueva⁷, Maria Pardo⁸

Filiaciones:

1 Grupo Obesidómica, Área de Endocrinología, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), Santiago de Compostela, España.

2 Unidad de Proteómica, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), Santiago de Compostela, España.

3 Plataforma de Bioinformática, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), Santiago de Compostela, España.

4 Grupo Endocrinología Molecular y Celular, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), España.

5 Servicio de Cirugía Plástica y Reparadora, Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), Santiago de Compostela, España.

6 Grupo Obesidómica, Área de Endocrinología, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), Santiago de Compostela, España; Servicio de Cirugía General, Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), Santiago de Compostela, España.

7 Grupo Endocrinología Molecular y Celular, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), España; CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, España.

8 Grupo Obesidómica, Área de Endocrinología, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), Santiago de Compostela, España; CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, España

Contribución de los autores: Diseño de la investigación: Sueiro A, Couto A, Baltar J, Casanueva F y Pardo M; realización de la investigación: Camino T, Lago-Baameiro N, Bravo SB; aportación de nuevos reactivos o herramientas analíticas: Bravo SB; análisis de los datos: Camino T, Molaes-Vila A, Bravo SB, Pardo M; escritura del artículo: Camino T y Pardo M.

Factor de impacto/categoría: 10,171; 1D, 1Q

Título: DECIPHERING ADIPOSE TISSUE EXTRACELLULAR VESICLES PROTEIN CARGO AND ITS ROLE IN OBESITY.

Revista: International Journal of Molecular Sciences (**acceso abierto**).

Identificador: PMID: 33316953; DOI: 10.3390/ijms21249366

Fecha publicación: 09/12/2020

Autores: Tamara Camino¹, Nerea Lago-Baameiro¹, Aurelio Martis-Sueiro^{2,3}, Iván Couto⁴, Francisco Santos⁵, Javier Baltar⁵, María Pardo^{1,3}

Filiaciones:

1 Grupo Obesidómica, Área de Endocrinología, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), 15706 Santiago de Compostela, España.

2 Grupo Endocrinología Molecular y Celular, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), 15706 Santiago de Compostela, España.

3 CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, 15706 Santiago de Compostela, España.

4 Servicio de Cirugía Plástica y Reparadora, Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), 15706 Santiago de Compostela, España.

5 Servicio de Cirugía General, Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), 15706 Santiago de Compostela, España.

Contribución de los autores: Esta revisión fue diseñada y escrita por todos los autores; la conceptualización fue realizada por: Camino T., Lago-Baameiro N., y Pardo M.; supervisión: Couto I., Baltar J., Santos F., Sueiro A. y Pardo M.; redacción del borrador original: Camino T., Lago-Baameiro N., M.P.; redacción-revisión y edición: Couto I., Baltar J., Santos F, Sueiro A., y Pardo M.; administración del proyecto y obtención de fondos: Pardo M.

Factor de impacto/categoría: 5,924; 1Q

Título: VESICLES SHED BY PATHOLOGICAL MURINE ADIPOCYTES SPREAD PATHOLOGY: CHARACTERIZATION AND FUNCTIONAL ROLE OF INSULIN RESISTANT/HYPERTROPHIED ADIPOSOMES.

Revista: International Journal of Molecular Sciences (**acceso abierto**).

Identificador: PMID: 32214011; DOI: 10.3390/ijms21062252

Fecha publicación: 24/03/2020

Autores: Tamara Camino¹, Nerea Lago-Baameiro¹, Susana B Bravo², Aurelio Sueiro^{3,4}, Iván Couto^{1,5}, Fernando Santos^{1,6}, Javier Baltar^{1,6}, Felipe F Casanueva^{3,4}, María Pardo^{1,4}

Filiaciones:

1 Grupo Obesidómica, Área de Endocrinología, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), 15706 Santiago de Compostela, España.

2 Unidad de Proteómica, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), 15706 Santiago de Compostela, España.

3 Grupo Endocrinología Molecular y Celular, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), 15706 Santiago de Compostela, España.

4 CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, 15706 Santiago de Compostela, España.

5 Servicio de Cirugía Plástica y Reparadora, Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), 15706 Santiago de Compostela, España.

6 Servicio de Cirugía General, Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), 15706 Santiago de Compostela, España.

Contribución de los autores: La conceptualización fue realizada por Sueiro A. y Pardo M.; la metodología por, **Camino T.**, Bravo S-B. y Lago Baameiro N.; la validación por **Camino T.**, Lago Baameiro N. y Bravo S-B.; el análisis formal, Sueiro A., **Camino T.** y Lago Baameiro N.; investigación por Couto I., Baltar J., Santos F., Casanueva F. y Pardo M.; redacción-borrador original por **Camino T.** y Pardo M.; redacción-revisión y edición, Couto I., Sueiro A., Baltar J., Santos F., Casanueva F. y Pardo M.; visualización por Pardo M.; supervisión por Pardo M.; administración del proyecto por Pardo M.; obtención de fondos por Pardo M.

Factor de impacto/categoría: 5,924; 1Q

Título: BROWN ADIPOSE TISSUE SHEDS EXTRACELLULAR VESICLES THAT CARRY POTENTIAL BIOMARKERS OF METABOLIC AND THERMOGENESIS ACTIVITY WHICH ARE AFFECTED BY HIGH FAT DIET INTERVENTION.

Revista: International Journal of Molecular Sciences (**acceso abierto**) (EN REVISIÓN)

Identificador: DOI: 10.3390/ijms231810826.

Autores: **Tamara Camino**, Nerea Lago-Baameiro, Aurelio Sueiro, Susana B Bravo, Iván Couto, Fernando Santos, Javier Baltar, Felipe F Casanueva, María Pardo.

Contribución de los autores: Conceptualización, Casanueva F. y Pardo M.; adquisición de datos, **Camino T.**, Lago-Baameiro N., Bravo S-B., Santos F., Baltar J. y Casanueva F.; adquisición de fondos, Pardo M.; investigación, **Camino T.**, Lago-Baameiro N., Sueiro A., Bravo S-B., Couto I., Santos F., Baltar J. y Pardo M.; metodología, **Camino T.** y Lago-Baameiro N.; administración del proyecto, Pardo M.; recursos, Sueiro A.; supervisión, Pardo M.; validación, **Camino T.**, Casanueva F. y Pardo M.; visualización, Sueiro A. y Couto I.; redacción-borrador original, **Camino T.**, y Pardo M.; redacción-revisión y edición, Casanueva F.

Factor de impacto/categoría: 5,924; 1Q

2. PUBLICACIONES EN COLABORACIÓN

Título: PARK7/DJ-1 INHIBITION DECREASES INVASION AND PROLIFERATION OF UVEAL MELANOMA CELLS.

Revista: Tumori

Identificador: DOI: 10.1177/030089162111061766

Fecha publicación: 17/12/2021

Autores: Nerea Lago-Baameiro, Maria Santiago-Varela, **Tamara Camino**, Paula Silva-Rodríguez, Manuel Bande, Maria Jose Blanco-Teijeiro, Maria Pardo, Antonio Piñeiro

Título: ALK-FUSION TRANSCRIPTS CAN BE DETECTED IN EXTRACELLULAR VESICLES (EVS) FROM NONSMALL CELL LUNG CANCER CELL LINES AND PATIENT PLASMA: TOWARD EV-BASED NONINVASIVE TESTING.

Revista: Clinical Chemistry

Identificador: DOI: 10.1093/clinchem/hvac021

Autores: Estela Sánchez-Herrero, Carmen Campos-Silva, Yaiza Cáceres-Martell, Lucía Robado de Lope, Sandra Sanz-Moreno, Roberto Serna-Blasco, Alejandro Rodríguez-Festa, Dunixe Ares Trotta, Paloma Martín-Acosta, Cristina Patiño, María José Coronado, Alexandra Beneitez, Ricardo Jara, Nerea Lago-Baameiro, **Tamara Camino**, Alberto Cruz-Bermúdez, María Pardo, Víctor González-Rumayor, Mar Valés-Gómez, Mariano Provencio, Atocha Romero

Título: INHIBITION OF *STREPTOCOCCUS MUTANS* BIOFILM FORMATION BY EXTRACTS OF *TENACIBACULUM SP. 20J*, A BACTERIUM WITH WIDE-SPECTRUM QUORUM QUENCHING ACTIVITY.

Revista: Journal of Oral Microbiology

Identificador: DOI: 10.1080/20002297.2018.1429788

Fecha publicación: 30/01/2018

Autores: Andrea Muras, Celia Mayer, Manuel Romero, **Tamara Camino**, Maria D Ferrer, Alex Mira, Ana Otero

RESUMEN/RESUMO/ABSTRACT

RESUMEN

La obesidad es una enfermedad metabólica que desencadena diferentes patologías, incluyendo el desarrollo de la diabetes tipo 2 (DM2), enfermedades cardiovasculares, la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) y ciertos tipos de cáncer, entre otras. En este contexto, surge el redescubrimiento de las vesículas extracelulares (VEs) y los exosomas como una nueva vía de comunicación celular a nivel fisiológico y patológico participando en la regulación del metabolismo del organismo, independiente de la vía clásica de secreción de hormonas y metabolitos. En la presente tesis doctoral, se ha optimizado el aislamiento y caracterizado las VEs liberadas por el tejido adiposo en el contexto de la obesidad, además de estudiar su rol funcional tanto en condiciones fisiológicas, como tras las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad. Por lo tanto, concluimos que las VEs liberadas por el tejido adiposo en el contexto de esta enfermedad, se postulan como estructuras de comunicación intercelular muy sofisticadas y dinámicas, que además de tener capacidad funcional induciendo o exacerbando la patología, portan diferentes biomarcadores de la obesidad y sus comorbilidades como la adiposidad visceral, o la resistencia a la insulina dependiendo de la localización anatómica y del estado metabólico de la célula/tejido de origen.

RESUMO

A obesidade é unha enfermidade metabólica que desencadea diferentes patoloxías, incluíndo o desenvolvemento da diabetes tipo 2 (DM2), enfermidades cardiovasculares, a enfermidade do fígado graxo non alcohólico (NAFLD) e certos tipos de cancro, entre outras. Neste contexto, prodúcese o redescubrimiento das vesículas extracelulares (VEs) e os exosomas como unha nova vía de comunicación celular a nivel fisiolóxico e patolóxico participando na regulación do metabolismo do organismo, independente da vía clásica de secreción de hormonas e metabolitos. Na presente tese de doutoramento, optimizouse o illamento e caracterización das VEs liberadas polo tecido adiposo no contexto da obesidade, ademais de estudar o seu papel funcional tanto en condicións fisiolóxicas, como tras as alteracións metabólicas asociadas á obesidade. Polo tanto, concluímos que as VEs liberadas polo tecido adiposo no contexto desta enfermidade, postúlanse como estruturas de comunicación intercelular moi sofisticadas e dinámicas, que ademais de ter capacidade funcional induciendo ou exacerbando a patoloxía, portan diferentes biomarcadores da obesidade e de comorbilidades como a adiposidade visceral, ou a resistencia á insulina dependendo da localización anatómica e do estado metabólico da célula/tecido de orixe.

ABSTRACT

Obesity is a metabolic disease that triggers different pathologies, including the development of type 2 diabetes (DM2), cardiovascular diseases, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and certain types of cancer, among others. In this context, the rediscovery of extracellular vesicles (EVs) and exosomes as a new pathway of cellular communication at physiological and pathological levels, participating in the regulation of the metabolism of the organism, independent of the classical pathway of hormone and metabolite secretion, has emerged. In the present doctoral thesis, we have optimized the isolation and characterized the EVs released by adipose tissue in the context of obesity, in addition to studying their functional role both in physiological conditions and after metabolic alterations associated with obesity. Therefore, we conclude that EVs released by adipose tissue in the context of this disease, are postulated as very sophisticated and dynamic intercellular communication structures, which in addition to having functional capacity inducing or exacerbating the pathology, carry different biomarkers of obesity and its comorbidities such as visceral adiposity, or insulin resistance depending on the anatomical location and metabolic state of the cell/tissue of origin.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE PUBLICACIONES.....	17
RESUMEN/RESUMO/ABSTRACT.....	23
ÍNDICE.....	27
1. INTRODUCCIÓN.....	35
1.1 OBESIDAD, INCIDENCIA MUNDIAL, ESPAÑA, GALICIA: ENFERMEDADES ASOCIADAS, NECESIDAD DE ENCONTRAR UNA SOLUCIÓN.....	37
1.1.1 Incidencia y problemática de la obesidad.....	37
1.1.2 Clasificación de la obesidad y enfermedades asociadas.....	38
1.2 TIPOS DE TEJIDO ADIPOSO, COMPOSICIÓN Y LOCALIZACIÓN ANATÓMICA, DIFERENCIAS Y ASOCIACIÓN A LAS PATOLOGÍAS.....	43
1.2.1 Adipocitos: clasificación del tejido adiposo.....	43
1.2.1.1 Tejido adiposo blanco (TAB).....	43
1.2.1.2 Tejido adiposo marrón o pardo (TAP).....	45
1.2.2 Fracción vascular estromal (FVS).....	49
1.2.2.1 Preadipocitos.....	49
1.2.2.2 Células inmunitarias.....	50
1.2.2.2.1 Células mieloides del TA.....	51
1.2.2.2.2 Células linfoides del TA.....	52
1.2.2.2.3 El papel de las células inmunitarias del TA con la obesidad y la DM2.....	54
1.2.2.3 Células madre del TA.....	55
1.3 TEJIDO ADIPOSO CÓMO ÓRGANO ENDOCRINO PERIFÉRICO, COMUNICACIÓN CON OTROS TEJIDOS Y A NIVEL CENTRAL. SECRECIÓN NO CLÁSICA: VESÍCULAS EXTRACELULARES Y OBESIDAD. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO.....	56
1.3.1 Vesículas extracelulares (VEs), biogénesis y composición.....	59
1.3.1.1 Biogénesis de las VEs.....	61
1.3.1.1.1 Biogénesis de los exosomas.....	61
1.3.1.1.2 Biogénesis de las microvesículas (MVs).....	64
1.3.1.2 Composición de las VEs.....	66
1.3.2 Función biológica de las vesículas extracelulares: comunicación intercelular a través de la interacción con células diana.....	68
1.3.2.1 Tipos de interacción de las VEs con las células diana.....	68
1.3.2.1.1 Contacto directo.....	68

1.3.2.1.2 <i>Fusión con la membrana celular e internalización de la carga exosomal</i>	69
1.3.2.2 Funciones biológicas de las VEs	71
1.3.2.2.1 <i>VEs en la comunicación celular</i>	72
1.3.1.2.2 <i>VEs como biomarcadores de enfermedad</i>	72
1.3.3 Técnicas de aislamiento de VEs	75
1.3.3.1 Ultracentrifugación (UC).....	76
1.3.3.2 Ultrafiltración (UF)	76
1.3.3.3 Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)	77
1.3.3.4 Precipitación.....	77
1.3.3.5 Captura por inmunoespecificidad.....	77
1.3.4 Vesículas extracelulares y obesidad	79
1.3.4.1 VEs aisladas de componentes celulares individuales del tejido adiposo.....	81
1.3.4.1.1 <i>Adipocitos primarios</i>	81
1.3.4.1.2 <i>Células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (ADSCs)</i>	81
1.3.4.2 VEs secretadas por explantes enteros de tejido adiposo.....	82
1.3.4.3 Las VEs circulantes en la obesidad	83
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	87
3. MATERIALES Y MÉTODOS	91
3.1 ADQUISICIÓN DE MUESTRAS	93
3.1.1 Explantes de TA (tejido adiposo) y plasma humano	93
3.1.1.1 Muestras de explantes de TA humano.....	93
3.1.1.2 Muestras de plasma humano	95
3.1.2 Explantes de TA del modelo animal: obesidad inducida por dieta en ratas	96
3.1.2.1 Aspectos éticos	96
3.1.2.2 Diseño experimental.....	97
3.1.2.3 Extracción de explantes de TA.....	97
3.2 CULTIVOS CELULARES	98
3.2.1 C3H10T1/2	98
3.2.1.1 Diferenciación adipocitaria	98
3.2.1.2 Tratamientos de resistencia insulínica o hipertrofia adipocitaria	99
3.2.1.3 Análisis de sensibilidad a insulina.....	100
3.2.1.4 Análisis de la captación de ácidos grasos mediante la tinción <i>Oil Red O</i>	100
3.2.2 Otros cultivos celulares	100
3.2.3 Cultivo primario de hepatocitos murinos	101
3.3 OBTENCIÓN DE SECRETOMAS	101
3.3.1 Secretoma de tejido adiposo	101

3.3.2 Secretoma celular	102
3.4 AISLAMIENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES	103
3.5 CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES	105
3.5.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	105
3.5.2 Nano Tracking Analysis (NTA)	105
3.5.3 Aislamiento y caracterización de VEs mediante ExoView®	106
3.5.3.1 Kits de marcaje de fluorescencia.....	107
3.5.3.2 ExoView por captura de tetraspaninas	107
3.5.3.3 ExoFlex	108
3.6 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	111
3.6.1 Lisis de proteínas.....	111
3.6.2 Cuantificación de proteína	111
3.6.3 Extracción de ARN y cuantificación	111
3.7 ESTUDIOS PROTEÓMICOS	112
3.7.1 Digestión triptica	112
3.7.2 Análisis cualitativo DDA (<i>Data Dependent Acquisition</i>) de espectrometría de masas	113
3.7.2 Análisis cuantitativo (SWATH/MS, adquisición de ventanas secuenciales de todos los espectros teóricos por espectrometría de masa)	114
3.7.2.1 Creación de la biblioteca espectral para el análisis SWATH/MS	114
3.7.2.2 Cuantificación relativa por adquisición de DIA-SWATH/MS	114
3.7.3 Análisis de datos	115
3.7.4 Análisis funcional proteico	116
3.8 ENSAYOS FUNCIONALES CON VES	116
3.8.1 Ensayos funcionales con VEs procedentes de adipocitos patológicos por hipertrofia lipídica y/o resistencia a insulina.....	117
3.8.2 Ensayos funcionales de VEs procedentes de adipocitos patológicos sobre células hepáticas.....	117
3.8.3 Ensayos funcionales de inflamación de macrófagos tras el tratamiento con VEs procedentes de adipocitos patológicos	118
3.8.4 Estudios del papel funcional de las VEs liberadas por los adipocitos patológicos sobre la diferenciación e hipertrofia adipocitaria, y la proliferación de células tumorales.....	118
3.9 ENSAYOS BIOQUÍMICOS	120
3.9.1 Arrays de anticuerpos.....	120
3.9.2 Detección de proteínas por <i>immunoblot</i> (<i>Western Blot</i>)	120
3.9.3 Estudios de proteínas mediante análisis <i>ELISA</i>	122
3.10 ESTUDIOS DE EXPRESIÓN POR PCR A TIEMPO REAL.....	122
3.11 ESTADÍSTICA	123

4. RESULTADOS	125
4.1 CAPÍTULO 1: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS VES SECRETADAS POR ADIPOCITOS EN DIFERENTES SITUACIONES METABÓLICAS	127
4.1.1 Caracterización de las VEs secretadas por adipocitos murinos y su alteración con la desregulación metabólica	127
4.1.1.1 Establecimiento y validación de un modelo <i>in vitro</i> de hipertrofia lipídica y/o resistencia a insulina (RI) con adipocitos murinos.....	127
4.1.1.2 Aislamiento y caracterización de las vesículas liberadas por los modelos establecidos.....	129
4.1.1.3 Caracterización proteómica de las vesículas extracelulares (VEs) liberadas por los adipocitos C3H10T1/2, y su alteración con la hipertrofia lipídica y el desarrollo de resistencia a la insulina (RI).....	132
4.1.1.4. Análisis proteómico comparativo mediante adquisición secuencial cuantitativa de todos los espectros de masas teóricos (DIA-SWATH/MS) de las VEs patológicas aisladas..	134
4.1.2 Caracterización de las VEs de explantes de tejido adiposo completo humano	138
4.1.2.1 Características clínicas de los pacientes.....	138
4.1.2.2 Caracterización del perfil vesicular de las VEs liberadas por el tejido adiposo obeso humano visceral y subcutáneo.....	139
4.1.2.3 Análisis cualitativo (DDA) del proteoma de las vesículas secretadas por el tejido obeso visceral y subcutáneo.....	142
4.1.2.4 Análisis proteómico cuantitativo mediante DIA-SWATH/MS de las vesículas secretadas por el tejido adiposo visceral y subcutáneo.....	145
4.1.3 Caracterización de las VEs de explantes de tejido adiposo completo (blanco y pardo) de ratas control y obesas	148
4.1.3.1 Establecimiento de un modelo de obesidad inducida por dieta (DIO) para el aislamiento de VEs del tejido adiposo.....	148
4.1.3.2 Caracterización del perfil vesicular de las VEs secretadas por el tejido adiposo marrón y blanco en animales con peso normal y obeso.....	149
4.1.3.3 Análisis proteómico de las VEs secretadas por el tejido adiposo marrón (TAP) y blanco (TAB), y su alteración tras la intervención de la dieta alta en grasas (HFD).....	153
4.1.3.4 Análisis proteómico cuantitativo (DIA-SWATH/MS) de las vesículas extracelulares secretadas por el tejido adiposo pardo y blanco, y su variación con el estado metabólico.....	157
4.1.4. Análisis comparativo de todas las proteínas identificadas en las distintas VEs aisladas en el contexto de la obesidad	162
4.1.5. Resumen de la caracterización de las VEs secretadas por adipocitos en diferentes situaciones metabólicas	164
4.2 CAPÍTULO 2: VALIDACIÓN DEL PANEL DE BIOMARCADORES IDENTIFICADOS EN VES AISLADAS DE LOS ADIPOCITOS EN DIFERENTES SITUACIONES METABÓLICAS	165
4.2.1 Validación de las proteínas reguladas en las VEs de cada uno de los modelos analizados mediante DIA-SWATH-MS (adquisición de ventanas secuenciales de todos los espectros teóricos)	165
4.2.1.1 Validación de la proteína TGFBI como biomarcador de resistencia insulínica, y mimecan como biomarcador de hipertrofia lipídica en adipocitos.....	165

4.2.1.2 Validación de biomarcadores de obesidad según la localización anatómica del tejido adiposo blanco (subcutáneo, visceral).....	169
4.2.1.3 Validación de los biomarcadores vesiculares del tejido adiposo pardo y blanco obeso y normopeso	175
4.2.2 Valoración de la proteína TGFBI como biomarcador de resistencia a insulina y mimecan como biomarcador de adiposidad central a nivel circulante	178
4.2.3 Resumen de la validación del panel de biomarcadores identificados en VEs aisladas de los adipocitos en diferentes situaciones metabólicas	181
4.3 CAPÍTULO 3: PAPEL FUNCIONAL DE LAS VES OBESAS EN LA OBESIDAD Y EN SUS COMORBILIDADES.....	183
4.3.1 Estudios funcionales con las VEs secretadas por los adipocitos murinos con hipertrofia lipídica y resistentes a la insulina (RI)	183
4.3.1.1 Estudios funcionales de diferenciación e hipertrofia adipocitaria.....	183
4.3.1.2 Estudios funcionales de resistencia a insulina en adipocitos	185
4.3.1.3 Estudios funcionales de resistencia a insulina en hepatocitos en cultivo.....	187
4.3.1.4 Estudios funcionales de inflamación en macrófagos	191
4.3.2 Estudios funcionales con las VEs secretadas por los explantes de tejido adiposo subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) obeso humano	194
4.3.3 Resumen del papel funcional de las VEs obesas en la obesidad y en sus comorbilidades.....	195
5. DISCUSIÓN.....	197
5.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS VES SECRETADAS POR ADIPOCITOS EN DIFERENTES SITUACIONES METABÓLICAS	201
5.2 CARACTERIZACIÓN DE LA CARGA PROTEICA DE LAS VES SECRETADAS POR EL TEJIDO ADIPOSO/ADIPOCITOS EN DIFERENTES SITUACIONES METABÓLICAS; PANEL DE BIOMARCADORES - VES	203
5.3 BIOMARCADORES VESICULARES CON POTENCIAL USO TRASLACIONAL.....	210
5.4 PAPEL FUNCIONAL DE LAS VES SECRETADAS POR EL TEJIDO ADIPOSO/ADIPOCITOS EN CONDICIONES DE OBESIDAD	210
5.5 LIMITACIONES DE ESTE TRABAJO DE TESIS Y RESUMEN.....	214
6. CONCLUSIONES.....	217
7. BIBLIOGRAFÍA	221
8. ANEXOS	243
ANEXO I: AUTORIZACIÓN DE LA EDITORIAL PARA LA REPRODUCCIÓN EN ESTA TESIS DE LOS RESULTADOS PUBLICADOS	245
ANEXO II: AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA PARA LOS ESTUDIOS EN HUMANOS Y EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	247
ANEXO III: TABLA SUPLEMENTARIA DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR EL ANÁLISIS PROTEÓMICO CUALITATIVO (DDA/MS).....	253
ANEXO IV: FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	297
ANEXO V: DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS Y FINANCIACIÓN	305

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 OBESIDAD, INCIDENCIA MUNDIAL, ESPAÑA, GALICIA: ENFERMEDADES ASOCIADAS, NECESIDAD DE ENCONTRAR UNA SOLUCIÓN

La obesidad es una enfermedad metabólica de origen multifactorial, en la cual se produce un desajuste en la homeostasis energética que provoca que el exceso de energía se almacene en forma de triglicéridos en los adipocitos, los cuales sufren un proceso de hiperplasia e hipertrofia celular. Actualmente, este desajuste energético se debe principalmente a un cambio de hábitos en el que predomina una ingesta calórica basada en comida procesada/rápida, junto con un estilo de vida más sedentario [1].

1.1.1 Incidencia y problemática de la obesidad

La elevada incidencia de la obesidad en los últimos años, especialmente la obesidad abdominal, que se asocia a un mayor riesgo de padecer otro tipo de patologías, está aumentando la morbilidad y la mortalidad en la población de los países en vías de desarrollo, provocando así un gran coste económico en los diferentes sistemas sanitarios del mundo como para la salud individual. En concreto, en España, el coste actual para el Sistema Nacional de Salud producido por los problemas de salud relacionados con la obesidad es ya de 2000 millones de euros [2]. Por este motivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha desarrollado estrategias para reducir esta incidencia. Una de ellas es el Plan de Acción Mundial para la Prevención y el Control de las Enfermedades No Transmisibles (2013-2020), cuyo objetivo es reducir la incidencia de la obesidad entre 2010-2025 [3].

En 2016, la OMS estimó que más de 1900 millones de personas mayores de 18 años tenían sobrepeso, de los cuales 650 millones eran obesos; es decir, el 13 % de la población era obesa [4]. Se estima que para 2030, el 50 % de la población mundial tendrá sobrepeso u obesidad [2,5]. Si la tendencia persiste, en España habrá más de 27 millones de personas con sobrepeso en 2030, lo que supondrá un coste adicional de salud pública de 3000 millones de euros [2]. Los países con las mayores tasas de prevalencia, del 30 %, son Estados Unidos, México y Arabia Saudí. Países como el Reino Unido, Alemania y España tienen tasas de prevalencia inferiores al 30 %, pero aun así, son consideradas muy altas [5,6].

Los estudios epidemiológicos, realizados en individuos de entre 25 y 64 años en España, indican una distribución desigual de la obesidad entre diferentes rangos de edad, sexo, nivel socioeconómico y comunidad autónoma [7,8]. La prevalencia de sobrepeso y obesidad según el Índice de Masa Corporal (IMC) es mayor en los hombres que en las mujeres, y esta prevalencia aumenta significativamente con la edad y con un nivel educativo más bajo tanto en hombres como en mujeres [7]. En el Estudio Nutricional de la Población Española (ENPA), se observó que las comunidades autónomas de Asturias, Galicia, Andalucía y Murcia tenían una mayor prevalencia de obesidad en comparación con otras comunidades como el País Vasco, Cataluña o Baleares [8].

A pesar de los esfuerzos realizados por diferentes sociedades, asociaciones científicas y administraciones públicas en materia de prevención y adaptación a hábitos más saludables, la incidencia de la obesidad sigue aumentando sin descanso. En la actualidad, el tratamiento de esta epidemia es muy limitado y poco exitoso, siendo la cirugía bariátrica junto con la dieta y el ejercicio físico el tratamiento más eficaz hasta el momento [9]. Además, la obesidad es un factor de riesgo para varias enfermedades crónicas (dislipidemia, hipertensión, hígado graso-NAFLD, síndrome de apnea obstructiva del sueño, infertilidad, etc.), entre las que destacan la diabetes tipo 2 (DM2), la enfermedad coronaria y ciertos tipos de cáncer, y se asocia a una menor esperanza de vida [10]. Así pues, el exceso de tejido adiposo tiene consecuencias metabólicas perjudiciales y representa una importante carga médica y socioeconómica en el mundo en la actualidad [6].

1.1.2 Clasificación de la obesidad y enfermedades asociadas

Una de las principales limitaciones para poder analizar la magnitud de esta patología es la discrepancia en la metodología y criterios utilizados para su evaluación. Según los criterios que establezcamos, podemos clasificar la obesidad en diferentes estados. Los criterios más utilizados son el Índice de Masa Corporal (IMC), la distribución del peso corporal, la etapa de la vida en la que aparece, la etiología de esta condición y las patologías asociadas.

- **IMC:**

Este parámetro se basa en la relación de las medidas antropométricas, es decir, este índice se refiere al peso del individuo (en kg) dividido por la altura (en m²). La Organización Mundial de la Salud (OMS) y otras instituciones como la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) recomiendan el uso del IMC. Existe un consenso uniforme para establecer el punto de corte para definir el sobrepeso y la obesidad. Aunque existen pequeñas diferencias en la clasificación de los distintos grupos de sobrepeso y obesidad entre la OMS y la SEEDO, ambas definen la obesidad a partir de un IMC ≥ 30 kg/m²; y el sobrepeso a partir de un IMC ≥ 25 kg/m² [7,10]. En la siguiente tabla (Tabla 1), observamos los diferentes grados de obesidad según la OMS y la SEEDO utilizando como criterio el IMC del paciente. En la población pediátrica y de edad avanzada, el IMC no está tan tabulado como en el caso de los adultos. Por ejemplo, en la edad pediátrica, el IMC debe compararse con el de la población correspondiente para la misma edad y sexo. Esta herramienta tiene limitaciones, ya que no puede distinguir entre la masa (peso) debida al exceso de grasa o a la masa magra. Por lo tanto, en la práctica clínica, solo puede complementarse con otras medidas antropométricas como la circunferencia de la cintura (CC) y el perímetro de la cintura/talla (CT). El CC permite valorar los niveles de grasa visceral que se relaciona con un aumento del riesgo de padecer diferentes patologías asociadas a la obesidad como las enfermedades cardiovasculares y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). La CT se obtiene de dividir la CC (cm) entre la altura (cm), por lo que establece puntos de corte independientes de la edad y del sexo [11]. Se ha observado que cuanto mayor es el IMC relacionado con la CC, mayor es el riesgo de que el paciente desarrolle patologías como la DM2 o tenga un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares [12].

Tabla 1. Clasificación del sobrepeso y obesidad establecida por la OMS (Organización Mundial de la Salud) y la SEEDO (Sociedad Española de Obesidad) según el IMC (Índice de Masa Corporal).

Grado de sobrepeso y obesidad clasificación OMS	Grado de sobrepeso y obesidad clasificación SEEDO	IMC (kg/m ²)
Peso insuficiente		≤ 18,5
Normopeso		18,5-24,9
Sobrepeso	Sobrepeso grado I	25-26,9
	Sobrepeso grado II	27-29,9
Obesidad grado I	Obesidad grado I	30-34,9
Obesidad grado II	Obesidad grado II	35-39,9
Obesidad grado III	Obesidad grado III	40-49,9
	Obesidad grado IV	≥ 50

- Distribución corporal de la grasa:

Según la distribución de la grasa corporal, podemos clasificar la obesidad en central (visceral, androide, en forma de malvavisco o manzana) o periférica (ginoide, en forma de pera). En la obesidad central hay una acumulación de grasa, principalmente en la cavidad abdominal, alrededor de las vísceras abdominales. Este tipo de obesidad se asocia al desarrollo de trastornos metabólicos como la resistencia a la insulina (RI), la dislipidemia, la hipertensión y un estado proinflamatorio crónico. Este tipo de obesidad es más frecuente en los hombres. En la obesidad periférica, el almacenamiento de grasa se produce principalmente en el tejido subcutáneo de la parte inferior del cuerpo (infraumbilical), como las nalgas y los glúteos. Este tipo de obesidad es más frecuente en las mujeres [13,14].

- Obesidad según la etapa da la vida:

Esta enfermedad puede desarrollarse en diferentes etapas de la vida del individuo, por lo que podemos diferenciar entre la obesidad infantil (influencia genética y hábitos de vida), la obesidad juvenil (debida principalmente a los cambios hormonales y al estilo de vida), la obesidad adulta, la obesidad en la población anciana, la obesidad durante el embarazo y la obesidad perimenopáusica [15].

- Según la etiología de la obesidad:

La obesidad es una enfermedad multifactorial en la que existe una compleja relación entre los factores biológicos, psicosociales y de comportamiento, es decir, incluyendo la composición genética, el estatus socioeconómico y la cultura. Los factores biológicos incluyen los genéticos, los epigenéticos, los disruptores endocrinos, la microbiota intestinal y la iatrogenicidad farmacéutica, entre otros. Dependiendo del factor causal principal podemos clasificar la obesidad como obesidad primaria u obesidad secundaria [1].

En la obesidad primaria, que es la mayoritaria, predomina una alteración de los mecanismos fisiológicos que regulan el peso sin un factor predominante. En cambio, en la obesidad secundaria, existe un factor causal identificado como el hormonal, los factores genéticos, la medicación o los cambios en el estilo de vida [10]. Las principales alteraciones hormonales asociadas a la obesidad son el exceso de cortisol (síndrome de Cushing) tanto

endógeno como exógeno, la hiperinsulinemia (debida tanto a la resistencia insulínica de la diabetes tipo 2 como al insulinoma), el síndrome de ovario poliquístico y el déficit de hormonas tiroideas (hipotiroidismo); principalmente [16]. La obesidad génica suele ser poligénica; afecta a varios genes que codifican proteínas implicadas en el control del metabolismo, como es el caso de la mutación para el gen de la leptina y su receptor, y para el gen asociado a la masa grasa y la obesidad (*FTO*) [17,18]. La obesidad por iatrogenia farmacéutica es aquella en la que algunos fármacos, como los antidepresivos tricíclicos, los antipsicóticos, las sulfonilureas y las tiazolidinedionas; presentan un aumento del apetito como efectos secundarios [19]. Los cambios en el estilo de vida, como el sedentarismo, la mala alimentación o los trastornos psicológicos conducen al desarrollo de esta enfermedad [1].

- Según las patologías asociadas:

Se puede distinguir entre obesidad simple y obesidad compleja [1]. La obesidad simple es aquella en la que hay un aumento de peso, pero no se detectan anomalías analíticas o funcionales, y no hay comorbilidad asociada de ningún tipo. Sin embargo, en la obesidad compleja, que es la mayoría de los casos, encontramos diferentes alteraciones, como metabólicas, cardiovasculares [1,10], enfermedad de vesícula biliar, problemas ginecológicos (amenorrea, ovario poliquístico, infertilidad), osteoartritis y pancreatitis, entre otras [20]. Las comorbilidades más frecuentes e importantes son la resistencia a la insulina, enfermedad del hígado graso no alcohólico, enfermedades cardiovasculares y pulmonares (Figura 1).

- La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una de las patologías implicadas en el síndrome metabólico, que incluye intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina (RI), obesidad, hipertrigliceridemia, baja densidad de lipoproteínas, hipertensión y arteriosclerosis. En la RI, las células beta del páncreas pueden seguir produciendo y secretando insulina, pero las células diana son incapaces de captar esta concentración de insulina en la sangre (hiperinsulinemia), lo que estimula al páncreas a secretar más insulina. Esto provoca altas concentraciones de glucosa en la sangre, ya que esta no es captada, produciendo así la diabetes mellitus de tipo 2 [21]. Los mecanismos que provocan la RI no se conocen bien, pero hay evidencias de que la inflamación crónica del tejido adiposo es una causa posible [22]. En concreto, esta inflamación se puede detectar clínicamente mediante el aumento de la proteína C reactiva [23].

- La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD de sus siglas en inglés de *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*) está causada principalmente por el almacenamiento de grasa en el parénquima hepático, que progresa hacia la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo que culmina en la lesión hepática y la muerte de los hepatocitos. Esto puede derivar en esteatohepatitis simple (sin inflamación), esteatohepatitis (depósito de grasa acompañado de inflamación) y fibrosis hepática. Esta patología (NAFLD) es un factor de riesgo para desarrollar DM2 y enfermedad coronaria [10,24].

- Las alteraciones metabólicas causadas por la obesidad, como la dislipidemia, la hipertensión arterial, la DM2 y las alteraciones del estado proinflamatorio y protrombótico, pueden aumentar tanto directa como indirectamente el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Cuanto mayor sea el perímetro de la cintura y el IMC, mayor será el riesgo cardiovascular [10]. La dislipidemia es un trastorno del metabolismo de las lipoproteínas en el que existe una concentración anormal de lípidos en la sangre (principalmente algunos de estos

casos: aumento de los niveles de triglicéridos y colesterol LDL, y disminución de los niveles de HDL). Estas anomalías aumentan el riesgo de que se formen placas de ateroma en las arterias por la acumulación de colesterol, triglicéridos, ácidos grasos y macrófagos muertos, impidiendo que la sangre circule con normalidad, provocando además una reacción inflamatoria [25]. El riesgo de hipertensión arterial en las personas obesas es 5 veces mayor que en las personas sanas, y este está estrechamente relacionado con la obesidad visceral. Los principales mecanismos propuestos para explicar este aumento son la hiperleptinemia, la activación de la angiotensina II, la hiperinsulinemia, la pérdida de sensibilidad de los barorreceptores y la acumulación de grasa en los riñones [12,26]. Además, la diabetes aumenta el desarrollo de la miocardiopatía, conocida como miocardiopatía diabética. Esta se produce por el daño miocárdico, causando anomalías estructurales que conducen a la disfunción diastólica que progresa a la hipertrofia del ventrículo izquierdo, y posteriormente a la disfunción sistólica [27].

- El sobrepeso y la obesidad afectan a la función pulmonar debido a una reducción del volumen pulmonar, que se manifiesta en un patrón de respiración rápida y superficial. Esto ocurre porque este exceso de grasa visceral aumenta la presión intraabdominal provocando un desplazamiento del diafragma, reduciendo así el volumen pulmonar; todo ello conlleva a la aparición de disnea [28]. Estos cambios patológicos causados por la obesidad producen enfermedades respiratorias como el asma, la hipertensión pulmonar y la apnea obstructiva del sueño, entre otras [29]. Además, el exceso de peso corporal, principalmente visceral, aumenta el riesgo de padecer otras enfermedades como las neurológicas que incluye ictus y demencia, musculoesqueléticas como artrosis y lesiones articulares, digestivas como colelitiasis y reflujo gastroesofágico, a nivel dermatológico como edema y psoriasis, a nivel psicosocial como depresión y otras, en el sistema endocrino/metabólico el hiperandrogenismo ovárico o hipogonadismo masculino, trastornos genitourinarios como el síndrome de ovario poliquístico y nefrolitiasis, e incluso el desarrollo de distintos tipos de cáncer como el adenocarcinoma, insulinoma, cáncer colorrectal y el cáncer de mama, entre otros [10].

COMORBILIDADES DE LA OBESIDAD

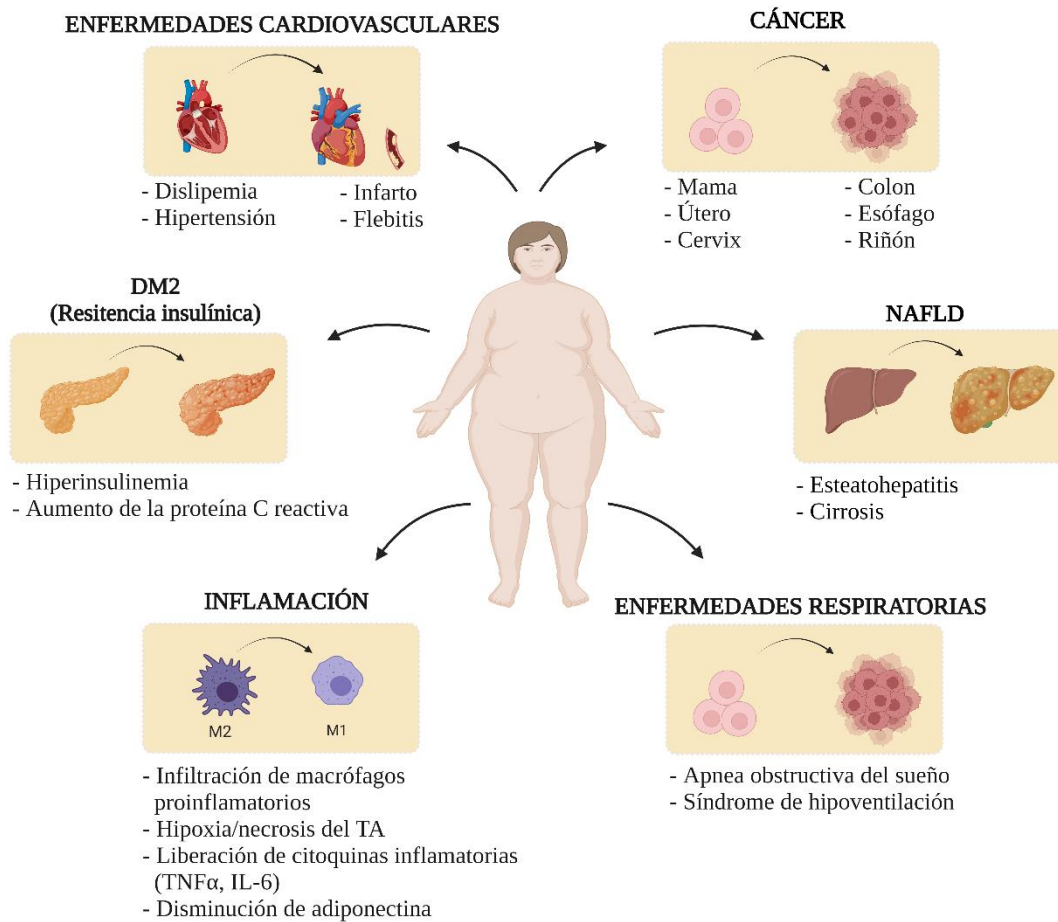


Figura 1. Comorbilidades de la obesidad. Esta imagen detalla las patologías más importantes asociadas a la obesidad como la resistencia a la insulina (RI) y la diabetes tipo 2 (DM2), la inflamación en el propio TA (tejido adiposo) y a nivel sistémico, la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), el cáncer u otras enfermedades como las cardiovasculares o respiratorias (Creado con BioRender.com).

1.2 TIPOS DE TEJIDO ADIPOSO, COMPOSICIÓN Y LOCALIZACIÓN ANATÓMICA, DIFERENCIAS Y ASOCIACIÓN A LAS PATOLOGÍAS

El tejido adiposo (TA) representa entre 20-28 % de masa corporal en individuos sanos, pero este puede variar según el estado energético y el sexo, pudiendo alcanzar en personas con obesidad hasta el 80 % [30]. Este tejido confiere cohesión y soporte a los órganos o sistemas y, regula el balance de energía.

El tejido adiposo no es un mero órgano de almacenamiento de energía, sino que participa en el estado energético a través de la secreción de hormonas, adipoquinas (proteínas secretadas por el tejido adiposo), y factores inflamatorios entre otros, regulando tanto de forma autocrina/paracrina y endocrina [31]. Este órgano endocrino, también, participa en la regulación de procesos fisiológicos como el dimorfismo sexual, la inmunidad, reproducción, angiogénesis, adipogénesis, la restructuración de la matriz extracelular, el metabolismo de esteroides y el control de la temperatura corporal, entre otros [32]. Dicha función está llevada a cabo por los distintos tipos celulares que conforman dicho tejido, principalmente de adipocitos y de la fracción vascular estromal, que incluye preadipocitos, fibroblastos, células endoteliales vasculares, pericitos, células estromales y células inmunitarias [33].

1.2.1 Adipocitos: clasificación del tejido adiposo

Los adipocitos se caracterizan por tener la capacidad de almacenar gotas de grasa o lípidos en su interior. Tanto el aumento del volumen (hipertrofia) como de la densidad celular (hiperplasia) de estas células determinan la masa del tejido adiposo en los adultos. El volumen de los adipocitos refleja el equilibrio entre la lipogénesis y la lipólisis, mientras que el número de adipocitos refleja el equilibrio entre la proliferación, diferenciación y apoptosis de los preadipocitos (los cuales con la estimulación adecuada se convierten en adipocitos) y la apoptosis de los adipocitos [33]. El número de adipocitos se fija durante la infancia y la adolescencia, y se mantienen relativamente constante (se regenera el 10 % de los adipocitos aproximadamente) en los adultos sanos [34]. Dependiendo del tipo de adipocito y de su función podemos clasificar el TA en tres tipos: blanco (TAB), pardo o marrón (TAP) y beige. Estas diferencias anatómicas y fisiológicas de estos adipocitos confieren plasticidad a este tejido, teniendo así, diferentes funciones dependiendo de dicha composición [33,34].

1.2.1.1 Tejido adiposo blanco (TAB)

Este tejido de origen mesodérmico se caracteriza por estar compuesto por los adipocitos más abundantes del cuerpo: adipocitos blancos. Estos son grandes células redondas de un tamaño entre los 20 y 200 μm , y uniloculares, es decir, que almacenan triglicéridos en forma de grandes gotas de lípidos en una vacuola lipídica la cual representa el 90 % del volumen de la célula [34]. Cuando el suministro de energía al organismo es excesivo y/o el gasto energético disminuye, el exceso de energía se deposita eficazmente en el TAB en forma de triacilgliceroles [35]. Por otro lado, cuando la ingesta de energía es inadecuada y/o el gasto energético aumenta, el TAB moviliza los depósitos de lípidos para liberar ácidos grasos y glicerol, que son transportados por la sangre a los tejidos, donde se oxidan para obtener energía [36]. Por lo que, entre las comidas y durante el ayuno, las células descomponen la grasa

almacenada en estas gotas para proporcionar energía; siendo así una fuente de energía cuando no hay alimentos disponibles. Además, este tiene la función de aislar y proporcionar protección mecánica a algunos órganos vitales [33,35,37].

Los adipocitos blancos liberan adipoquinas (péptidos), como la leptina y la adiponectina, y lipoquinas (de naturaleza lipídica) que pueden regular de forma autocrina/paracrina y/o endocrina la homeostasis energética [38–40]. Estas proteínas tienen una amplia versatilidad de funciones como pueden ser las citoquinas proinflamatorias, con el metabolismo y transporte de lípidos, enzimas del metabolismo de los esteroides o con la inmunidad, entre otros. Por este motivo, se considera este tejido un órgano endocrino [31]. El desequilibrio o la alteración en la producción de adipoquinas en condiciones de exceso energético muestra la pérdida de funcionalidad de los adipocitos.

En obesidad, se produce un aumento del tejido adiposo blanco [34,41], ya que, debido a la plasticidad de este tejido, los adipocitos tienen la capacidad de amortiguar el excedente energético debido a que se pueden expandir mediante hiperplasia e/o hipertrofia [42]. En condiciones fisiológicas este tejido se expande principalmente por hiperplasia. En la fase adulta, se pierde la capacidad de maduración de los preadipocitos (pérdida de reguladores de adipogénesis como PPAR- γ), por el que el tejido adiposo crece por hipertrofia [33,43]. Estos adipocitos hipertrofiados pueden liberar una mayor concentración de ácidos grasos y adipoquinas proinflamatorias. Este proceso va acompañado de cambios en la vascularización del tejido provocando un estado fibrótico con la posterior muerte celular [42–44].

La grasa blanca se distribuye por todo el cuerpo (Figura 2), pudiendo ser clasificada desde un punto de vista anatómico en: TA subcutáneo (TAS) y TA visceral (TAV) [13,45]. En los seres humanos sanos, el TAS comprende alrededor del 80 % de la grasa corporal, mientras que el TAV representa el 10-20 % [30,35]. Así, el tejido adiposo subcutáneo (TAS) se encuentra principalmente en las nalgas, los muslos y el abdomen, debajo de la piel, rodeado por la cápsula conectiva e innervado por vasos sanguíneos y nervios periféricos [46–48]. En cambio, el tejido adiposo visceral (TAV) se encuentra principalmente en el interior del abdomen alrededor del ombligo (omental), el intestino (mesentérico) y las áreas perirrenales (retroperitoneal), y también en la zona pericárdica [48]. Se sabe que la grasa visceral está formada por un mayor número de células inmunitarias y adipocitos, los cuales son metabólicamente más activos, ya que capta una mayor cantidad de glucosa y lípidos, y tienen una mayor innervación; además poseen un menor número de preadipocitos que el TAS [35,48,49].

Estos dos tipos de grasa blanca tienen diferencias tanto a nivel genético como metabólico. Se sabe que la expresión de familias de genes como *HOXA5* (Homeobox A5) y *TBX15* (factor de transcripción T-Box 15) predomina en el TA visceral, mientras que *GPC4* (glipican 4) se expresa con mayor intensidad en el TA subcutáneo [48]. En la grasa visceral, *GPC4* y *HOXA5* se correlaciona positivamente con el IMC (Índice de Masa Corporal) y la CC (circunferencia de cintura), mientras que la expresión de *TBX15* muestra una correlación negativa. Sin embargo, en la grasa subcutánea los niveles de expresión de *HOXA5* se correlaciona positivamente con el IMC y la CC; mientras que *GPC4* tiene una correlación negativa con ambos parámetros, siendo estos niveles de expresión extremadamente bajos para valores de IMC superiores a 30. Por lo tanto, se ha sugerido que la expresión de estos genes representa un excelente marcador

de la acumulación de grasa visceral [33]. Otra de las diferencias es en cómo se produce el drenaje venoso; el TAV drena su sangre en la vena porta hepática directamente, en cambio, el TAS a la vena cava. Además, en condiciones de exceso calórico, el TAS se expande por hipertrofia e hiperplasia, mientras que el TAV se expande predominantemente por hipertrofia de adipocitos. La hipertrofia de estos adipocitos del TAV, pero no de los del TAS, junto con la secreción de adipoquinas relacionadas con la inflamación e infiltración de macrófagos y células inmunitarias, está relacionada con la disfunción metabólica como la resistencia a la insulina (RI), hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y enfermedades cardiovasculares [13,23,37,50–54]. Así, se ha postulado que la transición de la obesidad simple, a diferentes comorbilidades, se debe, al principio, al desarrollo de una inflamación de bajo grado local que pasa a ser sistémica, la cual está caracterizada por la acumulación de células inmunitarias y una mayor producción de factores proinflamatorios en el TA obeso, siendo el TAV significativamente más propenso a estos efectos que el TAS [53,55]. Además, el aumento de grasa visceral produce un desajuste en la secreción de diferentes adipoquinas como el aumento de la leptina y la disminución de la adiponectina, lo que está relacionado con la acumulación de placas ateroscleróticas en las arterias [56]. Cabe destacar, también, que durante la obesidad la grasa visceral se acumula de forma ectópica, es decir, se produce un almacenamiento de grasa en tejidos distintos al tejido adiposo, en lugares atópicos, como el hígado, páncreas, músculo esquelético y corazón que conlleva a un mal funcionamiento de estos órganos. Por ejemplo, la acumulación de lípidos a nivel hepático (esteatosis) genera estrés oxidativo, inflamación y RI [57]. En el páncreas, esta acumulación de grasa provoca un mal funcionamiento de las células β provocando también un estado de RI [58]. Por lo tanto, la localización de grasa blanca tiene diferencias genéticas, metabólicas y endocrinas, siendo el TAV un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades metabólicas en la obesidad; mientras que el TAS juega un papel más protector [50].

1.2.1.2 Tejido adiposo marrón o pardo (TAP)

Este tipo de tejido se caracteriza por estar formado por adipocitos marrones, que son más pequeños que los blancos, con forma poligonal, y multiloculares con varias vacuolas lipídicas más pequeñas que las presentes en los adipocitos blancos [34]. Además, este tejido está más vascularizado que el TAB, y sus adipocitos presentan una alta densidad de mitocondrias que disipan el ATP para generar calor y mantener la temperatura corporal como mecanismo de defensa durante la exposición al frío, lo que se conoce como termogénesis sin escalofríos la cual está controlada tanto a nivel central como periférico por el sistema nervioso simpático (SNS) [36,45]. La inducción de la termogénesis comienza con llegada de la señal sináptica, que consiste en la liberación de noradrenalina la cual se une a los receptores adrenérgicos β_3 posinápticos en los adipocitos, activando la transcripción y expresión de UCP1 (proteína desacoplante de la cadena respiratoria mitocondrial) [59]. Así, los adipocitos marrones se caracterizan por presentar la proteína UCP1 en la membrana interna de sus mitocondrias, la cual es una enzima clave en la producción de calor mediante el desacoplamiento de la cadena respiratoria de la ATP sintetasa, usando como sustrato la oxidación de ácidos grasos, lo que permite el paso de protones de vuelta hacia la matriz

mitocondrial disipando de esta manera el gradiente energético, impidiendo la síntesis de ATP y liberando el exceso de energía en forma de calor [35,60].

A diferencia del tejido adiposo blanco, el pardo solo se encuentra en los mamíferos en zonas superficiales (regiones interescapulares, cervicales, axilares) y profundas (regiones perirrenales, inguinales) (Figura 2) [35]. Al principio se pensaba que el TAP se encontraba en los animales que invernaban, y en los bebés humanos; sin embargo, en estudios relativamente recientes de tomografía por emisión de positrones (PET) en pacientes con cáncer, se evidenció la existencia del TAP en humanos adultos [61]. Así, en los humanos, las regiones de tejido pardo más importantes son las interescapulares, axilares y perirrenal. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las características de este tejido cambian en función de diferentes factores como la edad, el sexo, los factores ambientales y la alimentación, entre otros [33,35].

Diferentes estudios sugieren que la de grasa parda no tiene el mismo origen que la grasa blanca [34]. Se ha visto que el TAP y el TAB se desarrollan durante la embriogénesis a partir de la expresión de diferentes percursoros, es decir, se ha observado que los preadipocitos del TAP tienen una firma de transcripción miogénica ya que expresan factores de transcripción para la diferenciación muscular como *MYF5* (factor miogénico 5) y *PAX7* (del inglés *Paired Box 7*) a diferencia del TAB [62,63]. Cabe destacar que se ha observado que algunos depósitos de grasa blanca, en concreto los de origen subcutáneo, pueden expresar estos factores de transcripción miogénicos a diferencia del tejido adiposo visceral [63]. Además, recientemente, de forma similar a los adipocitos blancos, se ha demostrado que los adipocitos marrones secretan una variedad de adipoquinas, denominadas batoquinas como son la neuregulina 4 (NRG-4, del inglés *neuregulin-4*), factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF-21, del inglés *fibroblast growth factor 21*), factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A, del inglés *vascular endothelial growth factor A*), quimiocina 14 con motivo C-X-C (del inglés *C-X-C motif chemokine 14*), la proteína morfogenética ósea 8B (BMP-8B, del inglés *bone morphogenetic protein 8B*) y la proteína homóloga Slit 2 (Slit-2, del inglés *Slit homolog 2 protein*), entre otras [64–66].

Además, en los últimos años, se ha estudiado el papel de tejido adiposo pardo como una diana terapéutica para el tratamiento de la obesidad y la diabetes a través de un enfoque farmacológico para estimular el crecimiento, la diferenciación y/o la activación del TAP [67]. Por ejemplo, se ha demostrado que el dinitrofenol, un desacoplador no selectivo de la oxidación mitocondrial, aumenta el gasto energético a través de la activación de la termogénesis lo que conlleva a perder peso y a reducir las comorbilidades de la obesidad; sin embargo, este compuesto tiene enormes efectos secundarios que impiden su uso como terapia [68]. Por lo tanto, es necesario un mayor conocimiento sobre el papel de este tejido en la obesidad y en la lucha contra la obesidad [69].

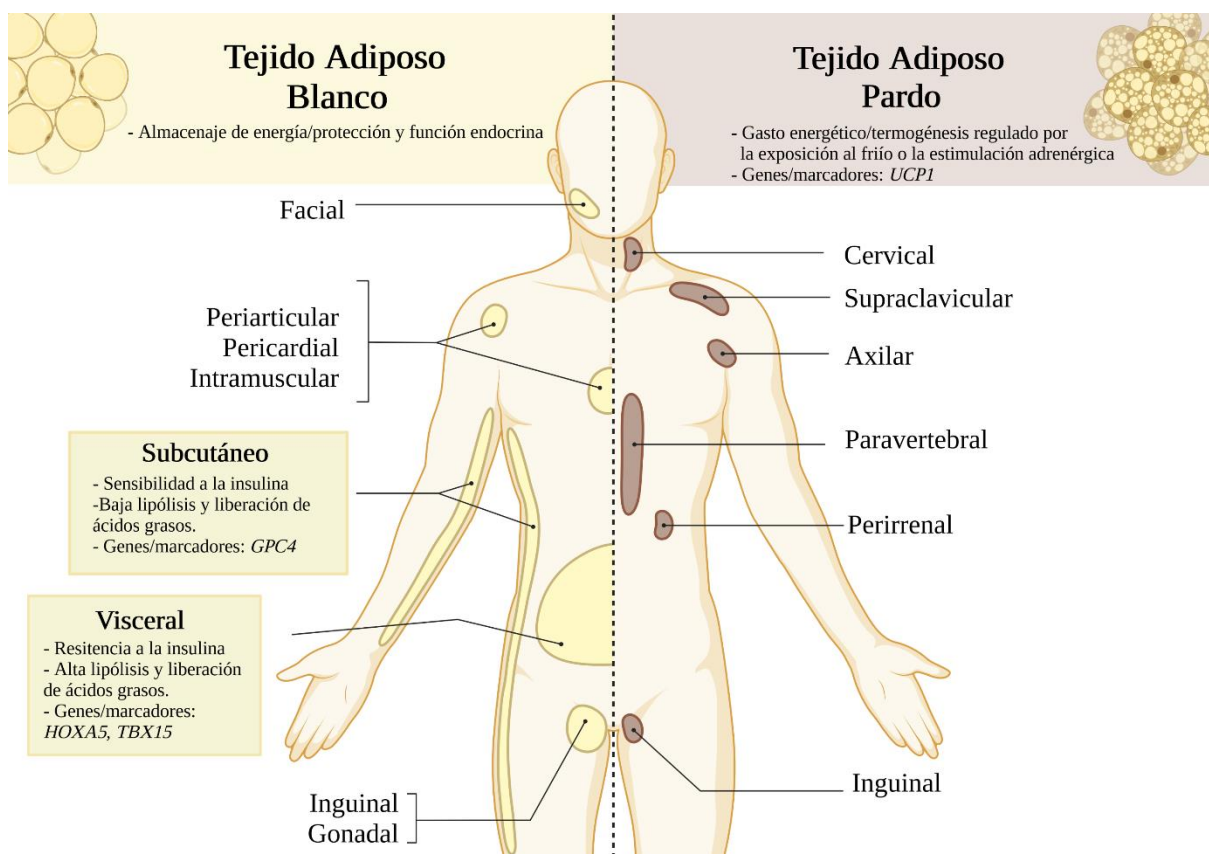


Figura 2. Localización anatómica del tejido adiposo blanco (subcutáneo y visceral) y pardo. La grasa blanca (TAB) se puede localizar principalmente en dos depósitos: subcutáneo (TAS) y visceral (TAV). También podemos hallarla en las regiones inguinales, gonadales, cardíacas y faciales. El tejido adiposo pardo (TAP) se encuentra principalmente en la región supraclavicular y cervical, además de regiones axilares, paravertebral, perirrenal e inguinal (Creado con BioRender.com).

1.2.1.3 Tejido adiposo beige

Este tejido se caracteriza por tener adipocitos beige con características propias de los blancos y de los pardos, siendo positivos para UCP1 [35,70,71]. Estos adipocitos suelen estar intercalados en las regiones subcutáneas del tejido adiposo blanco, y tras la estimulación adecuada van adquiriendo características de los adipocitos pardos (Figura 3) [34,72]. Los adipocitos beige parecen desarrollarse a partir de distintos precursores embrionarios, pero de un linaje negativo a *MYF5*; aunque su origen exacto aún está en debate [71]. Algunas teorías proponen que derivan de precursores de adipocitos blancos que se convierten en beige en repuestas a estímulos y/o que los adipocitos blancos maduros pueden transdiferenciarse (pardeamiento) al tener contacto con los estímulos adecuados para convertirse en beige. Por lo tanto, existe una marcada plasticidad entre el TAB y el TAP que sugiere la posibilidad de que entre la diversidad celular del TAB haya también preadipocitos destinados a diferenciarse en adipocitos pardos [73].

En las personas mayores y obesas, el órgano adiposo se blanquea, y el volumen del TAB aumenta mientras que el TAP se reduce [15]. Recientemente, se observó que en respuesta a determinados estímulos, como la exposición al frío o los agonistas β 3-adrenérgicos, la grasa se vuelve más parda y los fenotipos de tipo TAP prevalecen sobre fenotipos de TAB [60,73].

Además de la exposición crónica al frío y la activación β 3-adrenérgica, estos estímulos incluyen condiciones como la activación del receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ (PPAR γ) y el ejercicio, entre otros [74]. Cabe destacar, que el ejercicio a través de la secreción de un péptido liberado por el músculo esquelético (irisina), se ha visto capaz de transformar a los adipocitos blancos en beige mediante la expresión de UCP1 [75]. Otra proteína importante en la diferenciación de los adipocitos marrones es FGF21 (factor de crecimiento de fibroblastos 21), el cual potencia la expresión de UCP1 y, además, tras la exposición al frío o al ejercicio, induce la regulación al alza del coactivador local del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1- α), lo que promueve la termogénesis en el tejido adiposo y en el músculo esquelético [76,77]. En general, todos estos factores asociados al pardeamiento del TAB, estimulan un aumento de mitocondrias positivas para UCP1, pero una disminución de la cantidad de lípidos en los adipocitos. Al igual que el TAP, este tipo de adipocitos tiene efectos metabólicos positivos en la obesidad (disminuyendo la acumulación lipídica) y en las diferentes comorbilidades asociadas a dicha patología [60,64,70]. Por ello, hay investigaciones que se han centrado en el estudio de agonistas β 3 específicos en ratones o recombinantes FGF21 para estimular el pardeamiento del TA, y así desarrollar nuevas vías terapéuticas para el tratamiento de la obesidad [68].

Pardeamiento de los adipocitos

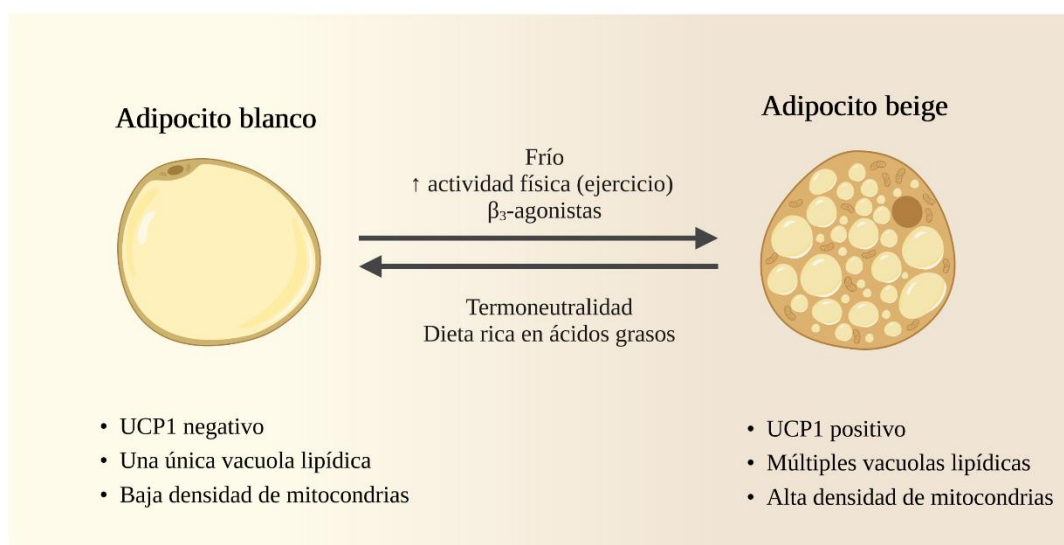


Figura 3. Pardeamiento de la grasa blanca. Los adipocitos blancos pueden transdiferenciarse (pardeamiento) en adipocitos en repuestas a estímulos como la exposición al frío, el aumento del ejercicio o los agonistas β 3-adrenérgicos. Este proceso se puede revertir. Los adipocitos beige contienen múltiples vacuolas lipídicas, alta densidad de mitocondrias las cuales contiene la proteína UCP1 (proteína desacoplante mitocondrial de la grasa parda 1) a diferencia de la grasa blanca (Creado con BioRender.com)

1.2.2 Fracción vascular estromal (FVS)

Además de los adipocitos, los depósitos adiposos contienen otros múltiples tipos de células y estructuras, incluidas las células endoteliales asociadas a la vascularización del tejido, las terminaciones nerviosas, las células precursoras no diferenciadas, preadipocitos y las células inmunitarias infiltrantes [33]. En las últimas décadas, numerosos estudios han puesto de manifiesto que las células inmunitarias infiltrantes y su participación en los procesos inflamatorios son importantes para la fisiopatología del TA obeso y en las alteraciones metabólicas sistémicas de la obesidad (por ejemplo, la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico) [52,78,79].

1.2.1.2 Preadipocitos

Los preadipocitos son pequeñas células con una morfología similar a los fibroblastos, los cuales, tras una estimulación adecuada, se convierten en adipocitos maduros. El estudio de Spalding y colaboradores reveló que aproximadamente el 10 % de los adipocitos de todo el cuerpo se regeneran cada año; y que el número de adipocitos se fija durante la infancia y la adolescencia y se mantiene relativamente constante en los adultos [80,81].

El proceso de diferenciación de preadipocitos a adipocitos se ha investigado ampliamente en varios modelos celulares de preadipocitos blancos, como 3T3-L1, y en líneas inmortales de preadipocitos marrones [23,82]. En primer lugar, se produce una detención de la proliferación inducida por la inhibición del contacto, lo que indica que se ha alcanzado la confluencia, tras lo cual el preadipocito se compromete a diferenciarse en un adipocito. A continuación, se produce una expansión clonal inducida por señales hormonales y se producen unas pocas divisiones mitóticas para sincronizar el ciclo celular. Después, se ha descrito una etapa de diferenciación temprana en la que se detiene la división celular, y comienzan a expresarse los genes característicos de los adipocitos; iniciando así la acumulación de lípidos. Finalmente, se alcanza la fase de diferenciación terminal, donde los adipocitos adquieren su morfología típica y se induce la transcripción de los genes propios de los adipocitos maduros (Figura 4) [33,34,82]. La coordinación de estas etapas está bajo el control de una compleja cascada transcripcional de factores reguladores en la que el receptor nuclear PPAR y varios miembros de la familia de factores de transcripción C/EBP (*CCAAT/enhancer-binding protein beta*) desempeñan un papel esencial [33]. Se ha demostrado que PPAR (receptor activado por el proliferador de peroxisomas) es necesario para la diferenciación de los adipocitos y también para el mantenimiento de la diferenciación. Cuando se silencia el PPAR γ en adipocitos 3T3-L1 ya diferenciados, se induce la desdiferenciación con pérdida de lípidos y la disminución de la expresión de los marcadores de adipocitos maduros [33,44,82]. Se ha observado que durante la diferenciación es necesario la expresión temprana de C/EBP para promover la expresión de C/EBP δ y PPAR γ [33,43,44,82].

La comprensión del proceso de diferenciación de preadipocitos a adipocitos es, por tanto, una condición previa esencial para responder a problemas como la obesidad. Además, se ha observado que los preadipocitos del TAB según su localización anatómica, tienen características específicas. Por ejemplo, los preadipocitos del TAS humano tienen una mayor capacidad de proliferación y diferenciación y una menor susceptibilidad a la apoptosis que los

preadipocitos del TAV; lo que permite diferenciar entre poblaciones de preadipocitos de proliferación rápida y lenta. El TAV está formado por un 90 % de preadipocitos de proliferación lenta, a diferencia que el TAS que contiene un 50 % [33]. Además, se sabe que los preadipocitos de la misma región pueden tener características distintas y, por ejemplo, diferenciarse en adipocitos diferentes como blancos o beige [72]. La presencia de dos subpoblaciones de preadipocitos con características diferentes podría ser un mecanismo potencial para explicar la plasticidad en el desarrollo del tejido adiposo. La abundancia de cada subpoblación podría regularse en respuesta a estímulos específicos, como las citoquinas proinflamatorias [33,83].

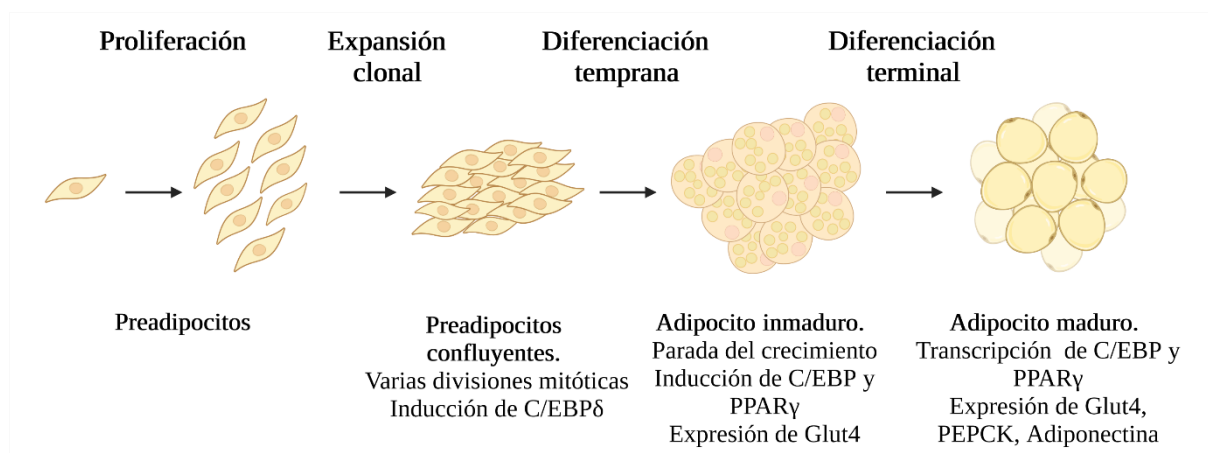


Figura 4. Diferenciación adipocitaria. Cuando los preadipocitos alcanzan la confluencia celular y entran en contacto con otros preadipocitos vecinos (expansión clonal), se detiene la proliferación celular, y empieza la diferenciación temprana de estos preadipocitos a adipocitos inmaduros. En esta fase, se produce la inducción de factores de transcripción como *C/EBP* (*CCAAT/enhancer-binding protein beta*) y *PPAR γ* (receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas). Finalmente, el adipocito se transforma a un estado maduro debido a la transcripción de *C/EBP* y *PPAR γ* , y la expresión de *Glut4*, *PEPCK* (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa) y *ADIPOQ* (adiponectina) (Creado con BioRender.com).

Por otro lado, las células madre mesenquimales (MSC) aisladas de la médula ósea se han utilizado ampliamente para estudiar la diferenciación de tejidos de origen mesodérmico, como el tejido adiposo. Estas son capaces de diferenciarse en adipocitos, osteoblastos, condrocitos, mioblastos y tejido conectivo dependiendo del entorno en el que se encuentren [42]. Las etapas intermedias entre una célula madre mesenquimal y el adipocito maduro no son bien conocidas, y la teoría que inicialmente se consideraba más factible era que las MSC dan lugar a un precursor común (adipoblasto) que posteriormente es capaz de diferenciarse en un adipocito blanco o marrón dependiendo de los estímulos específicos que reciba. Sin embargo, esta teoría no está del todo clara, ya que la falta de marcadores específicos hace que sea difícil establecer si existe un único precursor o si hay diferentes precursores para los adipoblastos y/o los preadipocitos blancos y marrones, o si este precursor es diferente incluso para los preadipocitos de diferentes lugares del TAB [33,84].

1.2.1.3 Células inmunitarias

Las células inmunitarias del TA desempeñan varias funciones. Desde el punto de vista fisiológico, contribuyen a la homeostasis de los tejidos al participar en la reparación de estos y en la apoptosis de las células dañadas o infectadas, ya que reaccionan a los patrones moleculares asociados a los daños (DAMP), como las proteínas nucleares o citosólicas, y a los patrones

moleculares asociados a los patógenos (PAMP), como el lipopolisacárido bacteriano o los peptidoglicanos [85]. Este proceso va acompañado de cambios metabólicos celulares y de la producción de diferentes citoquinas y otros factores proinflamatorios como radicales libres, óxido nítrico entre otros [86]. En el TA se pueden encontrar subconjuntos de células inmunitarias de las dos líneas principales (mieloides y linfoides), aunque con frecuencia e importancia diferente para el desarrollo de la inflamación en el TA, siendo los más importantes los macrófagos y los linfocitos T [52,78,79].

1.2.2.2.1 Células mieloides del TA

Las células mieloides están formadas por células de la línea monocito-macrófago, granulocitos, que se dividen a su vez en eosinófilos, basófilos y neutrófilos, y algunos subconjuntos de células dendríticas, que son cruciales para la inmunidad innata. Los macrófagos, tanto en número como en función, son las células inmunitarias más frecuentes en el TA que se encuentran en el estroma de la fracción vascular; y tienen una función fagocítica con la que defienden al organismo contra patógenos extraños y sus sustancias, como células tumorales o dañadas entre otros [78]. Pueden estar en forma residente en los tejidos (por ejemplo, las células de Kupffer en el hígado) o pueden ser reclutados y desarrollados a partir de monocitos sanguíneos en respuesta a la producción de citoquinas como la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) [87]. En el TA, otra fuente de macrófagos podrían ser los preadipocitos, ya que algunos estudios *in vitro* sugieren que estos expresan antígenos típicos tanto de los monocitos como de los macrófagos y ejercen una actividad antimicrobiana y fagocítica [88].

Los macrófagos pueden adquirir una amplia gama de estados efectores, pero se han definido dos polarizaciones *in vitro*: M1 (o activación clásica) y M2 (o activación alternativa) [89]. Los macrófagos M1 adquieren este fenotipo en respuesta a estímulos proinflamatorios, como el lipopolisacárido bacteriano (LPS), y a citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alpha (TNF α) y el interferón-c (IFN γ). Estas células participan en las respuestas inmunitarias realizando actividades fagocíticas y bactericidas, y secretan citoquinas proinflamatorias (como TNF α , IL12 e IL23) que, a su vez, pueden reclutar y activar otros tipos de células inmunitarias del componente innato (por ejemplo, neutrófilos, células dendríticas) y adaptativo (células T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$), con el fin de eliminar conjuntamente el origen de la infección [90]. En cambio, los macrófagos M2 representan el estado antiinflamatorio caracterizado por la producción de las interleuquinas (IL) IL4, IL13 e IL10 [89]. Los macrófagos M2 (antiinflamatorios) están presentes predominantemente en los sujetos delgados, donde ayudan a mantener la homeostasis del TA y la sensibilidad fisiológica a la insulina [78,91]. El aumento a largo plazo del peso corporal se asocia con una transición al fenotipo M1 proinflamatorio junto con un mayor reclutamiento de monocitos en el TA (Figura 5). Además de producir un mayor estado proinflamatorio del TA, estos también, representan una importante fuente de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico, que pueden contribuir al desarrollo de la fibrosis del TA a través de la disfunción mitocondrial de los preadipocitos y la activación de la metaloproteinasas de la matriz [90]. Además, la abundancia de macrófagos en el TA está relacionada con su tamaño, y existe una correlación directa entre el tamaño del TA y el número

de macrófagos que se han infiltrado en este tejido, de modo que los individuos obesos tienen un mayor número de macrófagos en su TA que los sujetos con peso normal [53,69].

Sin embargo, en la actualidad, parece que los macrófagos *in vivo* en TA muestran un fenotipo bastante mixto y una heterogeneidad funcional denominada fenotipo metabólicamente activado (MMe) [89]. Según los resultados de experimentos en murinos, los macrófagos MMe bajo el control del receptor tipo Toll 2 (TLR2), sobreexpresan las citoquinas proinflamatorias TNF α , IL1 β e IL6 promoviendo la resistencia a la insulina de forma similar a los macrófagos M1; mientras que también son capaces de exocitar sus lisosomas y eliminar los adipocitos muertos, limitando así la resistencia a la insulina de forma similar a los macrófagos M2 [92]. También, la activación metabólica de los macrófagos se asocia con los mismos marcadores de superficie que la activación clásica de los macrófagos M1, como CD36 [79].

Además de los macrófagos, como ya se ha mencionado, en el TA se pueden encontrar monocitos y granulocitos [85]. Los monocitos son grandes leucocitos mononucleares que participan en la inflamación y la eliminación de patógenos; y según la expresión de superficie de CD14 y CD16, los monocitos se dividen en tres subconjuntos: clásicos (85 % de los monocitos), no clásicos (10 % de los monocitos) y monocitos intermedios. Los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) desempeñan un papel esencial durante la inflamación inducida por microbios y la inflamación estéril [85]. Mientras que los eosinófilos y los basófilos participan en las reacciones antiinflamatorias en el TA sano, los neutrófilos actúan más bien en el TA obeso, donde, por el contrario, apoyan los procesos proinflamatorios (Figura5). En sujetos delgados, las acciones de los neutrófilos son suprimidas y reguladas negativamente por la adipoquina adiponectina [43,85].

La inflamación crónica en la obesidad, junto con el aumento de la infiltración de macrófagos en el TAB, sugiere una estrecha relación entre el sistema inmunitario y la obesidad [22]. Hay que tener en cuenta que los neutrófilos son los primeros glóbulos blancos seleccionados en la respuesta inflamatoria y que, a medida que esta respuesta avanza y se repara el daño, se produce un cambio gradual en el tipo de células presentes en el tejido inflamado que conduce a un aumento de la proporción de macrófagos que resuelven el daño y la inflamación [53]. Sin embargo, cuando el estímulo inflamatorio persiste, se alcanza un estado inflamatorio crónico que desequilibra la relación entre células proinflamatorias y antiinflamatorias. En resumen, el fenotipo de los macrófagos del TAB en condiciones normales corresponde al perfil M2, mientras que el TAB obeso secreta adipoquinas que produce la infiltración de macrófagos M1 [93]. Así pues, la presencia de macrófagos M1 desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la inflamación y en la aparición de la resistencia a la insulina debido a la alteración de la vía de señalización de esta [52,55].

1.2.2.2.2 Células linfoides del TA

Las células de la línea linfóide representan una población celular heterogénea que participa en la inmunidad innata y adquirida. Se desarrollan en la médula ósea, el timo y el bazo [94]. Los linfocitos sanguíneos son probablemente la única fuente de linfocitos del TA, que se reclutan en respuesta a la producción de citoquinas de los adipocitos estresados y de las células inmunitarias ya presentes. En el TA, los linfocitos sanguíneos sufren una mayor maduración en respuesta a las necesidades de los tejidos y al entorno actual de citoquinas. Así, en el TA se

puede encontrar todo el espectro de subtipos de linfocitos, incluyendo células T *helper* (Th) y citotóxicas, células B o *natural killer* (NK) [50].

El grupo de linfocitos Th está formado por varias subpoblaciones específicas de células T, entre las que se encuentran los linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg, que se desarrollan recíprocamente bajo una producción particular de citoquinas tisulares y todas ellas pueden encontrarse en el TA [94]. Según un concepto simplificado, los linfocitos Th1 y Th17 representan los fenotipos proinflamatorios que prevalecen en los TA de obesos, mientras que los linfocitos Th2 y Treg se consideran antiinflamatorios y participan en la homeostasis del TA en sujetos delgados (Figura 5) [95].

La inflamación crónica, como ya se ha mencionado, es un proceso complejo que implica, además de la acumulación de macrófagos, un deterioro de la función de los linfocitos T [94]. Además, se ha mostrado una correlación entre la concentración de linfocitos T y la CC (circunferencia de la cintura), ya que se ha observado un aumento de la expresión de marcadores de linfocitos T (CD3) en el TAV humano de pacientes obesos en comparación con el tejido de individuos delgados [56]. En cualquier caso, parece estar claro que existe una relación significativa entre el tipo de linfocito y el tipo de macrófago presente en la grasa corporal. Es decir, existe un cruce entre linfocitos y macrófagos que determina el perfil antiinflamatorio o proinflamatorio de estos tipos celulares. Los M1 regulan principalmente la respuesta de las células Th1 y Th17, mientras que los macrófagos M2 regulan los linfocitos Th2 [89]. Aparte de la comunicación a través de la producción de citoquinas, los macrófagos y los linfocitos T son capaces de comunicarse a través del contacto celular directo mediante los antígenos CD40 y CD154 [89].

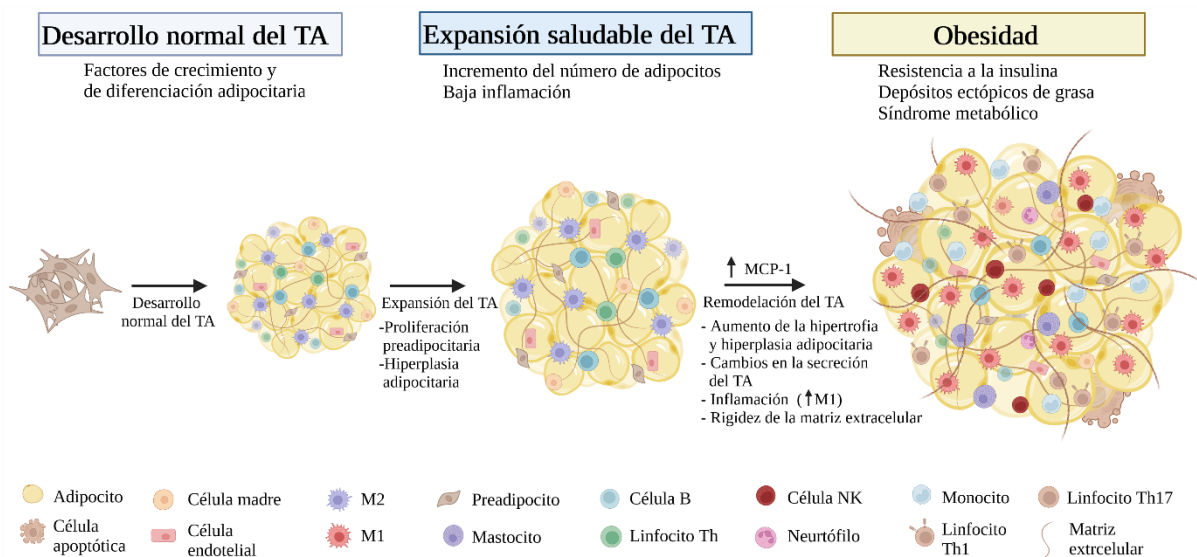


Figura 5. Remodelación del tejido adiposo (TA) en la obesidad. Durante la obesidad, el tejido adiposo sufre un proceso de hipertrofia e hiperplasia celular. Además, se produce una rigidez e inflamación del TA debido a cambios en la matriz extracelular y en las células inmunitarias. Concretamente, se produce una disminución de los antiinflamatorios (M2) y un aumento de los macrófagos proinflamatorios (M1), de los neutrófilos, de los linfocitos T y de las células NK (*natural killer*), entre otras. Este aumento de la inflamación puede provocar un estado de resistencia a la insulina (Creado con BioRender.com).

1.2.2.2.3 *El papel de las células inmunitarias del TA con la obesidad y la DM2*

El tejido adiposo blanco durante la expansión fisiológica produce una liberación autónoma de mediadores proinflamatorios para acomodar triglicéridos y prevenir la deposición ectópica de lípidos. Esta respuesta proinflamatoria inicial es fisiológicamente adaptativa, ya que su supresión experimental da lugar a un estrés metabólico e inflamatorio que es similar al observado en los individuos obesos [53]. Sin embargo, cuando el balance energético positivo se mantiene y la obesidad progresa, se establece un estado inflamatorio crónico de bajo grado en el TAB que conduce a múltiples estados patogénicos, que van desde la resistencia a la insulina (RI) hasta posiblemente algunos de los acontecimientos prooncogénicos asociados a la obesidad [55]. Estos factores de estrés promueven la fibrosis y el estrés mecánico debido a la rápida expansión del depósito adiposo y la inadecuada remodelación de la matriz extracelular (MEC); a la hipoxia debida a la insuficiente neovascularización del TAB en expansión; y a la senescencia y muerte de los adipocitos que se produce cuando la capacidad de almacenamiento de los triglicéridos se ve desbordada por el exceso de lípidos y glucosa [23,96].

En el caso del estrés tisular inducido por el sobrepeso y la obesidad a largo plazo, las células inmunitarias probablemente reaccionan en un primer momento a los cambios en el perfil de expresión de los adipocitos hipertrofiados (normalmente un aumento de TNF α e IL6), e intentan regular la inflamación inicial cambiando su perfil de secreción y polarización de los macrófagos [52]. En el caso de un estrés tisular sostenido, las reacciones reguladoras originales aparentemente se sobrepasan y las propias células inmunitarias, bajo la influencia de las citoquinas y quimiocinas producidas por los adipocitos, comienzan a contribuir al medio inflamatorio [93]. Así, las vías inflamatorias activan varias quinasas Ser/Thr que pueden perjudicar directamente la señalización del receptor de insulina en los adipocitos, lo que conduce a una resistencia local a la insulina debido a alteraciones en la vía de señalización (Figura 6) (47,65). Además, la interacción de las citoquinas proinflamatorias con receptores específicos y el depósito ectópico de lípidos en los tejidos periféricos como músculo esquelético y el hígado, reducen la sensibilidad a la insulina de estos órganos. Esto reduce la eliminación de la glucosa del torrente sanguíneo y aumenta la lipólisis, lo que hace que las células pancreáticas aumenten la producción de insulina; sin embargo, debido a la hiperglucemia sostenida y a la falta de sensibilidad a la insulina, estas células acaban pereciendo por agotamiento. La producción insuficiente de insulina y la disfunción del páncreas conducen al desarrollo de la diabetes tipo 2 (DM2) [22]. Además, la señalización inflamatoria también inhibe la expresión y la actividad del principal factor de transcripción de la adipogénesis, el receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR), lo que desencadena otras disfunciones en los adipocitos, como alteraciones en el perfil de adipoquinas y la diferenciación de nuevos adipocitos [55].

Este estado de RI e inflamación del TA se puede revertir tras la pérdida de peso. Se observó que el predominio de macrófagos M1 y neutrófilos dentro del TA obeso puede revertirse mediante la reducción de peso, ya que los sujetos obesos que se someten a la cirugía bariátrica muestran un menor recuento de macrófagos junto con un cambio de vuelta al fenotipo antiinflamatorio tanto en el TAS como en el TAV [55,97].

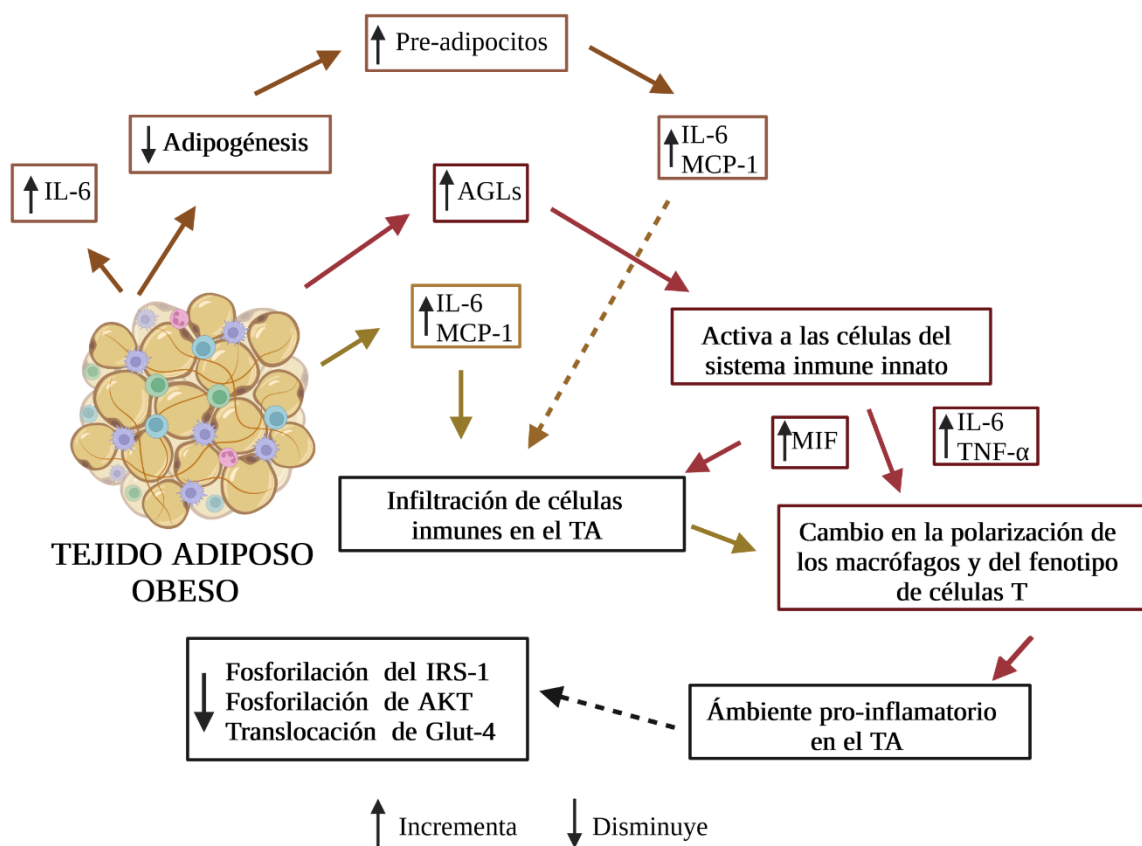


Figura 6. Activación y propagación de la inflamación y la resistencia a la insulina (RI) en el tejido adiposo (TA) obeso. La hipertrofia de los adipocitos da lugar a una circulación elevada de AGLs (ácidos grasos libres) y a un aumento de la secreción de adipoquinas. Estas, a su vez, provocan la infiltración de células inmunitarias y la activación de vías de señalización proinflamatorias, lo que conduce a una mayor infiltración y a la polarización de los macrófagos y las células T del TA hacia un fenotipo proinflamatorio. Este entorno impulsa más secreciones de adipoquinas y dificulta la adipogénesis, lo que da lugar a un mayor número de preadipocitos que, a su vez, secretan mediadores proinflamatorios. En conjunto, estos acontecimientos conducen a una señalización defectuosa de la insulina y, en última instancia, a un estado de RI (Creado con BioRender.com).

1.2.2.3 Células madre del TA

Las células del estroma vascular del TA también incluyen células madre derivadas del tejido adiposo (ADSC) con características muy similares a las MSC de la médula ósea. Existen múltiples estudios que informan del potencial de estas ADSC para diferenciarse *in vitro* en diferentes tipos de células dependiendo del estímulo recibido. Así, además de adipocitos, se han obtenido células óseas, cartilaginosas, musculares esqueléticas y cardíacas, nerviosas y endoteliales a partir de las ADSC [33]. La presencia de células madre en el TA adulto muestra su capacidad para generar nuevos adipocitos, característica que representa otro objetivo para los estudios relacionados con la homeostasis energética y la obesidad. Por otra parte, esta gran plasticidad de las ADSC y su capacidad angiogénica representan actualmente un foco de gran interés para la medicina regenerativa, ya que son una fuente de células madre de fácil obtención en comparación con las MSC [33,98].

1.3 TEJIDO ADIPOSO CÓMO ÓRGANO ENDOCRINO PERIFÉRICO, COMUNICACIÓN CON OTROS TEJIDOS Y A NIVEL CENTRAL. SECRECIÓN NO CLÁSICA: VESÍCULAS EXTRACELULARES Y OBESIDAD. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO

Al principio el TA se consideraba un tejido poco activo, y un mero depósito de energía, pero posteriormente, se descubrió que es un órgano endocrino muy dinámico capaz de sintetizar múltiples moléculas como factores lipídicos y proteicos (adipoquinas) que participan en la regulación de una amplia gama de procesos fisiológicos y metabólicos tanto de forma local (autocrina/paracrina) como distal (endocrina) (Figura 7) [41]. Aunque a finales de los años 80 ya se informó de que este tejido secretaba hormonas esteroideas, no fue hasta 1994, con el descubrimiento de la leptina cuando se reconoció el relevante papel de este tejido como órgano endocrino [83]. El tejido adiposo blanco secreta un número considerable de factores proteicos; así, el término adipoquina se utiliza para referirse a las proteínas sintetizadas y secretadas por el conjunto del tejido adiposo blanco. Estos péptidos tienen estructuras químicas y funciones fisiológicas muy diversas, ya que pueden intervenir en la regulación de la ingesta y el equilibrio energético (leptina), en la regulación de la presión arterial (angiotensina), en la hemostasia vascular (PAI-1), en el metabolismo de los lípidos (proteína de unión a retinol 4, proteína de transferencia de ésteres de colesterol), en la homeostasis de los hidratos de carbono (adiponectina, resistina), y en la angiogénesis (VEGF-A), así como fuente de factores de crecimiento (TGF- β -1) y de proteínas de respuesta a la inflamación y al estrés (haptoglobulina, 1-glicoproteína ácida), y aquellas relacionadas con el sistema inmunitario (citoquinas clásicas como TNF α , IL-1, IL-6, MCP-1, entre otras) [51]. Además, el tejido adiposo expresa numerosos receptores que le permiten responder a diferentes señales hormonales como las del sistema nervioso central (SNC). Así, el tejido adiposo se comunica con órganos distantes como el hígado o el músculo, incluyendo el SNC, coordinando así diversos procesos biológicos, como el metabolismo energético, la función neuroendocrina y la función inmunitaria [32,41,51,69].

Entre las adipoquinas principales, la leptina es una proteína (16 kDa) producida principalmente por los adipocitos blancos que actúa sobre receptores específicos (LEPR: del inglés *Leptin Receptor*) en el hipotálamo para suprimir la alimentación y aumentar el gasto energético [99,100]. En concreto, existen diferentes isoformas de los LEPR que se expresan en el SNC, y además en la periferia (tejido musculoesquelético o páncreas) [39,40]. La distribución de estos receptores facilita los efectos pleiotrópicos de la leptina, desempeñando un papel crucial en la regulación de la masa corporal a través de un mecanismo de retroalimentación negativa entre el tejido adiposo y el hipotálamo; regulando el apetito y el metabolismo mediante la inhibición de la síntesis y liberación del neuropéptido Y (NPY) anorexigénico en el núcleo arqueado (ARC) [17]. La secreción de leptina es directamente proporcional a la masa de tejido adiposo y al estado nutricional, y es mayor en el tejido adiposo subcutáneo que en el visceral [101]. Además, dicha expresión y secreción está regulada por factores, como por ejemplo, la insulina, los glucocorticoides, el TNF y los estrógenos, que aumentan la secreción de leptina; sin embargo, los andrógenos o los ácidos grasos libres disminuyen su secreción [17,102]. En condiciones de restricción calórica, los niveles de leptina disminuyen provocando una respuesta fisiológica adaptativa a la inanición en el eje hipotálamo-pituitario; de esta manera, se produce un aumento del apetito y la disminución del gasto energético [39]. En cambio, en condiciones

de realimentación los niveles de leptina aumentan [40,99]. En la obesidad, los niveles de leptina circulante son característicamente elevados, alcanzándose un estado de resistencia a la misma que se caracteriza por una reducción de la saciedad, un consumo excesivo de nutrientes y un aumento de la masa corporal total [17,103].

Por otro lado, la adiponectina, descubierta en 1996, es una proteína de aproximadamente 30 kDa multimérica (desde trímeros hasta dodecámeros de alto peso molecular); producida tanto en los adipocitos blancos como en los marrones, con los niveles más altos en el tejido adiposo subcutáneo [104]. Esta molécula dependiendo de su isoforma interacciona con receptores específicos, AdipoR1 y AdipoR2, los cuales se expresan principalmente en el músculo esquelético y en el hígado respectivamente. A parte de estos receptores, también ha sido identificado otro receptor para la adiponectina, la cadherina-T [104]. Los niveles plasmáticos de esta molécula se correlacionan negativamente con la acumulación de grasa visceral (obesidad) y con la diabetes tipo 2 (DM2). Por lo que, este péptido desempeña un papel crucial en las enfermedades relacionadas con la obesidad, como la resistencia a insulina (RI) o enfermedades cardiovasculares debido a sus efectos antidiabéticos, antiinflamatorios y angiogénicos, y como sensibilizador de la insulina [105]. Esta molécula actúa principalmente en el hígado para reducir la gluconeogénesis, y en el músculo esquelético para aumentar la oxidación de los ácidos grasos (activando AMPK) [106]. Además, la adiponectina puede actuar en el SNC para estimular el apetito y reducir el gasto energético [43,103,106].

Como se ha señalado anteriormente, además de la leptina y de la adiponectina, el tejido adiposo secreta otras hormonas adipocitarias relacionadas con la RI y el síndrome metabólico, como la proteína de unión al retinol 4 (RBP-4, producida por los adipocitos viscerales promoviendo la inflamación) o la resistina (secretada principalmente por los macrófagos y relacionada con la resistencia a la insulina) entre otras (Figura 7). Este tejido, también, es una fuente de múltiples factores de crecimiento como es FGF21 (siglas en inglés de *Fibroblast Growth Factor*), BMPs (siglas en inglés de *Bone Morphogenetic Proteins*), TGF- β (siglas en inglés de *Transforming Growth Factor-beta*), VEGFs (siglas en inglés de *Vascular Endothelial Growth Factors*); y de diferentes factores neurotróficos entre otros. En concreto, las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPS) como BMP2 y 4 están involucradas en la diferenciación adipocitaria, y BMP4 en el pardeamiento de la grasa blanca [32,51].

Además de estas moléculas proteicas, el TA secreta moléculas lipídicas, como los prostanoïdes, sintetizados por el propio tejido; el colesterol, y el retinol, que se almacenan para su posterior liberación; y las hormonas esteroideas (esteroides sexuales y glucocorticoides), que pueden experimentar transformaciones de formas inactivas a activas y viceversa en el TA con importantes funciones tanto autocrina como paracrina [38]. Por ejemplo, durante la obesidad se libera un mayor porcentaje de ácidos grasos (AG) no esteroïdes que intervienen en el desarrollo de la resistencia a la insulina (RI) afectando la función de los linfocitos B y de las células pancreáticas, entre otros [107] (Figura 7). Se ha observado que los ácidos grasos no esteroïdes que se liberan por los tejidos adiposos reflejan la ingesta de grasa, siendo los más abundantes el ácido palmítico (AP) y el oleico (AO) [96]. A diferencia del ácido oleico (ácido graso monoinsaturado), el ácido palmítico (ácido graso saturado) está asociado a diferentes disfunciones metabólicas como la RI [96,108]. Se ha descrito que el ácido palmítico puede estar

involucrado en la RI mediante tres mecanismos principales: aumento de la síntesis de complejos lipídicos perjudiciales, deterioro de la función de los orgánulos celulares, e inflamación a través de la activación del receptor tipo Toll (Figura 8) [96]. Es decir, el aumento de ácidos grasos no esteroideos a nivel plasmático favorece la acumulación de ácidos grasos (ácido palmítico) en tejidos no adiposos, como el hígado, páncreas, o el corazón; lo que conlleva a una disfunción metabólica (lipotoxicidad) y a la muerte celular programada (lipoapoptosis) en dichos orgánulos [96]. En estas circunstancias, cuando los niveles intracelulares de AP sean mayores que la tasa de oxidación, este se procesa en complejos lipídicos perjudiciales como el diacilglicerol (DAG) y la ceramida. El DAG activa diferentes isoformas de la proteína quinasa C (PKC), como la PKCe en el hígado, lo que provoca la atenuación de la vía de señalización de la insulina mediante la fosforilación del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) [96,109]. El aumento de ceramida activa los receptores tipo NOD y la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y PKC, atenuando así la vía de señalización de la insulina [109]. Además, el ácido palmítico afecta a la función del retículo endoplásmico (RE) y a la mitocondria, provocando estrés, apoptosis y un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) lo que favorece la inflamación [96]. Sin embargo, las dietas ricas en ácido oleico, en concreto las basadas en el consumo de aceite de oliva (dieta mediterránea), mejoran la sensibilidad a la insulina y tienen efectos protectores contra la obesidad y el desarrollo de DM2 [96].

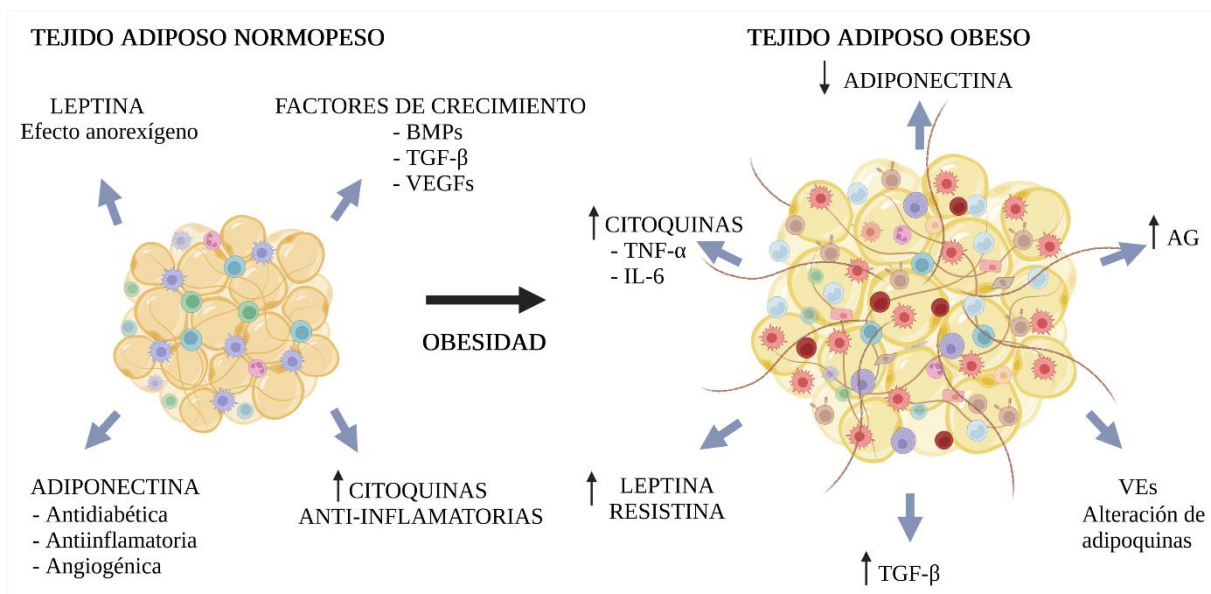


Figura 7. El tejido adiposo como órgano endocrino y desregulación en la obesidad. El tejido adiposo secreta distintas moléculas (proteínas, lípidos y otras) que ejercen una función autocrina, paracrina y endocrina alcanzando órganos periféricos y el SNC (Sistema Nervioso Central); destacan la leptina que ejerce un efecto anorexígeno, y la adiponectina con el efecto contrario. En condiciones de obesidad, la secreción de estas moléculas se altera, por ejemplo, aumenta los niveles de leptina, resistina, de citoquinas antiinflamatorias, ácidos grasos (AG), el factor de crecimiento transformante B (TGF-β); o la disminución de la adiponectina. Recientemente, se ha descubierto que, a esta vía clásica de secreción endocrina, se le añade otra vía alternativa de comunicación a través de distintas moléculas de ARNs o mediante estructuras vesiculares más complejas conocidas como vesículas extracelulares (VEs) (Creado con BioRender.com).

En resumen, el TA es un órgano endocrino que secreta diferentes moléculas que interaccionan con diferentes órganos periféricos como músculo, páncreas o hígado; o a nivel central en el hipotálamo. Además de estas moléculas (adipoquinas, citoquinas, y diferentes

moléculas lipídicas, etc), recientemente, se han revelado otras vías alternativas de comunicación para el tejido adiposo que incluyen la secreción no clásica de proteínas, la liberación de vesículas extracelulares (VEs), o la liberación de ARN largos no codificantes (ARNlnc) y microARNs (ARN micro), que pueden viajar libres, o dentro de las VEs. El análisis de estas nuevas moléculas no clásicas está causando un gran impacto en la investigación biomédica, y en concreto, en el estudio del metabolismo endocrino y las enfermedades asociadas. Sin embargo, este tipo de comunicación alternativo al clásico, y su papel autocrino/paracrino, está todavía poco explorado (Figura 7) [103,110,111].

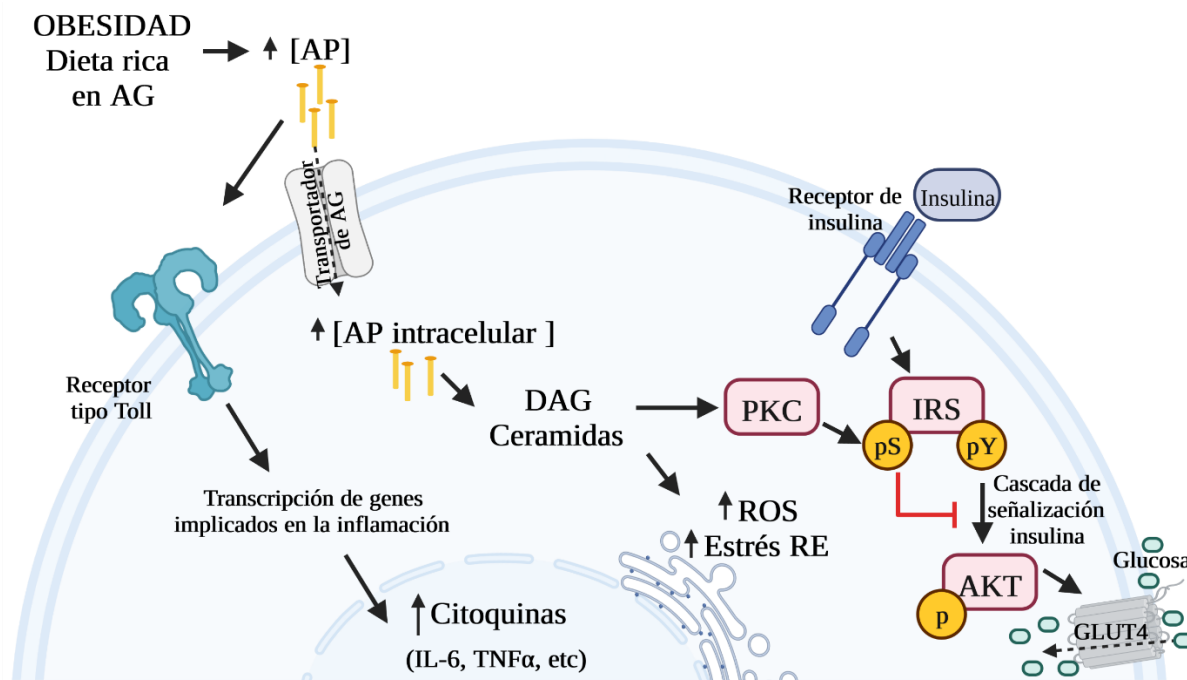


Figura 8. El ácido palmítico participa en la resistencia insulínica afectando a su vía de señalización mediante varios mecanismos. El desarrollo de la obesidad produce un aumento de la lipólisis y, por lo tanto, una liberación de ácidos grasos (AG) no esterificados. Esto junto con el aumento de la concentración plasmática de ácidos grasos provenientes de la dieta, principalmente el ácido palmítico (AP), provoca inflamación y resistencia a la insulina. El aumento de la internalización de AP da lugar a lipotoxicidad; y este lípido se procesa en complejos lipídicos perjudiciales como el diacilglicerol (DAG) y la ceramida. Estos compuestos activan la proteína quinasa C (PKC), que a su vez atenúa la vía de señalización de la insulina fosforilando la serina del sustrato del receptor de la insulina (IRS) lo que conlleva a una menor captación de glucosa. Además, estos compuestos aumentan el estrés oxidativo mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que afectan al funcionamiento del retículo endoplasmático (RE), promoviendo la inflamación y la apoptosis. A mayores, el AP también puede activar receptores de tipo Toll, provocando la activación de la transcripción de genes relacionados con la inflamación, y posteriormente la liberación de citoquinas, exacerbando así, el estado inflamatorio y la resistencia a la insulina (Creado con BioRender.com).

1.3.1 Vesículas extracelulares (VEs), biogénesis y composición

Las vesículas extracelulares son pequeñas esferas móviles limitadas por membrana lipídica y de tamaño diverso (30-1000 nm) que son liberadas al espacio extracelular [112]. Según ISEV (siglas del inglés *International Society for Extracellular Vesicles*), podemos usar este término de forma genérica para partículas de diferente naturaleza celular delimitadas por una bicapa lipídica, y que no pueden replicarse (carecen de núcleo) [113]. Estas vesículas contienen componentes de membrana y citosólicos como proteínas, ARN (ARNm, microARN) y lípidos.

Son liberadas por todos los tipos de células, y como resultado, estas vesículas pueden detectarse en el entorno extracelular y prácticamente en todos los fluidos corporales, como la sangre, la orina, el líquido cefalorraquídeo, la saliva, las lágrimas, etc. [114,115]. En un inicio, se pensaba que estas partículas eran meros desechos celulares; hasta que en 1981 fueron descritas por primera vez como enzimas secretadas al espacio extracelular (ectoenzimas) [116]. Posteriormente fueron clasificadas, según su tamaño y biogénesis, pudiéndose identificar en 3 grandes grupos: microvesículas (MVs) (100 nm-1µm), derivadas de la evaginación de la membrana plasmática; exosomas (30-100 nm), ensamblados en endosomas multivesiculares (MBVs del inglés *Multivesicular Bodies*) que son secretados por exocitosis; y vesículas más grandes (50-5000 nm), que comprenden cuerpos apoptóticos liberados por las células precediendo a la apoptosis (Figura 9) [115,117].

Vesículas Extracelulares (VEs)

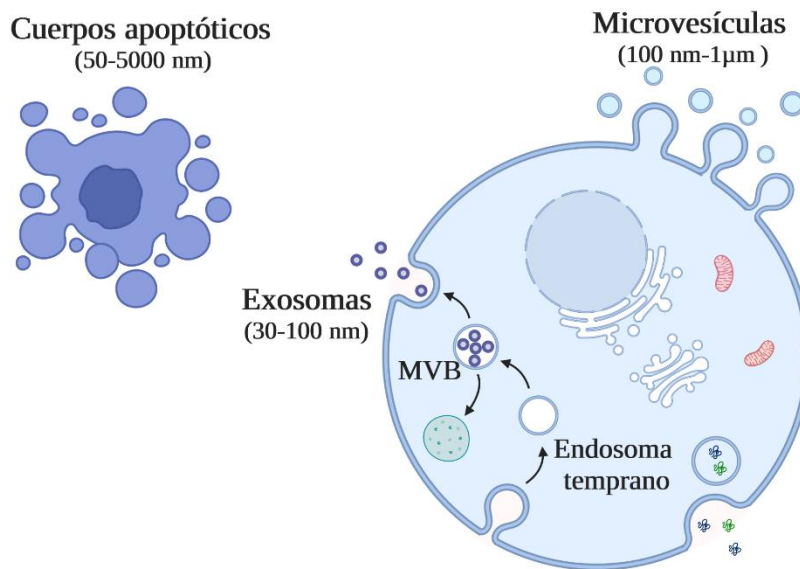


Figura 9. Clasificación de las VEs según su tamaño y biogénesis: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Los exosomas se forman a partir de la vía endosomal, las microvesículas de la rotura de la membrana plasmática y los cuerpos apoptóticos de la apoptosis celular (Creado con BioRender.com).

Actualmente, debido a que no hay un consenso internacional sobre los marcadores específicos de los diferentes subtipos de VEs, la asignación de una VE a una vía de biogénesis concreta sigue siendo complejo. En caso de que no se pueda establecer marcadores específicos de origen subcelular, se puede clasificar las VEs según [113]:

- Características físicas, como el tamaño: VEs pequeñas (sVEs del inglés *small Extracellular Vesicles*) que son menores de 200 nm y VEs medianas/grandes (m/IVEs del inglés *médium/large Extracellular Vesicles*) mayores de 200 nm; o la densidad (baja, media, alta, con cada rango definido).
- Composición bioquímica (VEs positivas/negativas para marcadores CD63/CD81, etc.).
- Descripción de las condiciones o de las células de origen (VEs hipóxicas, oncosomas grandes, cuerpos apoptóticos, etc.).

1.3.1.1 Biogénesis de las VEs.

La formación de estas vesículas ocurre principalmente en dos lugares subcelulares, como ya se ha mencionado antes, en la membrana plasmática (MP), como es el caso de las microvesículas, también denominadas ectosomas o micropartículas; o a partir de la vía endosomal en los exosomas [113]. Podemos establecer una serie de biomarcadores acordes a este lugar de origen. Por ejemplo, las tetraspaninas, que son una superfamilia de moléculas transmembrana ubicuas que median en la formación de microdominios especializados en las membranas plasmáticas e intracelulares (este es el caso de CD9, CD61, CD63 y CD81); las proteínas ESCRT, complejos de clasificación endosómica necesarios para la maquinaria de transporte, y proteínas asociadas como TSG101 (proteína del gen de susceptibilidad tumoral 101), Alix (proteína que interactúa con la proteína de muerte celular programada 6), así como sintenina, flotilina y las proteínas de choque térmico, son marcadores característicos de las VEs derivadas de la vía endosomal (exosomas) [118]. En cambio, la proteína que contiene el dominio arrestina 1 y CD73 se sugieren como marcadores de VEs liberadas a partir de la membrana plasmática [119]. Sin embargo, dado que la biogénesis de VEs es dinámica, hay que tener en cuenta que los marcadores específicos de vesículas pueden variar en función del tipo de célula y del estado metabólico y funcional de estas células; e incluso, los niveles de estas pueden variar a lo largo del tiempo y tras una alteración fisiológica y patológica [117,120,121]. Además, dado que los exosomas se forman en los cuerpos/endosomas multivesiculares (MVBs) y que las MVs se originan por brotación directa de la membrana plasmática, es probable que la maquinaria celular implicada en su formación y liberación difieran, aunque los elementos mecanísticos puedan ser compartidos [117,119,122].

1.3.1.1.1 Biogénesis de los exosomas

La formación de los exosomas consta de tres pasos: biogénesis (a partir de la vía endocítica), transporte y liberación al espacio extracelular (Figura 10).

- Biogénesis de MVBs:

La vía endocítica consiste en la formación de endosomas tempranos, compartimentos de membrana altamente dinámicos, que están involucrados en la internalización de ligandos extracelulares o componentes celulares, de su reciclaje a la membrana plasmática, y/o su degradación [119,123]. Los endosomas tempranos se convierten en endosomas tardíos, y durante este proceso acumulan vesículas intraluminales (VIs) en su lumen; por lo que generalmente se denominan cuerpos/endosomas multivesiculares. Las vesículas intraluminales que se forman por invaginación hacia dentro de la membrana endosomal temprana secuestran proteínas, lípidos que son específicamente almacenados [123]. En muchas de las células, el destino principal de los cuerpos multivesiculares es la vía lisosomal, es decir, fusionarse con los lisosomas, que son compartimentos ácidos que contienen hidrolasas lisosomales que degradan su contenido. Sin embargo, se sabe que las poblaciones de MVBs, que llevan las tetraspaninas CD63 o CD9, proteínas de membrana asociadas a los lisosomas LAMP1 y LAMP2, y otras moléculas que generalmente están presentes en los endosomas tardíos (como el complejo mayor de histocompatibilidad clase II), pueden fusionarse directamente con la membrana plasmática liberándose mediante exocitosis al espacio extracelular en forma de

exosomas [122]. Estas observaciones, junto con los diferentes cambios morfológicos en tamaño y aspecto de estos endosomas, sugieren que diferentes subpoblaciones de endosomas multivesiculares coexisten simultáneamente en las células, algunas destinadas a la vía de degradación mientras que otras están destinadas a la exocitosis [118,122]. Por ejemplo, se sabe que en los astrocitos existen diferentes poblaciones de MVBs según su contenido en colesterol, y que las que contienen un mayor porcentaje de colesterol se liberan en forma de exosomas [118]. Otro ejemplo, los MVBs que contienen LBPA (ácido lisobifosfatídico) están principalmente destinados a la degradación; ya que los exosomas no están enriquecidos en esta molécula lipídica [123]. Además, la secreción de exosomas puede ser inducida por diferentes estímulos, como la despolarización de células, el aumento de calcio intracelular o la remodelación del citoesqueleto, en la célula de origen; o incluso de forma espontánea [118,123].

La maquinaria molecular implicada en la formación de las vesículas intraluminales en los MVBs se reúne en complejos multiproteicos englobados en el complejo de clasificación endosomal responsable del transporte (ESCRT, del inglés *Endosomal Sorting Complexes Required For Transport*). Este macro complejo está formado por aproximadamente treinta proteínas que se reúnen en cuatro complejos (ESCRT-0, -I, -II y -III), los cuales tienen a su vez asociadas diversas proteínas (Vps4, Vta1, Alix, entre otras) [122]. El complejo ESCRT-0 reconoce y secuestra las proteínas transmembrana ubiquitinadas en la membrana endosomal, mientras que los complejos ESCRT-I y II parecen ser responsables de la deformación de la membrana para la posterior internalización de la carga celular en los MVBs; por su parte, los componentes de ESCRT-III se encargan finalmente de la escisión de la vesícula [122,123].

Por orden, en el proceso de biogénesis exosomal, primero, se produce el reclutamiento del complejo ESCRT-0 a través de su subunidad HRS (sustrato de tirosina quinasa regulado por el factor de crecimiento de los hepatocitos), la cual reconoce a proteínas monoubiquitinadas [124]. Esta subunidad HRS interactúa con la subunidad TSG101 del complejo ESCRT-I, y es entonces cuando este complejo participa en el reclutamiento de ESCRT-III a través de ESCRT-II (subunidad Alix). El reclutamiento de ESCRT-III es necesario para la escisión de las vesículas intraluminales (VIs) en el lumen de los MVBs. Después de la escisión, ESCRT-III se disocia de la membrana y se recicla, lo que requiere la interacción con la proteína Vps4 [122,125].

A parte de esta vía dependiente de los 4 complejos ESCRT, se ha observado otras vías que recluta alguno de los complejos ESCRT en la biogénesis de MVBs. Una de estas vías se lleva a cabo mediante la interacción del complejo sindecán-sintenina con Alix, es decir, la proteína transmembrana sindecán recluta a sintenina, y luego sintenina interactúa con Alix. Este mecanismo es independiente de ESCRT-0, pero dependiente de ESCRT-III [124]. Además, esta interacción de sindecán-sintenina-Alix participa en el reclutamiento de la carga vesicular [122]. También se sabe que Alix puede reclutar directamente a ESCRT-III en los endosomas tardíos uniéndose al LBPA (ácido lisobifosfatídico) sin reclutar ESCRT-0, -I y -II; esta vía podría desempeñar un papel directo en la formación de VIs en los endosomas tardíos y en la incorporación de tetraspaninas [122,123].

Además, trabajos recientes han demostrado otras vías independientes de cualquier complejo ESCRT, ya que se ha observado que la supresión simultánea de cualquier complejo ESCRT no inhibe la síntesis de MVBs [126]. En ausencia de esta maquinaria, la formación de

estas vesículas intraluminales se genera mediante la acción de tetraspaninas (CD63, CD9, CD81) y de enzimas del metabolismo lipídico como la esfingomielinasa neutra 2 (nSMase 2) la cual hidroliza esfingomielina en ceramida (Figura 10) [127]. Se observó que tras el tratamiento celular con GW4869 (inhibidor neutro y no competitivo de la esfingomielinasa) se disminuía la liberación de exosomas y la reducción de proteínas exosomales (CD63, CD81, o TSG101) [128,129]. Además, se mostró que la tetraspanina CD63 era necesaria para la formación de VIs y la subsiguiente liberación de vesículas extracelulares, debido a que es fundamental para dirigir la proteína LMP1 al interior de las vesículas intraluminales; y permitir así su posterior liberación en los exosomas [130]. Por lo tanto, los MVBs y sus VIs pueden formarse por mecanismos dependientes e independientes de ESCRT, los cuales están relacionados con la carga que almacenan [131,132].

Los mecanismos de inclusión de las proteínas citosólicas en las vesículas todavía no se conocen muy bien, pero se ha propuesto que la proteína de choque térmico HSC70 actúa como chaperona uniéndose a las proteínas citosólicas solubles que contienen una secuencia KFERQ, y a la fosfatidilserina en la membrana externa de los MVBs, y así, entra en las vesículas intraluminales formadas de manera dependiente de TSG101 y Vps4 [118]. Diferentes estudios proteómicos muestran la presencia de diferentes proteínas como TSG101, Alix, sintenina y sindecán en la formación de exosomas; por lo que se sugiere que estos se forman a partir de MVBs dependientes de los complejos ESCRT [131,132]. Se ha observado que un aumento en la expresión de sintenina conlleva a un aumento en la liberación de exosomas dependientes de Alix (vesículas positivas para CD63 y HSC70); mientras que una disminución en sintenina, Alix o sindecán impide la liberación de exosomas [124].

- Transporte de los MVBS:

El transporte de los MVBs a la membrana plasmática es similar a otros mecanismos de transporte de vesículas intracelulares implicando su interacción con el citoesqueleto (microtúbulos y actina) y con diferentes GTPasas como las proteínas Rab [133]. Los mecanismos moleculares implicados en este proceso no han sido identificados, aunque se ha demostrado que la actina proporciona sitios de acoplamiento para el tráfico intracelular de los MVBs en las células cancerosas [115]. Las proteínas Rab son reguladores esenciales del transporte de vesículas intracelulares entre diferentes compartimentos; estas pueden participar en la formación de las vesículas, en su movilidad a través de la interacción con el citoesqueleto, o la unión a la membrana de un compartimento receptor/diana [134]. La familia Rab se compone de más de 60 GTPasas, cada una de las cuales se asocia preferentemente con un compartimento intracelular. Rab11 fue el primer Rab del que se informó que estaba implicado en la secreción de exosomas (Figura 10). Se ha observado que la supresión de Rab11 disminuye la liberación de VEs que contienen el receptor de transferrina (TfR) y HSC70 [135]. Posteriormente, se destacaron otras proteínas Rab involucradas en este proceso: Rab27 y Rab35. Según el estudio de Stenmark y colaboradores, Rab11 y Rab35 se asocian principalmente a los endosomas de reciclaje y a los endosomas tempranos (que contienen flotilina), respectivamente; y Rab27 a los compartimentos endosómicos tardíos y de secreción (que se caracteriza por CD63, Alix y TSG101) [119,136]. Por lo tanto, diferentes subtipos de

endosomas tardíos pueden generar exosomas, y los mecanismos de secreción de VEs por parte de las proteínas Rab depende del tipo de célula [136].

- Liberación al espacio extracelular de los MVBS:

El paso final de la secreción de exosomas es la fusión de los MVBs con la membrana plasmática, impulsada por las proteínas receptoras de SNAPs, proteínas de fijación NSF (factor sensible a la N-etilmaleimida) solubles, (SNARE) (Figura 10). Las proteínas SNARE (acrónimo del inglés *SNAP Receptor*) forman complejos con SNAPs entre dos membranas y median la fusión de membranas entre los orgánulos [119]. Se ha demostrado que SNAP-23 media en la fusión de los lisosomas con la membrana plasmática en los mastocitos, y a VAMP-7 en las células epiteliales [133,137]. Además, se ha observado que VAMP-7 promueve la exocitosis de MVBs para liberar VEs que contienen acetilcolinesterasa en la línea celular de leucemia humana K562 [137]. Por lo tanto, en diferentes tipos de células, distintos complejos SNARE pueden estar involucrados en la fusión de un determinado orgánulo [119].

1.3.1.1.2 Biogénesis de las microvesículas (MVs)

Las microvesículas (ectosomas/micropartículas) se originan por la gemación y fisión directa de la membrana plasmática. Como ya se ha mencionado anteriormente, las MVs tienden a tener un tamaño mayor que los exosomas, aunque los rangos de tamaño se solapan. La formación de microvesículas es el resultado de una interacción dinámica entre la redistribución de fosfolípidos y la contracción de proteínas del citoesqueleto [118,138]. La distribución de proteínas y fosfolípidos dentro de la membrana plasmática no es uniforme, sino que forman microdominios. Esta asimetría está estrechamente regulada por las translocasas de aminofosfolípidos, proteínas que transfieren fosfolípidos de una capa de la membrana plasmática a la otra. Por ejemplo, las flipasas son translocasas que transfieren fosfolípidos del exterior de la membrana al interior, mientras que las flopasas transfieren fosfolípidos del interior al exterior [139]. La formación de estas vesículas a partir de la membrana es inducida por la translocación de la fosfatidilserina a la membrana externa; y este proceso se completa mediante la contracción de las estructuras del citoesqueleto por medio de interacciones entre la actina y la miosina [140,141].

Al igual que los exosomas, el contenido de las microvesículas parece altamente enriquecido para un subconjunto de proteínas. Por ejemplo, las microvesículas derivadas de células de melanoma están enriquecidas en receptores de integrina B1 y otras proteínas asociadas a la membrana, como la proteína de membrana asociada a vesículas 3 (VAMP3) [137]. Por otro lado, los receptores de transferrina, altamente enriquecidos en los exosomas, parecen estar notablemente ausentes en las microvesículas [122].

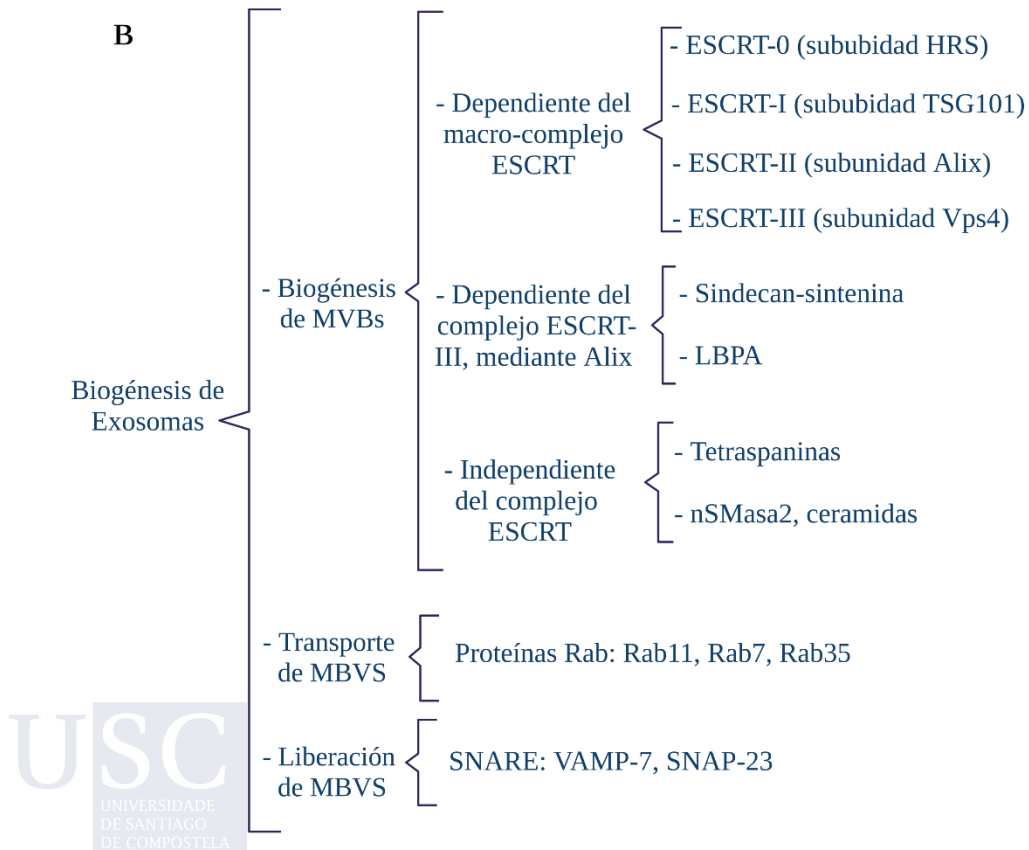
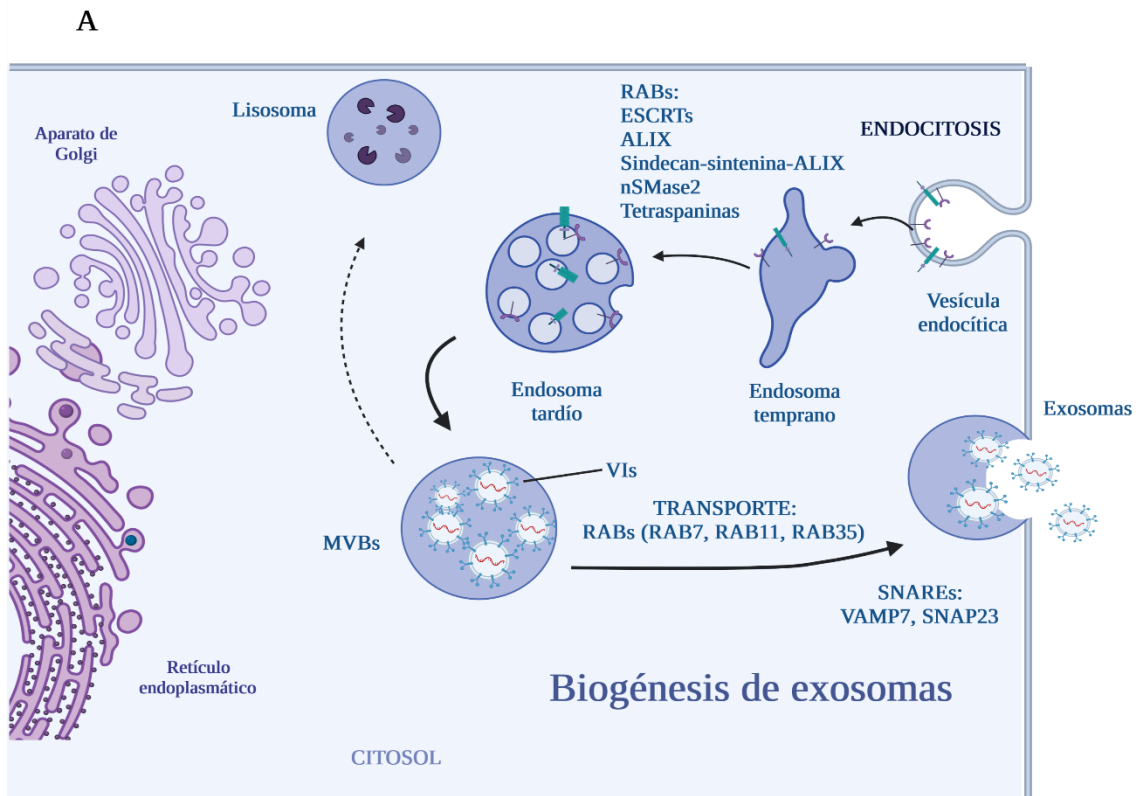


Figura 10. Biogénesis de los exosomas. En la biogénesis exosomal (A), primero se produce la formación de los MVBs (cuerpos multivesiculares) a partir de la vía dependiente/independiente de ESCRT (B); luego ocurre

su transporte mediante las proteínas Rab, y finalmente la liberación mediante exocitosis gracias a la fusión de la membrana de los MVBs con la membrana celular debido a la acción de las proteínas SNARE. LBPA: ácido lisobifosfatídico. nMasa2: esfingomielinasa neutra 2 (Creado con BioRender.com).

1.3.1.2 Composición de las VEs

Como ya se ha comentado con anterioridad, las vesículas extracelulares contienen en su interior diferente material bioactivo como proteínas, lípidos, diferentes tipos de ARN y ADN (Figura 11). La mayoría de los estudios sobre la composición bioquímica de las VEs implican el análisis de poblaciones de vesículas heterogéneas debido a las dificultades que presentan los diferentes métodos de aislamiento para obtener subtipos vesiculares puros [142]. Por lo tanto, la composición real de cada subtipo de VEs es desconocida en términos generales a pesar de que se conoce que dicha composición es relevante y juega un papel clave en la comunicación celular y en la transferencia celular [116]. En concreto, los exosomas se componen de varias proteínas: proteínas transmembrana como las tetraspaninas, las moléculas presentadoras de antígenos, las glicoproteínas y las moléculas de adhesión; y de proteínas en el lumen del exosoma como las proteínas de choque térmico (HSP), las proteínas del citoesqueleto, los componentes del complejo ESCRT, proteínas de transporte (SNARE), las proteínas de fusión, factores de crecimiento y citoquinas. Además, los exosomas están compuestos por múltiples lípidos como el colesterol, las ceramidas, la esfingomielina, entre otros; y por ácidos nucleicos como el ARNm, el microARN, el ARN no codificante y el ADN en su lumen [143].

El contenido proteico de estas partículas se ha estudiado mediante técnicas específicas de análisis de proteínas como la espectrometría de masas/proteómica, inmunodetección, u otros; dicha información se reúne en bases datos como Exocarta [144] o Vesiclepedia [145] entre otras, que también reúnen información sobre el componente lipídico y de ácidos nucleicos. Como se describe en el apartado de biogénesis, estas vesículas contienen un subconjunto de proteínas específicas de la célula de origen, y también específicas del tipo de biogénesis, según su origen endosomal (cuerpos multivesiculares) o a partir de la membrana plasmática. Así, los exosomas contienen marcadores como las tetraspaninas (CD9, CD63, CD81), Alix, HSP70, HSP90, GTPasas y moléculas MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) [142]. Las tetraspaninas como CD63, CD81, CD82, CD53 y CD37 se identificaron por primera vez en los exosomas de células B, y se pueden considerar tanto un marcador de la membrana de las VEs como de los endosomas tempranos [126]. A pesar de carecer de actividad catalítica, las tetraspaninas facilitan el tráfico, la estabilidad, la funcionalidad y la oligomerización de otras proteínas de membrana, ayudan en proceso selectivo de inclusión de proteínas y en la biogénesis de los MVBs [146]. Por ejemplo, CD81 se encuentra en la membrana plasmática y es la proteína más abundante en los exosomas; por otro lado, CD9, también se localiza en la membrana plasmática, y participa en los procesos de fusión de muchas células y puede facilitar la fusión de los exosomas con las células receptoras. En cambio, CD63 es un marcador de los endosomas tempranos que participa en la biogénesis de los exosomas que se encuentra en menor proporción que CD81 [126,143]. Cabe destacar otras proteínas transmembrana como moléculas presentadoras de antígenos como el MHC, glicoproteínas (β -galactosidasa), moléculas de adhesión (integrinas, P-selectina, ICAM1) y otras proteínas que actúan como receptores de señalización (receptor TNF, TfR) [143]. Las moléculas del MHC se expresan principalmente

en los exosomas liberados por las células presentadoras de antígenos, incluidas las células dendríticas, los macrófagos, las células B, la microglía y células del epitelio intestinal [143,147]. Además de proteínas de membrana, hallamos proteínas citosólicas en los exosomas como distintos componentes del citoesqueleto (tubulina, la actina, las proteínas de unión a la actina), así como anexinas, proteínas Rab y SNARE (participan en el transporte y fusión de los MVBs), moléculas que participan en la transducción de señales (como proteínas quinasas, proteínas G heterotrimérica, sintenina), enzimas metabólicas (como peroxidasas, enolasa-1), proteínas de choque térmico (HSP70, HSP90), proteínas del complejo ESCRT (Alix, Tsg101), factores de crecimiento (TGF- α), histonas y proteínas ribosomales, entre otras [142]. Las VEs también están enriquecidas en proteínas que se asocian a las balsas de lípidos, como las proteínas ancladas al glifosilinositol y la flotilina (97,110).

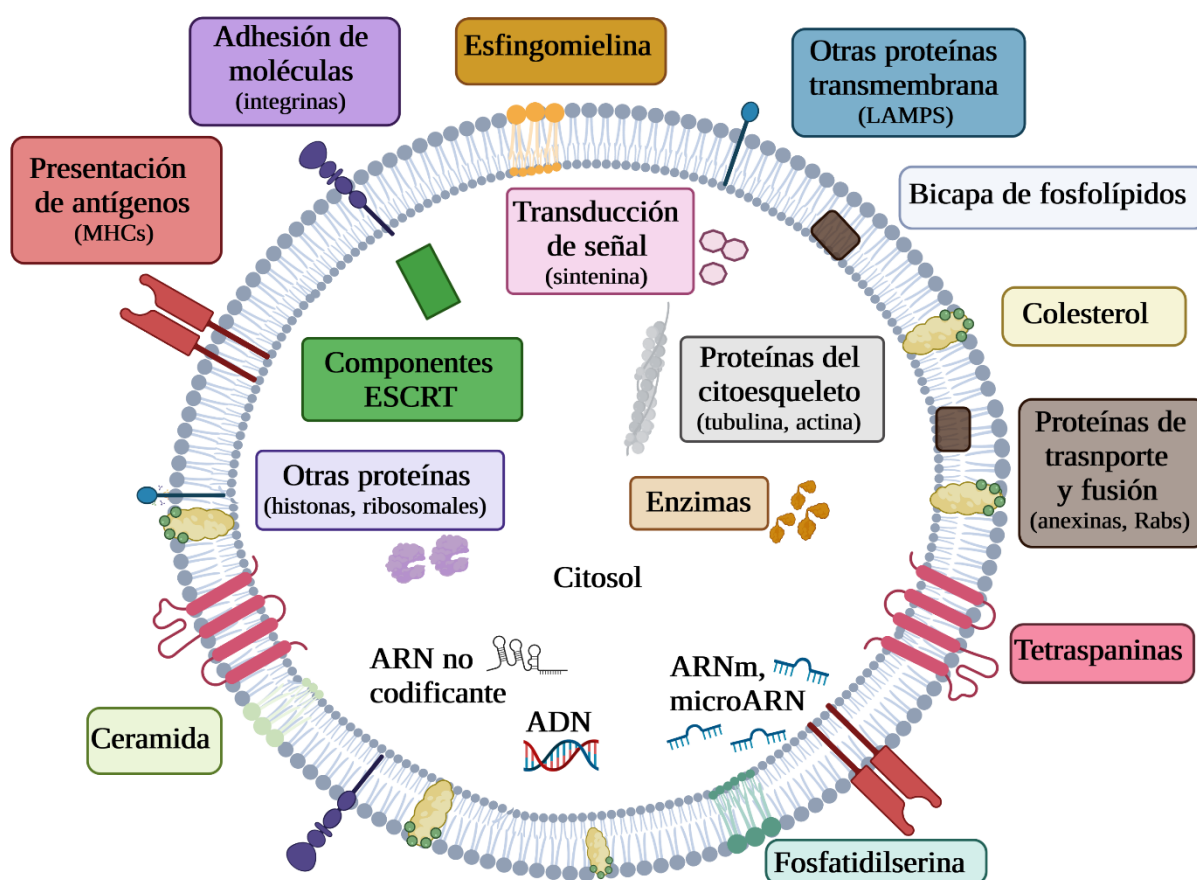


Figura 11. Composición molecular de los exosomas. Los exosomas se componen de varias proteínas: proteínas transmembrana como las tetraspaninas, las moléculas presentadoras de antígenos, las moléculas de adhesión; y de proteínas citosólicas como las proteínas del citoesqueleto, los componentes del complejo ESCRT, proteínas de transporte y fusión (anexinas), de transducción de señales, enzimas y otras proteínas como las ribosomales. Además, los exosomas están compuestos por múltiples lípidos como el colesterol, las ceramidas, la esfingomiélinea fosfatidilserina; y por ácidos nucleicos como el ARNm, el microARN, el ARN no codificante y el ADN. (Creado con BioRender.com).

La composición lipídica ha sido menos estudiada, pero se ha observado que esta refleja el perfil lipídico de la membrana plasmática de la célula de origen, y además, el ambiente celular puede alterar la composición lipídica de la membrana vesicular [142,148]. Asimismo, las VEs

están compuestas de colesterol, ceramidas, esfingomielina, fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina (PE), y en general de ácidos grasos saturados, que ayudan principalmente en la secreción, estructura, señalización, biogénesis y en el empaquetamiento de la carga exosomal [143]. Además, las vesículas de origen endosomal contiene derivados de ceramidas, a diferencia de las de origen plasmático, que contienen LBPA (ácido lisobifosfatídico) [115].

También, en las VEs se encuentra una composición diversa de material genético. En un pequeño número de casos, se ha encontrado ADN, incluyendo ADN genómico y mitocondrial [122]. Pero en general, las VEs se enriquecen principalmente con ARNm y microARNs, con pequeños ARN, muchos de ellos derivados de los ARNr 18S y 28S ribosomales, de los ARNt; con ARNs no codificantes de cadena larga (lncARN), con ARNs pequeños nucleares (snARN), y con ARN de interacción-piwi [149,150]. La mayor parte del ARN de dichas partículas tiene una longitud de unos 200 nucleótidos; por lo tanto, aunque parece haber algunos ARNm, la mayoría están probablemente fragmentados [151]. En concreto, los microARNs juegan un papel importante en la regulación génica de la célula diana y en diversos procesos biológicos como la exocitosis, hematopoyesis y la comunicación celular [152]. Sin embargo, el resto de pequeños y no codificantes ARNs están principalmente involucrados en el desarrollo tumoral [143]. Alternativamente, diferentes especies de ARN también pueden asociarse de forma estable con ribonucleoproteínas (RNPs), como la proteína argonauta 2 (AGO2), o las lipoproteínas de alta y baja densidad (HDLs y LDLs), que pueden asociarse con las VEs o incluirse con la fracción de vesículas dependiendo del tipo de aislamiento [153,154].

1.3.2 Función biológica de las vesículas extracelulares: comunicación intercelular a través de la interacción con células diana

Diversos estudios han demostrado que las VEs actúan como mensajeros en la comunicación intercelular debido a que estas partículas interactúan de forma altamente específica y sofisticada con células/tejido diana pudiendo producir cambios en la fisiología de dicha célula. Esto ha generado un creciente interés en el desarrollo de agentes terapéuticos basados en dichas partículas [116].

1.3.2.1 Tipos de interacción de las VEs con las células diana

En general, se acepta que las vesículas ejercen su función de señalización intercelular de dos maneras: pueden transmitir información a las células receptoras por contacto directo a través de sus ligandos de superficie, o pueden transferir proteínas y ácidos nucleicos, incluidos ARN y ADN, a las células diana mediante fusión directa de las membranas, fagocitosis o endocitosis dependiente de clatrina, entre otras (Figura 12) [119,149,155].

1.3.2.1.1 Contacto directo

El primer mecanismo depende de la interacción específica entre el ligando de las VEs y el receptor celular, sin la entrega del contenido de estas VEs en la célula receptora. Esta interacción puede dar lugar a la activación de una cascada de señalización, produciendo así, cambios funcionales diversos, además de inmunomoduladores y apoptóticos en las células diana [143]. Se han descrito varios tipos de ligando/receptor en estas interacciones, y cada uno

de ellos es altamente específico del lugar de origen de estas VEs y de la célula diana [116,119]. Por ejemplo, las células dendríticas portan el antígeno LFA-1 (antígeno 1 asociado a la función linfocitaria) el cuál captura de forma específica las VEs portadoras del ligando ICAM-1 [156]. También se ha observado que los macrófagos capturan VEs de eritrocitos que portan el ligando galectina-5 [157]. Otro ejemplo es el ligando de muerte programada 1 (PD1), presente en las VEs liberadas por células tumorales; el cual interacciona con la proteína de muerte celular programada (PD-L1) lo que provoca la evasión inmunitaria del tumor [158]. Esta especificidad de las VEs a determinadas células receptoras probablemente se deba a ligandos de superficie presentes en estas partículas; además, esta propiedad indica que las VEs son buenas candidatas para el desarrollo de terapias inmunomoduladoras y vacunas antitumorales entre otras [159].

1.3.2.1.2 Fusión con la membrana celular e internalización de la carga exosomal

Este segundo mecanismo depende de la fusión de membranas o de la internalización celular, lo que permite la entrada del contenido exosomal en las células diana. Dependiendo de la célula, se han descrito diferentes mecanismos los cuales son similares a los que se producen en la interacción virus-célula como la fusión directa de membranas, macropinocitosis, la fagocitosis y múltiples modos de endocitosis dependiente de clatrina e independiente de esta (Figura 12) [155]. La fusión de las membranas consiste en la formación de un tallo de hemifusión entre las bicapas lipídicas hidrofóbicas del exosoma y de la membrana plasmática, que seguidamente se expande formando una estructura consistente. Las proteínas SNARE, Rab, integrinas y otras moléculas de adhesión presentes en la membrana vesicular pueden mediar en este proceso [143]. La captación de VEs a través de la fusión directa con la membrana plasmática de la célula se ha observado directamente mediante el uso de decoloración lipídica fluorescente [148]. Parolini y colaboradores utilizaron una sonda fluorescente lipídica, R18, para marcar VEs derivadas de células de melanoma, y demostraron que una parte de estas VEs marcadas se fusionaba directamente con la membrana plasmática de las células receptoras [148]. Posteriormente, Montecalvo y colaboradores obtuvieron resultados similares en células dendríticas derivadas de la médula ósea [160]. Además, algunos estudios postulan que este tipo de interacción es frecuente en las células tumorales, ya que el microambiente tumoral genera un pH ácido que produce un aumento de la esfingomielina, la cual podría facilitar la fusión de los exosomas con la membrana celular [143].

No obstante, la vía basada en la fusión no es el principal mecanismo de captación. La mayor parte de las pruebas experimentales indican que las VEs se captan principalmente a través de la endocitosis [161]. Este proceso se puede dividir en cinco categorías: endocitosis mediada por receptores (también conocida como endocitosis mediada por clatrina), endocitosis mediada por caveolina, endocitosis mediada por balsa lipídica, fagocitosis y macropinocitosis [117,161,162]. Estos distintos tipos de internalización de VEs pueden coexistir [143]. Cabe destacar, que el tamaño de las VEs puede influir en el proceso de captación celular, ya que las VEs grandes (o los agregados de las pequeñas) probablemente inducen la fagocitosis, mientras que las VEs individuales o pequeñas pueden ser internalizadas por procesos no fagocíticos [117].

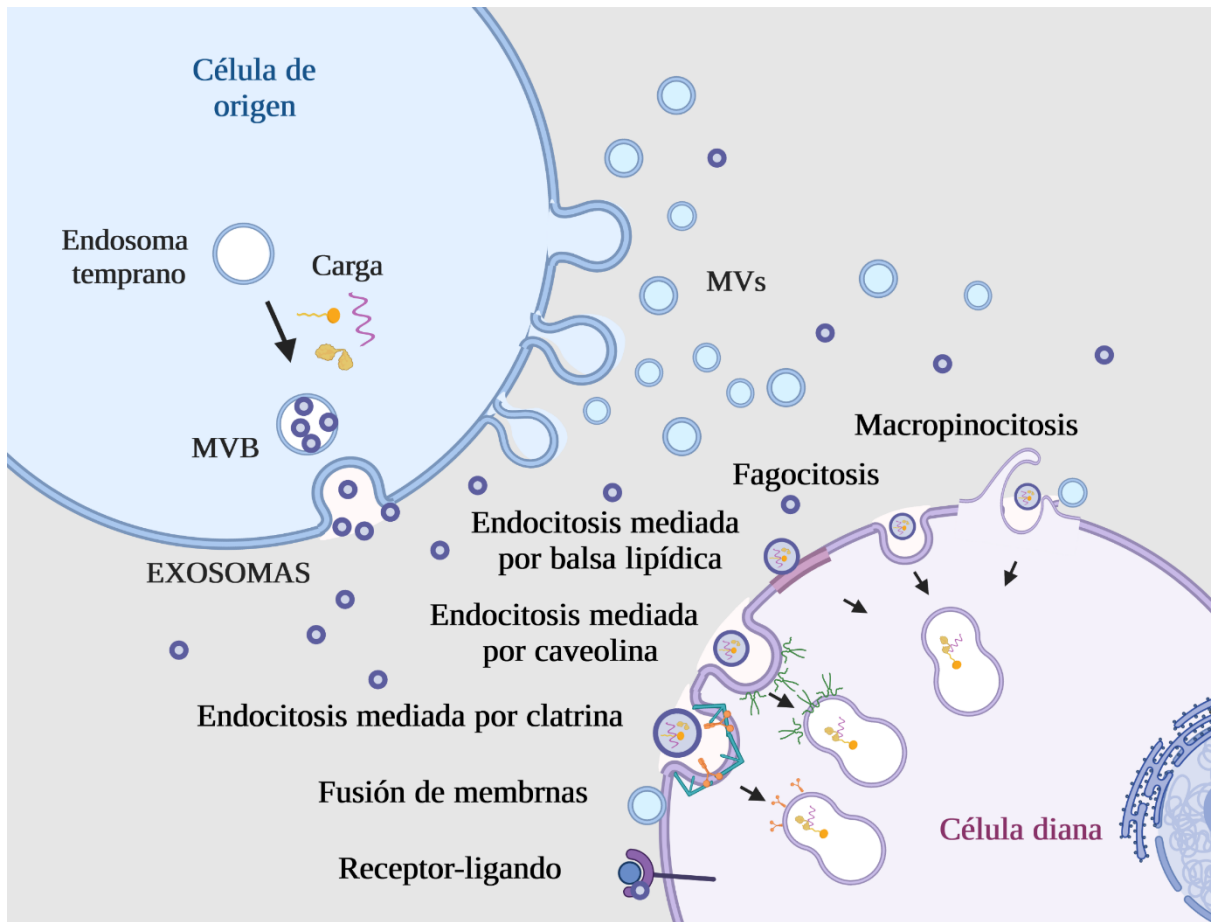


Figura 12. Interacción de las VEs con las células diana mediante receptor-ligando, fusión de membranas, endocitosis mediada por clatrina o caveolina, endocitosis por balsa lipídica, fagocitosis o macropinocitosis. MVBs: cuerpos multivesiculares; MVs: microvesículas (Creado con BioRender.com).

La endocitosis mediada por clatrina es un proceso altamente específico que solo puede ocurrir cuando las VEs y las células receptoras comparten la combinación correcta de ligando y receptor. Después de la fusión directa, la endocitosis es la ruta de entrada más común de las VEs [163]. Esta vía es un proceso de ensamblaje de varios receptores transmembrana y ligandos, en donde participa la proteína clatrina, la cual recubre las vesículas capturadas. Luego, las vesículas internalizadas se fusionan en endosomas [143]. Este mecanismo ocurre en diferentes tipos celulares como macrófagos, células dendríticas, hepatocitos, cardiomiocitos o células epiteliales, entre otras [163]. Por ejemplo, Morelli y colaboradores descubrieron que tanto las tetraspaninas CD9 y CD81 de las VEs, como la integrina celular $\alpha v/\beta 3$, contribuyen a la captación de VEs por las células dendríticas [147]. A mayores, también se ha observado que la integrina $\alpha v/\beta 3$ que porta las VEs derivadas de cáncer de próstata juega un papel importante en la migración celular [164]. Cabe destacar, que las integrinas vesiculares juegan un papel clave en la invasión, migración y progresión tumoral, y la formación de nichos pre-metastásicos [164,165]. También se ha observado que en las células cancerosas la expresión del receptor de transferrina facilita la captación de VEs [163].

La endocitosis dependiente de caveolina, como su nombre lo indica, está mediada por proteínas integradas en la membrana celular, caveolinas (caveolina-1, caveolina 2 o caveolina

3) que ayudan en la invaginación de la membrana plasmática en forma de caveolas [143,163]. Las caveolas permiten la internalización de los caveosomas, grandes vesículas hidrofóbicas y resistentes a los detergentes que contienen colesterol y esfingolípidos [162]. Se ha observado que la caveolina-1 regula positivamente la captación de exosomas en las células epiteliales [143].

La endocitosis mediada por balsa lipídica es un proceso importante en la captación de exosomas. Este proceso se produce debido a microdominios lipídicos en la membrana celular los cuales son resistentes a detergentes y están enriquecidos en colesterol, esfingolípidos y glicosilfosfatidilinositales [162]. Diferentes estudios han observado que la inhibición de estos lípidos provoca una menor captura de VEs [143]. Un ejemplo de esto, es la metil- β -ciclodextrina, la cual interfiere en el transporte intracelular de colesterol y reduce así la captación de exosomas en las células de cáncer de mama [166]. También se ha observado que la flotilina, un componente de las balsas lipídicas, regula positivamente este tipo de endocitosis [167].

Otro tipo de internalización es la fagocitosis [163]. Este es un proceso en el que las deformaciones de la membrana celular rodean las VEs formando fagosomas que finalmente dirigen la carga internalizada hacia los lisosomas. Las enzimas fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y fosfolipasa C (PLC) son necesarias para la formación del fagosoma [162]. Este tipo de ruta de captación es el más utilizado por las células inmunitarias, como los macrófagos y las células dendríticas [143].

Por otro lado, la macropinocitosis es un proceso de endocitosis en el que se producen cambios dinámicos de la actina lo que induce la invaginación de la membrana plasmática hacia el interior, y esta se desprende para formar compartimentos intracelulares denominados macropinosomas. Estos compartimentos se fusionan con lisosomas para su degradación o reciclaje [163]. Algunos tipos celulares que usan este proceso son las células de Hela, las gliales y células epiteliales [143].

Una vez internalizada la carga vesicular en el interior de la célula, y que esta no es destinada a la degradación, se produce una transferencia de información y transducción de señales [155]. Por ejemplo, los microARNs de las VEs, una vez transferidos en la célula diana, pueden producir modificaciones postranscripcionales en el ARNm de la célula diana [150,168,169]. Ratajczak y colaboradores demostraron que las células madre embrionarias segregan vesículas altamente enriquecidas en ARNm específicos, que pueden ser transferidos e inducir cambios fenotípicos en células progenitoras hematopoyéticas [170]. En resumen, diversos estudios han demostrado que la interacción de las VEs con las células diana ejerce resultados funcionales estimuladores o inhibidores, como la proliferación celular, la apoptosis, la producción de citoquinas, la modulación inmunitaria o la metástasis, entre otros, al inducir señales de transducción celular o al inducir cambios genéticos o epigenéticos [171].

1.3.2.2 Funciones biológicas de las VEs

En los últimos años, los exosomas se han postulado como factores clave en diversos procesos fisiológicos como el desarrollo, la homeostasis de los tejidos, el envejecimiento, la regulación metabólica, los ritmos circadianos, la lactancia; y en procesos patológicos como en

diversas enfermedades no infecciosas (cáncer, inflamación, trastornos metabólicos, inmunitarios, respiratorias) y enfermedades infecciosas [155,172]. En este contexto, han emergido diversos estudios acerca del papel biológico de las VEs en diversas patologías humanas que han aportado una nueva visión, y un cambio de paradigma en la investigación biomédica. Una de estas funciones está relacionada con su capacidad de interaccionar con células diana y liberar su contenido en dichas células, lo que hace que estas VEs tengan un papel funcional importante en la comunicación celular y en la entrega dirigida como vehículos terapéuticos [172]. Además de este papel en la comunicación celular, las VEs han surgido como una nueva vía diagnóstica y pronóstica en la detección y seguimiento de enfermedades [159].

1.3.2.2.1 VEs en la comunicación celular

Los exosomas, por sí mismos o como vehículos para la entrega de carga farmacológica, están siendo explorados activamente debido a que tienen una baja inmunogenicidad, su estructura proporciona protección del contenido, y presenta un alto tropismo celular [172]. Varios estudios han explorado el uso de exosomas derivados de células mesenquimales para la regeneración de tejidos y como tratamiento de enfermedades, como en el infarto de miocardio, en los trastornos inflamatorios del sistema nervioso central y en los accidentes cerebrovasculares [173]. Williams y colaboradores han observado que los exosomas derivados de las células del estroma mesenquimal humano favorece la neuroprotección en animales con lesión cerebral [174]. Además, otros estudios con exosomas procedentes de células mesenquimales han observado que estas vesículas son capaces de reducir la inflamación pulmonar [175]. Además, partiendo de la observación de que los microARNs exosómicos se unen eficazmente al ARNm de la célula diana, se han diseñado exosomas como herramientas de entrega de proteínas y microARNs [172]. Pruebas preclínicas han usado microARNs exosomales como tratamiento para cáncer de mama o páncreas en roedores [168]. También se ha observado que la presencia de CD47 en los exosomas les proporciona protección, ya que evita que sean fagocitados y eliminados de la circulación [172]. Otro estudio, ha observado que los exosomas circulatorios cargados con dopamina atraviesan la barrera hematoencefálica y muestran una mayor eficacia terapéutica que el propio uso de la dopamina [172].

Estas VEs también se usan en inmunoterapia en forma de vacunas [175]. Ejemplo de esto es el ensayo clínico con exosomas derivados de células dendríticas los cuales están cargados con antígenos tumorales para el tratamiento de cáncer de pulmón [159]. Otro ensayo, ha utilizado las VEs de plasma autólogo como tratamiento de la inflamación [172]. En la actualidad, tras la pandemia mundial de COVID-19, se han desarrollado diferentes estudios centrándose en la aplicación de los exosomas como tratamiento de esta enfermedad. Concretamente, en el hospital de Ruijin (China) han llevado a cabo un estudio clínico para evaluar el uso de VEs de células mesenquimales como tratamiento para la neumonía causada por esta enfermedad [175].

1.3.1.2.2 VEs como biomarcadores de enfermedad

En las últimas décadas, el interés de las VEs como biomarcadores de enfermedades, en particular los exosomas, ha crecido exponencialmente; debido a que estas VEs son muy dinámicas y reflejan el estado funcional de la célula de origen, y se pueden

encontrar en todos los fluidos corporales [159]. Los principales fluidos biológicos en los que se han identificado VEs circulantes son la sangre (plasma o suero), la orina, la saliva, la leche, el líquido amniótico y cefalorraquídeo, las lágrimas, entre otros [119]. En este contexto, las vesículas reflejan el estado actual de la enfermedad, ya que la biogénesis de estas es dinámica por lo que su composición (proteínas, lípidos, ARN) está condicionada por los diferentes cambios pato-fisiológicos de la célula de origen. Además, las VEs, a diferencia de otros biomarcadores clásicos, permiten un análisis poco invasivo, sin la necesidad de la realización de biopsias, permitiendo la obtención secuencial de muestras [159,176,177].

En sangre, se ha observado que las VEs llevan marcadores no solo de las células presentes en los vasos sanguíneos (células endoteliales e inmunes) sino también, en el caso de los pacientes con cáncer, de un tumor distante; demostrando así que las VEs secretadas dentro de un tumor sólido, no son captadas totalmente *in situ* por las células circundantes, o la matriz extracelular, sino que pueden atravesar el endotelio y acceder a la circulación sanguínea [177]. Precisamente, en enfermedades como el cáncer hay múltiples estudios sobre el papel de estas VEs como biomarcadores en el diagnóstico o progresión tumoral, la metástasis o la evasión inmunitaria [175]. Por ejemplo, el proteoglicano de la superficie celular, Glypican-1 (GPC1), se encuentra específicamente en los exosomas aislados de suero de pacientes con cáncer de páncreas. Además, los niveles de exosomas positivos para esta proteína se correlacionan con la carga tumoral y la supervivencia en pacientes antes y después de la resección quirúrgica del tumor [175,178]. Otro estudio como el de Ogata-Kawata y colaboradores indica que los niveles de siete microARNs en las VEs aisladas en suero, eran significativamente elevados en los pacientes con cáncer colorrectal, y que estos niveles disminuían después de la resección del tumor [179]. A parte de tumores primarios, también se ha observado la importancia de estos biomarcadores vesiculares en la detección temprana de la metástasis, como por ejemplo las proteínas MDA-9 y GRP78 [175]. Se ha observado que estas proteínas presentan una expresión significativamente más alta en los exosomas de suero de pacientes con melanoma metastásico que en los pacientes sin metástasis [180]. También, se han explorado estos biomarcadores en el refinamiento del pronóstico como en el cáncer de mama [175]. En esta patología, se ha demostrado que los niveles de microARNs como miR-373 en VEs liberadas por el tumor, permite distinguir diferentes subtipos de cáncer de mama, siendo más alto en las pacientes con carcinoma triple negativo que en las de carcinoma luminal [181]. Estos hallazgos también se han realizado en otros tipos de tumores como de pulmón, colorrectal o de ovarios, entre otros [159,175]. Aparte de las enfermedades tumorales, también existen diferentes estudios de biomarcadores exosomales en plasma de pacientes con enfermedades hepáticas o cardiovasculares, entre otras [182,183]. Por ejemplo, se ha observado que los pacientes tras la cirugía de la arteria carótida tienen una mayor concentración de VEs, la cual es proporcional a los niveles de troponina cardíaca [182].

En muestras de VEs de orina también se han identificado biomarcadores de enfermedades renales y genitourinarias [175]. Por ejemplo, Hogan y colaboradores observaron que la relación entre la policistina-1 (PC1) con la proteína transmembrana 2 (TMEM2) en los exosomas urinarios podría utilizarse para distinguir individuos con mutaciones en la poliquistosis renal 1 (PKD1) de pacientes sanos [184]. Además, los exosomas de orina positivos para la proteína

tumoral de Wilms (WT1) se han postulado como un buen biomarcador no invasivo de los podocitos para la detección temprana y el seguimiento del tratamiento de la lesión en pacientes con glomeruloesclerosis segmentaria focal, o con síndrome nefrótico sensible a los esteroides [175].

Así mismo, las vesículas extracelulares presentes en la saliva, se han propuesto como biomarcadores de diagnóstico para enfermedades y afecciones locales y sistémicas, como en el caso del cáncer de pulmón [175]. También, se ha postulado que las VEs derivadas de la leche materna humana pueden proporcionar información específica sobre la calidad, tanto a nivel inmunológico como nutricional, de la leche materna [185]. Además, las VEs procedentes del líquido cefalorraquídeo (LCR) han sido estudiadas en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson [182]. Por ejemplo, en el estudio de Lee y colaboradores, observaron que los exosomas del LCR de pacientes con Alzheimer contenían niveles significativamente mayores de proteínas tau y p-tau totales en comparación con los controles [175,186].

A parte de estos estudios preclínicos, hay diversos ensayos clínicos en los que las VEs se usan como biomarcadores diagnóstico y pronóstico de varias patologías (Tabla 2) [175]. Este aspecto está especialmente desarrollado en el área de la oncología, así, como se ha descrito anteriormente, las VEs desempeñan un papel importante en la progresión tumoral, de tal manera que a medida que el microambiente tumoral madura, la producción de VEs aumenta exponencialmente, promoviendo la progresión del mismo. Así, una reducción de la cantidad de VEs derivadas del tumor, podría constituir una oportunidad terapéutica para inhibir la progresión del cáncer; lo que permitiría desarrollar diferentes estrategias dirigidas a las VEs con una aplicación clínica [140]. Por ejemplo, Logozzi y colaboradores diseñaron un ELISA de tipo sándwich, denominado ExoTEST, para detectar y cuantificar VEs purificadas a partir de plasma humano. Observaron que el nivel de VEs doblemente positivas para caveolina-1/Rab-5b aumentaba significativamente en los pacientes con melanoma en comparación con los donantes sanos [187]. Otro ejemplo, es ExoDx Prostate IntelliScore, el cual es un test no invasivo, que junto con otros parámetros clínicos, permite evaluar el cáncer de próstata sin necesidad de biopsia [175]. El ensayo clínico de la Universidad de Alabama en Birmingham sobre biomarcadores exosomales de la enfermedad de Parkinson también ha permitido observar la eficacia del tratamiento con Sunitinib al correlacionarse con la disminución de la expresión de LRRK2 exosomal [175]. Por lo tanto, las vesículas extracelulares no son solo buenos biomarcadores diagnóstico y pronóstico de enfermedades, sino que también confirman la efectividad de las terapias.

A pesar de estos prometedores resultados de las VEs como biomarcadores de enfermedades humanas, hay diferentes factores técnicos y biológicos que limitan el uso clínico de estas partículas [182]. Uno de estos problemas es que no existe un método estandarizado para aislar y caracterizar las vesículas extracelulares de los fluidos biológicos [113]. Se han propuesto varios métodos de aislamiento, los cuales se describen a continuación, pero la ultracentrifugación parece ser la técnica más utilizada. Esta técnica es tediosa, poco reproducible, y requiere un alto volumen de fluido biológico, lo que limita su papel en la clínica [188]. Además, otro reto importante es obtener la misma población de vesículas en las

diferentes muestras, para poder obtener así resultados reproducibles [113]. También hay que destacar la falta de ensayos sobre la influencia que pueda ejercer diferentes factores clínicos, como la edad o el sexo, en la cantidad/composición de las vesículas extracelulares independientemente de la enfermedad [182].

Tabla 2. Resumen de los ensayos clínicos usados con VEs como biomarcadores o como herramientas terapéuticas [175].

	Fluido biológico/ Tipo celular	Aplicación
Biomarcadores	Líquido bronco-alveolar	Efecto del tabaquismo en los perfiles de microARNs
		Cáncer de pulmón
	Líquido cefalorraquídeo	Mutaciones específicas asociadas a LRRK2 en pacientes con Parkinson
	Sangre	Efectos <i>in vitro</i> sobre la coagulación sanguínea y la función plaquetaria
		Riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 en preadolescentes
	Sangre y orina	La expresión de la proteína HSP70 en pacientes con cáncer
		Sepsis, shock séptico o fallo orgánico múltiple
	Suero	Valor pronóstico de la hipoxia asociada al tumor
Orina	Cáncer de próstata	
	Pacientes trasplantados de riñón	
Herramientas terapéuticas	Células dendríticas	Inmunoterapia en cáncer de pulmón
	Células madre mesenquimales	Infección SARS-Cov-2
	Plasma autólogo	Inflamación crónica
	Sangre	Infarto de miocardio

1.3.3 Técnicas de aislamiento de VEs

El gran reto que rodea a las VEs en la actualidad, aparte de descifrar el papel funcional exacto y caracterizar su contenido dinámico, es encontrar un método factible, preciso y fiable para analizar estas vesículas con fines de investigación y aplicaciones clínicas [189]. Debido al pequeño tamaño de las VEs, existen varios procedimientos establecidos para aislarlas basados en protocolos de centrifugación diferencial, centrifugación en gradiente de densidad, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), inmunoafinidad y precipitación basada en polímeros [190]; sin embargo, todos tienen sus inconvenientes, siendo la mayoría de ellos tediosos o mostrando una alta variabilidad en el rendimiento de las vesículas (Tabla 3). Por ello, fue necesario que la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) elaborase unas guías con los requerimientos experimentales mínimos para el estudio de VEs (MISEV). La última actualización de la MISEV, MISEV2018, se basó en las aportaciones de más de 400 científicos y formuló recomendaciones en los seis temas generales de la nomenclatura de las VEs, la recogida de muestras y el procesamiento, la separación, la concentración y caracterización de las VEs, los estudios funcionales y los requisitos/excepciones de los informes [113,191].

En particular, al estudiar el proteoma de las vesículas, hay que tener en cuenta que la inmunoafinidad y los precipitantes pueden contaminar la muestra o impedir el análisis de las proteínas; siendo la centrifugación diferencial y la SEC los métodos más útiles para este fin [192]. Además, existe un problema con las proteínas solubles coaisladas (artefactos) que pueden distorsionar el análisis deseado. Sobre todo, hay que mencionar que el aislamiento, la cuantificación y la caracterización de las vesículas mediante la inmunocaptura de tetraspaninas específicas de las vesículas (CD9, CD63 y CD81) puede dar una visión incorrecta y distorsionar o no representar la realidad. Dado que la creación de vesículas es dinámica, incluido su contenido, las tetraspaninas pueden cambiar a lo largo del tiempo y tras una desregulación fisiológica y patológica [120,121]. Desgraciadamente, ninguno de los métodos actuales está adaptado a un entorno clínico rutinario [113,188,192–195]

1.3.3.1 Ultracentrifugación (UC)

La ultracentrifugación, sola o combinada con otras técnicas, es el método de separación más usado para el aislamiento de vesículas [190]. Esta técnica es un proceso de centrifugación optimizado para generar fuerzas centrífugas excepcionalmente altas (100000 g) y separar partículas según sus propiedades químicas como tamaño, densidad y forma. La ultracentrifugación diferencial separa las partículas en función de su tamaño y es adecuada para la extracción de VEs en varios fluidos corporales. Este método tiene como ventajas que es un procedimiento sencillo y de bajo costo. Sin embargo, las VEs aisladas con este método tienen una pureza baja debido a la agregación de proteínas y a la contaminación con lipoproteínas; y requiere de un alto volumen de muestra. Además de lo anterior, las desventajas de esta técnica son que los resultados obtenidos dependen del tipo de material biológico, del tipo específico de rotor y del tiempo de centrifugación, lo que dificulta las comparaciones entre diferentes experimentos [112,188].

La ultracentrifugación en gradiente se basa en el tamaño y la densidad de las vesículas; y es una combinación de centrifugación diferencial y centrifugación de densidad. El principio es que las VEs estarán suspendidas en líquidos de densidad o composición similar después de la centrifugación. Los disolventes más utilizados son principalmente la sacarosa y el iodixanol. Este tipo de técnica permite aislar VEs con una mayor pureza que la ultracentrifugación diferencial. Pero, este método aísla tanto microvesículas como exosomas de igual tamaño [113,193].

1.3.3.2 Ultrafiltración (UF)

La separación de exosomas por ultrafiltración es similar al principio de filtración tradicional, utilizando principalmente nano-membranas ultrafinas con diferentes cortes de peso molecular (MWCO) para separar vesículas extracelulares de diferentes tamaños. La ultrafiltración es especialmente adecuada para concentrar VEs que han sido aisladas por otros métodos como UC o SEC (del inglés *Size Exclusion Chromatography*), pero también puede utilizarse como técnica primaria de concentración de aislamiento de VEs [196]. Varios fluidos corporales y sobrenadantes de cultivos celulares se pasan secuencialmente a través de filtros para eliminar partículas pequeñas como restos celulares, proteínas libres y vesículas grandes como cuerpos apoptóticos, y recoger VEs de tamaño inferior a 200 nm. Esta técnica es sencilla

y rápida; pero puede dañar la membrana y la estructura de las VEs, obteniendo una muestra con poca pureza [113,123].

1.3.3.3 Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)

Esta técnica en los últimos años está ganando popularidad [190]. El principio de este tipo de cromatografía líquida, SEC, es la separación de partículas en solución en función de su radio hidrodinámico, mediante el paso de la muestra inicial a través de una columna llena de un material poroso (a base de polímeros o sílice), que representa la fase estacionaria. Las moléculas más grandes tendrán menos acceso al volumen de poros interno que las moléculas más pequeñas y, por lo tanto, se eluyen antes. Se han desarrollado varios protocolos para aplicar la SEC al aislamiento de VEs y, además, existen algunos kits comerciales como *SamartSEC Single for EV Isolation (System Biosciences)*. Las ventajas de esta técnica es que es rápida y no daña la integridad de las VEs. Sin embargo, es más costosa que la ultracentrifugación y precipita contaminantes como agregados proteicos o contaminaciones con albúmina o lipoproteínas [196].

1.3.3.4 Precipitación

Las técnicas de precipitación también pueden utilizarse para el aislamiento de VEs porque separan las vesículas de otros compuestos en función de su solubilidad. El método de precipitación utiliza principalmente polímeros altamente hidrofílicos para interactuar con las moléculas de agua alrededor de los exosomas para formar un microambiente hidrofóbico, permitiendo así que las VEs se depositen. Los polímeros hidrofílicos utilizados actualmente son principalmente el polietilglicol (PEG). El PEG aumenta el número de interacciones hidrofóbicas con las VEs y entre las VEs, lo que conduce a la exclusión del agua y a la formación de *pellets* de vesículas tras la incubación y centrifugación a baja velocidad [123,197]. En la actualidad existe una gran cantidad de kits comerciales, como *Exoquick™ (System Biosciences)*, *ExoGAG (Nasa-Biotech)*, entre otros. Este tipo de técnica se considera sencilla y rápida, y permite obtener un mayor rendimiento de VEs. En cambio, se ha observado que es difícil separar los polímeros de las VEs y otros agregados que precipitan; por lo que aumenta la probabilidad de contaminación en las muestras aisladas de VEs. Además, estudios funcionales muestran que esta representa una menor viabilidad celular, por lo que los componentes coaislados pueden ser tóxicos [188,192].

1.3.3.5 Captura por inmunoespecificidad

El método de inmunocaptura utiliza principalmente proteínas específicas en la superficie de los exosomas para su separación. Como se ha mencionado anteriormente, todos las VEs contienen algunas proteínas específicas y componentes de la membrana celular, por lo que pueden utilizarse para la inmunocaptura de estas partículas [192]. Esto incluye proteínas implicadas en el transporte y la fusión de membranas (GTPasas, anexas, flotilina), proteínas transmembrana (CD9, CD63, CD81, CD82), proteínas asociadas a lípidos y fosfolipasas; proteínas específicas de algún tipo celular, entre otras. Este método es sencillo y rápido. Sin embargo, se necesita un anticuerpo altamente específico, y que este marcador sea lo más estable posible ante diferentes situaciones fisiológicas debido a que las VEs son altamente dinámicas

[123]. Además, este método utiliza eluyentes con pH no fisiológico, por lo que inevitablemente se destruye la estructura fisiológica de las VEs y afecta a los posteriores estudios funcionales [192,197].

Una vez aisladas las vesículas, es importante evaluar y confirmar el método empleado en el aislamiento de estas partículas. Por ello, la ISEV recomienda el uso de diferentes técnicas complementarias de caracterización de vesículas como, por ejemplo, definir de forma cuantitativa la fuente de VEs (por ejemplo, número de células secretoras, volumen de fluido biológico, masa de tejido); determinar el número y tamaño de partículas mediante NTA (análisis de seguimiento de nanopartículas), TEM (microscopía electrónica de transmisión), citometría, ZetaView y/o la plataforma ExoView; y caracterizar el contenido vesicular para determinar la presencia de componentes asociados a los diversos subtipos de VEs y, así, descartar componentes coaislados importados tras el método de aislamiento [113].

Tabla 3. Resumen de las ventajas y desventajas de las diferentes técnicas de aislamiento de VEs [198].

Técnicas de aislamiento de VEs	Ventajas	Desventajas
Ultracentrifugación diferencial	Bajo coste Aislamiento de grandes volúmenes Ausencia de productos químicos adicionales	Baja pureza La eficiencia depende del tipo de rotor, de la fuerza g, de la viscosidad de la muestra
Ultrafiltración	Sencillo Preparaciones puras Sin limitaciones en el volumen de la muestra	Taponamiento del filtro Pérdida de la muestra Deformación de las vesículas Poca cantidad de proteínas exosomales
Cromatografía por exclusión de tamaño	Preserva la integridad de las VEs Alta sensibilidad y pureza Rápida Evita la agregación de VEs	Alto coste Con aislamiento de grandes agregados proteicos y lipoproteínas
Precipitación	Sencillo Sin necesidad de equipos adicionales Preservación de la integridad de las VEs	Alto coste Precipitación de impurezas Retención del polímero
Captura por inmunoadfinidad	Rápido Pureza y alta selectividad	Alto coste Disponibilidad de anticuerpos Los tampones de elución pueden dañar la actividad funcional de las VEs

1.3.4 Vesículas extracelulares y obesidad

En los últimos años, ha habido un auge de estudios sugiriendo que las VEs son actores clave en la comunicación, dentro y entre, de los órganos metabólicos en la homeostasis fisiológica, con probablemente una contribución importante en la alteración metabólica relacionada con la obesidad, la diabetes y las comorbilidades asociadas (173,174). Así, los trabajos de investigación en este campo están abriendo nuevas líneas de investigación centradas en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para la obesidad y las enfermedades relacionadas a través de las VEs liberadas por los órganos endocrinos implicados [111,199]. Sin embargo, el nivel de desarrollo y de conocimiento de las VEs y su papel en las enfermedades metabólicas es todavía incipiente comparado con el avance en otros procesos patológicos como el cáncer. En concreto, ya hay informes muy fascinantes que muestran la participación de las vesículas secretadas por TAB (tejido adiposo blanco) en la señalización de la insulina en las células hepáticas y musculares [110]. Además, estos estudios muestran como las VEs participan en un bucle proinflamatorio recíproco entre adipocitos y macrófagos que agrava la resistencia a la insulina (RI) local y sistémica [200,201], induce la desregulación de la vía del factor de crecimiento transformante beta en los hepatocitos [202], atrae a los macrófagos [203], regula el apetito y el peso a nivel central [204] o incluso participa en el cáncer relacionado con la obesidad [205]. Curiosamente, también se ha descrito la secreción de exosomas por parte del tejido adiposo marrón, especialmente tras la activación del TAP [206].

Ante lo anterior, es de gran interés obtener un mejor conocimiento de las VEs específicas para cada depósito de TA según su localización anatómica, ya que existe un claro papel de la distribución de la grasa corporal en las complicaciones metabólicas de la obesidad; siendo el TA visceral el que se considera más deletéreo [207]. Además, es necesario conocer mejor las vesículas específicas secretadas por los diferentes componentes celulares del TA, incluyendo las células inmunes que invaden este tejido en el desarrollo de la obesidad. Así, existe un interés en estudiar cómo estas vesículas permiten la comunicación intercelular cruzada que incluye señales de inflamación y la interacción de las células del TA con la matriz extracelular (MEC), la cual se ve característicamente afectada durante la obesidad [208]. De hecho, un mejor conocimiento sobre los antígenos y proteínas intracelulares liberados por las VEs derivadas del TA en condiciones fisiológicas, y su alteración en situaciones patológicas, puede aportar información relevante sobre esta vía alternativa de comunicación autocrina y paracrina. Además, las VEs liberadas por la TA pueden proporcionar biomarcadores no invasivos, y pueden revelar nuevas vías de acción terapéutica [209].

La función de las VEs está determinada en gran medida por su carga, por lo que sus antígenos de membrana y su carga molecular son cruciales para ejercer un efecto funcional sobre una célula/tejido objetivo. Bajo esta premisa, es vital caracterizar la composición de las VEs para dilucidar los cambios o alteraciones asociados a la fisiología de la célula de origen. A diferencia de otras células y tejidos, el análisis de la composición de las VEs desprendidas por el tejido adiposo en situaciones normales y patológicas es todavía escaso. Sin embargo, hay importantes avances en este campo, y varias publicaciones han descrito diferentes ARN no codificantes del tejido adiposo, como los microARN exosomales vinculados a la regulación metabólica a larga distancia; muchos de ellos secretados por las MSC [210,211]. En menor

medida, el análisis del proteoma de las VEs derivadas del tejido adiposo está en curso, ya sea en aquellas vesículas aisladas de explantes de tejido adiposo completo, o de aquellas secretadas por sus componentes celulares individuales (adipocitos, MSCs, macrófagos, etc.) (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen de las publicaciones relacionadas con la caracterización de la carga proteica de las VEs de tejido adiposo [176]. Se muestra la procedencia celular/tisular o circulante de las VEs estudiadas, la especie y los marcadores proteicos propuestos. ADSCs: células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo; l-VEs: vesículas extracelulares grandes; MSCs: células madre mesenquimales; SGBS: Síndrome de Simpson Golabi Behmel; s-VEs: vesículas extracelulares pequeñas.

	Tipo celular/tisular/ circulante	Especie	Marcadores de VEs
Cultivo de adipocitos	Adipocitos de la línea SGBS	Humano	FABP4, adiponectina, TNF α , MIF, RBP4
	Adipocitos primarios de mujeres con sobrepeso moderado	Humano	FABP4, adiponectina, metaloproteasas
	Adipocitos de la línea 3T3-F442A	Murino	Involucradas en la oxidación de ácidos grasos
	Adipocitos de la línea 3T3-L1	Murino	l-VEs: FABP4, anexina 2, endoplasmina, actina-4 s-VEs: FAS, adiponectina
	Cultivo primario de adipocitos de en condiciones de obesidad y diabetes	Rata	Caveolina, aquaporina-7
Cultivos adiposos derivados de MSCs	MSCs de grasa abdominal	Porcino	VEGF
	ADSCs	Ratón	Reparación tisular
Explantes de tejido adiposo	Sujetos bajo cirugía por aneurisma aórtico (obesos/sobrepeso)	Humano	MCP-1, IL-6, MIF
	Tejido omental de mujeres con diabetes gestacional	Humano	Proteínas relacionadas con el metabolismo de la glucosa
	Grasa inguinal	Rata	NPM3, DAD1
VEs circulantes	Plasma de pacientes con enfermedades vasculares	Humano	Cistatina C
	Plasma de pacientes con enfermedades metabólicas	Humano	Perilipina-1
	Plasma de sujetos con síndrome metabólico	Humano	Adiponectina, adiposina, quimerina, DDP4
	Plasma de sujetos obesos antes y después de la cirugía bariátrica	Humano	FABP4
	Suero de sujetos obesos	Murino	Adiponectina, resistina

1.3.4.1 VEs aisladas de componentes celulares individuales del tejido adiposo

1.3.4.1.1 Adipocitos primarios

Kranendonk y colaboradores publicaron un primer informe que describía el contenido proteico de los adipocitos humanos [200]. En su manuscrito, aislaron VEs de una línea celular diferenciada *in vitro* de adipocitos humanos del Síndrome de Simpson Golabi Behmel (SGBS), que es un complejo síndrome de sobrecrecimiento congénito. Dichas vesículas mostraron mediante inmunodetección ser portadoras de FABP4 (proteína de unión a ácidos grasos 4, adipocitaria) y adiponectina. Además, confirmaron la presencia de proteínas como el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α), el factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF), la proteína de unión al retinol 4 (RBP-4) y el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) [200]. Por otro lado, Rosina y colaboradores describieron a las VEs aisladas de cultivo primario de adipocitos marrones extraídos del TAP de ratones sometidos a estrés termogénico, y observaron que estas VEs contenían proteínas mitocondriales como PDHE1-B (piruvato deshidrogenasa beta, mitocondrial) [212].

1.3.4.1.2 Células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (ADSCs)

Eirin y colaboradores realizaron un análisis proteómico comparativo de las vesículas extracelulares aisladas de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo porcino [213]. En este trabajo, los autores describen que las proteínas enriquecidas en las VEs están relacionadas con una gran variedad de funciones biológicas como la angiogénesis, la coagulación sanguínea, la apoptosis, la remodelación de la matriz extracelular y la regulación de la inflamación. Por lo tanto, sugieren que las VEs tienen una carga proteica selectivamente enriquecida con una firma biológica específica que las ADSCs pueden utilizar para la comunicación intercelular con el fin de facilitar la reparación de los tejidos. Además, se ha publicado un análisis proteómico de los exosomas secretados por las ADSC para dilucidar su papel potencial como estrategia terapéutica para las lesiones tisulares [214]. En ese trabajo, se mencionan 1185 proteínas, muchas de las cuales participan en vías metabólicas, adhesión, regulación del citoesqueleto de actina, metabolismo microbiano y, lo que es más interesante, algunas pertenecen a vías de señalización relacionadas con la reparación tisular.

En un trabajo de investigación centrado en la relación de la obesidad con el cáncer, Lazar y colaboradores realizaron un análisis del proteoma de los exosomas de una línea celular de adipocitos murinos (3T3-F442A) diferenciada *in vitro*. La clasificación funcional de las 324 proteínas identificadas muestra que el proceso celular más representado era el metabolismo y el transporte, estando la mayoría implicados en el metabolismo de los lípidos [205]. Posteriormente, Durcin y colaboradores realizaron una caracterización detallada del análisis del proteoma de las vesículas pequeñas (sVEs) y grandes (IVEs) secretadas por una línea celular similar de adipocitos murinos (3T3-L1) [215]. Las vesículas aisladas mostraban marcadores de VEs como tetraspaninas (CD9, CD63, CD81), Alix, lactadherina, caveolina-1 y flotilina-2, estando la caveolina-1 y la flotilina-2 preferentemente en las VE grandes. Por otro lado, las VEs pequeñas estaban enriquecidas en Alix, ESCRT-I, TSG101 y las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81. Curiosamente, cada población vesicular secretada por los adipocitos se caracterizaba por contener un perfil proteico específico; mostrando así la presencia de 533 proteínas diferentes

entre las VEs pequeñas y grandes liberadas por los adipocitos. Cabe destacar que las VE grandes estaban enriquecidas en componentes de membranas, orgánulos y partes celulares en comparación con las VEs pequeñas, las cuales estaban enriquecidas en componentes de la matriz extracelular (MEC). Por último, y no menos importante, en esta investigación se seleccionaron marcadores proteicos específicos característicos de las IVEs de los adipocitos: FABP4, anexina A2, endoplasmina y actinina-4; y de las sVEs: FAS (sintetasa de ácidos grasos) y adiponectina [215].

En el aspecto patológico, la caracterización de los exosomas derivados de los adipocitos a partir de cultivos celulares primarios de ratas obesas diabéticas y no diabéticas realizada por Lee y colaboradores, mostró un perfil proteico diferente en las vesículas según el tipo de TA patológico [216]. Así, demuestran que las VEs desprendidas por el TA de ratas con resistencia a la insulina, obesidad, hipertensión, hiperinsulinemia e hiperglucemia contienen una presencia elevada de caveolina, lipoproteína lipasa y acuaporin-7 en comparación con las vesículas de ratas control [216].

Además de estos estudios en modelos celulares de adipocitos murinos, otros informes han mostrado el contenido proteico de VEs liberadas por cultivos de células madre mesenquimales humanas. Un análisis proteómico de las VEs secretadas por preadipocitos primarios, de tejido subcutáneo diferenciados a adipocitos, describió 884 proteínas y muchas de ellas estaban relacionadas con vías de señalización de procesos mediados por la membrana, lo que sugiere su participación en la comunicación entre tejidos [217].

1.3.4.2 VEs secretadas por explantes enteros de tejido adiposo

El análisis de VEs secretadas por explantes enteros de TA tiene desventajas ya que puede ser técnicamente complicado de manejar, y puede implicar un mayor riesgo de artefactos o contaminantes. Sin embargo, el aislamiento de VEs de TA entero fresco en cultivo es interesante porque comprende no solo las vesículas secretadas por los adipocitos maduros, sino también las liberadas por la fracción vascular estromal (SVF), incluidos los preadipocitos, las células endoteliales y también las células inmunitarias innatas y adaptativas, como los macrófagos y los linfocitos. Este enfoque puede ofrecer una visión más fisiológica y cercana a la realidad del TA, ya que se mantiene la estructura 3D del tejido y también se conserva la conversación intercelular cruzada [33].

Este enfoque fue estudiado por Kranendonk y colaboradores a partir de la caracterización del perfil de adipoquinas de las VEs liberadas por explantes humanos de TA subcutáneo y omental recogidos de sujetos delgados sometidos a cirugía por enfermedad aórtica aneurismática [200]. Mediante inmunoensayo, describieron no solo la presencia de adipoquinas conocidas (IL-6, MIF, MCP-1, adiponectina, resistina y RBP-4) en las vesículas desprendidas del TA, sino su variación según el tejido de origen [110].

Además, un interesante estudio analizó el perfil proteómico exosomal del TA en el contexto de la comunicación materno-fetal [214]. Así, muestran un análisis proteómico cuantitativo de exosomas aislados del secretoma del TA omental de mujeres embarazadas con tolerancia normal a la glucosa (TNG) en comparación con aquellas con diabetes mellitus gestacional (DMG). Además de observar que el número de vesículas era significativamente mayor en la

DMG que en la TNG, el estudio del proteoma muestra una expresión diferencial de las proteínas dirigidas a la vía de señalización de la sirtuina, la fosforilación oxidativa y la vía de señalización de la diana mecanística de la rapamicina en la DMG en relación con las VEs de mujeres con TNG [214].

Recientemente, también se han identificado nuevas adipoquinas a través de perfiles proteómicos de pequeñas VEs aisladas de tejido adiposo inguinal de rata. En este trabajo, describen tres nuevas adipoquinas vesiculares, nucleoplasmina-3, DAD-1 y metaloreductasa STEAP3, cuya expresión está alterada en animales obesos en comparación con los delgados [218].

1.3.4.3 Las VEs circulantes en la obesidad

En la actualidad existen pruebas sólidas sobre la existencia de vesículas secretadas por el tejido adiposo a nivel circulante [219,220]; por lo tanto, estas vesículas están vinculadas a la señalización metabólica como un sistema alternativo muy sofisticado y preciso de comunicación celular y tisular/hormonal. De manera importante, se ha demostrado que las VEs liberadas por el TA, participan en la comunicación entre órganos permitiendo al TA enviar mensajes a otros tejidos periféricos (hígado, músculo, páncreas, etc.), y también a nivel central a través de las áreas reguladoras de la ingesta de alimentos en el cerebro, ya que se ha descrito su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica [221]. Además, ahora está claro que las VEs desprendidas por el tejido adiposo pueden ejercer un papel crucial en la obesidad y sus comorbilidades asociadas, como la diabetes de tipo 2, la enfermedad vascular, la esteatosis hepática, la inflamación y el cáncer, entre otras; convirtiéndose en una atractiva fuente de biomarcadores de enfermedad a nivel circulante [111,222]. Resulta interesante la reciente y exponencial descripción de diferentes microARNs derivados de VEs que ejercen una regulación postranscripcional de los ARNm en las células/tejidos diana tanto a nivel fisiológico como patológico [69,223]. En un perfil de *microarray*, Ogawa y colaboradores identificaron 7000 ARNm en las VEs aisladas de adipocitos murinos 3T3-L1, entre estos, se hallaban transcritos específicos de adipocitos que codifican leptina, adiponectina, resistina, PPAR γ , FABP4 y C/EBPs [209,224]. Además, en ese trabajo, observaron que estas VEs de adipocitos eran capaces de transferir estas secuencias específicas a células diana como los macrófagos [224]. Diferentes pruebas de datos *in vitro* destacan la transferencia horizontal de microARNs de VEs liberadas de adipocitos a varias células receptoras [209]. Por ejemplo, Zhang y colaboradores demostraron que las VEs de TAB pueden participar en la polarización de los macrófagos a través de la entrega de miR-155 [225].

Varias evidencias demostraron la presencia de VEs de TA a nivel circulante; así, se describió la presencia de adiponectina y de resistina en vesículas aisladas en el suero de ratones tras ultracentrifugación [226]; y además, se identificó la adiponectina en VEs de plasma humano [227]. En relación con las enfermedades cardiovasculares, Kranendonk y colaboradores evaluaron la relación entre la cantidad, la distribución y los parámetros metabólicos del TA con los niveles plasmáticos de cuatro marcadores vesiculares asociados a esta patología. Además, investigaron la relación entre esos marcadores vesiculares y el síndrome metabólico, o la diabetes tipo 2 (DM2) incidente en pacientes con enfermedad

vascular; llegando así, a la conclusión de que la cistatina C de las VEs estaba relacionada positivamente con las complicaciones metabólicas de la obesidad, incluyendo la inflamación sistémica de bajo grado, los niveles bajos de colesterol HDL y el síndrome metabólico [228].

En un modelo de obesidad murino, se describió que la producción de VEs circulantes se incrementa durante la obesidad y se correlaciona con la intolerancia a la glucosa y la infiltración de macrófagos en el TA; y, lo que es más interesante, los autores describen la perilipina A (perilipina-1) como un biomarcador de VEs de tejido adiposo que puede detectarse por inmunodetección a nivel circulatorio [222]. En este manuscrito, demuestran que las VEs circulantes que contienen perilipina-1 aumentan en la obesidad murina y humana, estando también correlacionada con la resistencia a la insulina. Además, la cantidad de perilipina A en las VEs circulantes disminuyó significativamente tras la restricción calórica [222]. Además, estos mismos autores ampliaron estos resultados analizando las VEs en una cohorte de 203 sujetos con o sin factor de riesgo de enfermedades metabólicas. Sus resultados muestran varios hechos interesantes: que el número de VEs circulantes es significativamente mayor en los hombres que en las mujeres, y mayor en aquellos con la prueba de tolerancia a la glucosa oral alterada [219].

Precisamente, en relación con la obesidad, Amosse y sus colaboradores han mostrado el fenotipo de las VEs circulantes generales en el plasma recogido de pacientes con síndrome metabólico, y han descrito que las VEs aumentan significativamente con el IMC (Índice de Masa Corporal) y estas contienen adipoquinas derivadas del TA como el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) [220]. Por otro lado, Witczak y colaboradores analizaron las VEs circulantes prestando especial atención a los marcadores adipocíticos (adiponectina, FABP4 y PPAR γ) en pacientes obesos antes y después de la cirugía bariátrica [229]. En este estudio, encuentran que FABP4 vesicular aumenta al mes de la cirugía, volviendo a unos niveles basales paralelos a los niveles de la proteína soluble circulante a los 6 meses de la cirugía. Además, describen que aquellos pacientes que se sometieron a una derivación biliopancreática mostraron menos FABP4-VEs a los 6 meses en comparación con los que se sometieron a una gastrectomía en manga/banda, aunque ambos grupos de pacientes perdieron una cantidad similar de peso. Por lo tanto, en este estudio concluyen que esos cambios en la FABP4 circulante derivada de VEs y del plasma tras la cirugía bariátrica pueden representar alteraciones en la homeostasis del tejido adiposo [229].

Así, en este momento, las vesículas extracelulares están adquiriendo una enorme relevancia debido a su papel en la señalización celular, como vectores portadores de biomarcadores de la célula de origen incluyendo su desregulación patológica, y también por proporcionar nuevas opciones terapéuticas. Precisamente, el papel de las VEs liberadas por los tejidos endocrinos tardó cierto tiempo en emerger en comparación con otros sistemas celulares como en el sistema inmune o en patologías como el cáncer; sin embargo, el desarrollo de investigaciones relativas a las VEs en el contexto de la regulación metabólica ha aumentado significativamente en los últimos años. En consecuencia, actualmente no hay duda de las aplicaciones potenciales de las VEs para obtener una visión más profunda de la comunicación del tejido adiposo a nivel local y periférico/central. En la actualidad, existen varios informes que describen el ARN en las VEs desprendidas del TA [224,230]; en cambio, la descripción de la carga proteica de las VEs, no

ha sido paralela a esos estudios. Se puede concluir que el tejido adiposo refleja su estado metabólico y su desregulación a través de sus vesículas secretadas, que transportan no solo componentes de células adipocitarias, incluyendo adipoquinas bien conocidas como la leptina o la adiponectina, sino también marcadores de malignidad. Las investigaciones realizadas hasta el momento han demostrado que la obesidad se caracteriza por un mayor número de secreción de VEs que va en paralelo a nivel circulatorio [220]. Además, se puede afirmar que aquellos adipocitos sometidos a insultos metabólicos o procedentes del TA obeso desprenden un mayor número de VEs. Es importante destacar la proteína perilipina-1 como proteína específica de las VEs derivadas del TA que puede permitir discernir vesículas específicas de los adipocitos entre otras a nivel circulante [222].

Ahora es necesario obtener una imagen más amplia del papel funcional de las VEs derivadas del TA, incluyendo sus células/tejidos diana, y validar la presencia de esas vesículas en una cohorte razonable de pacientes para confirmar su valor como biomarcadores metabólicos. Un mejor conocimiento del papel funcional de las VEs liberadas por los tejidos alterados en la obesidad (tejido adiposo blanco y marrón, macrófagos inflamados, hígado, etc.), permitirá probablemente identificar posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de la obesidad y las enfermedades asociadas. Además, la selección de un panel de biomarcadores de VEs podría tener una gran aplicación a la clínica, siendo una herramienta muy útil en la consulta de obesidad. Dichas vesículas, fácilmente analizadas a nivel circulante de forma no invasiva, serían indicativas del tipo/cantidad de grasa acumulada (visceral vs. subcutánea), de la alteración del metabolismo adipocitario, de la eficacia del tratamiento de la obesidad (dieta/fármacos/cirugía), del nivel de inflamación, o de la aparición y seguimiento de comorbilidades (DM2, hígado graso, etc.). Por lo tanto, las VEs ofrecen un amplio abanico de nuevas posibilidades tanto para comprender mejor la desregulación de las señales en el desarrollo de la obesidad, y probablemente proporcionar nuevas dianas terapéuticas, como para monitorizar la enfermedad.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis que se plantea en la siguiente tesis doctoral es:

- Las vesículas extracelulares (VEs) liberadas por el tejido adiposo podrían participar en procesos patogénicos como el desarrollo de enfermedades metabólicas [111]. Un mejor conocimiento funcional y la caracterización del perfil molecular de estas vesículas en función de la situación fisiológica y patológica, así como la localización anatómica del tejido adiposo de origen (visceral vs subcutáneo; blanco vs pardo), podría ser de gran utilidad para conocer el papel de estas VEs en el desarrollo y mantenimiento de la obesidad, y su implicación en el desarrollo de las patologías asociadas (inflamación y resistencia a insulina, hígado graso, y cáncer entre otras); además de identificar nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de la obesidad y valorar la utilidad de los biomarcadores vesiculares para su uso en la práctica clínica.

Con esta hipótesis, los objetivos generales planteados en la presente tesis doctoral son los siguientes:

1. Aislar y caracterizar las VEs liberadas por el tejido adiposo en diferentes situaciones metabólicas y anatómicas, y su alteración con la desregulación metabólica asociada a la obesidad.
2. Estudiar el perfil proteómico de las VEs liberadas por el tejido adiposo humano y murino, y de adipocitos murinos bajo diferentes condiciones metabólicas (adipocitos con resistencia insulínica y/o hipertrofia por lípidos).
3. Entre las proteínas vesiculares identificadas en los estudios proteómicos, postular aquellas candidatas como posibles biomarcadores diagnóstico (adiposidad central/periférica, fenotipos metabólicos) o pronóstico (respuesta al tratamiento/riesgo de comorbilidades) de la obesidad, y valorar su papel como biomarcador mediante la correlación del perfil vesicular con parámetros clínicos de la enfermedad.
4. Estudiar el papel funcional de las VEs procedentes del tejido adiposo obeso sobre distintas células diana (adipocitos, macrófagos, hepatocitos, células de mama y melanoma) en el desarrollo y mantenimiento de la obesidad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ADQUISICIÓN DE MUESTRAS

3.1.1 Explantes de TA (tejido adiposo) y plasma humano

Las muestras humanas para esta tesis fueron recogidas bajo la línea de investigación: ‘Identificación de nuevas señales liberadas por el tejido adiposo humano y su implicación en la obesidad’. Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la Investigación de Galicia (código de registro: 2020/497) (**Anexo II**), y se llevó a cabo en base a los principios establecidos en la Declaración de Helsinki. Antes de la toma de muestra, todos los donantes firmaron un consentimiento informado (**Anexo II**) donde se detalla el objetivo principal de la línea de investigación.

3.1.1.1 Muestras de explantes de TA humano

Se obtuvo tejido adiposo visceral y subcutáneo humano de pacientes con obesidad mórbida sometidos a cirugía laparoscópica con IMC (Índice de Masa Corporal) más de >35 kg/m^2 en la Unidad de Tratamiento de la Obesidad ($n = 44$ pacientes independientes; 44 TAS, 44 TAV), y de pacientes con normopeso o con ligero sobrepeso ($\text{IMC} < 35$ kg/m^2) sometidos a colecistectomía o hernioplastia del Servicio de Cirugía General y Digestiva del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. El injerto visceral se extrajo de la región hipogástrica alrededor de los órganos internos, y el subcutáneo de la región mesogástrica. Los tejidos fueron transportados desde el quirófano al laboratorio en tampón salino estéril (PBS) con penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 $\mu\text{g/mL}$) (Biowest) para su posterior procesamiento. La cohorte de muestras usadas en los diferentes experimentos junto con los parámetros clínicos recogidos de rutina en la consulta de obesidad se observa en la Tabla 5. Los principales criterios de exclusión fueron: enfermedad sistémica grave no relacionada con la obesidad (enfermedad infecciosa, cáncer, nefropatía o hepatopatía grave), embarazo o lactancia, personas vegetarianas o sometidas a dietas irregulares, o pacientes con trastornos graves de la conducta alimentaria.

Tabla 5. Datos clínicos de los pacientes que donaron muestras de tejido adiposo humano para la realización de diferentes ensayos. Se observaron datos como el IMC (Índice de Masa Corporal), diabetes (DM2), glucosa basal (GLU), triglicéridos (TG), proteína C reactiva (CRP-ultra) y hemoglobina glicosilada (HbA1c). PRE-DM2: prediabético; NA: no aplica; OB: secretoma/VEs de TA obeso; NP: secretoma/VEs de TA control.

SUJETO	SEXO	AÑOS	IMC (kg/m2)	DM2	GLU (mg/Dl)	COLESTEROL (mg/dL)	TG (mg/dL)	CRP-ultra (mg/dL)	HbA1c (%)	ANÁLISIS
OB1	Mujer	47	46,02	PRE-DM2	82	162	120	0,837	6,2	ANÁLISIS PROTEÓMICO
OB6	Mujer	54	39,45	SI	115	123	87	0,213	6,4	
OB8	Mujer	58	62,58	SI	104	167	90	0,957	5,9	
OB9	Hombre	45	44,98	SI	78	158	112	1,54	5,7	PROLIFERACIÓN MCF10
OB10	Mujer	58	56,76	SI	132	96	122	1,6	6,7	
OB14	Mujer	56	45,49	PRE-DM2	103	263	95	NA	5,8	
OB19	Mujer	50	55,35	PRE-DM2	101	186	136	3,1	5,9	
OB21	Hombre	47	38,86	SI	149	125	89	0,073	7,9	
OB22	Mujer	55	47,66	SI	94	171	87	0,296	5,5	PROLIFERACIÓN MCF7
OB07	Mujer	43	35,04	NO	89	118	69	0,292	5,3	
OB19	Mujer	49	50,34	SI	125	198	322	1,72	5,9	
OB23	Mujer	53	56,2	PRE-DM2	75	111	79	0,353	5,4	
OB24	Mujer	29	49,76	NO	100	130	128	NA	5,2	
OB25	Mujer	48	45,52	SI	167	169	128	0,939	8,4	
OB40	Mujer	61	50,94	SI	186	157	338	1,381	6,9	
OB61	Mujer	54	39,99	SI	223	139	107	2,19	8,6	
OB62	Mujer	61	42,82	SI	114	241	502	0,103	7,0	
OB67	Mujer	47	55,09	NO	91	173	98	1,59	5,9	
OB40	Mujer	61	50,94	SI	186	157	338	1,381	6,9	PROLIFERACIÓN B16F1
OB61	Mujer	54	39,99	SI	223	139	107	2,19	8,6	
OB62	Mujer	61	42,82	SI	114	241	502	0,103	7,0	
OB67	Mujer	47	55,09	NO	91	173	98	1,59	5,9	
OB50	Mujer	39	51,86	NO	83	181	157	1,7	5,9	
OB69	Mujer	51	42,56	SI	126	159	134	0,06	5,2	INMUNODETENCIÓN (WB)
OB86	Mujer	30	31,58	SI	105	197	219	1,161	5,7	
OB2	Mujer	31	38,15	NO	84	181	93	0,633	5,2	
OB12	Hombre	44	38,28	SI	184	148	253	NA	7,2	
OB32	Hombre	56	59,72	NO	103	174	162	0,409	5,5	
OB33	Hombre	50	64,05	SI	121	186	88	2,02	6,5	
OB35	Mujer	43	46,08	NO	108	189	100	0,278	5,3	
OB39	Mujer	29	35,83	SI	109	196	181	0,584	5,8	
OB42	Mujer	58	42,92	NO	103	179	110	2,02	5,4	
OB44	Mujer	31	46,98	NO	86	157	97	0,87	5,3	
OB14 TAV	Mujer	56	45,49	PRE-DM2	103	263	95	NA	5,8	
OB18 TAS	Mujer	50	55,35	PRE-DM2	101	186	136	3,1	5,9	
OB20 TAV	Mujer	58	42,9	SI	124	158	125	1,995	6,5	
OB37 TAS	Hombre	44	44	NO	82	202	135	0,582	5,1	
OB45	Mujer	55	56,18	PRE-DM2	91	120	41	NA	5,8	
OB56	Mujer	55	50,7	NO	81	130	84	3,1	5	
NP2	Mujer	55	29,6	NO	108	250	215	NA	NA	
NP3	Hombre	53	25,2	NO	NA	NA	NA	NA	NA	
NP5	Hombre	77	25,8	NO	93	189	118	NA	NA	
NP6	Hombre	67	23,8	NO	116	251	99	NA	NA	
NP7	Mujer	69	26,5	NO	88	156	42	NA	NA	
NP12	Mujer	38	25,2	NO	83	243	101	NA	NA	
OB20	Mujer	58	42,9	SI	124	158	125	1,995	6,5	ELISA
OB31	Hombre	60	44,74	SI	105	155	129	NA	5,8	
OB37	Hombre	44	44	NO	82	202	135	0,582	5,1	
OB41	Mujer	47	40,51	NO	95	152	90	1,467	5,4	
OB55	Mujer	34	48,96	SI	82	177	80	1,5	5	
OB57	Mujer	56	36,47	NO	86	205	87	0,418	5,4	
OB41	Mujer	47	40,51	NO	95	152	90	1,467	5,4	EXOVIEW
OB47	Mujer	38	35,88	NO	85	116	89	0,003	5,1	
OB49	Mujer	61	45,49	SI	144	214	205	2,71	8,5	
OB50	Mujer	39	51,86	NO	92	181	157	1,7	5,9	
OB86	Mujer	30	31,58	SI	105	197	219	1,161	5,7	
OB87	Mujer	46	50,18	NO	84	175	53	1,381	5,4	
OB88	Mujer	41	51,51	NO	88	178	87	1,556	5,4	
OB93	Mujer	30	44,12	NO	80	187	143	0,243	4,9	
OB55	Mujer	34	48,96	NO	82	177	80	1,5	5	NTA
NP2	Mujer	55	29,6	NO	108	250	215	NA	NA	
OB57	Mujer	56	36,47	NO	86	205	87	0,418	5,4	TEM

3.1.1.2 Muestras de plasma humano

Estas muestras fueron recogidas a partir de la vena cubital en tubos Vacuette® de 4,5 mL con 3,2 % del anticoagulante de citrato de sodio para proceder posteriormente al aislamiento de VEs (86). Las muestras de plasma obeso ($n = 15$, Tabla 6) se obtuvieron de pacientes con obesidad mórbida ($IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$) en la consulta del investigador clínico de nuestro grupo, Martis Sueiro, del Servicio de Endocrinología de la Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela. Los criterios de inclusión fueron los mismos que los empleados en la recogida de explantes de TA (**apartado 3.1.1.1**). Las muestras de plasma de donantes control/delgados ($IMC < 27 \text{ kg/m}^2$) se recogieron a partir de voluntarios que se presentaron para donar sangre para este estudio ($n = 15$). Se seleccionaron aquellos que parecían con los obesos en edad y sexo (Tabla 6).

En el momento de recogida de las muestras, los tubos de citrato se invirtieron 3 veces y se procesaron antes de 1 hora y media después de la extracción de la muestra; hasta ese momento, se conservaron en posición vertical a temperatura ambiente. Estas muestras se centrifugaron a 2.500 g 15 minutos (Sorvall™ ST16, Fisher Scientific) para eliminar posibles restos celulares, y a temperatura ambiente para evitar la activación plaquetaria. Después, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio de 1,5 mL (Eppendorf Ibérica) y se volvió a centrifugar a 2500 g durante 15 minutos (Micro Start 17R, VWR) a temperatura ambiente, para eliminar las plaquetas; siguiendo así las recomendaciones de ISEV para obtención de VEs [113]. Estas muestras de plasma se guardaron a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior uso.

Tabla 6. Datos clínicos de los pacientes que donaron muestras de plasma para la realización de diferentes ensayos. Se observaron datos como el IMC (Índice de Masa Corporal), diabetes (DM2), glucosa basal (GLU), triglicéridos (TG), proteína C reactiva (CRP-ultra) y hemoglobina glicosilada (HbA1c). PRE-DM2: prediabético; NA: no aplica; OBp: VEs de plasma obeso, NPp: VEs de plasma control/normopeso.

SUJETO	SEXO	AÑOS	IMC (kg/m ²)	DM2	GLU (mg/dl)	COLESTEROL (mg/dL)	TG (mg/dL)	CRP-ultra (mg/dL)	HbA1c (%)	ANÁLISIS	
NPp7	Hombre	46	24,1	NO	NA	NA	NA	NA	NA	ELISA	
NPp8	Mujer	29	23,4	NO	NA	NA	NA	NA	NA		
NPp9	Mujer	38	21,4	NO	NA	NA	NA	NA	NA		
NPp10	Mujer	52	24,2	NO	NA	NA	NA	NA	NA		
NPp11	Hombre	28	22,0	NO	NA	NA	NA	NA	NA		
NPp12	Hombre	41	24,3	NO	NA	NA	NA	NA	NA		
NPp13	Mujer	34	22,7	NO	NA	NA	NA	NA	NA		
NPp14	Hombre	46	26,5	NO	NA	NA	NA	NA	NA		
NPp15	Hombre	60	26,3	NO	NA	NA	NA	NA	NA		
NPp16	Mujer	41	23,1	NO	NA	NA	NA	NA	NA		
NPp17	Hombre	58	22,8	NO	NA	NA	NA	NA	NA		
NPp18	Mujer	56	21,1	NO	NA	NA	NA	NA	NA		
NPp19	Mujer	53	18,3	NO	NA	NA	NA	NA	NA		
NPp20	Hombre	64	22,2	NO	NA	NA	NA	NA	NA		
OBp24	Hombre	62	59,2	NO	92	185	90	NA	5,5		
OBp25	Hombre	41	47,3	NO	87	160	120	0,835	5,5		
OBp26	Hombre	60	39,8	NO	85	174	93	NA	6		
OBp27	Mujer	54	46,6	PRE-DM2	104	141	102	NA	6,1		
OBp28	Hombre	27	46,7	PRE-DM2	73	212	232	0,85	5,9		
OBp29	Mujer	35	59,7	NO	99	188	74	NA	5,5		
OBp30	Mujer	53	37,4	NO	86	215	83	NA	5,6		
OBp31	Hombre	46	52,5	PRE-DM2	128	234	199	0,737	5,4		
OBp32	Mujer	37	47,8	NO	85	239	240	0,15	5,6		
OBp33	Mujer	41	49,7	SI	125	198	119	1,628	6,6		
OBp34	Mujer	30	42,9	NO	76	244	170	NA	NA		
OBp35	Hombre	64	41,5	SI	189	132	256	NA	7,9		
OBp36	Hombre	46	45,8	SI	106	214	293	0,935	6,2		
OBp37	Mujer	56	61,3	SI	140	160	159	NA	6,1		
NPp7	Hombre	46	24,1	NO	NA	NA	NA	NA	NA		NTA
OBp31	Hombre	46	52,5	PRE-DM2	128	234	199	0,737	5,4		

3.1.2 Explantes de TA del modelo animal: obesidad inducida por dieta en ratas

Para la obtención de VEs de explantes de TA en animales, primero, se estableció un modelo de obesidad inducido por dieta (DIO) en ratas (*Sprague-Dawley*). Este modelo de obesidad en roedores está bien descrito y establecido, y se asemeja al modelo de obesidad en humanos.

3.1.2.1 Aspectos éticos

Los procedimientos realizados con estos animales, en el proyecto con el código 15005/2015/003 del profesor Felipe Casanueva Freijo, fueron llevados a cabo bajo la supervisión del Comité Bioético de la Universidad de Santiago de Compostela (**Anexo II**) y de acuerdo con las directrices institucionales y las normas de la Unión Europea para el cuidado y uso de animales de experimentación (Ley Estatal 32/2007 del 7 de noviembre; Decreto 296/2008 del 30 de diciembre; Directiva 2010/53/UE del Parlamento Europeo y del Consejo del 22 de septiembre; Real Decreto 53/2013 del 6 junio; y Orden ECC/566/2015 del 20 de marzo). Por lo tanto, durante el desarrollo de este trabajo se ha implementado el ‘Principio de las 3 erres’ (Real Decreto 53/2013); es decir, reemplazo, reducción y refinamiento de los

procedimientos, y se ha tenido en cuenta el bienestar animal reduciendo el estrés, daño o dolor. Además, para poder manejar y realizar procedimientos con animales, me he acreditado con el certificado de realización de procedimientos y eutanasia (funciones B y C) en la especie *Rattus norvegicus* (Orden ECC/566/2015).

3.1.2.2 Diseño experimental

Para el desarrollo de este estudio, se adquirieron 40 ratas macho *Sprague-Dawley* (150-199 g) de 5 semanas de edad en el animalario central de la Universidad de Santiago de Compostela. Los animales se mantuvieron durante 7 días en el estabulario del CIMUS-USC (REGA ES150780275701) para permitir su aclimatación a las condiciones locales de temperatura (22-24 °C) y al ciclo de luz/oscuridad (12 h de luz, 12 h de oscuridad).

Después de la aclimatación, los animales se separaron aleatoriamente en dos grupos experimentales (n = 20/por grupo): control (peso normal) y obesos (DIO, del inglés *Diet Induced Obesity*) (Figura 13). Precisamente, los animales DIO fueron alimentados con una dieta alta en grasa (HFD, del inglés *High Fat Diet*): 60 % Kilocalorías (Kcal) de grasa, 20 % de Kcal de proteínas y un 20 % de Kcal de hidratos de carbono, con una densidad energética de 5,21 Kcal/g (D12492, Research Diets, NJ). En cambio, los animales del grupo control fueron alimentados con una dieta baja en grasa o estándar (LFD, del inglés *Low Fat Diet*) con un 10 % de contenido graso (D12450B, Research Diets, NJ) y, por lo tanto, con una densidad energética de 3,82 Kcal/g. Ambos grupos experimentales fueron alimentados *ad libitum* durante 9 semanas, y la ingesta de alimentos y el peso corporal se midieron semanalmente. Además, se midió la glucosa en ayunas a partir de sangre obtenida mediante una incisión en la cola una semana antes de la eutanasia utilizando el dispositivo Accu-check Performa (Roche). La eutanasia se llevó a cabo mediante la sobredosis de anestésicos por inyección intraperitoneal con Ketamina/Xilacina (KETAMIDOR, 100 mg/mL, Richter pharma ag; y ROMPUM, 20 mg/mL, Bayer).

3.1.2.3 Extracción de explantes de TA

Después de la confirmación de la eutanasia, se obtuvo tejido adiposo visceral, subcutáneo y pardo (Figura 13). El TAV se extrajo de la región hipogástrica alrededor de los órganos internos; el TAS de la región inguinal y el TAP de la región interescapular. Los tejidos se transportaron al laboratorio en tampón salino (PBS) estéril con penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 µg/mL) (Biowest) para su posterior procesamiento.

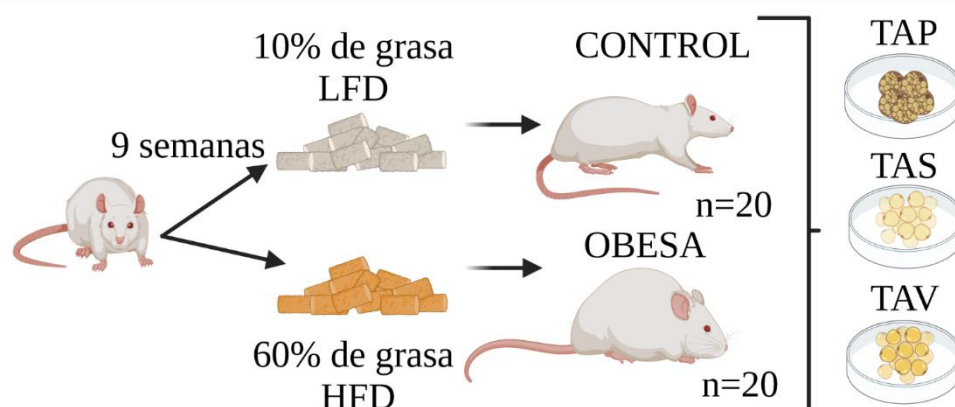


Figura 13. Diseño experimental de la adquisición de TAB (subcutáneo y visceral) y TAP de ratas control (dieta baja en grasas, LFD) y obesas (dieta alta en grasa, HFD) con un tamaño muestral $n = 20$ por grupo. Ratas macho de 5 semanas de edad se separaron en dos grupos: CONTROL ($n = 20$) y OBESAS ($n = 20$). Durante 9 semanas, las ratas obesas se alimentaron a base de una dieta rica en ácidos grasos (60 %); mientras que las controles se alimentaron a base de una dieta estándar (LFD) (REGA E5150780275701). Luego, estas fueron eutanasiadas mediante ketamina/xilacina para posteriormente extraer grasa parda (TAP) y blanca subcutánea (TAS) y visceral (TAV) (Creado con BioRender.com).

3.2 CULTIVOS CELULARES

3.2.1 C3H10T1/2

Las células madre mesenquimales murinas C3H10T1/2 fueron donadas por el Profesor Eduardo Domínguez Medina (Grupo Farmacología Aplicada al Descubrimiento de Fármacos, CIMUS-USC) [231]. Estas se cultivaron con medio de mantenimiento DMEM (4,5 g/L de glucosa, Lonza) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS, Sigma) y 1 % de penicilina/estreptomicina (P/S, Biowest) en placas de 100 mm (Corning) a 37 °C en una atmósfera del 5 % de CO₂. Para la realización de distintos ensayos, como la diferenciación adipocitaria, estas células se cultivaron en platos de 6 pocillos de 34,8 mm de diámetro (platos de 6 pocillos, Corning) con las mismas condiciones mencionadas antes.

3.2.1.1 Diferenciación adipocitaria

Como ya se sabe en la literatura, estas células fibroblásticas tienen la capacidad de diferenciarse a adipocitos bajo los estímulos adecuados [49,231]. Para ello, como se comentó en la introducción, las células después de 48 horas de alcanzar el 100 % de confluencia, detienen la proliferación (expansión clonal). En este momento bajo los estímulos adecuados (Figura 14), en este caso mediante un medio de diferenciación compuesto por DMEM (4,5 mg/L de glucosa, sin piruvato de sodio; Lonza) suplementado con un 10 % de FBS (Gibco) más 1 % de P/S (medio de diferenciación), junto con diferentes inductores de adipogénesis, como 1 μ M de dexametasona (DXM, Sigma), 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, Sigma), 1 μ M de rosiglitazona (Sigma) y 5 μ g/mL de insulina (ACTRAPID, NovoNordisk); comienza la diferenciación temprana de estos preadipocitos a adipocitos (día cero de diferenciación). Estos factores estimulan la diferenciación adipocitaria de la siguiente manera: la dexametasona (glucocorticoide) interacciona con los receptores para glucocorticoides en preadipocitos que activan la expresión de C/EBP δ y PPAR γ ; el 3-isobutil-1-metilxantina (inhibidor de fosfatasa) aumenta la concentración intracelular de AMPc e induce C/EBP δ ; la rosiglitazona

(tiazolidinedionas) es un agonista de PPAR γ que aumenta la sensibilidad a la insulina; y la insulina inhibe la lipólisis y mantiene la integridad de las gotas lipídicas [231]. Además, cada dos días después del inicio de la diferenciación, se refrescó el medio de diferenciación solo con la insulina. Se confirma este proceso de diferenciación cuando se observa el cambio morfológico y la acumulación de triglicéridos en forma de gotas lipídicas. Esto sucede al tercer o cuarto día desde el inicio del tratamiento. Se obtiene una adipogénesis homogénea y completa cuando los lípidos ocupan la mayor parte de la superficie del citoplasma, y esto sucede entre los días 7 y 10 del inicio del tratamiento de diferenciación [75,231].

3.2.1.2 Tratamientos de resistencia insulínica o hipertrofia adipocitaria

Como demuestran diferentes estudios, el estímulo prolongando con ácidos grasos (ácido palmítico-AP o ácido oleico-AO) en cultivos de adipocitos induce hipertrofia (sobrecarga de ácidos grasos), y genera además resistencia a insulina [96,232,233]. Además, el tratamiento de las mismas células con altas concentraciones de glucosa e insulina (HG/HI del inglés *High Glucosa and High Insulin*) inducen resistencia a la insulina (RI) [234]. De esta manera, establecimos modelos *in vitro* de hipertrofia adipocitaria y RI.

Concretamente, para establecer el modelo de hiperglucemia e hiperinsulina (HG/HI), se refrescó el medio sin insulina en el día 6 de diferenciación. En el día 8 de diferenciación, las células se lavaron 3 veces con PBS (sin calcio ni magnesio, Lonza), para ser tratadas a continuación con un medio sin FBS y bajo en glucosa (DMEM 1 g/L glucosa, Lonza) durante 2 horas (suero - deprivación). A continuación, las células se trataron con DMEM rico en glucosa (4,5 g/L, Lonza) e insulina (100 nM, ACTRAPID) durante 24 horas (Figura 14). Para el modelo de hipertrofia adipocitaria fue necesario preparar los ácidos grasos el día anterior a su uso: se preparó una solución de ácido oleico a 1 mM mediante la dilución de 1 M de ácido oleico (disuelto en etanol al 99 %) con 1 mM de hidróxido de potasio (KOH) y 0,5 mM de BSA sin AG (ácidos grasos); en el caso del palmitato, se preparó una solución 500 μ M a partir de una concentración madre de 50 mg/mL (diluido en metanol). Una vez conjugados, los ácidos grasos se guardaron a 4 °C hasta el día siguiente. El tratamiento se realizó en este caso a los 6 días de diferenciación; las células se trataron con 500 μ M de palmitato (Sigma) conjugado en DMEM (1 g/L de glucosa, Lonza) con 2 % de BSA (albumina de suero bovino) libre de ácidos grasos (Sigma) o con 1mM de ácido oleico (Sigma) conjugado con 0,5 mM de BSA libre de ácidos grasos (Sigma), en ambos casos durante 18 horas (Figura 14). Después del tratamiento, se realizaron lisados celulares para la obtención de proteína o extracción de ARN, tinción *Oil Red O*, u obtención de secretomas para el estudio de VEs, entre otros; para su posterior análisis.

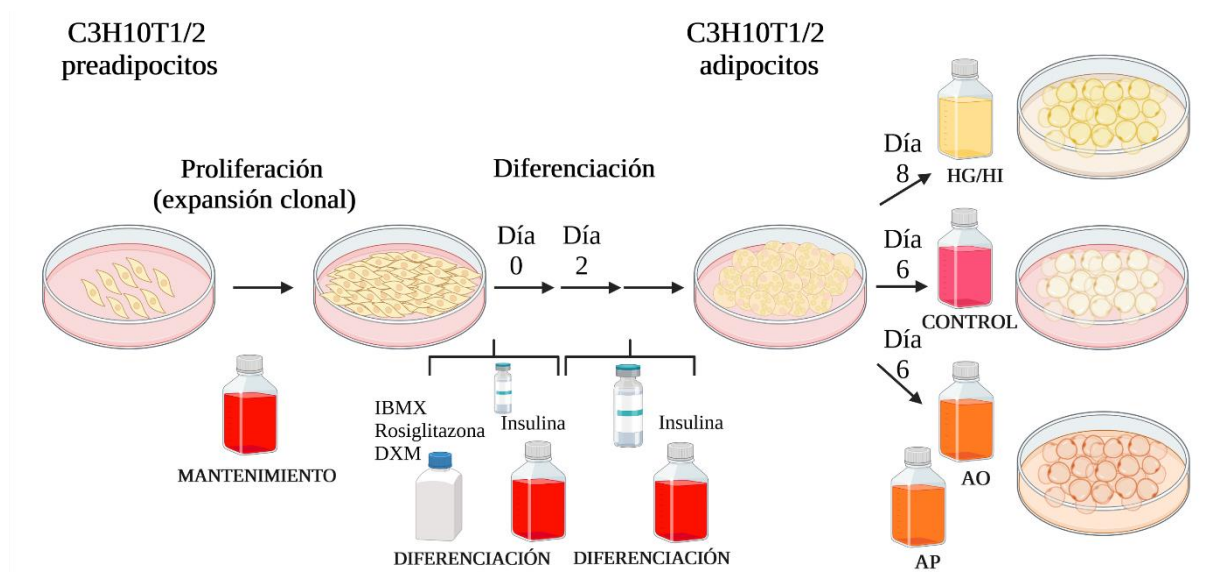


Figura 14. Diferenciación adipocitaria de las C3H10T1/2 mediante inductores de la adipogénesis y tratamientos con HG/Hi (alta glucosa/alta insulina) y ácidos grasos (palmitato-AP y oleico-AO). Una vez que los adipocitos están confluentes, se detiene la proliferación y bajo el estímulo de diferentes inductores adipogénicos (IBMX, DXM, insulina y rosiglitazona) se inicia la diferenciación (Día 0). Se estableció un modelo de hipertrofia lipídica con ácidos grasos o de resistencia a insulina mediante el tratamiento con alta glucosa/alta insulina (HG/Hi) siguiendo protocolos previamente establecidos en la literatura [232,234] (Creado con BioRender.com).

3.2.1.3 Análisis de sensibilidad a insulina

Una vez establecidos los modelos celulares con HG/Hi, palmitato u oleico, se determinó la sensibilidad a insulina. Para ello, las células fueron lavadas 3 veces en PBS para a continuación hacer un estímulo con insulina (100 nM) durante 10 minutos en medio DMEM bajo en glucosa (1 g/L de glucosa). Se cuantificó el grado de RI mediante la inmunodetección de la forma fosforilada de Akt (Cell Signaling) frente a la forma total de la proteína (Akt total).

3.2.1.4 Análisis de la captación de ácidos grasos mediante la tinción *Oil Red O*

El colorante *Oil Red O* tiñe las vacuolas lipídicas; y permite realizar estudios cualitativos y cuantitativos para observar el grado de acumulación lipídica [235]. Para ello, después de la diferenciación adipocitaria o tras los diferentes tratamientos, se siguió el siguiente protocolo. Las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído (4 %) durante 15 minutos. Después de lavarlas y permeabilizarlas 5 minutos con isopropanol al 60 %, las células se tiñeron con *Oil Red O* (Sigma) al 60 % (en H₂O miliQ) durante 10 minutos a 37 °C. A continuación, se lavaron 3 veces con H₂O miliQ, para eliminar el colorante no unido. Las células con los lípidos teñidos se observaron al microscopio para la obtención de imágenes. Para realizar un análisis cuantitativo, el colorante se eluyó mediante la incubación con isopropanol al 100 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbancia de este colorante a 520 nm en el lector de microplacas Epoch 2 (BioTek).

3.2.2 Otros cultivos celulares

La línea celular epitelial humana de mama no tumoral MCF10A, proporcionada por el Dr. Manel Esteller del Instituto de Investigación de la Universidad de Barcelona, se cultivó en

medio DMEM/F12 (1/1) (Lonza) complementado con 10 % de FBS (Sigma) y 1 % de P/S (Biowest), con 500 ng/mL de hidrocortisona (Sigma), 20 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (Life Technologies) y 10 µg/mL de insulina (ACTRAPID). En cambio, las células de adenocarcinoma de mama humano MCF7 (ATCC®) se cultivaron en DMEM (4,5 g/L de glucosa, Lonza) con un 10 % de FBS (Sigma) y 1 % de P/S (Biowest). Por otro lado, las líneas celulares murinas de macrófagos RAW 264.7 (ATCC®) y de melanoma B16-F1 (ATCC®) se cultivaron en DMEM (4,5 g/L de glucosa, Lonza) con un 10 % de FBS (Sigma) y 1 % de P/S (Biowest). Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5 % de CO₂.

3.2.3 Cultivo primario de hepatocitos murinos

Durante mi estancia en el laboratorio del Dr. Juan Manuel Falcón Pérez en el CICBiogune (Bilbao), tuve la oportunidad de establecer cultivos primarios de hepatocitos murinos [236,237]. Para ello, el grupo del Dr. Falcón, cumpliendo con las directrices institucionales y las normas de la Unión Europea para el cuidado y uso de animales de experimentación, obtuvieron los hepatocitos mediante la perfusión hepática de ratones macho C57BL/6 de 14 semanas de edad, y con un peso 20 gramos.

Los hepatocitos procedentes de la perfusión se resuspendieron en 100 mL de medio completo: DMEM (Gibco) con 10 % de FBS (Lonza) y 1 % P/S (Gibco), y se dividieron en 2 tubos de 50 mL para centrifugarse a 400 rpm (Sorvall™ ST16, Fisher Scientific) durante 4 minutos. El *pellet* se resuspendió en 30 mL de medio completo y 15 mL de Percoll (GE Healthcare) al 90 %, y se centrifugó a 500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, el precipitado de células de ambos tubos se pasó a un único tubo resuspendiéndolas en medio completo, y, se centrifugaron a 500 rpm durante 5 minutos 3 veces. Finalmente, el *pellet* de hepatocitos se resuspendió en 50 mL de medio completo para posteriormente analizar la viabilidad celular mediante la tinción *Trypan Blue* en portaobjetos (*Cell Counting Chamber Slides*, Invitrogen) para su recuento celular en el equipo Countess® (Invitrogen). Una vez obtenida la viabilidad de los hepatocitos, se sembraron 250000 células en placas de 9,2 cm² (Corning, ThermoFisher Scientific) previamente tratadas con colágeno (Sigma).

3.3 OBTENCIÓN DE SECRETOMAS

El secretoma es el conjunto de proteínas y moléculas secretadas al espacio celular por un órgano, tejido o línea celular. Dentro, de las diversas moléculas secretadas, se hallan las VEs. Así, para la obtención de VEs, se recogieron los secretomas de interés después de 48 horas siguiendo protocolos previos bien establecidos por el grupo [49,238]. Los secretomas fueron centrifugados a 300 g (Sorvall™ ST16, Fisher Scientific) durante 5 minutos, y el sobrenadante fue filtrado mediante un filtro con una membrana de PES de 0,22 µm (Biofil) para eliminar restos celulares y vesículas más grandes [113].

3.3.1 Secretoma de tejido adiposo

Las muestras de tejido adiposo (TA) tanto humano como de rata se procesaron siguiendo el protocolo de rutina del laboratorio (Figura 15) [49,239,240]. En primer lugar, los explantes completos de TA se lavaron varias veces con PBS (Lonza) para eliminar los restos de cualquier

contaminante. Además, con la ayuda de una hoja de bisturí de número 10 raspamos el tejido para romper los capilares sanguíneos y trozos del tejido que pudieran estar cauterizados. Después de esto, se cortó el tejido en fragmentos de 1 gramo, los cuales se transfirieron a un tubo con 25 mL de PBS (Lonza), y se centrifugaron durante 5 minutos a 300 g (Sorvall™ ST16, Fisher Scientific) a temperatura ambiente para eliminar los diferentes desechos celulares como los eritrocitos. Posteriormente, cada gramo de tejido se incubó en 5 mL de DMEM sin rojo fenol (bajo en glucosa, sin L-glutamina; Sigma), libre de suero, suplementado con 1 % de P/S (Biowest). El medio se renovó transcurridas 2 horas. Al día siguiente (24 horas después), se renovó el medio con 3 mL de medio fresco por cada gramo de tejido. Transcurridas 48 horas, se recogió el secretoma (3 mL por 1 gramo de tejido), y se centrifugó a 300 g durante 5 minutos (Micro Start 17R, VWR) y se filtró como previamente se ha descrito. Se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis.

Tejido Adiposo (TA)

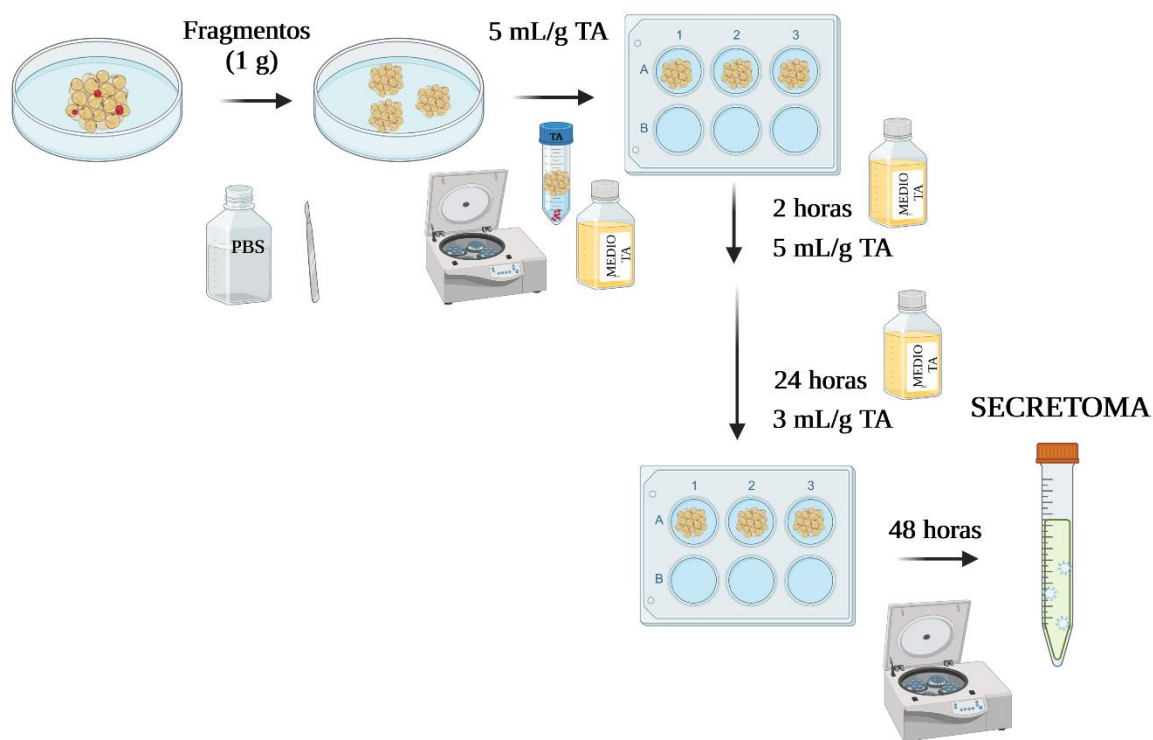


Figura 15. Procesamiento y recogida del secretoma del tejido adiposo (TA). Primero, los explantes de tejido adiposo se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar células sanguíneas u otros desechos. Luego cada gramo (g) de TA se incubó con 5 mL de medio (DMEM sin rojo fenol) durante 2 horas. Posteriormente, se refrescó el medio de cultivo. Pasadas 24 horas, se renovó el medio añadiendo 3 mL por cada gramo de tejido. Este se dejó durante 48 horas para la secreción de VEs. Finalmente, el secretoma de 48 horas se centrifugó y filtró antes de almacenarse a -80 °C (Creado con BioRender.com).

3.3.2 Secretoma celular

Para obtener el secretoma celular, se realizaron 3 lavados en PBS, y después se incubaron las células con medio de mantenimiento suplementado con 10 % FBS deplecionado de VEs (Gibco, Life technologies) y 1 % de P/S (Biowest). El medio de secreción se añadió con una densidad celular del 70 % de confluencia; y se obtuvieron 2 mL o 6 mL de secretoma a partir de pocillos de 34,8 mm de diámetro (platos de 6 pocillos, Corning) o de platos de diámetro de

100 mm (Corning), respectivamente. El secretoma de los adipocitos, C3H10T1/2 diferenciados, tratados con los diferentes tratamientos de AP (ácido palmítico), AO (ácido oleico) y HG/HI (alta glucosa e insulina), ya explicado en la **sección 3.2.1**, se obtuvo 48 horas después del inicio del tratamiento. Una vez recogido el secretoma, se centrifugó a 300 g durante 5 minutos (Sorvall™ ST16, Fisher Scientific) y se filtró como se ha descrito previamente. Las muestras se almacenaron a -80 °C para estudios posteriores.

3.4 AISLAMIENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

El método usado para el aislamiento de vesículas extracelulares (VEs) fue la ultracentrifugación diferencial [112,113,188,193]. Los secretomas se ultracentrifugaron en la centrífuga Beckman Coulter Optima™-100XP usando el rotor basculante SW41Ti y los tubos de 13,2 mL (*Thinwall Polypropylene Tubes*, 14 x 89 mm; Beckman Coulter); con un perfil de freno de aceleración y desaceleración de 9, y un factor *k*: 124. Para el aislamiento de VEs de TA (tejido adiposo), se ha partido de un volumen inicial de secretoma de 3 mL (procedente de la incubación de 1 gramo de TA) para cada tipo de tejido. En cambio, para el aislamiento de VEs a partir de cultivo celular se ha partido de 30 mL de volumen inicial para cada tipo de secretoma, los cuales se repartieron en 3 tubos de ultracentrifugación. El procedimiento llevado a cabo para el aislamiento de VEs fue el siguiente (Figura 16): a) se hizo una primera centrifugación de 10000 g durante 20 minutos a 4 °C para eliminar los posibles restos celulares y vesículas más grandes; b) el sobrenadante se pasó a otro tubo de centrifugación, y se ultracentrifugó a 100000 g durante 90 minutos a 4 °C; c) el sobrenadante se eliminó cuidadosamente por decantación y se guardó para posteriores estudios; por otro lado, el *pellet* (vesículas extracelulares) se resuspendió en 1 mL de PBS frío (Lonza) agrupándose aquellos tubos que pertenecían al mismo tipo de muestra; d) se añadió más PBS hasta alcanzar los 7 mL, y se volvió a ultracentrifugar a 100000 g durante 90 minutos a 4 °C; e) finalmente, el precipitado de vesículas extracelulares se resuspendió con cuidado en 60 µL de tampón de lisis (RIPA + 1 % de PIC + 1 % de PHIC) o tampón de fijación (2 % de paraformaldehído, PFA, Thermo Fisher Scientific); o 120 µL de PBS (Lonza), según el estudio posterior. Todo este procedimiento se llevó a cabo a 4 °C.

Las vesículas extracelulares liberadas en el plasma, se aislaron mediante ultracentrifugación diferencial, pero con algunos cambios en el protocolo anterior [193] (Figura 16). Como ya se indicó en el **apartado 3.1.1.2**, la sangre se centrifugó 2 veces a 2500 g durante 15 minutos. A partir de esto, se usó un volumen inicial de plasma de 2 mL que se combinó con 2 mL de PBS (Lonza), para evitar el colapso de los tubos de polipropileno. Este volumen se ultracentrifugó a 11000 g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se pasó a otro tubo y se centrifugó a 18000 g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante, se trasladó de nuevo a otro tubo, y se ultracentrifugó a 100000 g durante 120 minutos a 4 °C. Con cuidado, se eliminó el sobrenadante, y el precipitado donde se hallan las VEs, se volvió a ultracentrifugar a 100000 g durante 120 minutos a 4 °C. Finalmente, el precipitado de VEs se resuspendió, al igual que las VEs del secretoma, en 60 µL de tampón de lisis o 120 µL de PBS (Lonza).

Las VEs resuspendidas en tampón de lisis se usaron para ensayos proteómicos, inmunodetección *Western Blot* o *Elisa*, entre otros. Así, para el estudio de proteínas, las VEs se lisaron mediante ruptura mecánica de la membrana vesicular mediante el equipo TissueLyser

II (Qiagen), con una frecuencia de 30 Hz y durante 2 minutos en frío y en tubos de 2 mL (Eppendorf). Posteriormente, se centrifugaron (Micro Start 17R, VWR) a 17000 g durante 10 minutos a 4 °C para eliminar los restos de membrana. El sobrenadante, que sería mayoritariamente proteínas de las VEs, se trasladó a otro tubo nuevo de 1,5 mL para ser almacenado a -80 °C para posteriores estudios. Las VEs resuspendidas en 2 % de PFA se usaron para la caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *Transmission Electron Microscopy*).

Las VEs que se resuspendieron en PBS se usaron principalmente para observar su concentración y tamaño mediante dispersión de la luz (NTA, del inglés *Nano Tracking Analysis*) o para estudios funcionales. Para los estudios funcionales, los materiales usados (PBS, tubos, el secretoma, y el resto de material empleado como puntas serológicas) y el aislamiento, se hizo en condiciones de esterilidad.

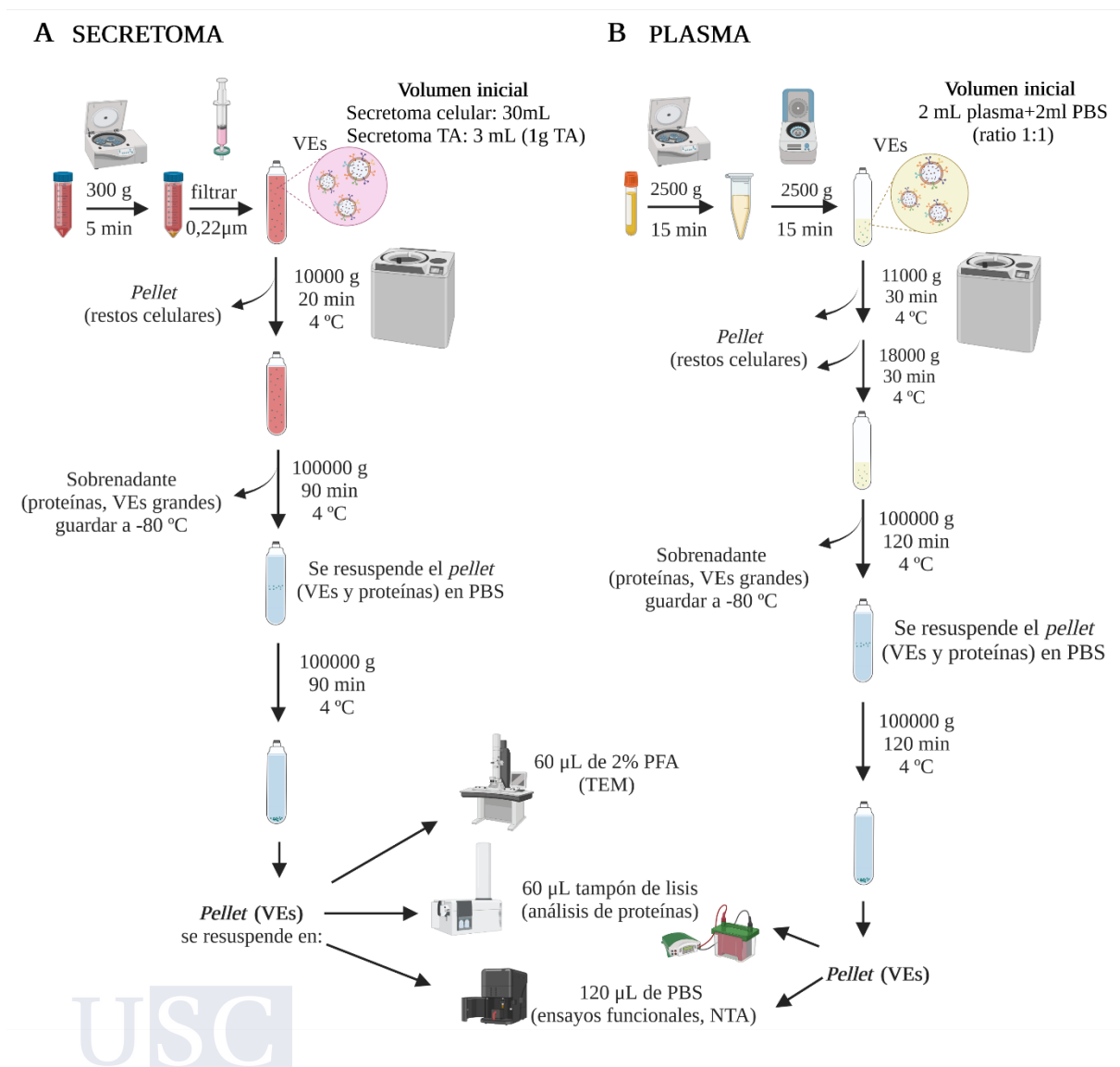


Figura 16. Aislamiento de VEs a partir de ultracentrifugación de las muestras de secretoma celular y de secretoma (A), y de plasma (B). Previamente, el secretoma recogido de explantes de tejido adiposo (3 mL por gramo de TA) y de cultivo celular (30 mL) fue centrifugado 5 minutos a 300 g y filtrado mediante membranas de PES de 0,22 µm. Luego, se hicieron ciclos de ultracentrifugación (10000 g durante 20 minutos, 100000 g durante

90 minutos, 100000 g durante 90 minutos) a 4 °C para la obtención de VEs (A). En cambio, las muestras de plasma (2 mL), previamente centrifugadas (2 ciclos de 2500 g durante 15 minutos) se diluyeron con PBS (ratio 1:1); primero se realizaron centrifugaciones de 11000 g durante 30 minutos y de 18000 g otros 30 minutos. Luego este sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se hicieron 2 ciclos de ultracentrifugación a 100000 g durante 2 horas a 4 °C (B). En ambos casos (A, B), el *pellet* de VEs se resuspendió en tampón de lisis, PFA (paraformaldehído) o PBS según el análisis posterior (Creado con BioRender.com).

3.5 CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Uno de los puntos importantes en el estudio de las vesículas extracelulares (VEs) es saber con certeza que lo que estamos analizando son VEs y no contaminaciones proteicas; por este motivo es importante caracterizar la naturaleza y composición de las partículas. La ISEV recomienda usar al menos dos técnicas diferentes a la hora de caracterizar las muestras [113]. En este apartado se detallan las técnicas de caracterización utilizadas en esta tesis: microscopía electrónica, seguimiento de nanopartículas y Exoview. En el **apartado 3.9.2**, se describe una cuarta técnica que es la inmunodetección.

3.5.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión, TEM (del inglés *Transmission Electron Microscopy*), es uno de los métodos de imagen por excelencia para el estudio de VEs. Debido a su alta resolución, este permite determinar la morfología y el tamaño de manera individual. En este trabajo, este análisis se realizó mediante inmunomarcaje de acuerdo con lo descrito anteriormente por Thèry y colaboradores [112] en el Servicio de Microscopia de la Universidad de Santiago de Compostela (USC). Primero, el *pellet* de VEs obtenido de la ultracentrifugación se resuspendió en paraformaldehído al 2 % (Figura 16). Una vez fijadas, se depositaron 5 µL en rejillas de microscopía electrónica recubiertas de película de carbón (Formvar, Gilder-Grids), y se dejaron secar al aire durante 1 hora. Después, se lavaron las rejillas tres veces con PBS (Lonza), y se incubaron 10 minutos con 0,1 M de glicina (Sigma) a temperatura ambiente. A continuación, las rejillas se incubaron con 1 % de BSA (Sigma) en PBS (Lonza) durante 10 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo primario (CD9; 1:10) se diluye en 1 % de BSA (Sigma), y a continuación, se añadió una gota de 5 µL sobre la rejilla para dejar incubando durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, el exceso de anticuerpo se eliminó lavando las rejillas con PBS (Lonza) con 1 % de BSA (Sigma). Luego, el anticuerpo secundario (*anti-mouse*) marcado con oro se incubó durante 1h a temperatura ambiente. El exceso de este anticuerpo también se eliminó lavando las rejillas seis veces con PBS y 1 % de BSA. A continuación, las rejillas se incubaron con 1 % de glutaraldehído durante 5 minutos tras los cuales se hicieron varios lavados con agua destilada. Luego, las rejillas se incubaron con oxalato de uranilo a pH 7 durante 5 minutos y, posteriormente, se contrastaron con una mezcla de 4 % de acetato de uranilo y 2 % de metilcelulosa durante 10 minutos en hielo. Las rejillas se secaron al aire y se visualizan utilizando el microscopio electrónico de transmisión JOEL JEM 1010.

3.5.2 Nano Tracking Analysis (NTA)

El análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) permite una determinación rápida del tamaño y del número de partículas que se encuentran en una muestra en suspensión mediante la dispersión de la luz y del movimiento browniano de dichas partículas en suspensión [241].

Como ya se ha descrito en el **apartado 3.4**, el precipitado de VEs se resuspendió en 120 μ L de PBS para este análisis. Dichas muestras (Tabla 7), se diluyeron en agua miliQ y se inyectaron mediante una jeringa de 1 mL (BD, Plastipak) en el equipo Malvern NanoSight NS300 (v3.3 Malvern Panaytical) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como control negativo, se usó agua miliQ. Cada análisis de la muestra se realizó durante 60 segundos haciendo cinco mediciones utilizando la configuración de análisis automático NanoSight. El límite de detección se estableció en 4, el nivel de la cámara en 14, la velocidad de la bomba de la jeringa en 40, con un obturador deslizante de 1256 y la ganancia del deslizado de 366.

Tabla 7. Muestras analizadas por NTA (*Nano Tracking Analysis*), y diluciones empleadas. Se analizaron las VEs aisladas del secretoma de TAS y TAV (grasa subcutánea y visceral) de obesos (OB) y normopeso/control (NP); y, además, las VEs obtenidas del plasma de donantes obesos (OBp) y normopeso/control (Npp). También, se caracterizaron las VEs aisladas de los adipocitos murinos (C3H10T1/2), las VEs de los tratamientos de HGHI, AP (ácido palmítico) y AO (ácido oleico); y las VEs liberadas por el TAP (TA pardo), TAS y TAV de ratas CONTROL y DIO (obesidad inducida por dieta).

MUESTRAS	DILUCIÓN
OB55 -TAS	1:50
OB55-TAV	1:100
NP2-TAS	1:50
NP2-TAV	1:50
OBp31	1:10
Npp8	1:10
VEs de C3H10T1/2 DIFERENCIADAS	1:100
VEs de C3H10T1/2 DIFERENCIADAS + HGHI	1:100
VEs de C3H10T1/2 DIFERENCIADAS + AP	1:100
VEs de C3H10T1/2 DIFERENCIADAS + AO	1:100
VEs de TAS de rata CONTROL	1:25
VEs de TAV de rata CONTROL	1:25
VEs de TAP de rata CONTROL	1:25
VEs de TAS de rata DIO	1:25
VEs de TAV de rata DIO	1.25
VEs de TAP de rata DIO	1:25

3.5.3 Aislamiento y caracterización de VEs mediante ExoView®

ExoView® (Unchained Labs, USA) es una nueva herramienta que proporciona de forma automatizada mediciones completas del tamaño, número de partículas, el fenotipo y la colocación de diferentes biomarcadores por fluorescencia en vesícula única. La plataforma ExoView proporciona una solución para la caracterización multiparamétrica de VEs individuales. Con ExoView, se puede realizar un análisis de una sola vesícula para determinar el tamaño y el perfil proteico de las VEs individuales. El núcleo de esta tecnología se encuentra en la inmunocaptura específica de VEs. Un chip ExoView captura específicamente exosomas a través de un chip de *microarray* funcionalizado con anticuerpos. Las proteínas específicas vesiculares se unen a los correspondientes anticuerpos del chip, por lo que esta tecnología evita

la contaminación con lipoproteínas. ExoView analiza las VEs mediante la interferencia de luz visible (interferometría) para medir el tamaño y la fluorescencia para el análisis de proteínas.

Concretamente, los chips están tallados con anticuerpos de captura contra las tetraspaninas como CD81, CD63 y CD9 (3 áreas por anticuerpo), y además se puede personalizar la captura con diferentes proteínas de interés como puede ser CD41 para plaquetas, o en nuestro caso, perilipina-1 para aislar las VEs que provienen de la grasa [242]. La muestra (50 μ L diluida) se incubaba directamente durante una noche en los chips, sin necesidad de aislar previamente las VEs. Después de la captura de las VEs en el chip, se puede observar y colocalizar diferentes proteínas de membrana o intravesiculares mediante inmunofluorescencia debido a la posibilidad de excitación a 488 nm, 555 nm, 640 nm y 750 nm (4 canales) (Figura 17).

En la Tabla 8 se detalla los diferentes kits, anticuerpos de captura, anticuerpos de fluorescencia, tipo de muestras y diluciones empleadas. Las diluciones se hicieron a partir de la concentración de partículas/mL obtenida en el NTA, siendo lo óptimo, según el fabricante, incubar 10^9 partículas por chip. Cada kit contiene 16 chips (tallado con los anticuerpos de captura o personalizable), distintas soluciones y los anticuerpos de detección anti-tetraspaninas, anti- CD9 (Alexa Fluor® 488), anti-CD81 (Alexa Fluor® 594) y anti-CD63 (Alexa Fluor® 647). Se ha seguido el protocolo del fabricante que se describe a continuación de forma resumida.

3.5.3.1 Kits de marcaje de fluorescencia

Antes de la caracterización mediante ExoView, los anticuerpos frente a las proteínas de nuestro interés (Tabla 8) se marcaron con diferentes kits de conjugación de fluoróforos dependiendo del campo de excitación. Se usaron los kits de conjugación Alexa Fluor® 488 - Lightning-Link® (Abcam), Alexa Fluor® 594 - Lightning-Link® (Abcam), Alexa Fluor® 647 - Lightning-Link® (Abcam) y DyLight® 755-Lightning-Link® (Abcam). Estos kits proporcionan un procedimiento rápido y sencillo para el marcaje covalente de anticuerpos dirigiéndose a grupos aminos primarios (como por ejemplo las lisinas). Se siguió el protocolo proporcionado por la casa comercial. En primer lugar, se equilibraron todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso. Después, se añadió un 1 μ L del reactivo *Modifier* por cada 10 μ L de anticuerpo (10 μ g) y se agitó suavemente. Previamente, para conseguir esta concentración de anticuerpo (1 mg/mL), se concentró el anticuerpo mediante el uso de unidades de filtración por centrifugación (Amicon® Ultra-0,5 mL 3K, Millipore) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Luego, la mezcla de anticuerpo más *Modifier* se transfirió al vial de la mezcla de conjugación, el cual está liofilizado; y se resuspendió cuidadosamente. Esta mezcla se dejó en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de este tiempo de incubación, se añadió 1 μ L del reactivo *Quencher* por cada 10 μ L de anticuerpo usado inicialmente. El anticuerpo conjugado con el fluoróforo se guardó a 4 °C en oscuridad.

3.5.3.2 ExoView por captura de tetraspaninas

Tras atemperar todos los reactivos empleados a temperatura ambiente, los chips se escanearon para medir la señal de fondo (pre-escaneado). A continuación, los chips se colocaron en placas de 12 pocillos (Corning) para añadir 50 μ L de cada una de las muestras diluidas en tampón de incubación provisto en el kit, tanto para el secretoma de células como de

TA (Tabla 8); se pipetearon cuidadosamente en distintos chips sin tocar la superficie de estos y se incubaron durante toda la noche sin agitación. Al día siguiente, se hicieron 4 lavados con solución A (provista en el kit) de 3 minutos cada uno de ellos en agitación. Para observar el cargo proteico en el interior de las VEs, se fijaron las VEs capturadas en el chip mediante una solución C (provista en el kit) durante 10 minutos, y posteriormente se permeabilizó la membrana de las VEs mediante una solución D (provista en el kit) durante 10 minutos en agitación. A continuación, se hicieron otros 4 lavados con la solución A de 3 minutos en agitación. Después, se diluyeron los anticuerpos marcados con el fluoróforo (tanto los provistos en el kit como los marcados en el **apartado 3.5.3.1**) en una solución de bloqueo (provista en el kit). Se incubaron 250 μL /chip de la mezcla de anticuerpos con marcaje fluorescente (0,6 μL /chip de anticuerpo en el caso de detección de proteínas de membrana, y 1,5 μL /chip de anticuerpo para detectar proteínas del interior de las VEs) diluidos en el tampón de bloqueo (provisto en el kit) en oscuridad durante una hora con agitación suave. Después de la incubación con los distintos anticuerpos, se realizó un lavado con solución A. Luego, se hicieron 4 lavados con la solución B (provista en el kit) de 3 minutos en agitación. A continuación, los chips se lavaron con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. Una vez secos, estos se escanearon y los resultados fueron analizados en el software provisto con el equipo ExoView® Software Suite.

En aquellos casos que se analizaron proteínas de membrana en las VEs, se omitió el paso de fijación y permeabilización; se lavaron los chips directamente con solución A 4 veces, y se incubaron con los anticuerpos marcados. A continuación, se siguió con el protocolo ya descrito.

3.5.3.3 ExoFlex

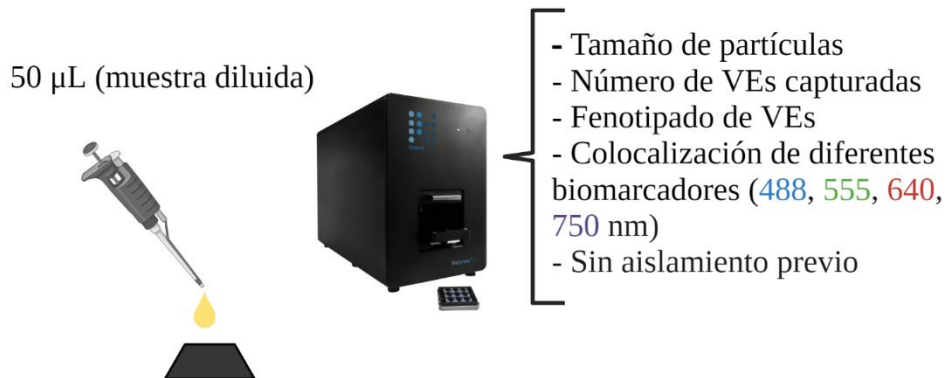
Los kits ExoFlex™ permiten capturar exosomas de forma totalmente personalizable, ya que se puede conjugar al chip diferentes anticuerpos contra proteínas de interés en el propio laboratorio. Al igual que con los kits de tetraspaninas, se puede observar el tamaño, número de partículas capturadas por cada anticuerpo, y cuántas de estas proteínas son positivas para diferentes biomarcadores/proteínas de interés y su colocalización (Figura 17).

Este kit provee el material necesario para la conjugación del anticuerpo de captura en el chip. Previamente, se equilibró el kit a temperatura ambiente. Primero se preparó la conjugación del anticuerpo, por lo que 80 μL de anticuerpo (0,5 mg/mL) de captura (Tabla 8) se mezclaron con 8 μL de reactivo *Modifier* (provisto en el kit) en un agitador de vórtice. A continuación, esta mezcla se pipeteó en el vial del *Linker* (provisto en el kit) y se incubó 45 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Luego, para detener la reacción, se añadieron 8 μL de *Quencher* (provisto en el kit) y se dejó la reacción durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez conjugados los anticuerpos al *linker*, estos se diluyeron 1:100 en la solución A (provista en el kit); en concreto se usaron 35 μL de esta dilución por chip, que se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Después, los chips se lavaron con la solución A y B (provistas en el kit); y finalmente en agua destilada. A continuación, se secaron a temperatura ambiente, y una vez secos se hizo un pre-escaneado. Después de medir el fondo, se continuó con la incubación de la muestra y con el resto del protocolo descrito en el **apartado 3.5.3.2**.

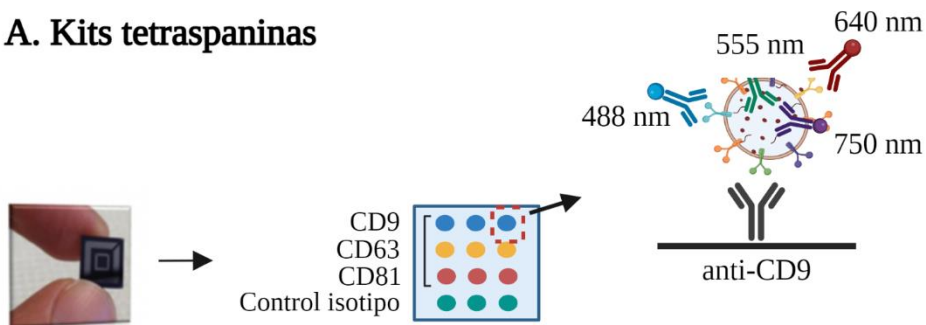
Tabla 8. Tipo de kits y muestras utilizadas en el análisis por ExoView®. Se analizaron las VEs en muestras de secretomas celulares, de TA de ratas y de humanos mediante kits ExoView de captura basada en tetraspaninas CD9, CD81 y CD63. También, se caracterizaron las VEs liberadas por el TA mediante kits ExoFlex usando como anticuerpos de captura para TA anti- caveolina-1 y perilipina-1. AB: anticuerpo; AF: Alexa Fluor; REF: referencia; TAS: tejido adiposo subcutáneo; TAV: tejido adiposo visceral; TAP: tejido adiposo pardo.

NANOVIEW (KIT REF)	AB CAPTURA	AB DETECCIÓN/ BIOMARCADOR DE FLUORESCENCIA	TIPO DE MUESTRA	DILUCIÓN
NAVEV- TETRA-M2: TETRASPANINAS RATÓN	CD9, CD81	Conjugados: Mimecan (AF® 488) Ceruleoplasmina (AF® 594) TGFBI (AF® 647)	16 chips: Secretoma de adipocitos diferenciados murinos (C3H10T1/2), modelos HGHL, AP y AO (n = 4)	1:100
NAVEV- TETRA-M2: TETRASPANINAS RATÓN	CD9, CD81	Provistos en el kit: CD9 (AF® 488) CD81 (AF® 594) CD63 (AF® 647) Conjugados: CAV-1 (AF® 488) FABP4 (AF® 594) UCP1 (AF® 647)	24 chips: Secretoma de TAS, TAV, TAP de ratas obesas y control (n = 4)	1:25
NAVEV- TETRA-C: TETRASPANINAS HUMANO	CD9, CD63, CD81	Conjugados: Mimecan (AF® 488) Perilipina-1 (AF® 594) TGFBI (AF® 647)	8 chips: TAS y TAV (Tabla 5) (n = 4)	1:50 (TAS) 1:100 (TAV)
NAVEV- TC FLEX: EXOFLEX HUMANO	CD9, CD63, CD81 Personalizable: Caveolina-1 Perilipina-1	Conjugados: CD9 (AF® 488) Sintenina-1 (AF® 594) TGFBI (AF® 647) Mimecan (DyLight® 755)	8 chips: TAS y TAV (Tabla 5) (n = 4)	1:50 (TAS) 1:100 (TAV)

ExoView



A. Kits tetraspaninas



B. Kits ExoFlex

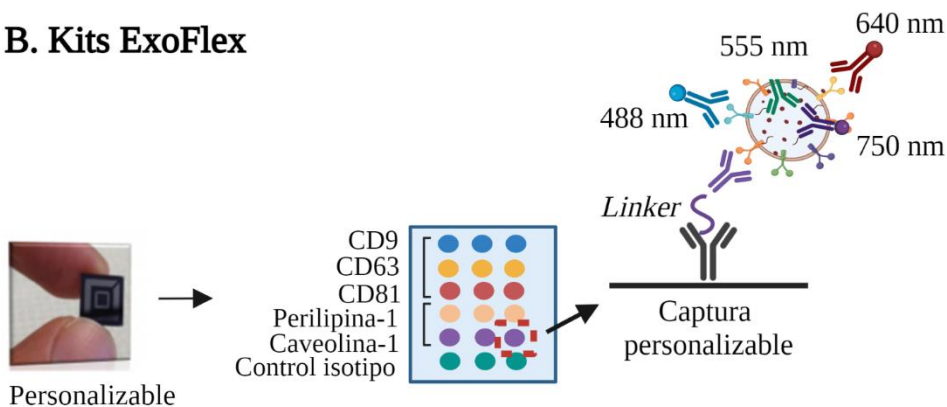


Figura 17. Aislamiento y caracterización de VEs por ExoView® a partir de secretoma de tejido adiposo (TA) y de cultivo celular. 50 μ L de secretoma diluido (Tabla 8) se incuban en el chip toda la noche a temperatura ambiente para el día siguiente hacer el análisis. Los chips contienen anticuerpos de captura específicos de exosomas (tetraspaninas), como las tetraspaninas CD9, CD81 y CD63 (A), o con la captura personalizada mediante la conjugación del anticuerpo de interés con un *linker* (caveolina-1 y perilipina-1) (B). Cada chip contiene cada anticuerpo de captura por triplicado. Una vez capturadas las VEs, se puede observar el tamaño, número de VEs capturadas, y el fenotipo y la colocalización de diferentes biomarcadores, tanto de membrana como intravesiculares; mediante la incubación con anticuerpos fluorescentes que se excitan en diferentes longitudes de onda (488, 555, 640 y 750 nm) (Creado con BioRender.com).

3.6 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

3.6.1 Lisis de proteínas

Los extractos proteicos celulares/tejido y de VEs se obtuvieron a partir de la lisis con el tampón RIPA [Tris 200 mM (pH 7,4), NaCl 130 mM, glicerol al 10 % (v / v), SDS (dodecilsulfato sódico) 0,1 % (v /v), Triton X-100 al 1 % (v / v), MgCl₂ 10 mM (Sigma)], suplementado con 1 % de inhibidores de proteasas (PIC, *Protein Inhibitor Cocktail*, Sigma) y de fosfatasas (PHIC, *Phosphatase Inhibitor Cocktail*, Sigma); siguiendo el protocolo establecido en nuestro grupo [75]. Previamente, las células se lavaron 3 veces con PBS (Lonza), y se incubaron durante 15 minutos con el tampón de lisis (100 µL en cada pocillo de una placa de 6 pocillos) a 4 °C. Después, los lisados celulares se transfirieron a tubos de 2 mL (Eppendorf). Para la lisis de proteínas en tejido, se incubaron 200 mg de tejido con 600 µL de tampón de lisis. Al igual que la lisis de las VEs, mencionada en el **apartado 3.4**, se usó el equipo TissueLyser II (Qiagen) para la homogenización mecánica y finalizar la ruptura de la membrana celular. En los lisados de proteína celular y de vesículas, se realizaron a una frecuencia de 30 Hz durante 2 minutos en frío; en cambio, para los lisados de tejido el tiempo aplicado fueron 3 minutos. Posteriormente, se centrifugaron (Micro Start 17R, VWR) a 17000 g durante 10 minutos a 4 °C para eliminar los restos de membrana. El sobrenadante se trasladó a otro nuevo tubo de 1,5 mL (Eppendorf) para almacenarlo a -80 °C para estudios posteriores.

3.6.2 Cuantificación de proteína

El método de cuantificación de proteína usado fue a partir del kit de ensayo de proteínas RC DC™ (Bio-Rad) el cuál se basa en el método Lowry [243]. Este procedimiento permite la cuantificación colorimétrica de proteínas en presencia de agentes reductores y detergentes, a partir de la medición de la absorbancia a 750 nm siguiendo las instrucciones del fabricante.

En primero lugar, se realizó una recta patrón a partir de 4 diluciones seriadas de BSA (Protein Standar II, Bio-Rad), siendo cada una de ellas la mitad de la anterior, con un volumen final de 20 µL y utilizando como diluyente el tampón de las muestras. Como fondo (0 mg/mL) se usó el propio tampón de las muestras. Luego, se cargaron 5 µL de las diluciones seriadas, fondo, y de las muestras en cada pocillo en una placa de 96 pocillos (Corning). Todas las mediciones se realizaron por duplicado. A continuación, se incubaron las muestras con 25 µL del reactivo AS (mezcla de 250 µL de reactivo A y 5 µL del reactivo S, provistos en el kit RC DC™) en cada pocillo durante 5 minutos en agitación. Luego, se añadieron 200 µL de reactivo B (provisto en el kit) en cada pocillo, y la mezcla se incubó durante 15 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia a 750 nm en el lector de placas Epoch 2 (BioTek).

3.6.3 Extracción de ARN y cuantificación

El ARN celular se extrajo mediante solventes orgánicos. Primero, se añadieron 600 µL de Trizol (Sigma) en cada pocillo de una placa de 6. Luego, se recogieron y se transfirieron a un tubo de 2 mL (Eppendorf), en donde se añadieron 300 µL de cloroformo (Sigma). Esta mezcla se incubó 15 minutos en hielo, y se agitó vigorosamente por inversión. Luego, las muestras se centrifugaron 15 minutos a 12000 g a 4 °C para diferenciar las distintas fases. Se recogió el sobrenadante y se incubó con 200 µL de isopropanol (Sigma) durante 1 hora a -20 °C. Después

de ese tiempo, se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C para, luego, eliminar el sobrenadante decantando de una sola vez para no arrastrar el *pellet* (ARN). A continuación, se hicieron 3 lavados de 300 µL de etanol al 75 %. Después, se dejaron secar y se resuspendió el precipitado de ARN en 50 µL agua DEPC (dietilopirocarbonato, Ambion) con 1 % de inhibidor de ARNasas (SUPERase RNase Inhibitor, Thermo Fisher Scientific). En cambio, la extracción de ARN de hepatocitos primarios se realizó mediante el kit RNeasy Mini de 50 columnas (Qiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez extraído el ARN, este se cuantificó mediante el equipo NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific).

3.7 ESTUDIOS PROTEÓMICOS

Se realizó la identificación cualitativa y cuantitativa de las proteínas de VEs en la Unidad de Proteómica del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS). Para ello, se partió del mismo volumen de VEs aisladas del secretoma de 1 gramo TA humano (TAS y TAV de 3 pacientes obesos independientes) (Tabla 5), de TA de rata obesa y control (TAS, TAV y TAB de 4 animales obesos y 4 controles independientes); y de 30 mL de secretoma celular de los adipocitos C3H10T1/2 control o de los modelos HG/HI, palmitato y oleico (4 experimentos independientes) (**apartado 3.2.1.2**). Las VEs aisladas se lisaron como ya se mencionó en el **apartado 3.4**.

Las muestras de proteína se sometieron a un proceso de desnaturalización y reducción mediante un tampón reductor Laemmli 5X [Tris 300 mM (pH 6,8), 50 % glicerol, 10 % SDS (dodecilsulfato sódico), 25 % de 2-mercapto-ethanol, 5 mg/mL de azul de bromofenol] y calentamiento durante 5 minutos a 95 °C. Posteriormente, 60 µL de las muestras desnaturalizadas se corrieron en un gel SDS-PAGE (12 % acrilamida) a 125 V en una cubeta de electroforesis (Bio-Rad). Se finalizó la electroforesis en el momento en el que la muestra se concentró completamente en el gel *stacking*, pero sin que atravesara este para facilitar el proceso de digestión previo al análisis proteómico. Luego, los geles se tiñeron durante 2 horas con una tinción azul de Coomassie (Bio-Rad). A continuación, se incubó durante 24 h en una solución de desteñido (7,5 % de ácido acético en metanol al 45 %, VWR). Después de este tiempo, se cortó la banda de proteína del gel y se depositó en 20 µL de agua miliQ para evitar la deshidratación del gel. Estas bandas de proteínas de cada muestra, de forma independiente, se sometieron a la digestión con tripsina para la identificaron mediante espectrometría de masas (Triple TOF 6600-Unidad de Proteómica del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela-IDIS).

3.7.1 Digestión triptica

La digestión triptica en gel se llevó a cabo de manera manual y utilizando el protocolo de Shevchenko y colaboradores con pequeñas modificaciones en una sala blanca [244]. Antes de su digestión, el gel se corta en trozos muy pequeños y se lavan tres veces con 190 µL de bicarbonato amónico (50 mM) en 50 % de metanol (VWR Chemicals). Luego se añadieron 100 µL de acetonitrilo (ACN, VWR Chemicals) durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se secaron al vacío (SpeedVac, Thermo Fisher Scientific). A continuación, se sometieron a un proceso de reducción con DTT (di-tio-treitól, Sigma) 10 mM durante 30 minutos a 56 °C. Una

vez reducidas, las muestras se lavaron de nuevo con bicarbonato amónico (3 veces), se deshidrataron con 100 μL acetonitrilo durante 10 minutos, y se secaron en el SpeedVac. Luego, se realizó el proceso de alquilación con 50 μL de 50 mM de iodoacetamida (VWR Chemicals) durante 20 minutos en oscuridad. Una vez terminada la alquilación, se volvió a lavar la muestra con bicarbonato amónico (3 veces), se deshidrató y se volvió a secar con el SpeedVac. A continuación, se añadieron 40 μL de tripsina porcina modificada (Promega, Madison) a una concentración final de 20 ng/mL en bicarbonato amónico 20 mM, que se incubó durante toda la noche a 37 °C. Finalmente, al día siguiente se realizó la extracción de los péptidos del gel usando 40 μL de una solución al 60 % acetonitrilo y 0,5 % ácido fórmico durante 20 minutos, tres veces. Una vez acabado, las muestras se secaron en el SpeedVac durante 2 horas, y se guardaron a -20 °C hasta su análisis.

3.7.2 Análisis cualitativo DDA (*Data Dependent Acquisition*) de espectrometría de masas

4 μL (aproximadamente 4 μg) de los péptidos disueltos en fase A (2 % de acetonitrilo, 0,1 % de ácido fórmico) se separaron mediante cromatografía de fase inversa. El gradiente se creó utilizando un sistema de cromatografía de microlíquidos (Eksigent Technologies nanoLC 400, Sciex) que está acoplado a un espectrómetro de masas de alta velocidad Triple TOF 6600 (Sciex) a través de una fuente de ionización de microflujo. Los péptidos entran primero a una precolumna de fase reversa basada en sílica YMC TRIART C18, 5 x 0,5 mm, 3 mm de tamaño de partícula y 120 Å de tamaño de poro (YMC Technologies) donde se eliminaron posibles contaminantes que pueden dañar la columna. Esta precolumna está conectada online a una columna de captura YMC-TRIART C18, 150 x 0,30 mm, con un tamaño de partícula de 3 mm y un tamaño de poro de 120 Å (YMC Technologies) donde los péptidos se van separando por polaridad a una velocidad de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. El gradiente de elución utiliza un 0,1 % de ácido fórmico en agua como fase móvil A, y un 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo como fase móvil B. Los péptidos se separaron utilizando un gradiente de 90 minutos que oscilaba entre el 2 % y el 90 % de la fase móvil B.

La adquisición de datos se realizó en un sistema Triple TOF 6600 (Sciex) utilizando el enfoque de adquisición dependiente de datos (DDA). Las condiciones de la fuente y la interfaz fueron las siguientes: voltaje flotante de los iones (ISVF) 5500 V, gas de cortina (CUR) 25, energía de colisión (CE) 10 y gas de la fuente de iones 1 (GS1) 25. El instrumento funcionó con el software Analyst TF 1.7.1 (Sciex). Los criterios de conmutación se fijaron en iones mayores que la relación masa/carga (m/z) 350 y menores que m/z 1400 con un estado de carga de 2-5, tolerancia de masa 250 ppm y un límite de abundancia de más de 200 cuentas (cps). Los iones diana se excluyeron durante 15 segundos. El instrumento se calibraba automáticamente cada 4 horas usando como calibrador externo péptidos trípticos de PepCalMix (Sciex).

3.7.2 Análisis cuantitativo (SWATH/MS, adquisición de ventanas secuenciales de todos los espectros teóricos por espectrometría de masa)

3.7.2.1 Creación de la biblioteca espectral para el análisis SWATH/MS

Para elaborar las bibliotecas espectrales MS/MS, las soluciones peptídicas se analizaron mediante el método de adquisición dependiente de datos (DDA) obtenido por micro-LC-MS/MS. Para obtener una buena representación de los péptidos y proteínas presentes en todas las muestras, se prepararon agrupaciones combinados de 3 o 4 muestras (según el experimento). Se separaron 4 µl de cada agrupación en un sistema micro-LC Ekspert nLC425 (Eksigen) utilizando una columna YCM-TriartC18 (150 µm × 0,3 mm) a un flujo de 5 L/min. El agua y el ACN, ambos con 0,1 % de ácido fórmico, se utilizaron como disolventes A y B, respectivamente. El gradiente para conseguir una buena separación de péptidos va desde una 5 % a un 95 % de fase B durante 30 minutos, 5 minutos al 90 % de B y finalmente 5 minutos al 5 % de B para el equilibrio de la columna, siendo el tiempo total del gradiente de 40 minutos. Se utilizó una fuente de ionización micro (Sciex) como interfaz para una correcta ionización de los péptidos entre el micro LC y el MS (Sistema TripleTOF 6600, Sciex). En esta fuente de ionización se aplicó un voltaje de 2600 V para ayudar a la buena ionización de los péptidos. El modo de adquisición consistió en un barrido MS de 400 a 1250 m/z, seguido de un barrido MS/MS de 100 a 1500 m/z (tiempo de adquisición de 25 ms) de los 100 principales iones precursores del barrido, por un tiempo de ciclo total de 2,8 s. Además, los precursores fragmentados se incorporaron a una lista de exclusión dinámica durante 15 s para evitar que se incluyeran iones cargados individualmente en el análisis MS/MS.

Las identificaciones de péptidos y proteínas para realizar la biblioteca SWATH/MS, se fijaron mediante el software Protein Pilot (versión 5.0.1, Sciex) utilizando una base de datos Uniprot específica para humanos, murina y para ratas, especificando la yodo-acetamida como alquilación de Cys (cisteínas). La tasa de falsos descubrimientos (FDR) se fijó en 1 % para péptidos y proteínas. Los espectros MS/MS de los péptidos identificados se usaron posteriormente para generar la biblioteca espectral para la extracción de picos SWATH/MS utilizando el software PeakView (versión 2.2, (Sciex) con SWATH Acquisition MicroApp (versión 2.0, Sciex). Se incorporó a la biblioteca espectral solo aquellos péptidos con una puntuación de confianza superior al 99 %.

3.7.2.2 Cuantificación relativa por adquisición de DIA-SWATH/MS

Las muestras de VEs de TA humano (TAS, TAV) de 3 pacientes obesos independientes, y de TA de ratas (TAS, TAV, TAP) de 4 animales independientes y las muestras de VEs secretadas por los modelos celulares de adipocitos resistentes a insulina e hipertrofiados (**apartado 3.2.1.2**) de 4 experimentos independientes se analizaron utilizando un método de adquisición independiente de datos (DIA) haciendo 3 réplicas técnicas para cada muestra (n = 18 muestras en total para humano; n = 48 muestras de la línea celular C3H10T1/2; n = 72 muestras en total de las VEs de TA de rata). Cada muestra se analizó utilizando el equipo LC-MS/MS con gradiente LC de 40 minutos descrito anteriormente para elaborar una biblioteca espectral, pero en lugar de usar el método de adquisición dependiente de datos (DDA) se utilizó en su lugar el método de adquisición independiente de datos (DIA). El método consiste en la

repetición de un ciclo que hace 100 escaneos (ventanas) de MS/MS (ventanas entre 400 a 1500 m/z, en modo de alta sensibilidad, con un tiempo de adquisición total de 50 ms) de aislamiento de precursores de ancho variable con una superposición de 1 m/z, consiguiendo así que cubran el rango de masas de 400 a 1500. El tiempo total por ciclo fue de 6,3 s. Para cada conjunto de muestras, el ancho de las 100 variables de ventanas se optimizó según la densidad de iones establecida en las inyecciones del DDA usadas para crear la librería utilizando una hoja de cálculo de variables de ventanas de SWATH/MS de Sciex.

3.7.3 Análisis de datos

Para conseguir el análisis global del proteoma, como ya se ha explicado en los apartados anteriores, los archivos de datos se procesaron utilizando el software ProteinPilot (versión 5.0.1, Sciex), que utiliza el algoritmo Paragon™ para la búsqueda en la base de datos y Progroup™ para la agrupación de datos. Los datos se buscaron utilizando una base de datos específica para humanos, ratas y para proteínas murinas en UniProt, especificando la yodoacetamida como la alquilación de Cys (cisteínas). La tasa de falsos descubrimientos (FDR) se realizó utilizando un método de ajuste no lineal que mostraba así aquellos resultados que informaban de una tasa de falsos descubrimientos global del 1 % o superior [245]. Los espectros MS/MS de los péptidos identificados se usaron posteriormente para generar la biblioteca espectral para la extracción de picos SWATH/MS utilizando el software PeakView (versión 2.2, (Sciex) con MicroApp de Adquisición de SWATH/MS (versión 2.0, Sciex). Se incorporó a la biblioteca espectral solo aquellos péptidos con una puntuación de confianza superior al 99 %. Esta aplicación procesa los datos mediante la biblioteca espectral creada a partir del análisis DDA. Se seleccionan hasta diez péptidos por proteína y siete fragmentos por péptido, en función de la intensidad de la señal; los péptidos compartidos y modificados se eliminan del proceso para extraer las áreas. Para incrementar la exactitud de la cuantificación se utiliza ventanas de 5 minutos y 30 ppm de ancho para extraer los cromatogramas de iones [246].

Las áreas de pico para los péptidos se establecieron sumando las áreas de pico a partir de los fragmentos de iones correspondientes. PeakView calculó un FDR y una puntuación para cada péptido asignado en relación con los componentes cromatográficos y de los espectros (siempre se seleccionan 10 péptidos por proteínas y 7 fragmentos por péptidos para hacer la cuantificación); así que aquellos péptidos con FDR inferior al 1 % se eligieron para la cuantificación de la proteína [245]. Las áreas de pico integradas (archivos.mrkvw procesados de PeakView) se exportan directamente al software MarkerView (Sciex) para un análisis cuantitativo relativo como se describió anteriormente [247]. Dicha exportación incluyó tres archivos que contienen información cuantitativa sobre los iones individuales, la intensidad sumada de dos iones diferentes para un péptido determinado y la intensidad sumada de dos péptidos diferentes para una proteína determinada. La combinación de dos datos mediante MarkerView compensa las pequeñas variaciones en los valores tanto de masa como de tiempo de retención, asegurando que los compuestos idénticos de diferentes muestras se puedan comparar con precisión entre sí. Para controlar la posible pérdida desigual de los péptidos entre las diferentes muestras, durante el proceso de preparación de estas, se realizó una normalización global basada en la suma total de todas las áreas de pico extraídas de todos los péptidos y las

transiciones a través de las réplicas de cada muestra. El área media de los picos de MS de cada proteína se obtuvo a partir de las réplicas del SWATH/MS de cada muestra, seguido de un análisis de prueba t-Student utilizando el software MarkerView para la comparación entre las muestras, basado en las sumas de áreas medias de todos los péptidos y las transiciones obtenidas para cada proteína. La prueba t-test indicó en qué medida cada variable distingue a los dos grupos. Para cada biblioteca, se seleccionó su conjunto de proteínas expresadas diferencialmente (valor $p < 0,05$) con un aumento o disminución de 1,5 veces (*fold change* $> 1,5$ o $< 0,75$).

Además, se realizó un análisis estadístico multivariante no supervisado utilizando el análisis de componentes principales (PCA) para comparar los datos entre las muestras. Se utilizaron diagramas de volcán (*volcano-plots*) para visualizar gráficamente los resultados, que se generaron trazando los cambios logarítmicos en base 2 del valor-p para todas las proteínas identificadas frente a su $-\log_{10}$ del *fold change*. Se realizaron mapas de calor (*heatmap*) del análisis de grupos no supervisado de las proteínas con diferencias significativas según el análisis DIA-SWATH/MS para detectar diferentes agrupaciones de proteínas en los diferentes grupos estudiados.

3.7.4 Análisis funcional proteico

El análisis funcional se realizó mediante el software FunRich (herramienta de acceso abierto, versión 3.1.3) para el enriquecimiento funcional y el análisis de redes de interacción (<http://funrich.org/index.html>) [248], Panther como sistema de clasificación en línea (<http://www.pantherdb.org>) [249] y Reactome como una base de datos de rutas en línea (<https://www.reactome.org>) [250]. El programa FunRich permite analizar múltiples conjuntos de datos contra tres bases de datos diferentes: FunRich, UniProt y una base configurada y personalizada para el propio usuario. Además, en esta herramienta, los resultados se pueden representar de varias formas como diagramas de Venn, gráficos de columna y barras entre otros. Esta base de datos proporciona multitud de información sobre vías, factores de transcripción, procesos biológicos, componentes celulares, interacciones proteína-proteína, función molecular, etc. [145,248]. La herramienta Panther es un sistema de clasificación que permite analizar datos del genoma a gran escala, ya que está construido con 82 genomas completos que combina la función génica, la ontología, las vías y las herramientas de análisis estadístico como modelos de Markov y Hidden-Markov [249]. El programa Reactome sirve como una base de datos de procesos biológicos, pero también como una herramienta para observar la relación funcional de los datos a analizar, proporcionando información molecular de transmisión de señales, transporte, metabolismo y replicación de ADN, entre otros [250].

3.8 ENSAYOS FUNCIONALES CON VES

Las VEs, concretamente los exosomas, son una nueva vía de comunicación celular no clásica [149]. Por esta razón, quisimos observar cómo las vesículas liberadas tanto del tejido adiposo humano subcutáneo o visceral (Tabla 5), como las VEs patológicas de cada uno de los diferentes tratamientos con HG/HI (alta glucosa e insulina), palmitato (AP), ácido oleico (AO) o de adipocitos maduros C3H10T1/2 sin tratamiento, interferían en diferentes rutas biológicas en

diversos tipos celulares. Por lo tanto, estas VEs fueron incubadas con diferentes líneas celulares, como las células de mama no tumorales MCF10, tumorales MCF7, la línea de melanoma B16F1, los macrófagos murinos RAW264.7, los hepatocitos primarios (**apartado 3.2.3**) o los propios adipocitos C3H10T1/2 (Figura 18). La cantidad de VEs usadas en los diferentes tratamientos se determinó en base a concentraciones fisiológicas, es decir, se trataron las células con la misma cantidad de VEs liberadas de esa misma densidad celular; estableciendo así una relación 1:1.

3.8.1 Ensayos funcionales con VEs procedentes de adipocitos patológicos por hipertrofia lipídica y/o resistencia a insulina

Para observar las posibles alteraciones metabólicas que las VEs pueden inducir en las diferentes líneas celulares, se extrajo proteína y ARN (**apartado 3.6.1 y 3.6.2**) para realizar posteriormente diferentes ensayos de inmunodetección y PCR. Las VEs utilizadas en estos ensayos corresponde a las VEs liberadas de las C3H10T1/2 diferenciadas a adipocitos; tras el tratamiento de HG/HI, AP y AO (Figura 18). Se observó la funcionalidad de cada tipo de vesícula por separado. En dichos estudios, se incubaron 8 μ L de VEs por pocillo de 34,8 mm de diámetro (platos de 6 pocillos, Corning); es decir, las VEs se aislaron de 30 mL de secretoma celular (15 pocillos de 34,8 mm) y se resuspendieron en 120 μ L de PBS (**apartado 3.4**), y 1/15 de este volumen se añadió a cada pocillo de 34,8 mm. Por lo tanto, como se comentó al principio de este apartado, la cantidad de VEs inoculadas se corresponde a una ratio 1:1 con respecto al volumen inicial de secretoma en el que se aislaron estas VEs.

En primer lugar, los adipocitos C3H10T1/2 se diferenciaron como ya se describió en el **apartado 3.2.1.1**. En el día 6 de la diferenciación, después de tres lavados con PBS (Lonza) y seguidos de 2 horas de deprivación de suero; las células se cultivaron con VEs aisladas de modelos de adipocitos con tratamiento de HG/HI, palmitato y oleico (**apartado 3.2.1.2**) durante 24 horas. Como control, se usó el mismo volumen de vehículo (PBS). Posteriormente se realizaron lisados celulares o tinción *Oil Red O* (**apartado 3.2.1.3**). Siempre se realizaron 6 experimentos independientes para cada ensayo.

3.8.2 Ensayos funcionales de VEs procedentes de adipocitos patológicos sobre células hepáticas

Para los experimentos funcionales en hepatocitos, se incubaron las mismas VEs adipocitarias patológicas del apartado anterior y las liberadas de adipocitos C3H10T1/2 sin tratar (ADIPO) sobre células del cultivo primario de hepatocitos murinos durante 24 horas, realizando siempre 6 experimentos independientes por condición (Figura 18). Dichas células se cultivaron como se mencionó en el **apartado 3.2.3**. Cuatro horas después de que estas células se adhirieran al plato, se refrescó el medio con DMEM (Gibco) sin FBS y con 8 μ L de VEs continuando con las dosis establecidas en los ensayos funcionales anteriores. Como control negativo se usó la misma cantidad de vehículo (PBS). Estas células también se trataron con ácidos grasos como palmitato (AP) y oleico (AO) (**apartado 3.2.1.2**). Tras las incubaciones, se hicieron extracciones de proteína y ARNm para su posterior análisis.

3.8.3 Ensayos funcionales de inflamación de macrófagos tras el tratamiento con VEs procedentes de adipocitos patológicos

Las VEs aisladas de adipocitos hipertrofiados con ácido palmítico y/u oleico, o de aquellos con resistencia insulínica (HG/HI), se incubaron con la línea de macrófagos murinos Raw 264.7 (Figura 18). Estas células se cultivaron en placas de 6 pocillos (Corning) con su medio de mantenimiento mencionado en la **sección 3.2.2** en 6 experimentos independientes. Cuando estas células llegaron a una confluencia del 70 % se incubaron con estas VEs en medio DMEM (4,5 g/L glucosa, Lonza) con 1 % de P/S (Biowest) durante 24 horas. Se inocularon con diferentes concentraciones de VEs: 8 μ L (ratio 1:1), 4 μ L (0,5 de la ratio 1:1) y 16 μ L (2 veces la ratio 1:1). Como control negativo utilizamos el vehículo PBS (LONZA), y como control positivo del estado inflamatorio utilizamos el tratamiento con 1 μ g/mL de LPS (lipopolisacáridos de *Escherichia coli* O111:B4, Sigma). Posteriormente, se extrajo el ARNm para su análisis (**apartado 3.6.2**).

3.8.4 Estudios del papel funcional de las VEs liberadas por los adipocitos patológicos sobre la diferenciación e hipertrofia adipocitaria, y la proliferación de células tumorales

La proliferación y diferenciación celular se midió a tiempo real mediante el equipo xCELLigence RTCA SP (ACEA Biosciences). Este sistema está compuesto de un biosensor microelectrónico que proporciona información sobre el grado de adhesión de las células y permite obtener datos celulares con una alta precisión y sensibilidad a tiempo real durante todo el experimento. Para el uso de este equipo, se necesitan unas placas con electrodos de oro en el fondo de los pocillos (*E-plate*, RTCA Agilent). Las células se cultivan, crecen y se adhieren a estos pocillos, lo que dificulta el paso de la corriente eléctrica (impedancia). La fuerza de adhesión celular depende de una multitud de factores que incluyen el tipo de célula, el crecimiento, la migración, la propagación y la proliferación [82,251]. La impedancia, debida a esta adhesión celular, se transforma mediante un algoritmo matemático en un parámetro adimensional denominado índice celular (IC). En ausencia de células, el IC es cero, y a medida que las células se adhieren, el IC aumenta. Por lo tanto, durante la proliferación celular habrá una mayor oposición a la corriente eléctrica, por lo que el sistema detectará un mayor IC [251]. En cambio, en la diferenciación celular de preadipocitos a adipocitos, cuando las células cambian de tamaño, forma y volumen; afecta a esta adhesión celular y, por lo tanto, afecta al IC. Es decir, el aumento de la diferenciación adipocitaria se traduce en un menor IC [82].

Para la realización de estos experimentos en este equipo xCELLigence RTCA SP (ACEA Biosciences), primero se equilibraron los *E-plate* mediante la lectura del fondo con 50 μ L del medio de cultivo de las correspondientes líneas celulares en cada uno de los pocillos. Después, se incubaron con 100 μ L de medio en los que se disolvieron las correspondientes células en la misma densidad celular en cada pocillo. Estas se dejaron asentar durante 1 hora, y después, se procedió a añadir la cantidad correspondiente de VEs, siguiendo su monitorización a tempo real.

Los preadipocitos C3H10T1/2 (3000 células por pocillo) se diferenciaron en *E-plates* (RTCA Agilent) (Figura 18). Una vez alcanzado el 100 % de confluencia, después de 48 horas de cultivo, se comenzó a medir la diferenciación a tiempo real en el equipo xCELLigence

(RTCA, ACEA Biosciences) usando el medio de diferenciación ya explicado en el **apartado 3.2.1.1**. Al mismo tiempo, estas células se incubaron con VEs liberadas por los adipocitos tratados con HG/HI, AP y AO (**apartado 3.2.1.2**); y se registró el índice celular en los días 0 (día del inicio de diferenciación), 2, 4 y 6 de la diferenciación ($n = 4$ experimentos independientes, 3 réplicas biológicas por cada experimento). Cada dos días de diferenciación se refrescó el medio de cultivo celular con la misma cantidad de VEs de tratamiento. Como control se utilizó el vehículo PBS (Lonza).

Tras un proceso de optimización de densidad celular, se cultivaron cantidades iguales de células, 7500 células MCF7 o MCF10 o B16F1 en los medios correspondientes explicados anteriormente (**apartado 3.2.2**) sin FBS. Después de que las células se adhiran a los pocillos, las VEs liberadas de 1 gramo de tejido subcutáneo y visceral de pacientes independientes con obesidad (Tabla 5) se distribuyeron en tres pocillos (réplicas biológicas) (Figura 18). Como control se usó la misma cantidad de vehículo, PBS (Lonza); el secretoma resultante de centrifugar las vesículas, y la misma cantidad de vesículas artificiales (cedidas por el grupo de la Dra. María de la Fuente Freire) diluidas en PBS (Lonza). Estas vesículas artificiales muestran una composición definida (colesterol: fosfatidilcolina: esfingomiélna: ceramida) siendo comparables a de los exosomas según estudios lipídómicos [252]. Esta proliferación a tiempo real se dejó durante 80 horas en el sistema xCELLigence (RTCA, ACEA Biosciences). Para el análisis del secretoma ultracentrifugado, del cual se extrajeron dichas VEs, se añadió el secretoma al 10 % (v/v) en medio de cultivo celular sin FBS, siguiendo los protocolos previamente establecidos para los estudios funcionales [75]. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

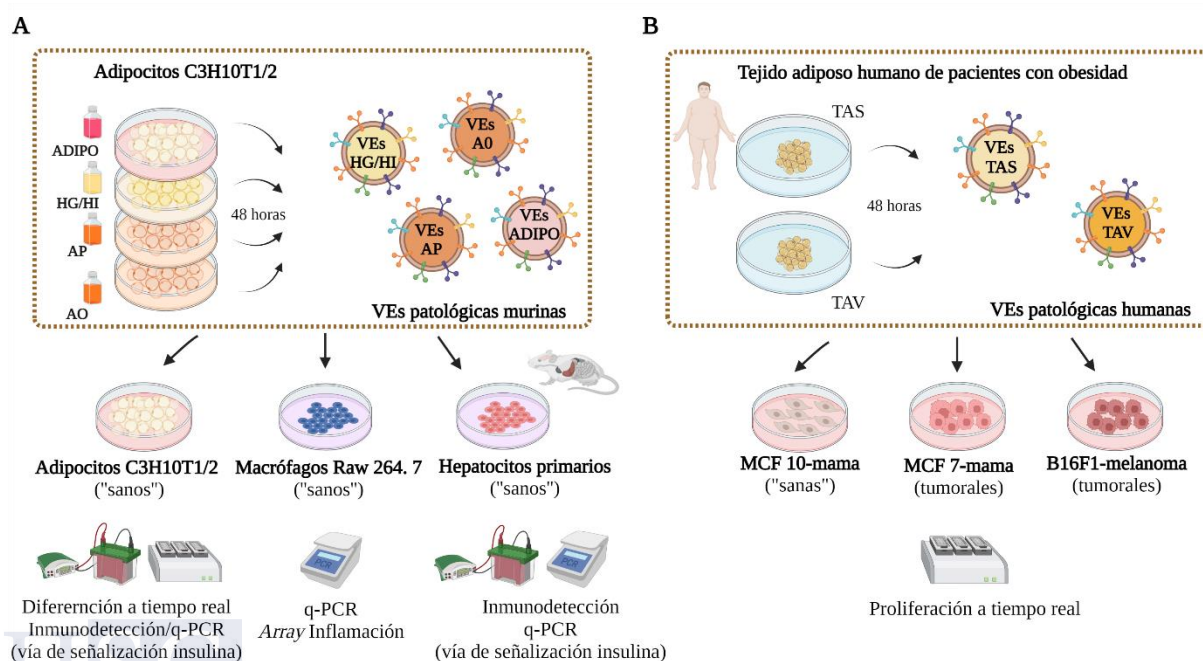


Figura 18. Ensayos funcionales con VEs liberadas de los adipocitos C3H10T1/2 (A) y del TA humano (B). Las VEs patológicas, aisladas de 30 mL de secretoma de los adipocitos murinos C3H10T1/2 (VEs ADIPO/CONTROL), de los adipocitos tratados con alta glucosa/alta insulina (VEs HG/HI), palmitato (VEs AP) u oleico (VEs AO), se incubaron con diferentes líneas celulares como los propios adipocitos C3H10T1/2, macrófagos Raw 264.7, y hepatocitos primarios murinos, para posteriormente observar diferentes rutas bioquímicas y metabólicas (A). Las

VEs aisladas de 1 gramo de tejido adiposo humano subcutáneo (VEs TAS) y visceral (VEs TAV) (Tabla 5), se incubaron con diferentes líneas celulares como MCF10A o células tumorales como MCF7 y B16F1, para realizar ensayos de proliferación celular a tiempo real mediante el equipo xCELLigence (RTCA, ACEA Biosciences) (Creado con BioRender.com).

3.9 ENSAYOS BIOQUÍMICOS

3.9.1 Arrays de anticuerpos

El secretoma celular (1 mL) de los macrófagos Raw 264.7 tratados con las VEs de adipocitos patológicos (VEs HG/HI; VEs AP; VEs AO) se utilizó para observar el perfil de proteínas inflamatorias mediante la realización del *array Inflammation Mouse Antibody Membranes* (4 membranas, Abcam) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Previamente, las membranas se bloquearon con una solución de bloqueo (provista en el kit) durante 30 minutos. Luego, las membranas se incubaron con 1 ml de secretoma en agitación durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se realizaron varios lavados con el tampón de lavado provisto en el kit. A continuación, se añadió el anticuerpo anti-citoquinas conjugadas con biotina durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con estreptavidina conjugada con HRP durante 2 horas a temperatura ambiente. Después, las membranas se incubaron con el tampón de detección, para a continuación, adquirir las imágenes en el equipo ChemiDoc™ Imaging System (Bio-Rad). Los *spots* de las proteínas se cuantificaron con el software ImageJ® Lab (v 4.0.1). Las proteínas analizadas en este array fueron BLC, CD30L, eotaxina, eotaxina-2, ligando FAS, Fractalkina, GCSF, GM-CSF, IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 p40/p70, IL-12 p70, IL-13, IL-17, I-TAC, KC/CXCL1, Leptina/OB, LIX, Linfotactina, MCP-1, MCSF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 γ , RANTES, SDF-1, TCA-3, TECK, TIMP-1, TIMP-2, TNF- α , sTNF RI, sTNF-RII. Se hicieron 3 experimentos independientes para cada condición.

3.9.2 Detección de proteínas por *immunoblot* (Western Blot)

Los ensayos de inmunodetección se realizaron en lisados celulares y de vesículas extracelulares, descritos anteriormente. Después de la cuantificación de proteína mediante el método Lowry (**apartado 3.6.2**), la misma cantidad de proteína de cada muestra de lisados celulares (25 μ g de proteína) y el mismo volumen de lisado de VEs para cada muestra se diluyeron en un tampón de carga reductor (5X Laemmli), y se hirvieron a 95 °C durante 5 minutos. Estas muestras, y el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad) se cargaron en geles de 10-12 % de acrilamida y se corrieron a 125 V. Después, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) mediante transferencia húmeda a 200 mA a 4 °C durante 2 horas. Luego, las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente utilizando una solución de BSA al 5 % (Sigma) para las proteínas fosforiladas, o el tampón de bloqueo SuperBlock (Thermo Fisher), para así evitar uniones inespecíficas. A continuación, las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpos primarios (Tabla 9) y se lavaron a continuación con Tween-20 (Sigma) al 0,1 % en PBS (Sigma) durante 1 hora. Por último, estas membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios ligados a la HRP (Tabla 9). Las señales se revelaron con el kit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher) antes de la visualización en el ChemiDoc™ Imaging System (Bio-Rad). Las bandas de

proteínas se cuantificaron con el software ImageJ® Lab (v 4.0.1). Como control de carga se utilizó el anticuerpo contra la proteína GAPDH, el cual se utilizó para la normalización de cada muestra. Además, el área bajo la curva obtenido de la densitometría de cada muestra se comparó con el obtenido de las muestras controles, obteniendo así un *fold-change*. Se hicieron un mínimo de 4 experimentos independientes para cada condición.

Tabla 9. Anticuerpos primarios y secundarios usados en esta tesis. Se incluye entre paréntesis referencia y casa comercial.

ANTICUERPO 1°	DILUCIÓN	ANTICUERPO 2°	DILUCIÓN
ACLY (4332s, Cell Signaling)	1:1000	Goat-anti rabbit IgG (H+L) (31460, Thermo Fisher Scientific)	1:500
Alix (sc-53538, Santa Cruz)	1:500	Goat-anti mouse IgG (H+L) (31430, Thermo Fisher Scientific)	1:5000
AKT (9272S, Cell Signaling)	1:1000	Goat-anti rabbit IgG (H+L) (31460, Thermo Fisher Scientific)	1:5000
p-AKT (ser 473, 9271S, Cell Signaling)	1:1000		
CD9 (sc-13118, Santa Cruz)	1:250	Goat-anti mouse IgG (H+L) (31430, Thermo Fisher Scientific)	1:5000
CD14 (H4) (sc-515785, Santa Cruz)	1:500		
CD81 (sc-166029, Santa Cruz)	1:500		
Caveolina-1 (NB100-615, Novus)	1:1000		
Ceruloplasmina (sc-365205, Santa Cruz)	1:500		
Complemento C3 (sc-238294, Santa Cruz)	1:500		
ERK ½ (p44/42) (9102s, Cell Signaling)	1:1000	Goat-anti rabbit IgG (H+L) (31460, Thermo Fisher Scientific)	1:5000
p-ERK ½ (p-p44/42) (9101s, Cell Signaling)	1:1000		
FABP4 (PA5-19811, Thermo Fisher Scientific)	1:1000		
FAS (G-11) (sc-48357, Santa Cruz)	1:500	Goat-anti mouse IgG (H+L) (31430, Thermo Fisher Scientific)	1:5000
GAPDH (ab8245, Abcam)	1:2500		1:10000
GRP94 (NBP1-04346, Novus)	1:1000		1:5000
Mimecan (sc-365228, Santa Cruz)	1:250		
Perilipina-1 (ab3526, Abcam)	1:1000	Goat-anti rabbit IgG (H+L) (31460, Thermo Fisher Scientific)	1:4000
Perilipina-1 (PA5-55046, Thermo Fisher Scientific)	1:1000		1:5000
S6 (2317S, Cell Signaling)	1:1000		
p-S6 (2215S, Cell Signaling)	1:1000		
Sintenina-1 (sc-100336, Santa Cruz)	1:250	Goat-anti mouse IgG (H+L) (31430, Thermo Fisher Scientific)	1:5000
TGFBI (NMP2-67186, Novus)	1:500	Goat-anti rabbit IgG (H+L) (31460, Thermo Fisher Scientific)	1:5000
TSG-101 (C2) (sc-7964, Santa Cruz)	1:250	Goat-anti mouse IgG (H+L) (31430, Thermo Fisher Scientific)	1:5000
UCP1 (ab-10983, Abcam)	1:1000	Goat-anti rabbit IgG (H+L) (31460, Thermo Fisher Scientific)	1:5000
Vimentina (PA5-27231, Thermo Fisher Scientific)	1:500		

3.9.3 Estudios de proteínas mediante análisis *ELISA*

Se realizaron diferentes ensayos de *ELISA* (del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) siguiendo el protocolo establecido para cada kit. Previamente, las VEs aisladas mediante ultracentrifugación y resuspendidas en 60 μ L de tampón de lisis (**apartado 3.4**) fueron lisadas como se ha descrito anteriormente. Las VEs humanas, liberadas del plasma de donantes obesos y delgados (Tabla 6) y del secretoma de TAS y TAV de pacientes obesos (Tabla 5), se utilizaron para evaluar los niveles de TGFBI [Human BIGH3 *ELISA* Kit, (96 assays), Thermo Fisher Scientific], Mimecan [Human Mimecan/OIF *ELISA* Kit (96 assays), Novus Biologicals] y Caveolina-1 [Human Cav-1 *ELISA* Kit (96 assays), ELISAGenie]. Las muestras de VEs se diluyeron 1:2 para Mimecan y Caveolina-1, y 1:20 para TGFBI. Además, las VEs murinas, liberadas de los adipocitos C3H10T1/2 y de los adipocitos con distintos tratamientos (HG/HI, AP, AO), se usaron para medir los niveles de TGFBI [Mouse BIGH3 *ELISA* Kit, (96 assays), Thermo Fisher Scientific], Mimecan [Mouse Mimecan *ELISA* Kit (96 assays), Boster], Caveolina-1 [Mouse Cav-1 *ELISA* Kit (96 assays), ELISAGenie] y Ceruloplasmina [Mouse Ceruloplasmin *ELISA* Kit (96 assays), Novus Biologicals]. Estas VEs se diluyeron 1:20. Se realizaron un mínimo de 6 experimentos independientes para cada tipo de muestras, y dos replicados técnicos por muestra. Se hicieron lecturas de densidad óptica (DO) a 450 nm en el lector de placas Epoch 2 (BioTek). Las lecturas de DO 450 nm de TGFBI, Mimecan y Ceruloplasmina se normalizaron con la lectura de DO 450 nm de Caveolina-1.

3.10 ESTUDIOS DE EXPRESIÓN POR PCR A TIEMPO REAL

Después de la cuantificación del ARN, explicado anteriormente, se trató 1 μ g de ARN con DNasa I (Invitrogen). Luego se realizó la transcripción inversa mediante el kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). El ADNc se empleó para el análisis de la expresión génica, utilizando FastStart Universal SYBR GREEN Master (ROX) (Roche) en un sistema Mx3005P (Agilent Technologies). Las reacciones completas se sometieron al siguiente programa: un paso de desnaturalización con 30 segundos a 95°C; 45 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C y 30 segundos a 72°C; seguido de un paso de enfriamiento. En cambio, como se comentó anteriormente (**apartado 3.6.3**), el ARN de los hepatocitos primarios se extrajo mediante columnas comerciales; y el tratamiento con DNasa se hizo siguiendo las recomendaciones del fabricante (RNeasy Mini de 50 columnas, Qiagen). Posteriormente, el ARN cuantificado (1 μ g) se usó para realizar la transcripción inversa mediante qScript Super cDNA SuperMix (Quanta). Luego, el ADNc se usó para el análisis de la expresión génica utilizando SYBER Select Master Mix (ROX) (Applied Biosystems). El programa usado fue el siguiente: un paso de desnaturalización de 2 minutos a 95 °C; 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C; seguido de un paso de enfriamiento.

Cada muestra se ejecutó por triplicado en cada experimento, y se hicieron 6 experimentos independientes. Los resultados se trataron con el método de cuantificación absoluta; por lo tanto, se utilizó una curva estándar con concentraciones conocidas en el ensayo. Además, cada muestra se normalizó con respecto a un gen de expresión constante: *HPRT*. Los cebadores se diseñaron con Primer 3 Plus (<http://tiny.cc/pf928y>), y estos se basan en la secuencia de ADN

publicada en Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). La secuencia de los cebadores usados se describe en la Tabla 10.

Tabla 10. Secuencia de los cebadores usados en esta tesis. F: forward (5'-3'); R: reverse (5'-3').

CEBADOR	SECUENCIA
<i>FASN</i> (Sintetasa de ácidos grasos)	F-GCCACCTCAGTCCTGCTATC R-GGTATAGACGACGGGCACAG
<i>FATP2</i> (Proteína transportadora de ácidos grasos 2)	F-CCGCAGAAACCAAATGACCG R-TGCCTTCAGTGGATGCGTAG
<i>FBP1</i> (Fructosa-bifosfatasa 1)	F-GTCTGTTTCGATCCCCTTGA R-TCCAGCATGAAGCAGTTGAC
<i>GLUT1</i> (Transportador de glucosa 1)	F-GTCCGATTGCCAGCTAATGC R-CACAGGCAGAAATCGCCAAC
<i>HPRT</i> (Hipoxantina fosforibosiltransferasa 1)	F-CAATGCAAACCTTGCTTTCCC R-TCCTTTCACCAAGCTTG
<i>Il-6</i> (Interleuquina-6)	F-CCCAACAGACCTGTCTACCA R-CAGAATTGCCATTGCACAAC
<i>NONO</i>	F-TGCTCCTGTGCCACCTGGTACTC R-CCGGAGCTGGACGGTTGAATGC
<i>PDK1</i> (Piruvato deshidrogenasa quinasa isoforma 1)	F-GTCCGATTGCCAGCTAATGC R-CACAGGCAGAAATCGCCAAC
<i>PLIN2</i>	F-AAACGTCTGTCTGGACCGAAT R-ACACGCCTTGAGAGAAACAGA
<i>PLIN3</i>	F-CGCCTATGAACACTCCCTCG R-CGAGCACACTTGTTAAGCTGC
<i>PPARα</i> (Receptor Alpha activado por proliferador de peroxisoma)	F-GCAGTGCCCTGAACATCGAG R-GCCCTTACAGCCTTCACATGC
<i>PPARγ</i> (Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma)	F-ATCATCTACACGATGCTGGCC R-CTCCCTGGTCATGAATCCTTG
<i>TNFα</i> (Factor de necrosis tumoral Alpha)	F-CCACGTTCTGTCTA R-AGGGTCTGGCCATAGAACT

3.11 ESTADÍSTICA

Salvo en los estudios proteómicos, que se usó el test estadístico incluido en el software del equipo de masas (**apartado 3.7.3**), todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 7.0 (GraphPadSoftware). Previamente, se realizó un análisis de valores atípicos (*outliers*) aplicando el método ROUT en los diferentes grupos de datos. En el caso de identificar algún valor atípico, se eliminó la muestra correspondiente de todos los análisis.

Los datos se presentan como media \pm SEM tanto en los gráficos de barras como los de puntos. En primer lugar, se observó la normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para las comparaciones entre varios grupos, se realizó una prueba de *one way*-ANOVA con la prueba posterior de Tukey para análisis paramétrico; y se hizo la prueba Anova-Kruskall Wallis seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn para el análisis no paramétrico. En cambio, para determinar diferencias entre dos grupos se utilizó la prueba t de Student para valores paramétricos y la prueba Mann Whitney para datos no paramétricos. Además, las correlaciones lineales se realizaron con el test Spearman o Pearson dependiendo si los datos se ajustan o no la distribución Gaussiana. Los valores-p (*p-value*) inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos (*). También, ** corresponde a valores $p < 0,01$, *** a valores $p < 0,001$ y **** a valores $p < 0,0001$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 CAPÍTULO 1: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS VES SECRETADAS POR ADIPOCITOS EN DIFERENTES SITUACIONES METABÓLICAS

Una de las primeras hipótesis de este trabajo es que las vesículas extracelulares (VEs) liberadas por el tejido adiposo (TA) podrían participar en procesos patogénicos como el desarrollo de enfermedades metabólicas en gran medida debido a su carga proteica, que además de ejercer un papel funcional, puede aportar una fuente rica de biomarcadores de desregulación metabólica y enfermedad. Además, como las VEs son altamente dinámicas, postulamos que su composición puede variar dependiendo de los estímulos que llegan a las células productoras de origen, y también en función del tipo celular. Por lo tanto, este primer capítulo se centra en el estudio de la caracterización de las VEs en el contexto de la obesidad, desde vesículas liberadas por adipocitos patológicos (hipertrofia lipídica y/o con resistencia a insulina), como las VEs de explantes completos de tejido adiposo obeso humano (subcutáneo y visceral), así como aquellas liberadas por tejido adiposo murino. Debido a que el tipo de grasa y la localización anatómica de este tejido, tiene características funcionales y metabólicas distintas, pueden jugar un papel clave en la composición molecular de las VEs. Por ese motivo, en este capítulo se estudió el perfil de las VEs, incluyendo el contenido proteico, de la grasa blanca según su localización anatómica (subcutánea y visceral) y de la grasa parda según el estado metabólico, obeso o delgado. Este estudio permitirá contribuir a la identificación de posibles biomarcadores o de nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de la obesidad.

4.1.1 Caracterización de las VEs secretadas por adipocitos murinos y su alteración con la desregulación metabólica

4.1.1.1 Establecimiento y validación de un modelo *in vitro* de hipertrofia lipídica y/o resistencia a insulina (RI) con adipocitos murinos

Como se ha descrito en el apartado 3.2.1.2, se establecieron dos modelos celulares de adipocitos hipertrofiados mediante el tratamiento con ácido oleico (AO) y palmitato (AP), y un modelo de resistencia a la insulina (RI) mediante el tratamiento con concentraciones elevadas de glucosa e insulina (alta glucosa-alta insulina, HG/HI: del inglés *High Glucose/High Insulin*) en la línea C3H10T1/2 de células madre pluripotenciales con capacidad de diferenciación a adipocito (Figura 14). Una vez establecidos, estos modelos se confirmaron observando la incorporación de lípidos intracelulares mediante tinción *Oil Red O*, y determinando la activación del receptor de insulina mediante la inmunodetección de las proteínas implicadas en la vía de señalización de la misma (niveles de pAkt/Akt total). La exposición de los adipocitos al palmitato (500 μ M, 18 h) y al ácido oleico (1 mM, 18 h) aumentó significativamente la acumulación de lípidos, según la tinción *Oil Red O*, mientras que no se observaron cambios

estadísticamente significativos en los adipocitos expuestos a un tratamiento con alta glucosa e insulina (4,5 g/L de glucosa, 5 µg/mL de insulina, 24 h) (Figura 19 A, B). En cuanto a la vía de la insulina, tanto la hipertrofia lipídica, como la exposición a HG/HI, indujeron resistencia a la insulina mediante una reducción significativa de la señalización p-Akt/Akt en estas células tras 10 minutos de estimulación con 100 nM de insulina (Figura 19 C). En concreto, se observó una mayor resistencia (disminución en la fosforilación de Akt), en los adipocitos tratados con HG/HI en comparación con los tratamientos con AP y AO. En resumen, tal y como se esperaba, los tratamientos con lípidos (AP y AO) provocan una mayor hipertrofia lipídica en los adipocitos que el tratamiento HG/HI; sin embargo, en los dos modelos se encuentra resistencia a insulina significativa, siendo aún más aguda en el modelo de HG/HI.

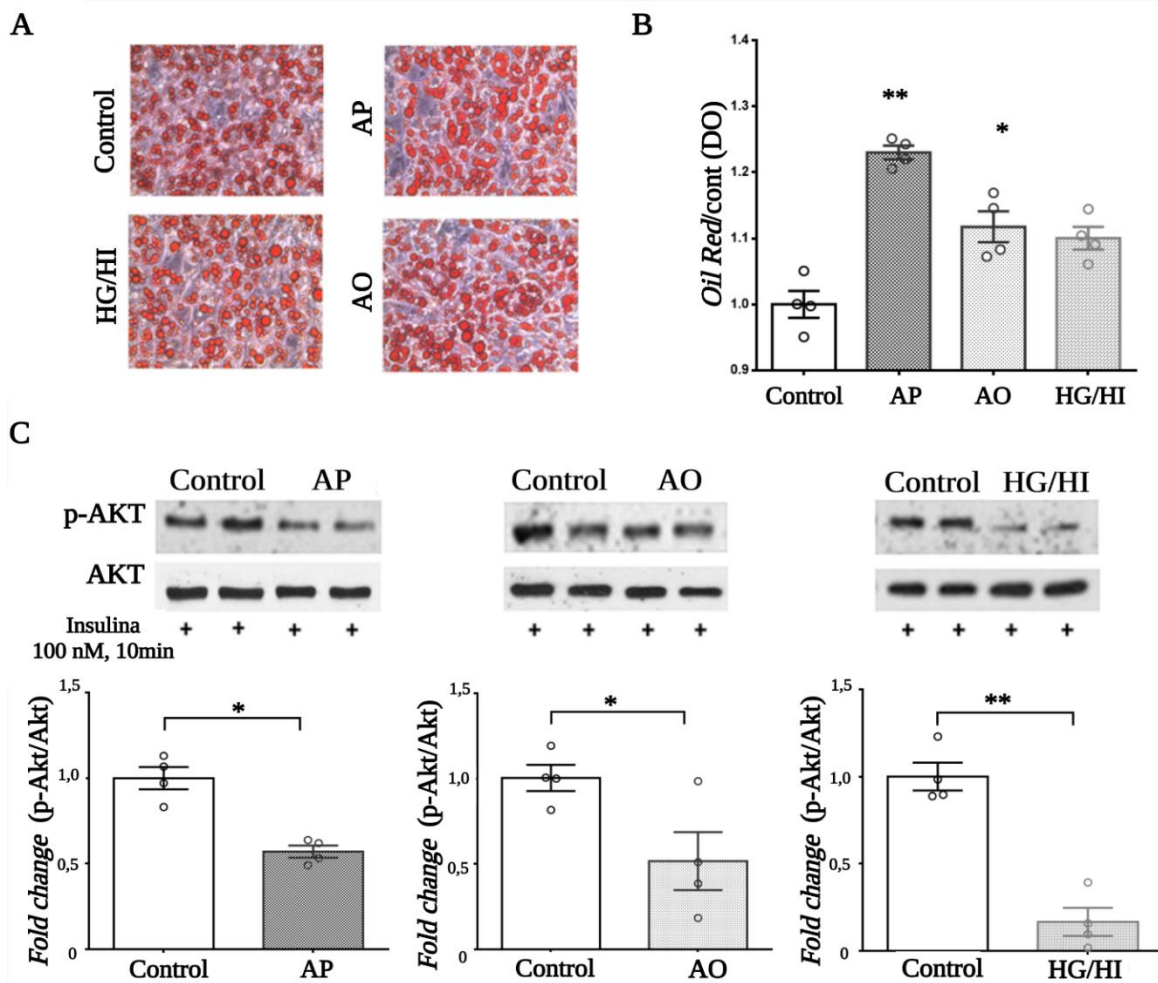


Figura 19. Establecimiento de modelos celulares de adipocitos patológicos [253]. Los preadipocitos C3H10T1/2 se diferenciaron a adipocitos maduros y se trataron con palmitato (500 µM, 18 h) (AP), ácido oleico (1 mM, 18 h) (AO) y glucosa alta (4,5 g/mL) / insulina alta (5 µg/mL, 24 h) (HG/HI) como se describe en el apartado de métodos (Figura 14). En (A) se muestran imágenes representativas de células control y tratadas teñidas con *Oil Red O*, y en (B) se representa la acumulación de lípidos estimada por densidad óptica (DO) con respecto a los adipocitos diferenciados control (n = 4 experimentos independientes). Las diferencias se analizaron mediante la prueba de *One-Way Anova-Kruskall Wallis*, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de *Dunn* ($p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativa). La estimulación de la vía de la insulina (insulina 100 nM, 10 min) de los adipocitos control y de los tratados con AP, AO y HG/HI se evaluó en los lisados celulares mediante inmunodetección de la forma fosforilada de Akt (ser 473-Akt). En (D) se muestran imágenes representativas de p-Akt y Akt total, y gráficos que muestran la densitometría de las bandas (expresión relativa p-Akt/Akt total respecto a las células control) de al menos 4 ensayos independientes para cada modelo celular. Las diferencias se analizaron mediante la prueba U de *Mann-Whitney*; $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) (Creado con BioRender.com).

4.1.1.2 Aislamiento y caracterización de las vesículas liberadas por los modelos establecidos

En un intento de dilucidar si los cambios metabólicos se reflejan en las vesículas extracelulares liberadas, se recogieron secretomas de los tres modelos celulares establecidos (4.1.1.1), y de adipocitos diferenciados como control. Un primer análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) de los precipitados resultantes (VEs) de la ultracentrifugación de estos secretomas, mostró la identificación de vesículas con un tamaño medio de 189,9 nm para las células de adipocitos control (VEs ADIPO), 144,9 nm para los tratados con palmitato (VEs AP), 145,0 nm para aquellos con ácido oleico (VEs AO) y 128,7 nm para las aisladas de las células expuestas al tratamiento HG/HI (VEs HG/HI) (Figura 20 A-F). En cambio, el tamaño de partículas capturadas mediante CD9 y CD81 (ExoView) mostró un perfil exosomal en torno a los 58 nm (Figura 20 F). Concretamente, se observó que las partículas capturadas con CD81 son más pequeñas que las VEs capturadas con CD9; teniendo un tamaño medio de 56 nm las VEs ADIPO, 58,75 nm las VEs HG/HI, 57,75 nm las VEs AP y 56,5 nm las VEs AO.

Además, curiosamente, las células hipertrofiadas con palmitato y ácido oleico mostraron una menor concentración de partículas/mL, pero un doble contenido proteico en comparación con las vesículas de las células de control y HG/HI (Figura 20 F). En cambio, el número de partículas capturadas por las tetraspaninas CD9 y CD81 mediante la tecnología ExoView fue similar en los diferentes secretomas celulares (Figura 20 G). Cabe destacar que el análisis con ExoView nos permitió observar que en general en estos modelos, las VEs están enriquecidas con CD9, ya que se capturaron el doble de vesículas con esta tetraspanina que con CD81 en los secretomas de adipocitos control, tratados con oleico, palmitato y HG/HI (Figura 20 F). Además, observamos mediante inmunodetección que estas VEs contienen diferentes marcadores endosomales/exosomales como la proteína que interactúa con la proteína de muerte celular programada 6 (Alix), la proteína del gen de susceptibilidad tumoral 101 (TSG101) y las tetraspaninas CD9 y CD81 (Figura 20 H). En definitiva, se puede concluir, que los adipocitos secretan vesículas extracelulares de carácter exosomal cuyo tamaño y concentración varía con los insultos metabólicos.

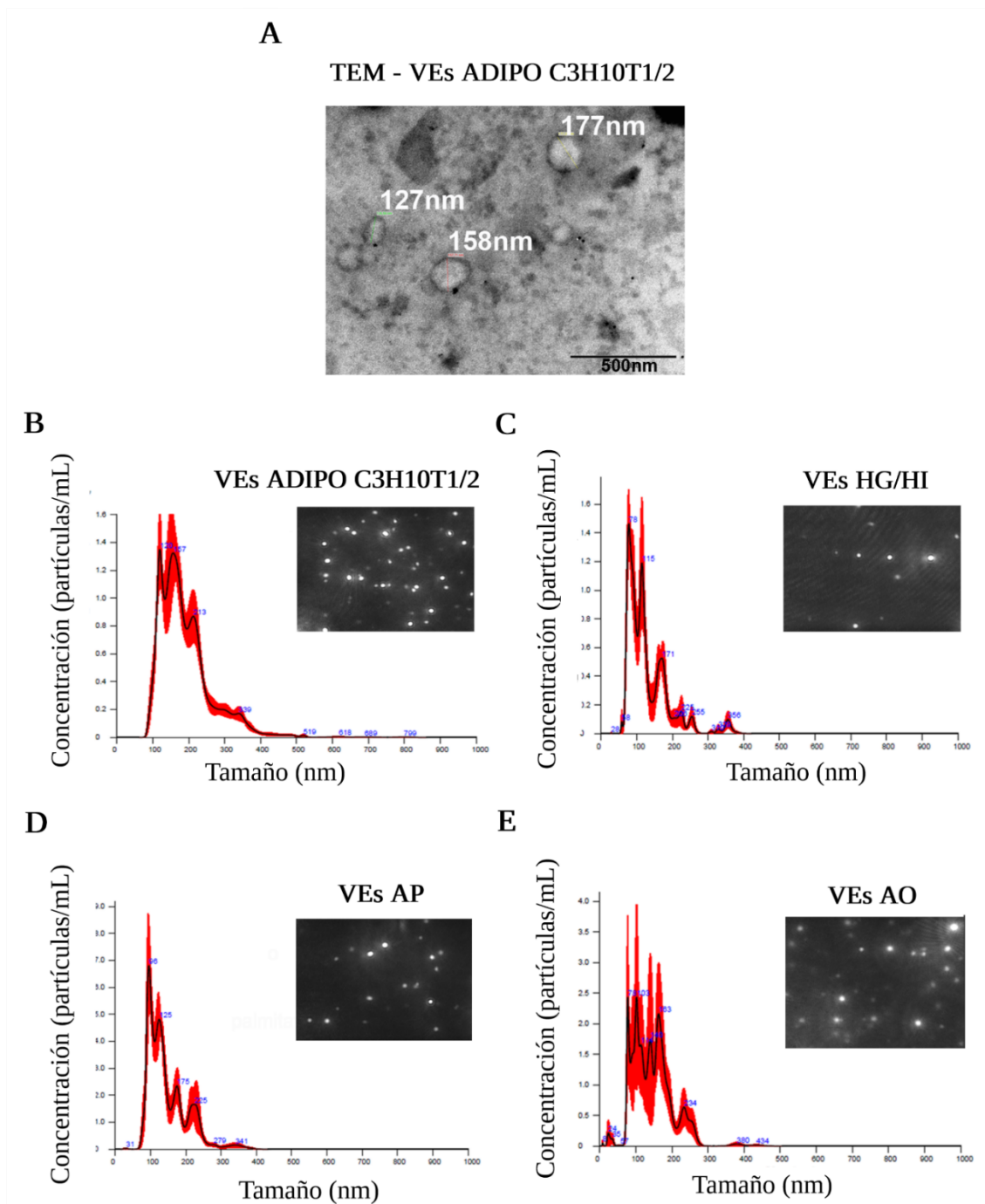
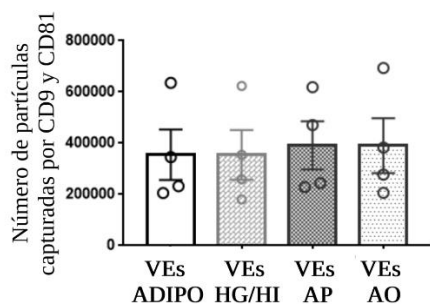


Figura 20.1. Los adipocitos secretan vesículas extracelulares de carácter exosomal cuyo tamaño y concentración varía con los insultos metabólicos. Se muestra una imagen representativa de TEM (microscopía electrónica de transmisión) de las VEs aisladas de adipocitos C3H10T1/2 control (VEs ADIPO) (A). Análisis mediante NTA (análisis de seguimiento de nanopartículas) de las VEs (vesículas extracelulares) de secretomas obtenidos de adipocitos C3H10T1/2 control (B) y tras insultos metabólicos con alta glucosa (4,5 g/L) / alta insulina (5 µg/mL, 24 h) (VEs HG/HI) (C), palmitato (500 µM, 18 h) (VEs AP) (D), y ácido oleico (1 mM, 18 h) (VEs AO) (E).

F

		VEs ADIPO	VEs HG/HI	VEs AP	VEs AO	
NTA	Concentración (partículas/frame)	51,4 +/- 4,6	13,6 +/- 0,4	7 +/- 0,5	4,3 +/- 0,3	
	Concentración (partículas/mL)	1,68*10 ¹² +/- 1,53*10 ¹¹	9,26*10 ⁹ +/- 2,90*10 ⁸	4,60*10 ⁹ +/- 3,56*10 ⁸	2,28*10 ⁹ +/- 1,80*10 ⁸	
	Tamaño medio (nm)	189,9 +/- 74,6	128,7 +/- 59	144,9 +/- 55,6	145,0 +/- 55,1	
ExoView	CD9	Número de partículas/μL	232242,25 +/- 153444	243081,2 +/- 172882	241754,25 +/- 120626	253299,5 +/- 151047
		Tamaño medio (nm)	59,5 +/- 2,08	59,25 +/- 3,33	58,5 +/- 0,58	60,25 +/- 2,22
	CD81	Número de partículas/μL	122606,25 +/- 44368	111390,2 +/- 23559	149160 +/- 94148	136865,7 +/- 64107
		Tamaño medio (nm)	56 +/- 0,5	58,75 +/- 2,87	57,75 +/- 0,95	56,5 +/- 2,71
Cuantificación proteica por el método Lowry (mg/mL)		0,27	0,25	0,4	0,48	

G



H

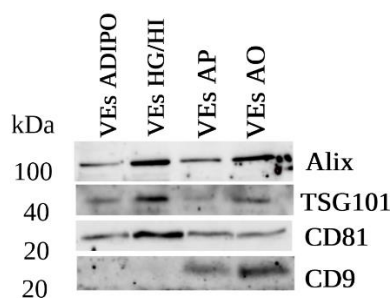


Figura 20.2. Los adipocitos secretan vesículas extracelulares de carácter exosomal cuyo tamaño y concentración varía con los insultos metabólicos. También se muestra el tamaño medio (nm) y la concentración estimada como partículas/frame, partículas/mL analizados mediante NTA; el tamaño (nm) y el número de partículas mediante análisis ExoView, y la concentración proteica (mg/mL) obtenida tras ultracentrifugar 30 mL de secretomas de cada condición (F). Además, se representa gráficamente el número de partículas capturadas por CD9 y CD81 en los distintos secretomas celulares (G). Se muestra la inmunodetección contra Alix (proteína que interactúa con PDCD6), TSG101 (proteína del gen de susceptibilidad tumoral 101), CD81 y CD9 en las VEs aisladas de 30 mL de secretoma celular (H). Se realizaron al menos 4 ensayos independientes para cada condición, y las diferencias se analizaron mediante *One-Way Anova-Kruskall Wallis* ($p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo) (Creado con BioRender.com).

4.1.1.3 Caracterización proteómica de las vesículas extracelulares (VEs) liberadas por los adipocitos C3H10T1/2, y su alteración con la hipertrofia lipídica y el desarrollo de resistencia a la insulina (RI)

Para obtener información sobre la composición proteica de las vesículas y de su variación en función del estado metabólico/patológico de la célula de origen, las vesículas aisladas se caracterizaron mediante análisis proteómico cualitativo (DDA) y cuantitativo (DIA-SWATH) por espectrometría de masas (MS) (n = 4 experimentos independientes). En el análisis proteómico cualitativo se consideraron aquellas proteínas presentes en 3 de los 4 experimentos independientes. Así, en este análisis cualitativo, se observó una llamativa diferencia entre las vesículas aisladas de los preadipocitos y de adipocitos diferenciados, identificando 138 proteínas diferentes y 825 respectivamente (Figura 21 A, C; **Anexo III**). Además, se identificaron 580 proteínas en las VEs de adipocitos hipertrofiados con palmitato (VEs AP), 292 en las vesículas desprendidas por adipocitos tratados con ácido oleico (VEs AO) y 590 en las de adipocitos resistentes a la insulina (VEs HG/HI) (Figura 21 B; **Anexo III**). Las VEs de los adipocitos control (VEs ADIPO) comparten el 55,8 %, el 57,7 % y el 31,3 % de las proteínas identificadas en las VEs HG/HI, AP y AO, respectivamente (Figura 21 C; **Anexo III**). Sin embargo; 209, 67, 32 y 5 proteínas diferentes estaban presentes exclusivamente en las VEs de adipocitos control, HG/HI, palmitato y ácido oleico, respectivamente (Figura 21 B; **Anexo III**).

La clasificación funcional de la carga proteica de las VEs analizadas mostró que la mayoría de las proteínas identificadas estaban presentes en la base de datos Vesiclepedia (Figura 21 D) [145]. Además, fue interesante ver que las VEs de adipocitos diferenciados contenían, en comparación con los preadipocitos, un mayor porcentaje de proteínas relacionadas con el metabolismo de las proteínas, el metabolismo general y las vías energéticas, y una disminución de las proteínas de crecimiento y/o mantenimiento celular (Figura 21 E). Por otro lado, las VEs aisladas de adipocitos resistentes a la insulina (VEs HG/HI) mostraron proteínas relacionadas con vías de señalización implicadas en el desarrollo de diabetes, las cuales no estaban presentes en las VEs secretadas por las células hipertrofiadas por los lípidos (VEs AP y VEs AO) (Figura 21 F, G). Las VEs liberadas por los adipocitos tratados con palmitato y ácido oleico contenían proteínas implicadas en las vías energéticas, rutas metabólicas, y transducción de señales, entre otras. En concreto, las VEs AO contienen un mayor porcentaje de proteínas implicadas en el metabolismo general, el crecimiento celular, el metabolismo de las proteínas y la transducción de señales en comparación con las VEs AP. Sin embargo, las VEs AP contenían proteínas de transducción de señales y de comunicación celular las cuales estaban en una menor proporción o ausentes en las VEs de adipocitos tratados con ácido oleico (Figura 21 G).

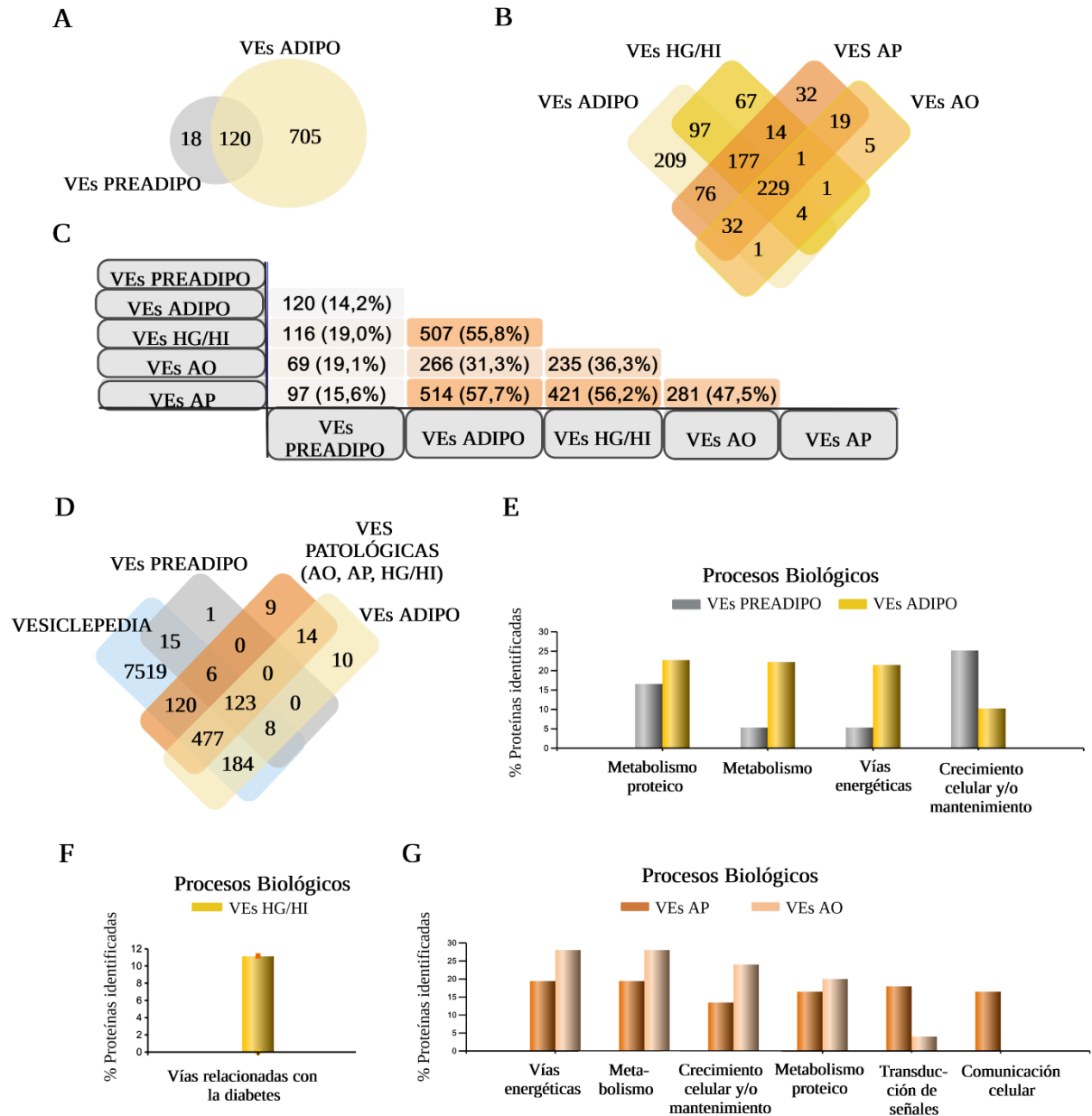


Figura 21. El análisis cualitativo de espectrometría de masas (DDA-MS) muestra que la carga proteica de las vesículas extracelulares (VEs) varía con la hipertrofia lipídica y la resistencia a la insulina [253]. Se analizaron por espectrometría de masas las VEs aisladas de adipocitos no diferenciados (VEs PREADIPO) y diferenciados (VEs ADIPO) como control, y también de los tratados con palmitato (500 μ M, 48 h) (VEs AP), ácido oleico (1 mM, 48 h) (VEs AO) y tratamiento con alta glucosa (4,5 g/L) / alta insulina (5 μ g/mL, 48 h) (VEs HG/HI). Diagrama de Venn descriptivo que muestra el número total de proteínas identificadas con un FDR <1 % (99 % de confianza en las proteínas) en vesículas aisladas de preadipocitos, adipocitos diferenciados de control y las de los tres modelos celulares patológicos (HG/HI, hipertrofia por palmitato y oleico) (n = 4 experimentos independientes considerando solo las proteínas presentes en 3 de las 4 muestras) (A - C). Todas las proteínas identificadas se compararon también con la base de datos Vesiclepedia [145] (D). Se muestra la clasificación del análisis funcional de las proteínas identificadas por proceso biológico y vías (mediante análisis en FunRich) para vesículas aisladas de preadipocitos y adipocitos (E); de HG/HI (F), y de células tratadas con palmitato y ácido oleico (G). FDR: tasa de falsos descubrimientos (Creado con BioRender.com).

Las proteínas identificadas exclusivamente en cada uno de los modelos patológicos (HG/HI, AP, AO) se compararon con la base de datos de obesidad y diabetes de GeneCards (<https://www.genecards.org>) (Figura 22 A, B) detectando que 42 proteínas de las VEs HG/HI, y 23 proteínas de las VEs AP y AO estaban presentes en esta base de datos de obesidad y

diabetes. En concreto, las proteínas que obtuvieron una mayor puntuación fueron la insulina-1, nicotinamida fosforribosiltransferasa, carboxipeptidasa E, metaloproteasa de matriz-2 y la proteína DJ-1 en las VEs HG/HI; en cambio, ceruloplasmina, osteopontina, hemo-oxigenasa 1, GTPasa pequeña de la familia Rac1 y calreticulina en las VEs AP y AO (Figura 22 A, B).

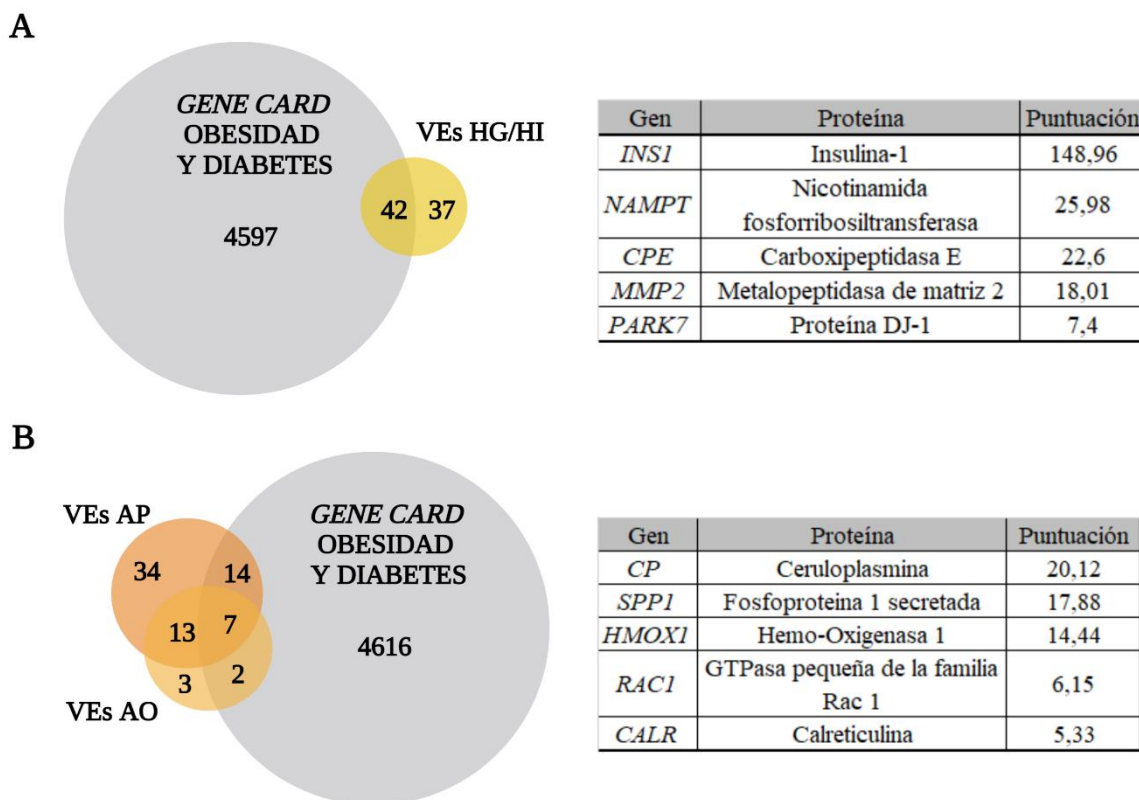


Figura 22. Las VEs patológicas contienen proteínas relacionadas con la obesidad y la diabetes. Se muestran diagramas de Venn en los que se compara la base de datos de genes de obesidad y diabetes de GeneCard con las proteínas identificadas exclusivamente (no presentes en las VEs liberadas de los adipocitos control) en las VEs de adipocitos tratados con alta glucosa/alta insulina (HG/HI) (A) y en los hipertrofiados por lípidos como palmitato (AP) y oleico (AO) (B). En las tablas se destacan las proteínas con una mayor puntuación.

4.1.1.4. Análisis proteómico comparativo mediante adquisición secuencial cuantitativa de todos los espectros de masas teóricos (DIA-SWATH/MS) de las VEs patológicas aisladas

El análisis cuantitativo de espectrometría de masas sin etiquetas mediante la adquisición secuencial diferencial de todos los espectros de iones-fragmentos teóricos (DIA-SWATH/MS) mostró aquellas proteínas que se encuentran elevadas y disminuidas en las VEs de los adipocitos diferenciados (VEs ADIPO) en comparación con las células no diferenciadas (VEs PREADIPO), y también comparando cada modelo patológico con los adipocitos control ($p \leq 0,05$, y $fold\ change \geq 2$) (Figura 23 A). Observamos que las VEs liberadas por adipocitos hipertrofiados con oleico (VEs AO) contienen más proteínas reguladas al alza (193) o disminuidas (131) que las VEs de los adipocitos hipertrofiados con palmitato (VEs AP) o con resistencia insulínica (VEs HG/HI). El análisis de componentes principales (PCA) de los resultados obtenidos muestra una clara separación de las VEs liberadas por los adipocitos tratados con palmitato (AP) y ácido oleico (AO) con respecto a los tratados con alta glucosa e

insulina (HG/HI), los cuales estaban más cerca de los adipocitos diferenciados control (Figura 23 B). En la Figura S1 (**Anexo IV**) se muestran los análisis de agrupación DIA-SWATH/MS de las proteínas de las VEs identificadas en los adipocitos control (VEs ADIPO) en comparación con las VEs de los preadipocitos (VEs PREADIPO), y de las VEs desprendidas de los modelos patológicos (HG/HI, AP, AO) en comparación con las VEs ADIPO.

Se representaron diagramas de Venn con el número de proteínas reguladas y mapas proteómicos representativos de la carga proteica de las vesículas secretadas por los adipocitos diferenciados control respecto a los preadipocitos, y de aquellas reguladas al alza o disminuidas en los adipocitos patológicos en comparación con las VEs de las células diferenciadas control (Figura 23 C-F). En las VEs ADIPO se observó un mayor número de adipocinas clásicas de los adipocitos como es la adiponectina u otras proteínas y hormonas relacionadas con la diferenciación y adipogénesis como la proteína de síntesis de ácidos grasos (FAS), la proteína de unión a ácidos grasos en adipocitos (FABP4), la hormona sensible a lipasas (HSL), caveolina-1, entre otras. Al contrario, las VEs PREADIPO estaban compuestas por proteínas relacionadas con la adhesión celular o remodelación de la matriz como la miosina-3, α -actina-1 o fibronectina; y proteínas de carácter endosomal o tetraspaninas como la proteína que interactúa con la proteína de muerte celular programada 6 (Alix), CD81 o la tetraspanina 4 (Figura 23 E). Cabe destacar, que las VEs patológicas contenían una mayor ratio de proteínas relacionadas con la adiposidad, la remodelación de la matriz o la diferenciación celular como FABP4, la metaloproteínasa de matriz 2 (MMP-2) o galectina 1 y 2 en las VEs HG/HI; proteínas relacionadas con el tráfico de proteínas o la activación de cascadas de señalización como syntaxina-1, Glut-4 o la proteína de factor tisular en las VEs AP; o proteínas relacionadas con el tráfico de lípidos como la proteína asociada a las caveolas 1 (CAVN1) u otras proteínas relacionadas con la matriz extracelular como osteopontina o la proteína de cadena pesada del inhibidor de la inter- α -tripsina H3 (ITIH3) en las VEs AO en comparación a las VES ADIPO (Figura 23 F). Curiosamente, encontramos que la glicoproteína ceruloplasmina se encontraba elevada en las VEs de los tres modelos patológicos en comparación con las VEs ADIPO.

Además, el análisis DIA-SWATH/MS permitió observar diferencias en la composición proteica de las VEs desprendidas por los diferentes adipocitos patológicos (Tabla 11). Concretamente, las VEs de los modelos de resistencia insulínica (HG/HI) en comparación con las VEs de los modelos de hipertrofia lipídica (AP, OA) mostraron diversas proteínas o enzimas regulados al alza como la proteína relacionada con el citoesqueleto vimentina, o la proteína relacionada con la adhesión celular como la proteína ig-h3 inducida por el factor de crecimiento transformante (BGH3, TGFBI), proteína de unión a la calciclina y diferentes anexinas y queratinas entre otras proteínas. Curiosamente, se observó que la proteína ceruloplasmina o la enzima ATP-citrato sintasa (ACLY) se encontraban disminuidas en las VEs HG/HI.

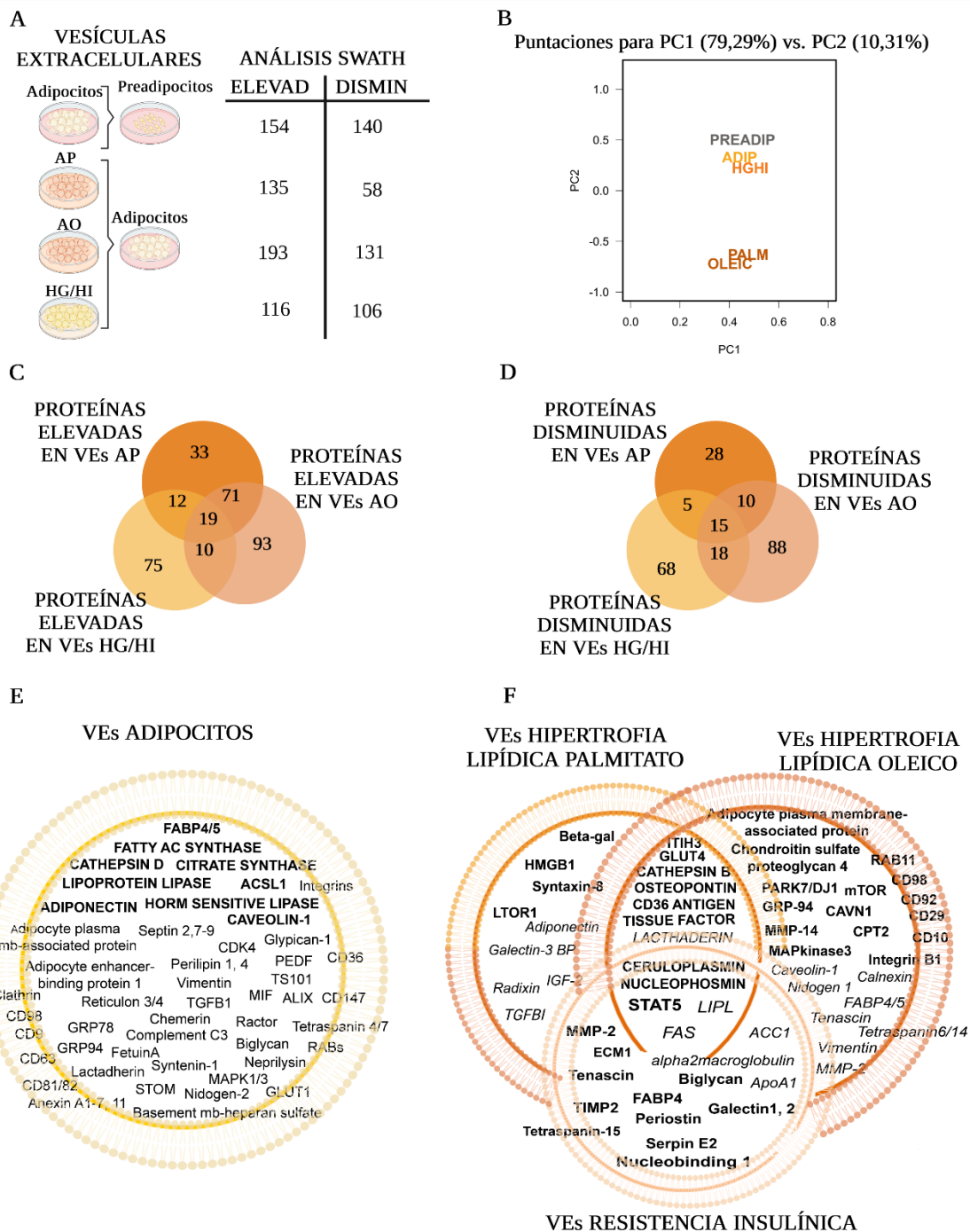


Figura 23. La adquisición secuencial cuantitativa de todos los espectros de masas teóricos (DIA-SWATH/MS) de las VEs patológicas identifica proteínas relacionadas con la obesidad y potenciales biomarcadores [253]. Se muestran las diferencias en la carga proteica de los adipocitos control (ADIPO) frente a los preadipocitos (PREADIPO), y también en las VEs desprendidas por las células patológicas tratadas con palmitato (AP), oleico (AO) y alta glucosa/alta insulina (HG/HI) en comparación con los ADIPO mediante el análisis comparativo DIA-SWATH/MS (A). Se muestra el análisis de los componentes principales (PCA) de las áreas DIA-SWATH/MS transformadas para la comparación cuantitativa de todas las muestras ($n = 4$ experimentos independientes con 3 réplicas técnicas cada uno; p -valor $\leq 0,05$; a $fold\ change \geq 2$) (B). Se representan diagramas de Venn que comparan las proteínas reguladas: elevadas (ELEVAD) (C) y disminuidas (DISMIN) (D) en las VEs de los 3 modelos patológicos. Se muestra un mapa representativo del proteoma de las VEs ADIPO en comparación con el proteoma de las VEs PREADIPO; en negrita se representan las proteínas que se encontraron elevadas (E). También, se muestra un mapa representativo del proteoma en el que se destacan las proteínas elevadas (en negrita) y disminuidas (en cursiva) en las VEs aisladas de adipocitos patológicos (HG/HI, AP, AO) en comparación con las VEs ADIPO (F) (Creado con BioRender.com).

Tabla 11. Lista de proteínas identificadas en el análisis cuantitativo DIA-SWATH/MS de las VEs del modelo celular HG/HI en comparación con los modelos celulares de hipertrofia con palmitato (AP) y oleico (AO) [253]. Se muestra el *fold change* de las proteínas elevadas y disminuidas para un p-valor <0,05.

UNIPROT	NOMBRE PROTEÍNA	HGHI/AP Fold Change	HGHI/AO Fold Change
CH60_MOUSE	Proteína de choque térmico de 60 kDa, mitocondrial	2,88	4,24
RL18A_MOUSE	Proteína ribosomal 60S L18a	Infinito	Infinito
MMP2_MOUSE	Colagenasa tipo IV de 72 kDa	14,89	Infinito
ANXA4_MOUSE	Anexina A4	2,22	3,15
ANXA5_MOUSE	Anexina A5	2,59	4,21
ACLY_MOUSE	ATP-citrato sintasa	0,29	0,18
E41L2_MOUSE	Proteína 2 similar a la banda 4.1	Infinito	Infinito
BASP1_MOUSE	Proteína soluble en ácido cerebral 1	12,14	3,42
CYBP_MOUSE	Proteína de unión a calciclina	50,17	12,74
CERU_MOUSE	Ceruloplasmina	0,05	0,04
CO6A1_MOUSE	Cadena de colágeno alfa-1(VI)	4,89	7,69
CTBP1_MOUSE	Proteína de unión C-terminal 1	0,06	0,03
CUL4A_MOUSE	Cullin-4A	0,37	0,24
CP2DB_MOUSE	Citocromo P450 2D11	Infinito	7,98
DNJA1_MOUSE	DnaJ homólogo subfamilia A miembro 1	Infinito	Infinito
ECII_MOUSE	Enoyl-CoA delta isomerasa 1, mitocondrial	2,06	4,20
ECHD1_MOUSE	Etilmalonil-CoA descarboxilasa	3,60	2,25
ECM1_MOUSE	Proteína de la matriz extracelular 1	5,04	6,96
GDN_MOUSE	Nexina derivada de la glía	3,51	3,80
GFPT1_MOUSE	Glutamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa [isomerizante] 1	Infinito	Infinito
AMPE_MOUSE	Glutamil aminopeptidasa	3,44	6,77
GNA11_MOUSE	Subunidad de la proteína de unión a nucleótidos de guanina α -11	3,21	Infinito
H11_MOUSE	Histona H1.1	7,54	5,41
H14_MOUSE	Histona H1.4	3,47	28,62
IPO5_MOUSE	Importina-5	0,36	0,35
ITA5_MOUSE	Integrina alfa-5	2,70	4,59
KRT34_MOUSE	Queratina, tipo I cuticular Ha4	2,57	4,82
K2C1_MOUSE	Queratina, tipo II citoesquelética 1	7,01	11,99
K2C5_MOUSE	Queratina, tipo II citoesquelética 5	3,79	3,04
MFGM_MOUSE	Lactadherina	2,79	2,10
MYADM_MOUSE	Marcador de diferenciación asociado a los mieloides	2,17	2,06
ML12B_MOUSE	Cadena ligera reguladora de la miosina 12B	2,97	28,24
MYH1_MOUSE	Miosina-1	0,33	0,19
MYPC2_MOUSE	Proteína C de unión a la miosina, tipo rápido	10,19	6,07
MARCS_MOUSE	Sustrato de la cinasa C rica en alanina miristoilada	3,09	3,61
NPL4_MOUSE	Proteína nuclear de localización 4 homóloga	Infinito	Infinito
NUCB1_MOUSE	Nucleobindina-1	4,70	3,68
PEBP1_MOUSE	Proteína de unión a fosfatidiletanolamina 1	2,52	Infinito
PLS3_MOUSE	Fosfolípido revuelto 3	Infinito	3,52
PA1B2_MOUSE	Subunidad beta de la acetilhidrolasa IB del factor activador de las plaquetas	3,32	6,81
FPRP_MOUSE	Regulador negativo del receptor de prostaglandina F2	2,68	2,07
RENK_MOUSE	Receptor de renina	3,06	3,62
SERPH_MOUSE	Serpina H1	4,86	7,92
SPTN1_MOUSE	Cadena alfa de espectrina, no eritrocítica 1	5,08	7,67
SCOT1_MOUSE	Succinil-CoA:3-cetoácido coenzima A transferasa 1, mitocondrial	0,40	0,40
TENA_MOUSE	Tenascina	3,70	82,98
TSN15_MOUSE	Tetraspanina-15	8,85	15,34
TITIN_MOUSE	Titina	0,22	0,17
BGH3_MOUSE	Proteína ig/h3 inducida por el factor de crecimiento transformante	16,46	3,58
TXTP_MOUSE	Proteína transportadora de tricarbóxilato, mitocondrial	5,02	2,68
TBA3_MOUSE	Cadena de tubulina alfa-3	0,26	0,17
COQ9_MOUSE	Proteína de biosíntesis de ubiquinona COQ9, mitocondrial	4,05	6,27
VIME_MOUSE	Vimentina	3,14	5,52

4.1.2 Caracterización de las VEs de explantes de tejido adiposo completo humano

El tejido adiposo blanco (TAB) muestra un fenotipo metabólico y genético distinto según su localización anatómica, siendo la acumulación en exceso de tejido adiposo visceral (TAV) un factor de riesgo clave en el desarrollo de enfermedades metabólicas en pacientes obesos; mientras que el subcutáneo (TAS) juega un papel más protector [48]. Por ello, después de observar que los insultos metabólicos provocan cambios en la composición proteica de los adipocitos en cultivo, nuestro objetivo fue determinar si las VEs del tejido adiposo contenían diferente composición proteica según su lugar de origen, y si las VEs del TAV estaban relacionadas con diferentes comorbilidades de la obesidad. Además, con este estudio del tejido completo, pretendemos hacer un análisis no solo de las VEs secretadas por los adipocitos, sino de todas las demás componentes celulares incluidas las células del sistema inmune que invaden este tejido en la obesidad. Por otro lado, nos permitirá obtener una visión más real del tejido al poder mantener la estructura tridimensional del mismo; así se podrá considerar la rigidez de la matriz extracelular y la hipoxia propia del tejido adiposo hipertrofiado e inflamado.

4.1.2.1 Características clínicas de los pacientes

Como se comentó en el **apartado 3.1.1.1**, se recogieron explantes de tejido adiposo (subcutáneo y visceral) de donantes obesos sometidos a cirugía bariátrica tras la firma de consentimiento informado (n = 44 pacientes) (Tabla 5). De esa cohorte, se aislaron las VEs del secretoma de los explantes de tejido adiposo de 10 pacientes independientes (n = 20 muestras; 10 TAS, 10 TAV) para su posterior caracterización vesicular y proteómica: NTA (análisis de seguimiento de nanopartículas) (n = 2), TEM (microscopio electrónico de transmisión) (n = 2), inmunodetección con antígenos vesiculares (n = 2), ExoView (n = 8) y análisis proteómico (DDA, DIA-SWATH/MS) (n = 6). Cabe destacar que las muestras destinadas para el análisis de espectrometría de masas pertenecían a donantes con comorbilidades asociadas a la obesidad y, además, presentaban características más extremas que otros donantes. En concreto, estas muestras pertenecían a 3 mujeres con un IMC promedio de 49,35 (+/- 11,19) kg/m² y con una edad promedio de 53 años (+/- 5) (Tabla 12). Además 2 de las donantes eran diabéticas, y otra prediabética con un 6,2 % de hemoglobina glicosilada (HbA1c) (Tabla 5 y 12). También, se observó que estas donantes tenían un nivel promedio de glucosa en ayuno de 100,33 (+/- 16,8) mg/dL, 150,67 (24,09) mg/dL de colesterol, 99 (+/- 18,25) mg/dL de triglicéridos y 0,669 (+/- 0,399) mg/dL de proteína C reactiva (CRP-ultra) (Tabla 5 y 12).

En el caso del análisis con ExoView, las muestras de secretomas utilizadas fueron donadas por 4 mujeres con obesidad con un promedio de IMC de 43,43 (+/- 6,85) kg/m² y con una edad media de 46 (+/- 10) años. Cabe mencionar que una de las donantes era diabética con un porcentaje de hemoglobina glicosilada de 8,5 (Tabla 5 y 8) y, además, 3 de ellas tenían un nivel de proteína C reactiva (CRP-ultra) mayor que 1 mg/dL lo que indicaba un estado inflamatorio. También, se observó que estas donantes tenían un nivel promedio de glucosa en ayuno de 104 (+/- 26,99) mg/dL, 171,5 (25,25) mg/dL de colesterol y 135,25 (+/- 56,34) mg/dL de triglicéridos (Tabla 5 y 12).

Tabla 12. Datos clínicos de las pacientes que donaron muestras de tejido adiposo subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) que fueron analizadas mediante espectrometría de masas y ExoView (Tabla 5). Se muestra el promedio junto la desviación estándar de los siguientes datos clínicos: sexo, edad, IMC (Índice de Masa Corporal), HbA1c (hemoglobina glicosilada), glucosa, colesterol, triglicéridos y la proteína C reactiva (CRP-ultra).

	ANÁLISIS PROTEÓMICO (N = 3)	ANÁLISIS EXOVIEW (N = 4)
SEXO	Mujeres	Mujeres
EDAD (AÑOS)	53 +/- 5	46 +/- 10
IMC (Kg/m²)	49,35 +/- 11,91	43,43 +/- 6,85
HBA1C (%)	6,16 +/- 0,25	6,225 +/- 1,55
GLUCOSA (mg/dL)	100,33 +/- 16,8	104 +/- 26,99
COLESTEROL (mg/dL)	150,67 +/-24,09	171,5 +/- 25,25
TRIGLICÉRIDOS (mg/dL)	99 +/- 18,25	135,25 +/- 56,34
CRP-ULTRA (mg/dL)	0,669 +/- 0,339	1,47 +/- 1,117

4.1.2.2 Caracterización del perfil vesicular de las VEs liberadas por el tejido adiposo obeso humano visceral y subcutáneo

Las VEs, aisladas de los secretomas del TA humano de origen visceral (TAV) y subcutáneo (TAS) se caracterizaron por TEM (microscopía electrónica de trasmisión) y NTA (análisis de seguimiento de nanopartículas) (Figura 24 A, B), ExoView (caracterización de tamaño, cantidad y perfil de tetraspaninas) (Figura 24 C-E) e inmunodetección de marcadores vesiculares (Figura 24 F). La medición de tamaño mediante NTA mostró que el tamaño medio de las vesículas aisladas del tejido adiposo obeso era de 175,9 +/- 5,4 nm para las secretadas por la grasa visceral (VEs TAV) y 167,3 +/- 2,9 nm para las secretadas por la subcutánea (VEs TAS) (Figura 24 C). En cambio, mediante el análisis ExoView se observó que estas VEs medían entre 60 y 70 nm, siendo las VEs capturadas con la tetraspanina CD63 más pequeñas que las VEs capturadas con CD9 o CD81 (Figura 24 C y D).

La concentración de VEs aisladas por gramo de TA resultó ser mayor en las vesículas de origen visceral que de origen subcutáneo, observando diferencias estadísticamente significativas mediante el aislamiento con la captura con las tetraspaninas CD63, CD81 y CD9 (Figura 24 C, E). Además, las VEs TAV contiene una mayor concentración proteica (mg/mL) por gramo de tejido adiposo que las VEs TAS (Figura 24 C). Tanto las vesículas aisladas del TAV como TAS fueron positivas para diferentes marcadores endosomales/exosomales como CD81, CD9, CD63 y Alix, y negativas para GRP94 por detección inmunológica (Figura 24 F).

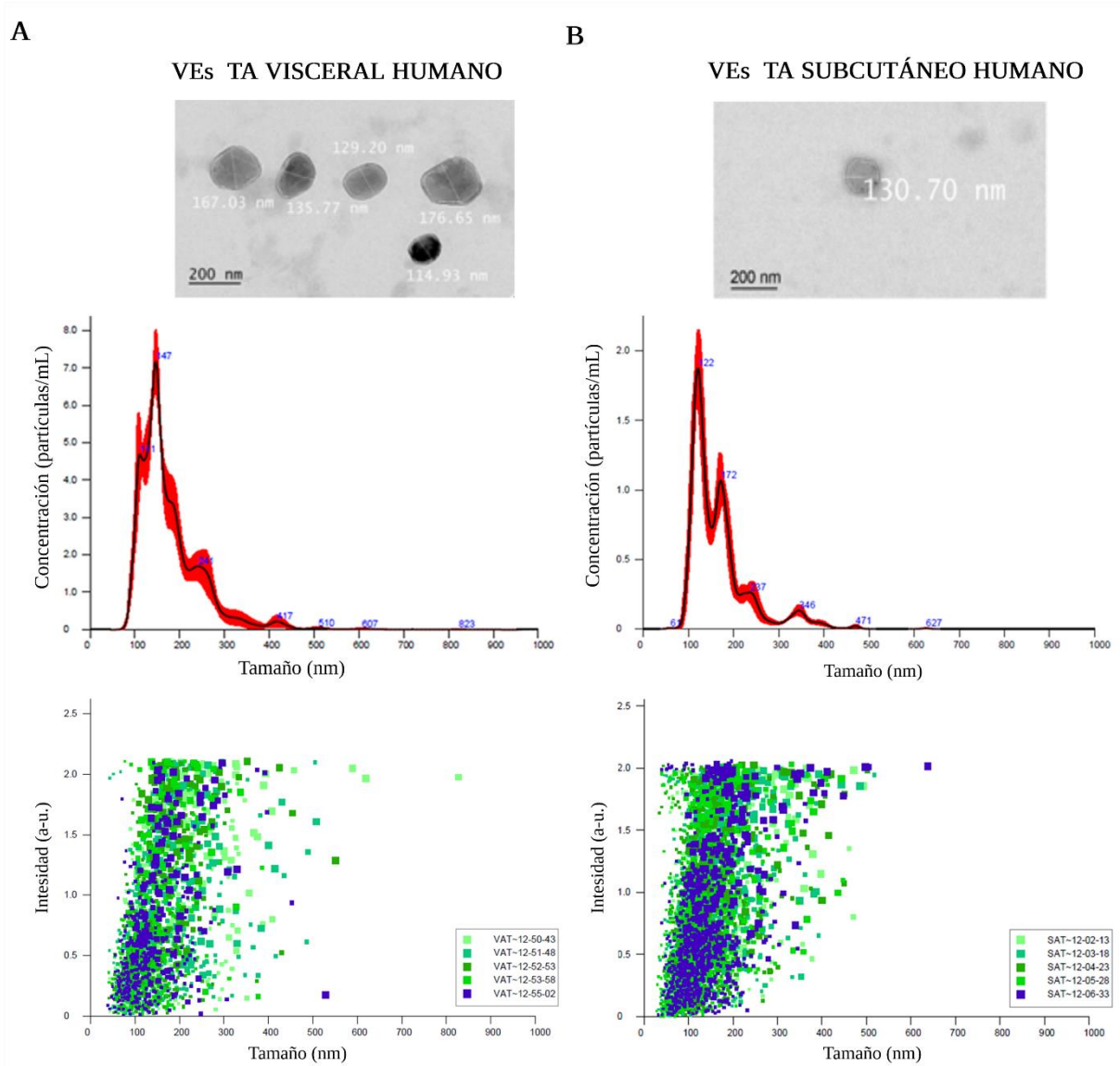
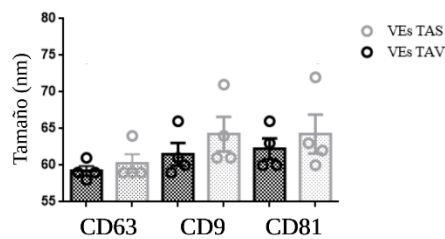


Figura 24.1. Caracterización de las VEs aisladas de explantes de tejido visceral (TAV) y subcutáneo (TAS) de pacientes con obesidad [254]. Se muestran las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y la distribución del tamaño (nm) mediante el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) de muestras representativas de VEs aisladas de los secretomas TAV (A) y TAS (B) (n = 1).

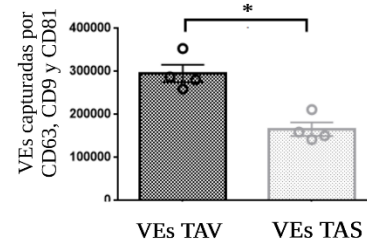
C

		VEs TAV Humano	VEs TAS Humano	
NTA	Concentración (partículas/frame)	59,1 +/-5,4	40,7+/-2,0	
	Concentración (partículas/ 1 g TA)	$9,4 \cdot 10^{10}$	$6,7 \cdot 10^{10}$	
	Tamaño medio (nm)	175+/- 5,4	167,3+/- 2,9	
ExoView	CD63	Número de partículas/ μ L	107370,5+/- 16384	60946+/-8908
		Tamaño medio (nm)	59,25+/-1,25	60,25+/-2,5
	CD9	Número de partículas/ μ L	99381+/-8956	60577+/- 10216
		Tamaño medio (nm)	61,5+/-3,11	64,25+/-4.71
	CD81	Número de partículas/ μ L	88619+/-7747	44304,25+/- 5204
		Tamaño medio (nm)	62,25+/-2,87	64,25+/-5,31
Cuantificación proteica por el método Lowry (mg/mL)/1 g TA)		8	5,3	

D



E



F

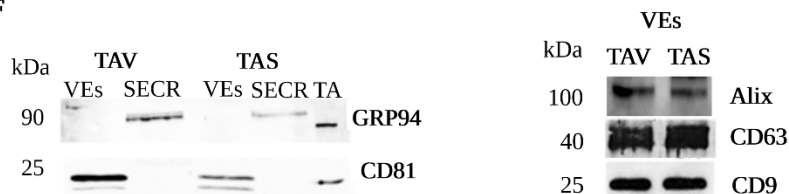


Figura 24.2. Caracterización de las VEs aisladas de explantes de tejido visceral (TAV) y subcutáneo (TAS) de pacientes con obesidad [254]. Se resume el promedio junto a la desviación estándar del tamaño (nm), la concentración de partículas/frame, las partículas aisladas por 1 gramo de cada explante de tejido analizado por NTA; el número y tamaño de VEs según el anticuerpo de captura: CD63, CD9 y CD81 analizados por ExoView; y la concentración de proteína en las VEs (mg/mL) (C). También se muestra la representación gráfica del tamaño (nm) (D) y el número de VEs capturadas por las tres tetraspaninas en cada chip (E) (n = 4). Las imágenes representativas de inmunodetección para marcadores de las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81, de la proteína endosomal Alix y del control negativo GRP94 en VEs aisladas de los secretomas y de las VEs del TAV y TAS de pacientes con obesidad se representan en (F). Las diferencias se analizaron mediante *One-Way Anova-Kruskall Wallis* o el test de Wilcoxon Mann Whitney (se consideró estadísticamente significativo *: $p \leq 0,05$). TA: tejido adiposo; SECR: medio de cultivo tisular tras el aislamiento de las vesículas por ultracentrifugación (Creado con BioRender.com).

4.1.2.3 Análisis cualitativo (DDA) del proteoma de las vesículas secretadas por el tejido obeso visceral y subcutáneo

El análisis proteómico cualitativo (DDA) de vesículas aisladas de 3 pacientes obesos mórbidos independientes identificó 575 proteínas diferentes en las vesículas liberadas por el tejido adiposo visceral obeso (VEs TAV) y 404 en las liberadas por la grasa subcutánea (VEs TAS) (**Anexo III**). El análisis de enriquecimiento funcional de todas las proteínas identificadas muestra que la mayoría de las proteínas estaban presentes en la base de datos de la Vesiclepedia (Figura 25 A) [145]. Así, el análisis de componentes celulares clasificó estas proteínas como pertenecientes a exosomas (68,55 % en VEs TAV; 75,25 % en VEs TAS), lisosomas, membrana plasmática, y extracelular (región espacio, y matriz) entre otros (Figura 25 B). Estas vesículas de naturaleza exosomal mostraron marcadores de tetraspaninas (CD63, CD9 y CD81) y marcadores de endosoma como sintenina-1 y TSG101 (**Anexo III**). También se identificaron marcadores de VEs pequeñas, como ADAM10 (proteína que contiene el dominio de desintegrina y metaloproteínasa 10) y EHD4 (proteína que contiene el dominio EH 4). Además, en las VEs de TAV obeso se identificó la proteína endoplasmína (gp96) la cual se considera un marcador de VEs grandes (**Anexo III**).

El análisis funcional (FunRich) de todas las proteínas identificadas en las VEs del TAV y TAS mostró la presencia de proteínas relacionadas con transporte, catalíticas, GTPasas, moléculas estructurales, proteasas y chaperonas, con muy pocas diferencias entre ambos depósitos (Figura 25 C). Sin embargo, las VEs TAS mostraron un mayor porcentaje de diversos constituyentes de la matriz extracelular que las del TAV (Figura 25 C). En términos de procesos biológicos, las VEs TAV mostraron más proteínas relacionadas con la vía energética y el metabolismo; mientras que las VEs TAS contenían más proteínas clasificadas como de transducción y crecimiento, mantenimiento y comunicación celular (Figura 25 C). Las vesículas de ambos depósitos contenían proteínas de señalización de la vía TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral), VEGF (factor de crecimiento endotelial) y VEGFR (factor de crecimiento endotelial vascular), y de sindecán-1. Es interesante destacar que se observó que las proteínas identificadas en las vesículas de ambos depósitos se clasificaron como presentes en suero, monocitos, neutrófilos, tejido blando, leucocitos, preadipocitos, macrófagos y adipocitos (Figura 25 C).

Además, el análisis de la anotación de proteínas mediante el sistema de clasificación de relaciones evolutivas (PANTHER) mostró que las vesículas liberadas por TAV y TAS de pacientes con obesidad divergían en su clasificación funcional (**Anexo IV**- Figura S2, A). De acuerdo con el anterior análisis (FunRich), las VEs aisladas por el TAV mostraron un mayor porcentaje relacionado con el proceso metabólico. Entre otras funciones, el análisis de vías de señalización Reactome reveló un mayor porcentaje de proteínas relacionadas con el sistema inmunitario (tanto innato como adaptativo) en las vesículas de TAV (**Anexo IV**-Figura S2, B).

El 52 % de las proteínas identificadas en las VEs del TAV y el 31 % en las VEs del TAS obeso eran exclusivas de cada depósito (Figura 25). Teniendo en cuenta que la descripción de la carga proteica de las vesículas del TA (tejido adiposo) en el contexto de la obesidad es esencial para comprender su papel en la desregulación del metabolismo, establecimos un mapa de proteínas de referencia de las vesículas TAV y TAS obeso que muestra las proteínas más

relevantes clasificadas según su función (Figura 26). Además de contener un mayor número de proteínas diferentes las VEs TAV de pacientes con obesidad, estas mostraban más carga relacionada con el TA y la adiposidad central que las vesículas del TAS. Es relevante destacar que fuimos capaces de identificar adipoquinas como la leptina, la GRP78, la lipasa sensible a hormonas (HSL), ceruloplasmina, DDP-4 (dipetidilpeptidasa 4) y septina 11, entre otras, en las vesículas desprendidas por el TAV obeso (Figura 26 A). Sin embargo, las VEs de origen subcutáneo contenían principalmente constituyentes de la matriz celular como anexinas, integrinas o proteínas implicadas en eventos de señalización (Figura 26 B).

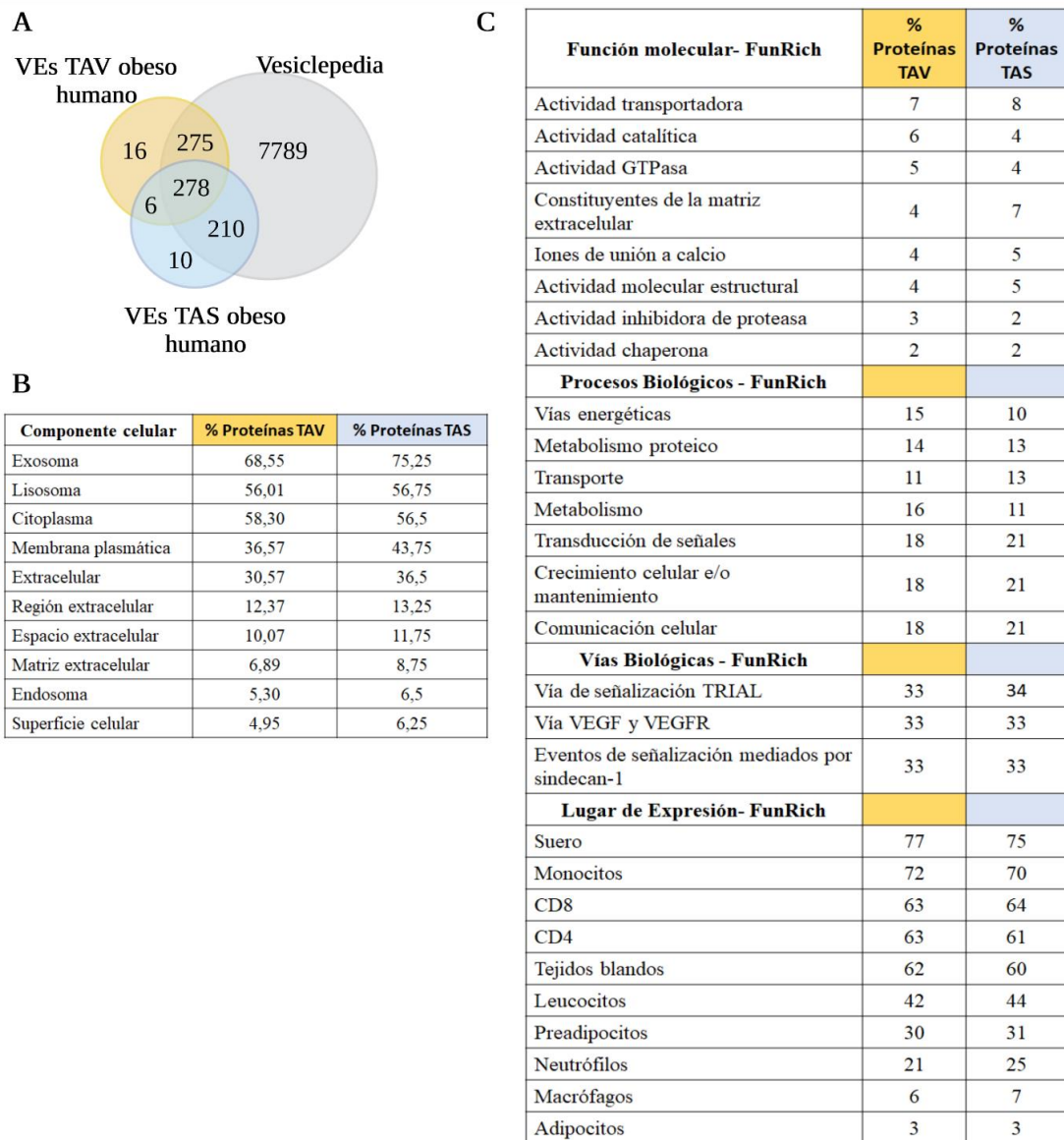


Figura 25. Análisis del proteoma de las vesículas (VEs) liberadas por el TAV y el TAS de pacientes con obesidad [254]. Se muestra un diagrama de Venn descriptivo con el número total de proteínas identificadas con un FDR (tasa de falsos descubrimientos) <1 % en VEs aisladas de tejido adiposo visceral (TAV) en comparación con el tejido adiposo subcutáneo (TAS) de 3 pacientes obesos independientes (Tabla 12), también en comparación con la base de datos Vesiclepedia [145] (A). Se muestra la clasificación del análisis funcional de las proteínas identificadas por componente celular (porcentajes por genes anotados a cada clase) para las VEs aisladas TAV y TAS (B). Se muestra el análisis funcional (FunRich) según la función molecular, proceso y vía biológica, y lugar de expresión (porcentajes de genes anotados a cada clase) en (C) (Creado con BioRender.com).

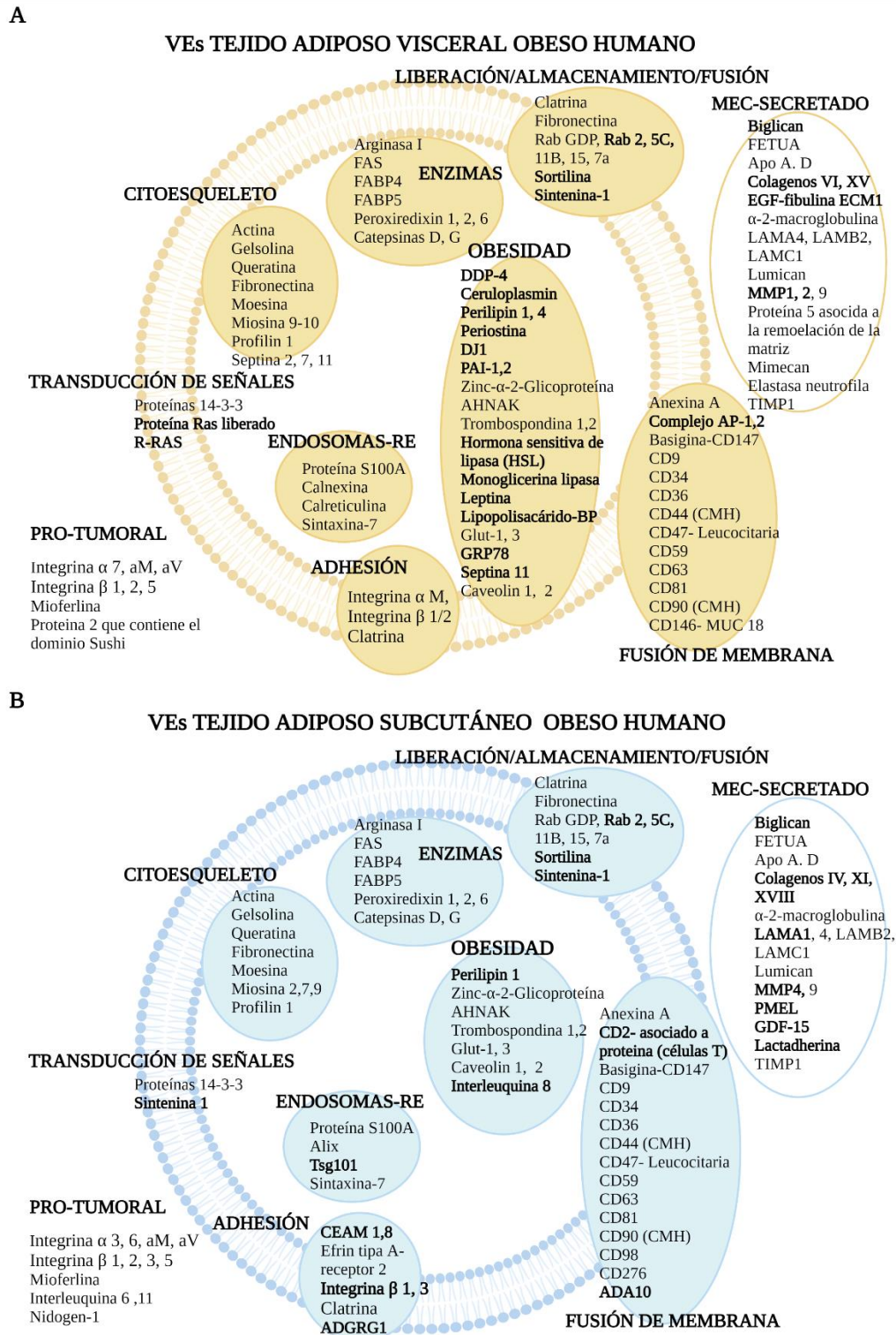


Figura 26. Mapas del proteoma de las vesículas (VEs) liberadas por tejido adiposo visceral y subcutáneo de pacientes con obesidad [254]. Se establecieron mapas proteómicos con las proteínas más representativas obtenidas en el análisis por espectrometría de masas de VEs aisladas de secretomas de 3 pacientes independientes (n = 3 VAT y n = 3 SAT); Tabla 12. Las proteínas se clasificaron según la estructura, la biogénesis y la función, incluyendo la matriz extracelular (MEC). Además, se destacan las proteínas relacionadas con el tejido adiposo y la obesidad en la bibliografía, y también las proteínas potencialmente protumorales. Las proteínas en negrita indican que son exclusivas del depósito (Creado con BioRender.com).

4.1.2.4 Análisis proteómico cuantitativo mediante DIA-SWATH/MS de las vesículas secretadas por el tejido adiposo visceral y subcutáneo

Para obtener un análisis más profundo, se realizó un análisis diferencial cuantitativo mediante DIA-SWATH/MS (adquisición secuencial de todos los espectros de masas teóricos) (Figura 27). El PCA (análisis de componentes principales) de los resultados obtenidos mostró una separación de las muestras de VEs de TAV y TAS, y también reveló un subconjunto dentro de las muestras de TAV (Figura 27 A). El análisis de la expresión diferencial de proteínas con un *fold change* mayor que 1,5 y un p-valor de 0,05 permitió seleccionar las diez proteínas que mejor separan las vesículas TAS y TAV: decorina (PGS2_HUMAN), ATPasa TER (TERA_HUMAN), la proteína asociada a la diferenciación del neuroblasto AHNAK (AHNK_HUMAN), la histona H2B (H2B2E_HUMAN), la proteína asociada a la caveola 1 (CAVN1_HUMAN), CD157 (BST1_HUMAN), integrina beta-1 (ITB1_HUMAN), aldehído deshidrogenasa (ALDH2_HUMAN), inmunoglobulina gamma-1 de cadena pesada (IGG1_HUMAN), y mimecan (MIME_HUMAN) (Figura 27 B, C).

Mediante un análisis más restrictivo (*fold change* ≥ 2), se encontró que 18 proteínas estaban elevadas en las vesículas liberadas por el TAV obeso, y 34 en las VEs del TAS (Tabla 13 y Figura 27 D). Las proteínas más elevadas en las vesículas del TAV son la histona H2B (H2B2E), la queratina, TGFBI (proteína ig-h3 inducida por el factor de crecimiento transformante, BGH3), proteína asociada a la caveola 1 (CAVN1), antígeno de diferenciación de monocitos, CD14 y mimecan entre otros (Tabla 13). Sin embargo, las VEs liberadas del TAS de pacientes con obesidad mostraron un aumento de las proteínas sintenina-1, fibrilina-1, CD316, Alix, y CD98 entre otras (Figura 27 D). Precisamente, la histona H2B, la proteína asociada a la caveola 1, AHNAK y mimecan estaban dentro de las diez proteínas obtenidas en el análisis de grupos (Figura 27 C).

El análisis funcional (base de datos FunRich) de las proteínas elevadas en las vesículas de TAV y TAS mostró la composición exosomal de estas VEs. Además, en las vesículas de TAV se observó una mayor presencia de proteínas citoplasmáticas y proteínas nucleares que en las vesículas del TAS obeso (Figura 27 E). Por el contrario, las vesículas del tejido subcutáneo mostraron un mayor porcentaje de proteínas relacionadas con el espacio extracelular, el lisosoma y la membrana plasmática que las VEs liberadas por el TAV. En relación con el proceso biológico, las proteínas reguladas al alza en las vesículas de origen visceral se clasificaron como relacionadas con la regulación del nucleósido, nucleótido y de ácidos nucleicos. Por otro lado, el conjunto de proteínas elevadas en las vesículas del TAS se clasificó como de transducción y comunicación celular y, sobre todo, del metabolismo y transporte de proteínas. Resulta interesante que las proteínas elevadas en las vesículas de TAV demostraron participar en el empaquetamiento de los extremos de los telómeros, la recombinación meiótica y la elongación de la cadena de la ARN polimerasa I. Además, tanto las vesículas del TAV como las del TAS mostraron proteínas de la familia de las integrinas $\beta 1$ y de la familia de la superficie celular; y las vesículas del TAS incluían también proteínas relacionadas con la red de señalización del VEGF (factor de crecimiento endotelial) y VEGFR (factor de crecimiento endotelial vascular) (Figura 27 E).

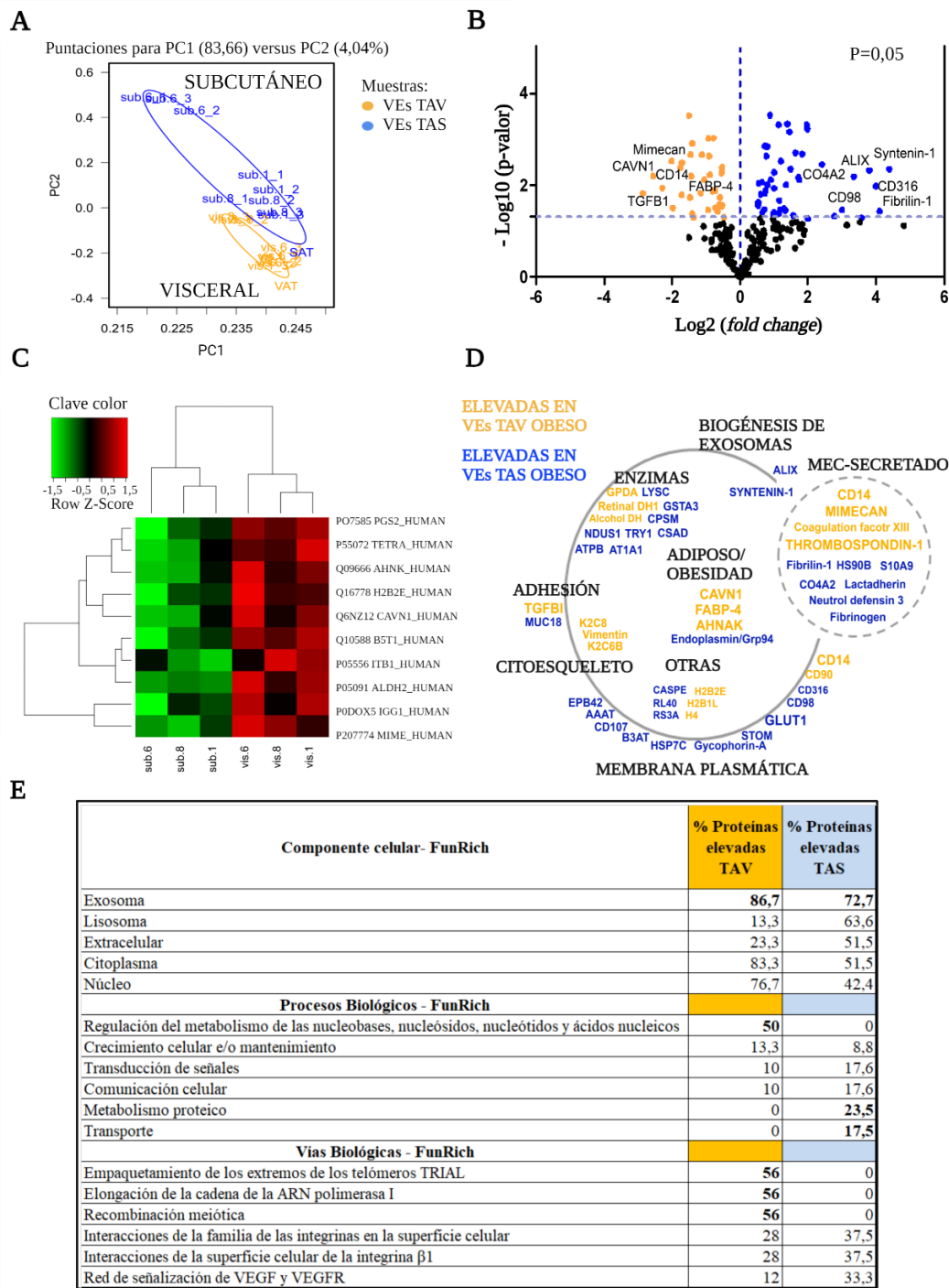


Figura 27. Análisis cuantitativo mediante DIA-SWATH/MS de la carga proteica de vesículas secretadas del tejido adiposo visceral (TAV) y adiposo subcutáneo (TAS) [254]. Se muestra el análisis PCA (análisis de componentes principales) de las áreas transformadas del DIA-SWATH/MS para la comparación cuantitativa de todas las muestras [n = 18 (n = 3 pacientes independientes: n = 3 TAS y n = 3 TAV; n = 3 réplicas técnicas para cada muestra de tejido)] (A). El análisis cuantitativo (DIA-SWATH) de las proteínas identificadas en las vesículas del TAV (amarillo) en comparación con las del TAS (azul) se representa como un gráfico de Volcano, eje x = log₂ (fold change), eje y = - log₁₀ (p-valor). La línea punteada horizontal azul muestra el p-valor elegido para seleccionar proteínas reguladas al alza en el TAV (amarillo) y en el TAS (azul) (B). Se representa el análisis de cluster de las proteínas con un fold change ≥1,5 y un p-valor ≤0,05 en (C). Se muestra una representación esquemática de las proteínas elevadas en las VEs del TAV (amarillo) y TAS (azul) según su función (D). La clasificación del enriquecimiento funcional (base FunRich) comparativo según el componente celular, el proceso y la vía biológica de las proteínas reguladas en las VEs del TAV y TAS se describe en (E) (Creado con BioRender.com).

Tabla 13. Análisis cuantitativo DIA-SWATH/MS de las VEs liberadas por el tejido adiposo subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) de pacientes con obesidad [254]. La lista de proteínas corresponde a las que fueron halladas diferencialmente por el análisis DIA-SWATH/MS con un p-valor $\leq 0,05$ (análisis de la prueba t de Student utilizando el software MarkerView) y un *fold change* ≥ 2 . Las proteínas relacionadas con la obesidad aparecen en mayúsculas.

UNIPROT	NOMBRE DE LA PROTEÍNA	t-Test p-Value	Fold change
ELEVADAS EN VEs DE TAV OBESO			
H2B2E_HUMAN	Histona H2B tipo 2-E	0,015	7,24
K2C8_HUMAN	Queratina, tipo II del citoesqueleto 8	0,006	5,87
BGH3_HUMAN	PROTEÍNA INDUCIDA POR EL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMADOR ig-h3 (TFGBI)	0,011	4,87
CAVN1_HUMAN	PROTEÍNA ASOCIADA A LA CAVEOLA 1	0,003	4,03
H2B1L_HUMAN	Histona H2B tipo 1-L	0,032	3,92
CD14_HUMAN	ANTÍGENO DE DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS CD14	0,004	3,36
H4_HUMAN	Histona H4	0,016	3,28
MIME_HUMAN	MIMECAN	0,003	3,26
F13A_HUMAN	Cadena A del factor de coagulación XIII	0,000	2,83
GPDA_HUMAN	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [NAD(+)], citoplásmica	0,019	2,76
ALIA1_HUMAN	Retina deshidrogenasa 1	0,002	2,75
VIME_HUMAN	Vimentina	0,006	2,69
TSP1_HUMAN	TROMBOSPONDINA 1	0,041	2,65
ADH1B_HUMAN	Alcohol deshidrogenasa 1B	0,001	2,64
K2C6B_HUMAN	Queratina, tipo II del citoesqueleto 6B	0,049	2,58
FABP4_HUMAN	PROTEÍNA DE UNIÓN A ÁCIDOS GRASOS, ADIPOCITO (FABP-4)	0,015	2,22
AHNK_HUMAN	PROTEÍNA ASOCIADA A LA DIFERENCIACIÓN DE NEUROBLASTOS AHNAK	0,002	2,17
THY1_HUMAN	Glicoproteína de membrana Thy-1 (CD90)	0,008	2,07
ELEVADAS EN VEs DE TAS OBESO			
SDCB1_HUMAN	Sintenina-1	0,004	21,07
FBN1_HUMAN	Fibrilina-1	0,036	17,21
IGSF8_HUMAN	Miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas 8 (CD316)	0,010	15,89
PDC6L_HUMAN	Proteína que interactúa con la muerte celular programada 6 (ALIX)	0,005	13,97
4F2_HUMAN	Cadena pesada del antígeno de superficie celular 4F2 (CD98)	0,051	11,96
CO4A2_HUMAN	Cadena de colágeno alfa-2(IV)	0,007	10,21
MFGM_HUMAN	Lactadherina	0,034	8,02
AAAT_HUMAN	Transportador de aminoácidos neutros B	0,047	6,85
HSP7C_HUMAN	Proteína de choque térmico de 71 kDa	0,004	5,32
DEF3_HUMAN	Defensina 3 de los neutrófilos	0,053	3,98
GTR1_HUMAN	Transportador de solutos de la familia 2, miembro facilitador de la glucosa 1 (GLUT1)	0,001	3,97
B3AT_HUMAN	Proteína transportadora de aniones de la banda 3	0,000	3,91
RL40_HUMAN	Proteína ribosomal L40 de ubiquitina-60S	0,002	3,56
FIBG_HUMAN	Cadena gamma del fibrinógeno	0,008	3,35
HS90B_HUMAN	Proteína de choque térmico HSP 90-beta	0,007	3,28
NDUS1_HUMAN	Subunidad NADH-ubiquinona oxidoreductasa 75 kDa, mitocondrial	0,002	3,11
CPSM_HUMAN	Carbamoil-fosfato sintasa [amoniaco], mitocondrial	0,045	2,96
STOM_HUMAN	Proteína integral de la membrana de la banda 7 del eritrocito	0,004	2,82
EPB42_HUMAN	Proteína de membrana eritrocitaria banda 4.2	0,001	2,74
MUC18_HUMAN	Glicoproteína de la superficie celular MUC18	0,000	2,64
FIBB_HUMAN	Cadena beta del fibrinógeno	0,010	2,55
AT1A1_HUMAN	Subunidad alfa-1 de la ATPasa transportadora de sodio/potasio	0,035	2,54
CSAD_HUMAN	Ácido sulfínico cisteína descarboxilasa	0,033	2,48
LAMP1_HUMAN	Glicoproteína de membrana asociada al lisosoma 1 (CD107)	0,003	2,30
GSTA3_HUMAN	Glutathión S-transferasa A3	0,033	2,28
CASPE_HUMAN	Caspasa-14	0,021	2,22
GLPA_HUMAN	Glicoforina-A	0,000	2,20
ATPB_HUMAN	Subunidad beta de la ATP sintasa, mitocondrial	0,042	2,20

4.1.3 Caracterización de las VEs de explantes de tejido adiposo completo (blanco y pardo) de ratas control y obesas

El tejido adiposo según el tipo de adipocito, blanco o pardo, cumple funciones metabólicas distintas como ya se ha descrito en la introducción. Bajo este contexto, basándose en los estudios previos, se realizó el aislamiento y la caracterización de VEs en un modelo animal de obesidad para analizar aquellas vesículas secretadas por el tejido adiposo pardo (TAP), y estudiar así el papel de estas VEs en la actividad termogénica o como fuente de dianas terapéuticas. Como referencia, se analizaron aquellas vesículas secretadas por el tejido adiposo blanco (TAB: TAV-visceral y TAS-subcutáneo) de los mismos animales, pudiendo así hacer un estudio comparativo, teniendo como referencia los hallazgos presentados anteriormente del análisis de las VEs de los modelos *in vitro* de adipocitos murinos, y del TAV y TAS humano. También se estudió la composición metabólica de las VEs aisladas de tejido adiposo blanco (TAB) y pardo (TAP) de ratas según diferentes estados metabólicos (normopeso u obeso).

4.1.3.1 Establecimiento de un modelo de obesidad inducida por dieta (DIO) para el aislamiento de VEs del tejido adiposo

Como se describió en el **apartado 3.1.2**, para establecer este modelo, los animales se separaron en dos grupos: control/normopeso y obeso (n = 12), los cuales fueron alimentados con una dieta baja en ácidos grasos (LFD, del inglés *Low Fat Diet*) o rica en ácidos grasos (60 % HFD, del inglés *High Fat Diet*) durante 9 semanas, respectivamente (Figura 13). En la semana 9, se observó que los animales con la HFD tenían un aumento estadísticamente significativo de los valores del IMC (g/cm^2) y de la glucosa basal (mg/dL) comparados con las ratas control (Figura 28). A partir de este modelo, se aislaron las VEs del secretoma de los explantes de TAB (subcutáneo y visceral) y TAP de ratas del grupo control y obeso, para ser caracterizadas mediante el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) (n = 1 control y 1 obesa: 2 TAS, 2 TAV, 2 TAB), ExoView (n = 4 control y 4 obesas: 8 TAS, 8 TAV, 8 TAB), inmunodetección (n = 4 control y 4 obesas: 8 TAS, 8 TAV, 8 TAB), y caracterización proteómica cualitativa (DDA) y cuantitativa (DIA-SWATH/MS) (n = 4 control y 4 obesas: 8 TAS, 8 TAV, 8 TAB) siguiendo el patrón de trabajo realizado anteriormente.

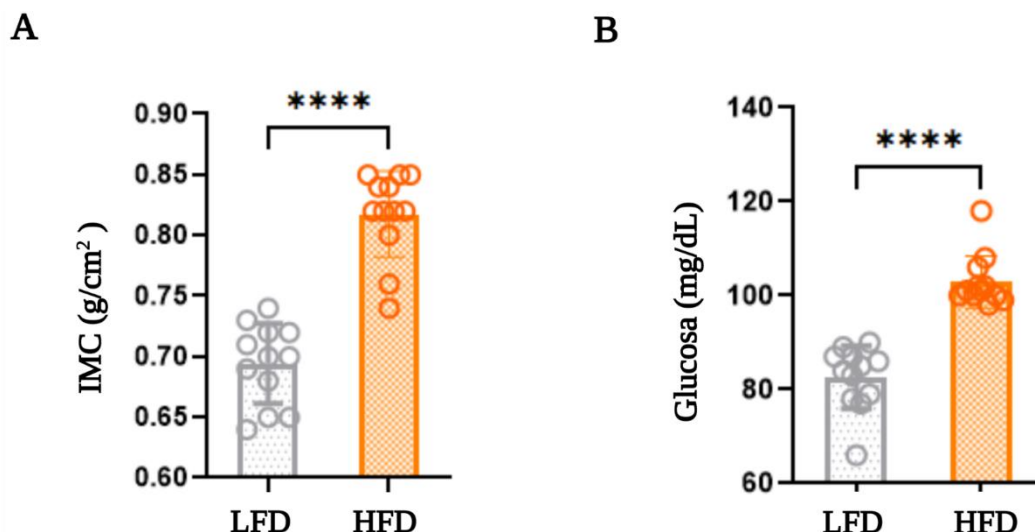


Figura 28. Establecimiento y caracterización de un modelo de obesidad inducida por dieta (DIO). Se representa el IMC (Índice de Masa Corporal, g/cm²) (A) y la glucosa basal (mg/dL) (B) en las ratas control (LFD: dieta baja en grasa; n = 12) y obesas (60 % de HFD: dieta rica en grasa; n = 12) una vez transcurridas las 9 semanas de intervención (Figura 13). Las diferencias se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney; p ≤ 0,05 se consideró estadísticamente significativo (**** p < 0,0001) (Creado con BioRender.com).

4.1.3.2 Caracterización del perfil vesicular de las VEs secretadas por el tejido adiposo marrón y blanco en animales con peso normal y obeso

La caracterización de las vesículas aisladas del secretoma de los tres tipos de tejido adiposo (TAV, TAS, TAP) mediante ultracentrifugación no mostró diferencias importantes en el tamaño de las vesículas en función del estado metabólico, normopeso (Figura 29 A, C, E) u obeso (Figura 29 B, D, F), o del depósito de origen mediante el análisis NTA (análisis de seguimiento de partículas); el cual oscilaba entre 75 y 112 nm. Cabe destacar que las VEs secretadas por el tejido adiposo subcutáneo obeso medían 111,6 nm, lo que indicó que estas vesículas tienen un tamaño mayor que las de origen subcutáneo de animales delgados o que las de origen visceral o pardo de ratas tanto obesas como controles (Figura 29 G). Por otro lado, la concentración de partículas/mL y la de proteína vesicular (µg/mL) no mostraron diferencias destacables entre las VEs aisladas de los diferentes depósitos de grasa, visceral (TAV), subcutánea (TAS) o parda (TAP), ni se vieron afectadas por el estado metabólico de estos depósitos, normopeso u obeso (Figura 29 G). También, se observó que las vesículas secretadas por el tejido adiposo blanco eran positivas para marcadores exosomales como Alix y CD81 (Figura 29 H).

Además, se realizó una caracterización completa de las VEs mediante la plataforma ExoView, la cual permitió analizar el tamaño de partículas según el anticuerpo de captura, CD81 y CD9, y el perfil de tetraspaninas que colocalizan en cada vesícula dependiendo del depósito de grasa (Tabla 8, Figura 17 A). Usando esta metodología, se observó que las VEs capturadas tanto por CD9 como por CD81 tienen un tamaño medio entre 55 y 75 nm. Las VEs marrones capturadas por CD9 son más grandes que las vesículas liberadas por el tejido adiposo blanco (TAS y TAV) (Figura 30 A). También, se observó de forma estadísticamente significativa que el número de partículas capturadas por CD9 y CD81 era mayor en las VEs del

TA visceral y pardo de ratas con peso normal que en las vesículas de ratas obesas, y que las de origen subcutáneo tanto de animales delgados como obesos (Figura 30 B). En general, el análisis de colocalización de las tetraspaninas mostró que las VEs secretadas por el TAS contenían más vesículas positivas para CD63, capturadas en los microchips con anticuerpo de captura anti- CD9 y CD81, que por el TAV de animales del grupo control (Figura 30 C, D). Además, se encontró un aumento de las vesículas CD63+ en todos los tejidos obesos (TAS, TAV y TAP), especialmente en las vesículas del TAP obeso. Curiosamente, se observó que con la obesidad hay una disminución de las vesículas positivas para CD81, especialmente en el TAP. Por otra parte, las vesículas de origen subcutáneo y visceral de animales normopeso contenían menos vesículas CD9+ que las del TAP, y además se observó un aumento de las vesículas CD9+ en las vesículas liberadas por el TAV y el TAP con la obesidad (Figura 30 C, D).

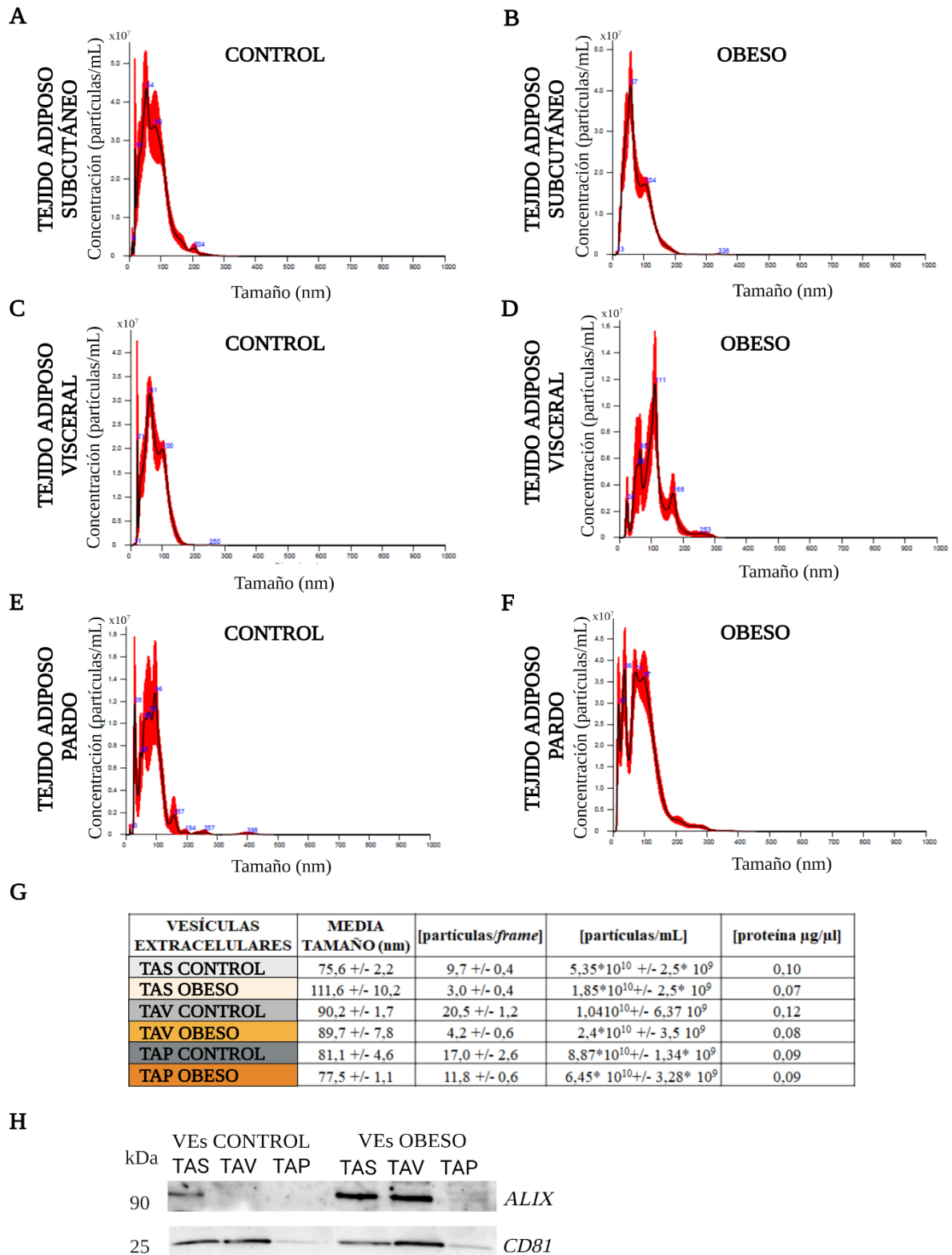


Figura 29. Caracterización de las VEs aisladas de explantes de tejido adiposo blanco, visceral (TAV) y subcutáneo (TAS), y pardo (TAP) de ratas obesas y controles mediante NTA e inmunodetección para marcadores vesiculares. Se representa gráficamente la concentración de partículas/mL según el tamaño (nm) de las VEs liberadas del TAS (A, B), TAV (C, D) y TAP (E, F) de ratas control (A, C, E) y obesas (B, D, F) obtenido mediante el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). También se resume el promedio junto a la desviación estándar del tamaño (nm), la concentración de partículas/frame, las partículas/mL y la concentración proteica de estas vesículas aisladas del secretoma de 1 gramo de TA (G). Imágenes representativas de inmunodetección para los marcadores vesiculares Alix y CD81 en (H).

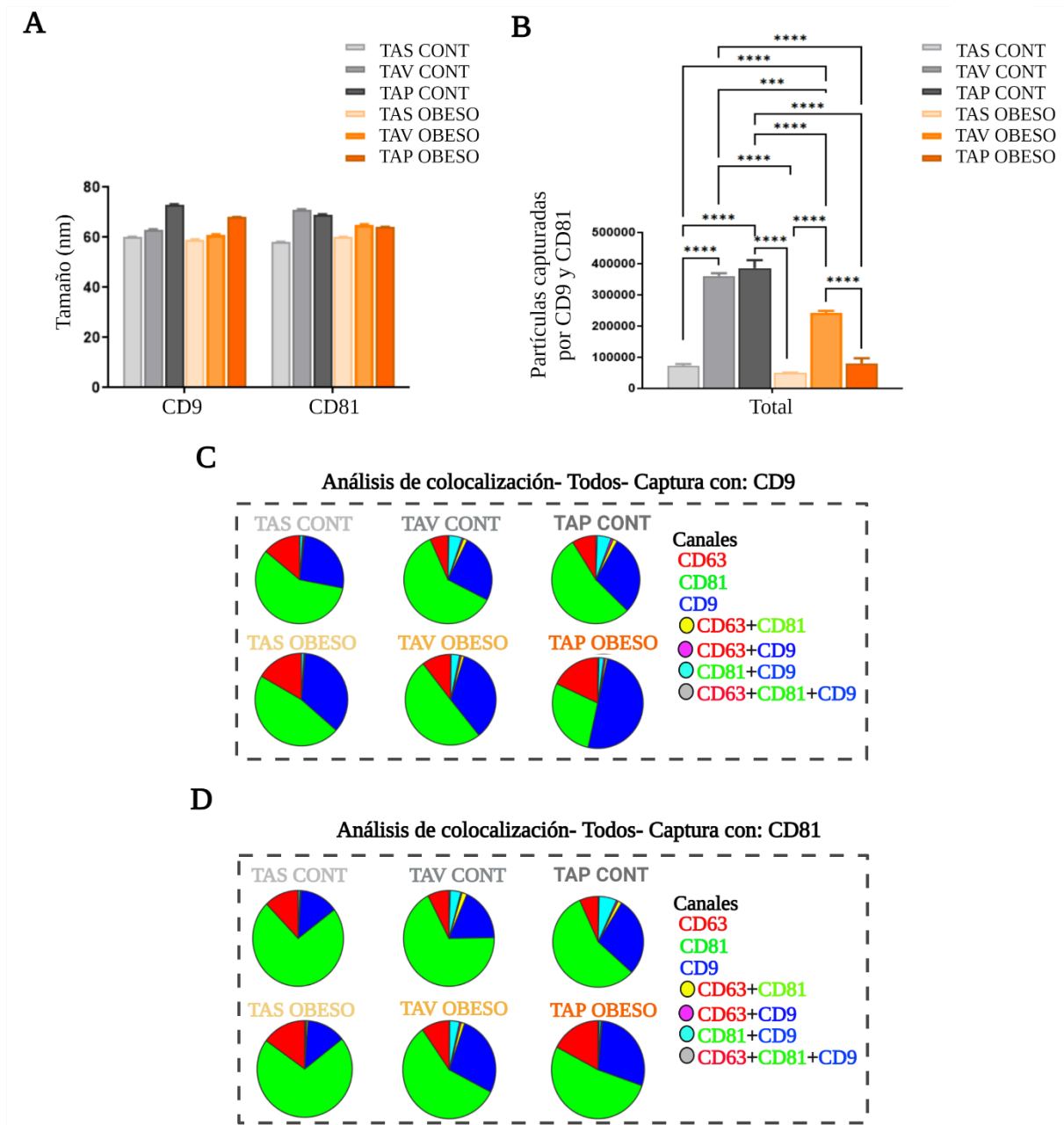


Figura 30. Caracterización completa de las VEs aisladas de explantes de tejido adiposo blanco, visceral (TAV) y subcutáneo (TAS), y pardo (TAP) de ratas obesas y normopeso mediante la plataforma ExoView. El análisis mediante la tecnología ExoView permitió analizar el tamaño, la concentración de partículas capturadas y la colocalización de las tetraspaninas CD63, CD9 y CD81 de las diferentes VEs aisladas de los explantes de tejido adiposo blanco y pardo de ratas obesas y control, mediante la inmunocaptura con anti-CD9 y CD81 en chips individualizados (Tabla 8, Figura 17 A). Se analizó el tamaño de las VEs según el anticuerpo de captura CD9 o CD81 mediante interferometría (A). También se observó el número de partículas capturadas por las tetraspaninas CD9 y CD81 (B). Se analizó la colocalización de las tetraspaninas CD63 (rojo), CD81 (verde) y CD9 (azul) en las VEs según su captura con CD9 (C) o CD81 (D). Se realizaron al menos 4 ensayos independientes para cada condición, y las diferencias se analizaron mediante *One-Way Anova-Kruskall Wallis*, $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. (** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$) (Creado con BioRender.com).

4.1.3.3 Análisis proteómico de las VEs secretadas por el tejido adiposo marrón (TAP) y blanco (TAB), y su alteración tras la intervención de la dieta alta en grasas (HFD)

El análisis cualitativo (DDA) por espectrometría de masas del proteoma de las VEs aisladas de 4 animales obesos y 4 animales delgados independientes identificó 212 proteínas (18 exclusivas) en las VEs del TAP delgado y 286 proteínas (92 exclusivas) en las secretadas por los animales obesos (Figura 31 A, E); compartiendo el 63,8 % de las proteínas identificadas (Figura 31 A, E; **Anexo III**). Igualmente, un 60 % de las proteínas identificadas eran exclusivas de las vesículas del TAP en comparación con las del tejido adiposo blanco (visceral, subcutáneo), siendo la mayoría de ellas clasificadas como de carácter exosomal y propias de componentes de la mitocondria (Figura 31 A, F). Curiosamente, observamos diferencias en el perfil proteico de estas partículas liberadas por el tejido adiposo (blanco y pardo) en función del estado metabólico (delgado u obeso) (Figura 31 B). Concretamente, se identificaron 87 proteínas comunes a todos los depósitos de grasa (blanca y parda) en las VEs de animales delgados, y 100 en las vesículas de animales obesos; encontrando el 100 % de estas proteínas en la base de datos Vesiclepedia (Figura 31 B) [145]. Cabe destacar que 30 proteínas eran exclusivas de las VEs liberadas de todos los depósitos de grasa (subcutáneo, visceral y pardo) de animales normopeso y 17 en las VEs de estos depósitos de animales con obesidad, compartiendo así 70 proteínas todas las VEs secretadas por el tejido adiposo de animales delgados y obesos (Figura 31 B).

Además, el análisis del proteoma de las VEs del tejido adiposo blanco reveló diferentes proteínas en las vesículas desprendidas por los animales obesos o delgados y en función de la localización anatómica: subcutánea y visceral. Se identificaron 326 proteínas en las vesículas de grasa subcutánea (TAS) de animales con peso normal (control) y 231 en las VEs de este mismo tejido de animales obesos (comparten 219 proteínas); y 200 proteínas en las VEs viscerales (TAV) de animales control y 165 en las VEs del TAV obeso (120 proteínas en común) (Figura 31 A, E; **Anexo III**). Las VEs de tejido adiposo blanco (subcutáneo y visceral), tanto en animales controles como obesos, compartían en torno al 50 % de las proteínas identificadas, 174 en las VEs de delgados y 136 en las de obesos; siendo 117 exclusivas de las vesículas del TAS y 17 del TAV de animales control, 60 del TAS y 23 del TAV de animales con obesidad (Figura 31 C, D).

El análisis funcional (FunRich) de todas las proteínas mostró que la mayoría estaban presentes en la base de datos de Vesiclepedia [145]; y además, el análisis de componentes celulares clasificó entre el 60-80 % de las proteínas como pertenecientes a exosomas, identificando así marcadores exosomales como las tetraspaninas CD63, CD9 y CD81, y marcadores de endosomas como la sintenina-1 (Figura 31 F, **Anexo III**). En particular, las VEs del TAP tanto de animales con obesidad como normopeso tenían un importante componente mitocondrial (40-45 %) a diferencia de las VEs secretadas por el tejido adiposo blanco (Figura 31 F). Se observó que las vesículas del tejido adiposo pardo contenían proteínas relacionadas con el metabolismo mitocondrial propio de este tejido, y con rutas energéticas del mismo como la proteína desacoplante mitocondrial de la grasa parda 1 (UCP1), la ATP citrato sintasa (ACLY), diferentes subunidades (1 y 2) del complejo citocromo b-c1 de las mitocondrias,

diferentes enzimas metabólicas como la isocitrato deshidrogenasa mitocondrial subunidad α y β , entre otras (**Anexo III**).

Además, el análisis funcional (FunRich) de todas las proteínas identificadas en las VEs del TAV y TAS mostró la presencia de proteínas relacionadas con el metabolismo de proteínas, moléculas estructurales como anexinas y queratinas, y moléculas de transducción de señal como las proteínas relacionadas con Ras, entre otras (Figura 31 F, **Anexo III**). En términos de procesos biológicos, las VEs liberadas del TAV mostraron más proteínas relacionadas con el metabolismo y crecimiento celular; mientras que las VEs del TAS contenían más proteínas clasificadas como de transducción de señales y metabolismo proteico (Figura 31 F). Las vesículas de ambos depósitos contenían proteínas de señalización de la vía de las integrinas, TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral), VEGF (factor de crecimiento endotelial) y VEGFR (factor de crecimiento endotelial vascular), y de sindecán-1 (Figura 31 F).

De forma interesante, cabe destacar que se observaron proteínas asociadas al citoesqueleto como vimentina o anexinas (A2, A4 y A6), proteínas relacionadas con la adiposidad y la obesidad como la proteína de síntesis de ácidos grasos (FAS), la proteína de unión a ácidos grasos 4 en adipocitos (FABP4) o caveolina-1, y diferentes histonas como la histona H3.1 en todas las VEs desprendidas tanto de tejido adiposo blanco (subcutáneo y visceral) como pardo de animales obesos y delgados (**Anexo III**). Cabe destacar que entre las 30 proteínas exclusivas en las VEs liberadas del tejido adiposo de animales normopeso se identificaron proteínas como ACLY, factor inhibitorio de migración de macrófagos (MIF) y la proteína asociada a las caveolas 1 (CAVN1); sin embargo, ceruloplasmina y dipeptidasa-1 se hallaron entre las 17 proteínas comunes a las VEs procedentes de los depósitos de animales con obesidad (Figura 31 B, Tabla 14).

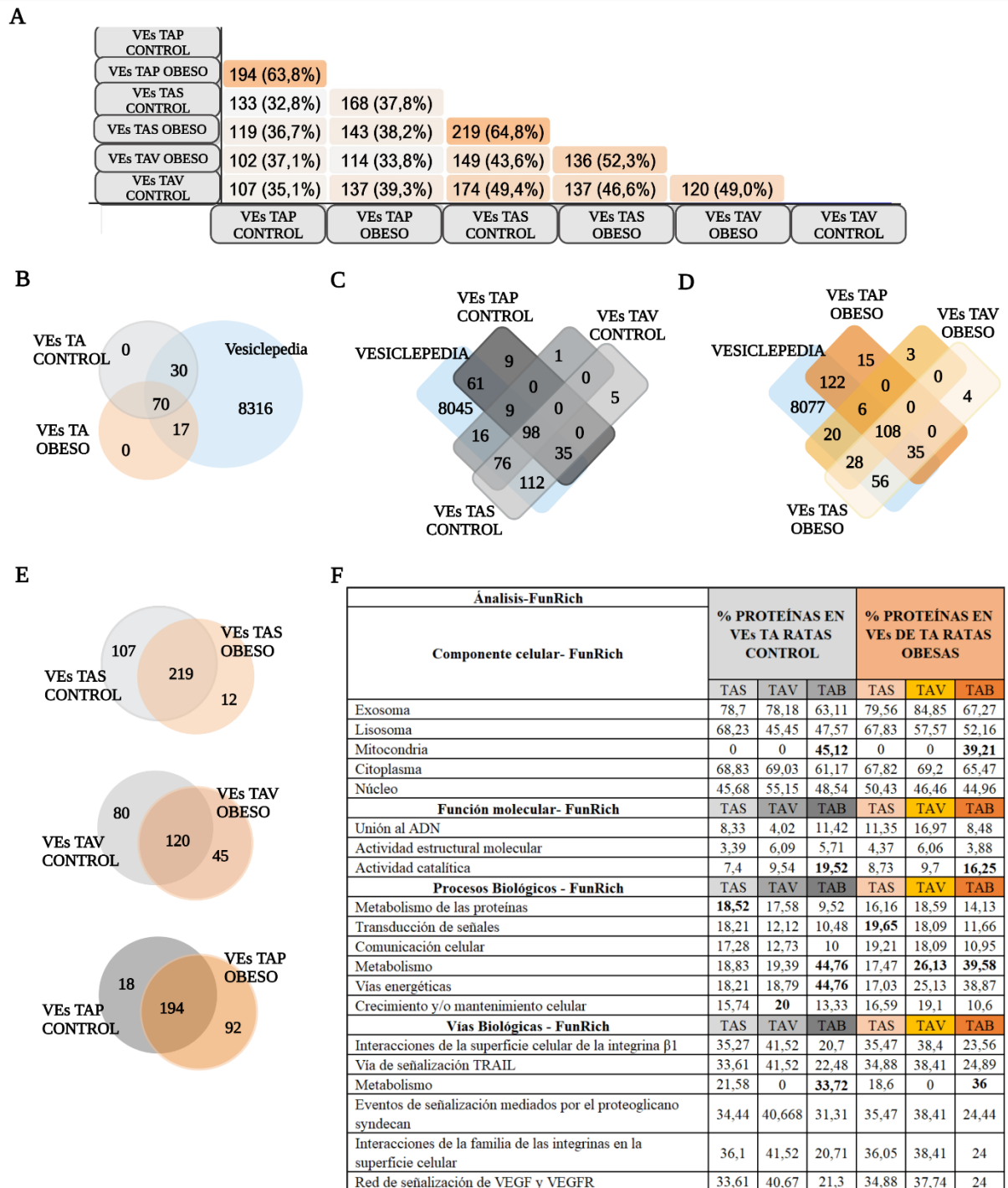


Figura 31. Análisis cualitativo (DDA) del proteoma de las vesículas liberadas por el TA blanco (visceral, subcutáneo) y pardo de ratas delgadas/control y obesas. Diagrama de Venn descriptivo y comparativo que muestra el número total de proteínas identificadas con un FDR <1 % (99 % de confianza en las proteínas) en las vesículas aisladas de tejido adiposo visceral (TAV), subcutáneo (TAS) y pardo (TAP) de 4 animales control y 4 obesos independientes y también en comparación con la base de datos Vesiclepedia [145] (A-E). Se muestra la clasificación del análisis funcional (FunRich) de las proteínas identificadas por componente celular (porcentajes por genes anotados a cada clase), función molecular, procesos y vías biológicas para las vesículas aisladas TAV, TAS y TAP delgadas/control y obesas (F). FDR: Tasa de falsos descubrimientos (Creado con BioRender.com).

Tabla 14. Análisis cualitativo (DDA) de las VEs del tejido adiposo blanco y pardo de ratas obesas y control. Se muestra la lista de proteínas exclusivas a cada estado metabólico, control/normopeso y obeso, y presentes en las VEs desprendidas por todos los depósitos de grasa (subcutáneo, visceral, y pardo). FDR <1 % (99 % de confianza). FDR: Tasa de falsos descubrimientos.

UNIPROT	NOMBRE DE LA PROTEÍNA
COMÚN A TODAS LAS VEs CONTROL	
REEP5_RAT	Proteína potenciadora de la expresión del receptor 5
GSTP1_RAT	Glutación S-transferasa P
DHE3_RAT	Glutamato deshidrogenasa 1, mitocondrial
ACLY_RAT	ATP-citrato sintasa
MIF_RAT	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
RSSA_RAT	Proteína ribosomal 40S SA
RACK1_RAT	Receptor de la proteína C quinasa activada 1
ACTS_RAT	Actina, músculo esquelético alfa
CAVN1_RAT	Proteína asociada a la caveola 1
K1C19_RAT	Queratina, citoesqueleto tipo I 19
AL9A1_RAT	4-trimetilaminobutiraldehído deshidrogenasa
MAOX_RAT	Enzima málica dependiente de NADP
RLA1_RAT	Proteína ribosómica ácida 60S P1
RL12_RAT	Proteína ribosómica 60S L12
TKT_RAT	Transquetolasa
LUM_RAT	Lumican
GBB1_RAT	Proteína de unión a nucleótidos de guanina G
1433G_RAT	Proteína 14-3-3 gamma
RS16_RAT	Proteína ribosomal 40S S16
1433E_RAT	Proteína 14-3-3 épsilon
RL10A_RAT	Proteína ribosomal 60S L10a
CH60_RAT	Proteína de choque térmico de 60 kDa, mitocondrial
ACTG_RAT	Actina, citoplasma 2
TBB5_RAT	Tubulina de cadena beta-5
PNPH_RAT	Purina nucleósido fosforilasa
ACOC_RAT	Acónito hidratasa citoplasmática
AMPL_RAT	Citosol aminopeptidasa
G6PI_RAT	Glucosa-6-fosfato isomerasa
SBP1_RAT	Metanotiol oxidasa
PRDX5_RAT	Peroxiredoxina-5, mitocondrial
COMÚN A TODAS LAS VEs OBESAS	
GPDA_RAT	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
CO1A2_RAT	Colágeno alfa-2
ANXA3_RAT	Anexina A3
TAGL2_RAT	Transgelina-2
THY1_RAT	Glicoproteína de membrana Thy-1
S10AA_RAT	Proteína S100-A10
CERU_RAT	Ceruloplasmina
A1I3_RAT	Inhibidor alfa-1 3
FIBB_RAT	Cadena beta del fibrinógeno
5NTD_RAT	5'-nucleotidasa
XDH_RAT	Xantina deshidrogenasa/oxidasa
BASI_RAT	Basigina
CD59_RAT	Glicoproteína CD59
DPEP1_RAT	Dipeptidasa 1
RAP1B_RAT	Proteína relacionada con Ras Rap-1b
AT1B3_RAT	Subunidad beta-3 de la ATPasa transportadora de sodio/potasio
RIPR2_RAT	Regulador de la polarización celular que interactúa con la familia Rho 2

4.1.3.4 Análisis proteómico cuantitativo (DIA-SWATH/MS) de las vesículas extracelulares secretadas por el tejido adiposo pardo y blanco, y su variación con el estado metabólico

Para obtener un análisis más profundo sobre el cargo proteico que viaja en las VEs del tejido adiposo blanco (TAB) y pardo (TAP), prestando especial atención a este último, se realizó un análisis diferencial cuantitativo mediante la adquisición secuencial de todos los espectros de iones de fragmentos teóricos (DIA-SWATH/MS) (Figura 32). El PCA de los resultados obtenidos mostró claramente la separación de las muestras de VEs según el depósito de grasa (subcutánea, visceral y parda). Además, se observó un subconjunto en las VEs del TAP dependiendo del estado metabólico (Figura 32 A, B). El análisis de la expresión diferencial de proteínas con un *fold change* mayor de 1,5 y un p-valor menor de 0,05 permitió seleccionar las proteínas que mejor separan las vesículas TAP obeso y normopeso como la proteína desacoplante mitocondrial de la grasa parda 1 (UCP1_RAT), factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF_RAT), ceruloplasmina (CERU_RAT), dipeptidasa-1 (DPEP1) y CD14 (CD14_RAT) en las VEs del TAP obeso; la subunidad 6 del complejo citocromo b-c1 mitocondrial (QCR6_RAT) y la ATP citrato sintetasa (ACLY_RAT) en las vesículas liberadas por el TAP de animales normopeso (**Anexo IV**-Figura S3 A).

Mediante un análisis más restrictivo (*fold change* ≥ 2), se encontró que 12 proteínas estaban disminuidas y 38 elevadas en las vesículas de tejido pardo de animales obesos comparado con el grupo control (normopeso) (Figura 32 B-D, Tabla 15). Las proteínas más elevadas en las vesículas del TAP de ratas normopeso/control son la proteína relacionada con Ras-Rab14, la subunidad 6 del complejo citocromo b-c1 mitocondrial, la metilmalonato semialdehído deshidrogenasa, la proteína ribosomal 40s, y la ATP citrato-sintasa, entre otras (Figura 32 D, Tabla 15). Curiosamente, las VEs del TAP de animales con obesidad mostraban un aumento de la proteína desacoplante mitocondrial 1 (UCP1) que en las VEs liberadas del mismo tejido en rata control. También, se observó que la dipeptidasa-1, el fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (citósica), la proteína potenciadora de la expresión del receptor 5, y el antígeno CD9 estaban elevadas en las vesículas del TAP obeso (Figura 32 C, Tabla 15).

El análisis funcional en la base de datos FunRich de las proteínas elevadas en las vesículas de TAP mostró la naturaleza exosomal de estas VEs (Figura 32 E, F; Figura 33 A). Además, las proteínas elevadas en las vesículas del TAP de animales normopeso/control mostraron una mayor presencia de proteínas de la membrana mitocondrial interna que las del mismo tejido en animales obesos (Figura 32 E, F). Cabe destacar, que las proteínas al alza en las vesículas del TAP obeso están principalmente implicadas en el metabolismo lipídico y de ácidos grasos (Figura 32 E). Por el contrario, las proteínas elevadas en las vesículas del TAP de animales control están implicadas en procesos metabólicos y en la cadena transportadora de electrones (Figura 32 F).

Además, coincide que 28 de las proteínas elevadas en las VEs del TAP de ratas obesas se encontraron también elevadas en las VEs de origen subcutáneo en los mismos animales (Figura 33). Curiosamente, no se halló ninguna proteína elevada en las vesículas de origen visceral (Figura 33 A). Además, el análisis funcional (FunRich) reveló que las proteínas elevadas en el TAP obeso tenían principalmente una actividad catalítica y GTPasa, y estaban relacionadas con

el metabolismo y con distintas vías energéticas a diferencia de las VEs del depósito blanco (Figura 33 B).

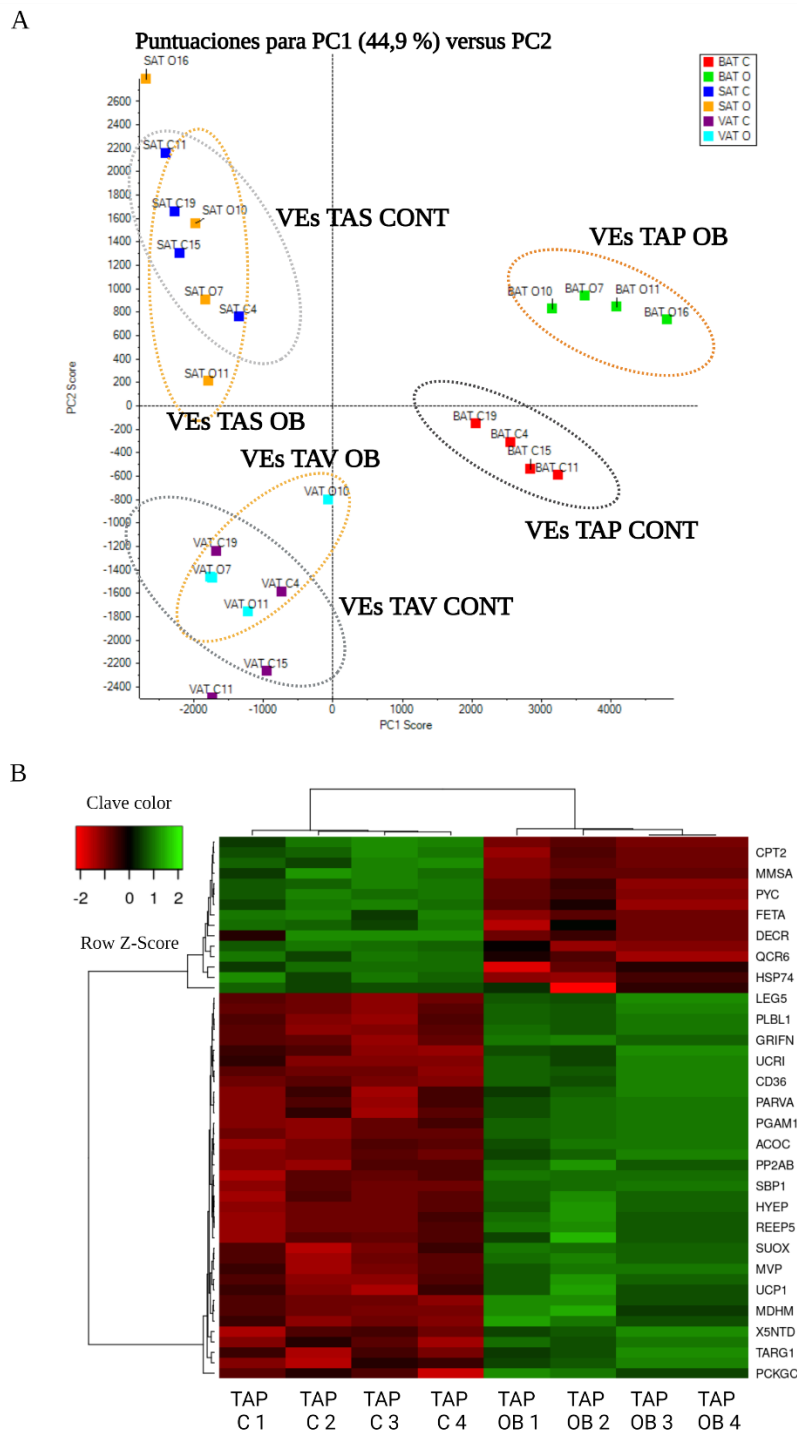


Figura 32.1 Análisis cuantitativo (DIA-SWATH/MS) del contenido proteico en VEs secretadas por el tejido adiposo pardo (TAP) y blanco (subcutáneo-TAS, visceral-TAV) en animales normopeso/control (CONT) y obesos (OB). Análisis PCA de las áreas transformadas del DIA-SWATH para la comparación cuantitativa de todas las muestras [n = 24 (n = 8 ratas; 4 delgadas y 4 obesas: n = 8 TAS, n = 8= TAV y n = 8 TAP; por 3 réplicas técnicas para cada muestra de tejido)] (A). Análisis de cluster de las proteínas de las VEs-TAP con un *fold change* ≥ 2 y un p-valor $\leq 0,05$ (B).

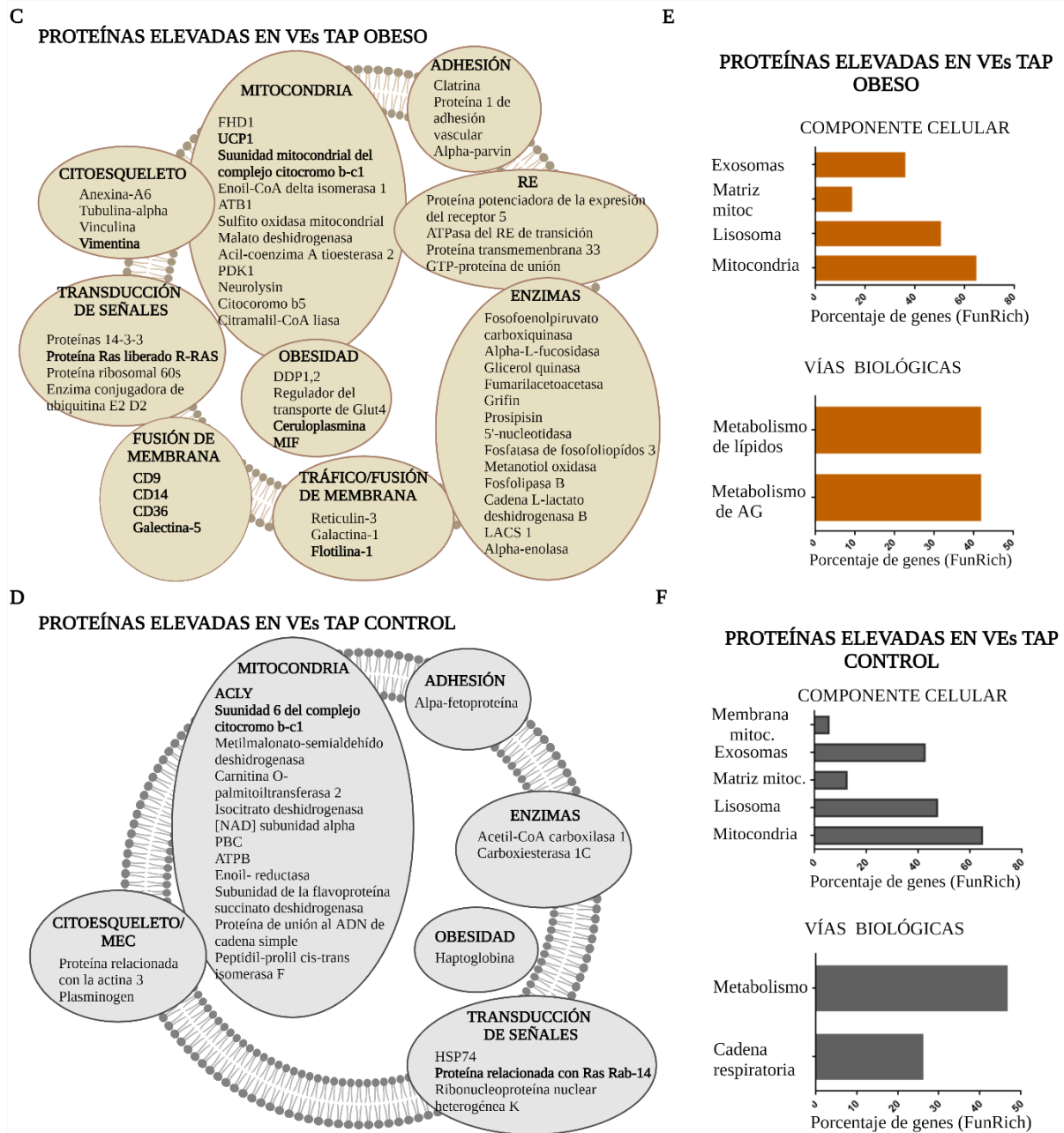


Figura 32.2 Análisis cuantitativo del DIA-SWATH/MS del contenido proteico en VEs secretadas por el tejido pardo (TAP) y blanco (subcutáneo-TAS, visceral-TAV) en animales normopeso/control y obesos. Se muestra una representación esquemática de las proteínas elevadas en las VEs-TAP obeso (C) y control (D) con un *fold change* >1,5. Clasificación del enriquecimiento funcional (base FunRich) comparativo según el componente celular y la vía biológica de las proteínas elevadas en VEs de TAP obeso (E) y control (F). RE: retículo endoplasmático, Mitoc: mitocondrial; MEC: matriz extracelular; AG: ácidos grasos (Creado con BioRender.com).

Tabla 15. Análisis cuantitativo DIA-SWATH/MS de las VEs del TAP de ratas normopeso y con obesidad. La lista de proteínas en esta tabla corresponde a las proteínas reguladas diferencialmente y analizadas mediante DIA-SWATH/MS con un p-valor $\leq 0,05$ (análisis de la prueba t de Student) y un *fold change* ≥ 2 .

UNIPROT	NOMBRE PROTEINA	p-value	Fold Change
DISMINUIDAS EN VEs TAP OBESO			
RAB14_RAT	Proteína relacionada con Ras, Rab-14	0,02	4,2
QCR6_RAT	Subunidad 6 del complejo citocromo b-c1, mitocondrial	0,01	3,2
DX39A_RAT	ARN helicasa dependiente de ATP DDX39A	0,04	2,9
MMSA_RAT	Metilmalonato-semialdehído deshidrogenasa [acilante], mitocondrial	0,02	2,7
ARP3_RAT	Proteína relacionada con la actina 3	0,01	2,5
RS12_RAT	Proteína ribosomal 40S S12	0,05	2,4
ACLY_RAT	ATP-citrato sintasa	0,01	2,3
CPT2_RAT	Carnitina O-palmitoiltransferasa 2, mitocondrial	0,01	2,3
ACADM_RAT	Acil-CoA deshidrogenasa específica de cadena media, mitocondrial	0,05	2,1
THIL_RAT	Acetil-CoA acetiltransferasa, mitocondrial	0,01	2,1
PYC_RAT	Piruvato carboxilasa, mitocondrial	0,00	2,1
IDH3A_RAT	Isocitrato deshidrogenasa subunidad α , mitocondrial	0,03	2,1
ELEVADAS EN VEs TAP OBESO			
UCP1_RAT	Proteína desacopladora mitocondrial de la grasa marrón 1	0,01	4,4
DPEP1_RAT	Dipeptidasa 1	0,00	3,7
PCKGC_RAT	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, citosólica [GTP]	0,06	3,4
FAHD1_RAT	Acilpiruvasa FAHD1, mitocondrial	0,00	3,3
FUCO_RAT	Alfa-L-fucosidasa tisular	0,01	3,2
REEP5_RAT	Proteína potenciadora de la expresión del receptor 5	0,00	3,1
CD9_RAT	Antígeno CD9	0,01	3,0
UCRI_RAT	Subunidad del complejo citocromo b-c1 Rieske, mitocondrial	0,03	2,9
TERA_RAT	ATPasa del retículo endoplásmico de transición	0,00	2,7
2 RTN3_RA	Isoforma 2 de Reticulon-3	0,00	2,7
SEC13_RAT	Proteína homóloga a la SEC13	0,04	2,7
AOC3_RAT	Amina oxidasa primaria de membrana	0,04	2,7
TARG1_RAT	Regulador del tráfico de GLUT4 1	0,02	2,7
LEG5_RAT	Galectina-5	0,01	2,6
GLPK_RAT	Glicerol quinasa	0,00	2,6
CLH1_RAT	Cadena pesada de clatrina 1	0,00	2,6
ECI1_RAT	Enoyl-CoA delta isomerasa 1, mitocondrial	0,02	2,5
PARVA_RAT	α -parvina	0,00	2,4
AT1B3_RAT	Subunidad beta-3 de la ATPasa transportadora de sodio/potasio	0,01	2,4
PP2AB_RAT	Subunidad catalítica de la serina/treonina-proteína fosfatasa 2A, isoforma beta	0,01	2,4
SUOX_RAT	Sulfito oxidasa, mitocondrial	0,02	2,4
CD36_RAT	Glicoproteína plaquetaria 4	0,00	2,4
FAAA_RAT	Fumarilacetoacetasa	0,00	2,4
MVP_RAT	Proteína mayor de la bóveda	0,00	2,3
HYEP_RAT	Epóxido hidrolasa 1	0,01	2,3
NIT2_RAT	Omega-amidasa NIT2	0,01	2,3
GRIFN_RAT	Grifin	0,01	2,3
SAP_RAT	Prosaposina	0,01	2,3
5NTD_RAT	5'-nucleotidasa	0,02	2,3
PGAM1_RAT	Fosfoglicerato mutasa 1	0,00	2,2
DPP2_RAT	Dipeptidil peptidasa 2	0,00	2,2
MDHM_RAT	Malato deshidrogenasa, mitocondrial	0,05	2,2
PLPP3_RAT	Fosfolípido fosfatasa 3	0,03	2,2
ACOC_RAT	Acónito hidatasa citoplasmática	0,00	2,2
SBP1_RAT	Metanotiol oxidasa	0,04	2,2
PLBL1_RAT	Fosfolipasa B-like 1	0,01	2,2
LDHB_RAT	Cadena L-lactato deshidrogenasa B	0,00	2,1

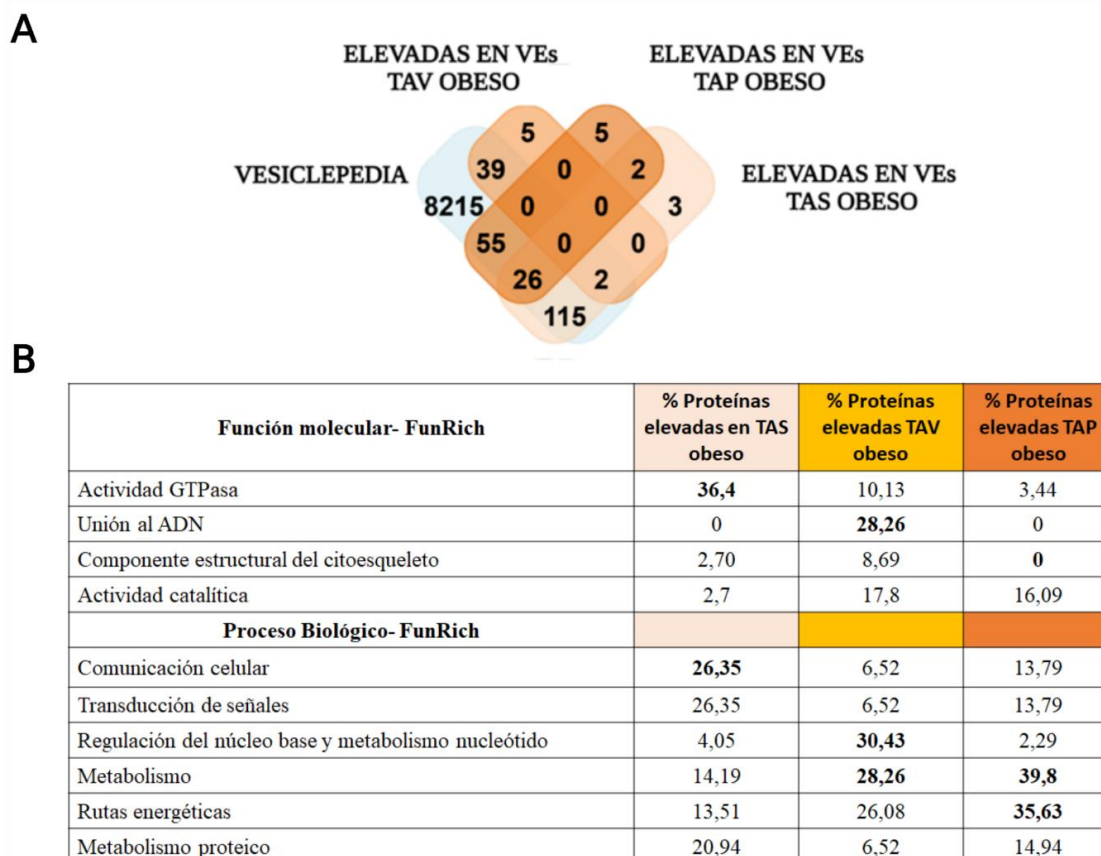


Figura 33. Análisis cuantitativo (DIA-SWATH/MS) de las proteínas presentes en las VEs secretadas por el tejido adiposo pardo y blanco de ratas obesas. Diagrama de Venn de la comparación de las proteínas identificadas como elevadas en las VEs secretadas por el depósito pardo (TAP), subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) con la base de datos Vesiclepedia [145] (A). Clasificación del enriquecimiento funcional (base FunRich) comparativo según la función molecular y el proceso biológico de las proteínas elevadas en VEs del TAP, TAS y TAV de animales con obesidad frente a las de animales control (B).

Además, el análisis DIA-SWATH/MS permitió observar diferencias en la composición proteica de las VEs liberadas por la grasa blanca subcutánea y visceral de ratas con obesidad y normopeso. En la Figura S3 (**Anexo IV**), mediante el análisis de la expresión diferencial con un *fold change* >1,5 y un p-valor <0,05, se seleccionaron las proteínas que separan las vesículas obesas de las delgadas tanto de origen subcutáneo (B) y visceral (C). Se observó que proteínas como profilina 1 (PROF1_RAT), destrina (DEST_RAT) y plastin 3 (PLST) estaban disminuidas en las VEs viscerales obesas; y en cambio vimentina (VIME_RAT) y haptoglobina (HPT_RAT) estaban elevadas. En las VEs de origen subcutáneo, se observaron las proteínas dipeptidil-peptidasa 2 (DPP2_RAT) y galectina 3 (LEG3_RAT) elevadas en las vesículas de ratas delgadas; y caveolina-1 (CAV1_RAT) y la lipasa de monoglicéridos (MGLL_RAT) en las vesículas de animales obesos (**Anexo IV**-Figura S3 B, C).

Cabe destacar que las VEs de tejido adiposo blanco obeso contenían 23 proteínas elevadas en las de origen visceral y 46 en las de subcutáneo (p-valor <0,05; *fold change* >2) (**Anexo IV**-Figura S4). Entre las proteínas elevadas en las VEs del tejido adiposo subcutáneo obeso destacaban proteínas relacionadas con el citoesqueleto como anexina 4, diferentes enzimas metabólicas como galectina 3 y también proteínas relacionadas con las balsas lipídicas como

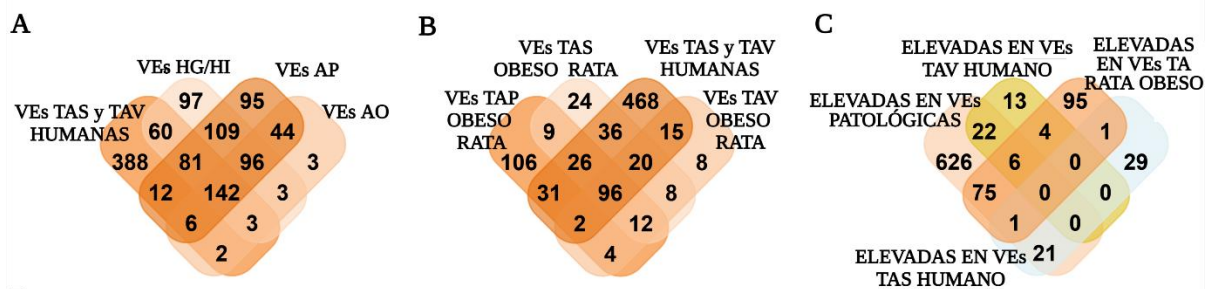
caveolina-1 y 2 (**Anexo IV**- Figura S4 A). En cambio, las vesículas viscerales de animales con obesidad contenían un mayor porcentaje de histonas, como H2B tipo 1, que las subcutáneas. Además, en las vesículas de origen visceral obeso se observaron proteínas relacionadas con el citoesqueleto como diferentes queratinas o la proteína vimentina, y también proteínas relacionadas con la adiposidad como la proteína asociada a la caveola 1 (**Anexo IV**- Figura S4 B).

4.1.4. Análisis comparativo de todas las proteínas identificadas en las distintas VEs aisladas en el contexto de la obesidad

Para identificar potenciales biomarcadores de la obesidad o de patologías asociadas a esta enfermedad, se decidió comparar los resultados cualitativos y cuantitativos de las proteínas halladas por espectrometría de masas de las VEs liberadas por los explantes de tejido adiposo subcutáneo (VEs TAS) y visceral (TAV) de obesos humanos con las vesículas aisladas de los explantes de tejido adiposo blanco (TAS, TAV) y pardo (TAP) de ratas obesas, y de cultivos de adipocitos murino tratados con palmitato (VEs AP), oleico (VEs AO) o alta insulina/alta glucosa (VEs HG/HI). En primer lugar, se observó que las VEs de los explantes de tejido adiposo de pacientes con obesidad compartían el 38 %, 32,5 % y el 20 % de las proteínas halladas con las VEs de los adipocitos resistentes a insulina, hipertrofiados con palmitato y ácido oleico, respectivamente (Figura 34 A). Por otro lado, estas vesículas, del tejido adiposo humano obeso, compartían el 23,8 %, 18,3 % y el 18,8 % de las proteínas identificadas con las VEs del TAS, TAV y TAP de ratas obesas, respectivamente (Figura 34 B). Entre todas las proteínas comunes a estas vesículas, se observó la presencia de marcadores vesiculares como CD81, CD9 o la glicoproteína de membrana asociada al lisosoma 1 (LAMP1). Además, estas vesículas contienen proteínas estructurales y del citoesqueleto como anexina A1, A2, A5, A6, queratinas como la de tipo I citoesquelética, profilin-1, fibronectina; proteínas de transducción de señales como la proteína 14-3-3 o proteínas Ras como la proteína Ras-Rab7; histonas como la histona H4; o enzimas metabólicas como la malato deshidrogenasa o piruvato quinasa (PKM). Pero lo más destacable de este análisis, es que en todas las vesículas analizadas se identificaron proteínas relacionadas con la síntesis, el transporte de ácidos grasos, o con la adiposidad como el caso de las proteínas caveolina-1, sintetasa de ácidos grasos (FAS), la proteína de unión a ácidos grasos adipocitaria (FABP4) o la perilipina-1 (**Anexo III**).

La comparación de las proteínas que se encuentran elevadas en cada tipo de vesícula mostró que las vesículas patológicas (VEs HG/HI, VEs AP, VEs AO) comparten 22 y 28 proteínas con las vesículas subcutáneas (VES TAS) y viscerales (VEs TAV) secretadas por el tejido adiposo humano con obesidad, respectivamente (Figura 34 C). Además, se observó que 12 de las proteínas reguladas al alza en los depósitos de tejido adiposo blanco y pardo de ratas obesas se encontraban elevadas en las vesículas humanas, concretamente 2 en las VEs del TAS y 10 en las del TAV obeso humano (Figura 34 C). Cabe destacar que 82 proteínas que se identificaron reguladas al alza en las VEs secretadas por los adipocitos C3H10T1/2 patológicos (HG/HI, AP, AO) se hallaron en las vesículas liberadas por los explantes de tejido adiposo blanco y pardo de ratas (Figura 34 C).

Este análisis comparativo permitió establecer un panel de 20 proteínas candidatas a biomarcadores de la obesidad y de sus comorbilidades (Figura 34 D). Entre estas proteínas cabe mencionar a la proteína ig-h3 inducida por el factor de crecimiento transformante (TGFB1) que se encuentra elevada en las vesículas de origen visceral humano y en las de resistencia insulínica (HG/HI); la adipoquina mimecan, elevada en las vesículas de TAV humano y en las VEs AP y AO; la proteína del citoesqueleto vimentina, regulada al alza en las vesículas de TAV de pacientes y animales con obesidad; ceruloplasmina, presente en las VEs de TAP obeso y en las VEs secretadas de los adipocitos con hipertrofia lipídica (AO y AP); el marcador de inflamación CD14, encontrado en las VEs del TAV humano y en las de TAP de ratas obesas, y CD36 en las VEs de adipocitos con hipertrofia lipídica; y la enzima ATP-citrato sintasa (ACLY), identificada en las VEs de TAP control/normopeso y en las VEs de hipertrofia lipídica. También se hallaron proteínas relacionadas con la síntesis y transporte de ácidos grasos como FABP4, FAS y caveolina-1. Por otro lado, cabe destacar que la proteína desacoplante mitocondrial de la grasa parda 1 (UCP1) se halló exclusivamente en las VEs de tejido adiposo de las ratas, en concreto elevada en las VEs TAP obeso, como un marcador del origen tisular (Figura 34 D). También, se debe tener en cuenta la proteína sintenina-1, la cual puede ser un marcador diferencial entre el tejido adiposo visceral y subcutáneo humano, ya que se identificó elevada en las vesículas subcutáneas con un *fold-change* superior a 20 (Tabla 13).



D

POTENCIAL BIOMARCADOR VEs	VEs HG/HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS HUMANO	VEs TAV HUMANO	VEs TAB RATA OBESA	VEs TAP RATA CONTROL	VEs TAP RATA OBESA
Anexina 6	X			X				X
ATP-citrato sintasa (ACLY)		X	X				X	
Catepsina B		X	X		X			
Caveolina 1	X					X		
CD14					X	X		
CD36		X	X					
Ceruloplasmina		X	X		X			X
FABP-4	X				X			X
Factor tisular		X	X					
FAS		X						X
Histona 4 (H4)	X				X			
ITIH3		X	X					
Metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2)	X							
Mimecan		X	X		X			
Osteopontin		X	X					
PARK7/DJ1		X	X					
Perilipina-1		X	X					
TGFB1	X				X			
UCP1								X
Vimentina	X				X	X		

Figura 34. Análisis comparativo de las proteínas identificadas en las VEs de origen subcutáneo y visceral humano, del tejido adiposo blanco y pardo de ratas y de los modelos de adipocitos C3H10T1/2 patológicos. Diagramas de

Venn de las proteínas comunes a las VEs humanas con las VEs del modelo de alta glucosa/alta insulina (HG/HI), palmitato (AP) y ácido oleico (AO) (A); y con las VEs liberadas por los explantes del tejido adiposo subcutáneo (TAS), visceral (TAV) y pardo (TAP) de ratas obesas (B). Diagrama de Venn para la comparación de las proteínas elevadas en las VEs secretadas por el depósito pardo y blanco de ratas obesas, por TAS y TAV humano obeso y por las VEs patológicas (HG/HI, AP, AO) (C). Lista de posibles proteínas candidatas a biomarcadores de obesidad y comorbilidades de esta patología en (D).

4.1.5. Resumen de la caracterización de las VEs secretadas por adipocitos en diferentes situaciones metabólicas

El análisis proteómico de las VEs liberadas por los adipocitos murinos patológicos, hipertrofiados con palmitato (AP) y ácido oleico (AO) y con resistencia insulínica mediante el tratamiento con alta glucosa / alta insulina (HG/HI), y por los explantes de tejido adiposo blanco (subcutáneo y visceral) de obesos sometidos a cirugía bariátrica y pardo de ratas obesas y delgadas, demostró la naturaleza exosomal/endosomal de estas partículas debido a la identificación de marcadores vesiculares como las tetraspaninas CD81, CD9 y CD63, la proteína Alix o sintenina-1 entre otras [253,254]. Además, el análisis mediante la plataforma ExoView determinó que el tamaño de estas partículas estaba comprendido entre 60-80 nm (Figura 20, 24, 30). Cabe destacar que la composición de los marcadores exosomales varía en función de los estímulos que reciba la célula de origen, es decir, se observó un perfil de tetraspaninas distinto según el proceso fisiopatológico. El análisis proteómico (DDA, DIA-SWATH/MS) permitió observar que la composición proteica de estas VEs es distinta dependiendo de la localización anatómica del tejido adiposo (subcutáneo, visceral o pardo), y del estado metabólico de este tejido o de los propios adipocitos. De forma interesante, se observó que las vesículas del TAV obeso contienen principalmente proteínas relacionadas con la adiposidad como la adipoquina clásica leptina y con la inflamación (catepsina B, CD36, CD14, ITH3, osteopontina, Park7/DJ1 o factor tisular), con el síndrome metabólico (catepsina B o ceruloplasmina), y la resistencia a la insulina (MMP-2, CD36, MMP-14, osteopontina o TGFBI), relacionadas con la adiposidad central (mimecan, perilipina-1, caveolina-1 o vimentina), y en definitiva con la obesidad, a diferencia del tejido adiposo subcutáneo que contiene proteínas relacionadas con el citoesqueleto y la matriz extracelular (Figura 26) [253,254]. Además, observamos que las VEs extracelulares del tejido adiposo pardo, tanto de ratas obesas como delgadas, contienen proteínas de la beta oxidación como la proteína UCP1 (proteína desacoplante mitocondrial de la grasa parda 1) o el citocromo b-c1 subunidad 6 (Figura 32).

4.2 CAPÍTULO 2: VALIDACIÓN DEL PANEL DE BIOMARCADORES IDENTIFICADOS EN VES AISLADAS DE LOS ADIPOCITOS EN DIFERENTES SITUACIONES METABÓLICAS

Cada vez hay más evidencias experimentales que postulan que las vesículas extracelulares (VEs) pueden aportar información predictiva, diagnóstica y pronóstica en la diabetes tipo II (DM2) y obesidad [111]. Además, dada su presencia y accesibilidad en los fluidos biológicos, a diferencia de otros biomarcadores clásicos, permiten un análisis poco invasivo [182]. En este contexto, el análisis proteómico de las VEs, secretadas por adipocitos patológicos y explantes de tejido adiposo obeso humano y de ratas obesas y delgadas, permitió establecer un panel de proteínas candidatas a posibles biomarcadores diagnósticos y pronósticos de la obesidad y de las comorbilidades asociadas a esta. En este capítulo, se muestran las validaciones y el papel de estos posibles biomarcadores en el contexto de la obesidad.

4.2.1 Validación de las proteínas reguladas en las VEs de cada uno de los modelos analizados mediante DIA-SWATH-MS (adquisición de ventanas secuenciales de todos los espectros teóricos)

4.2.1.1 Validación de la proteína TGFBI como biomarcador de resistencia insulínica, y mimecan como biomarcador de hipertrofia lipídica en adipocitos

Para confirmar los resultados de la proteómica de las VEs secretadas por los adipocitos murinos C3H10T1/2, se validaron las proteínas reguladas en dichas vesículas (**apartado 1.4.1.1**) mediante inmunodetección con anticuerpos específicos por *Western Blot* (Tabla 9) y ELISA a partir de lisados vesiculares obtenidos tras la ultracentrifugación de 30 mL de secretoma celular de cada una de las condiciones: control (VEs ADIPO), adipocitos con resistencia insulínica (HG/HI) o con hipertrofia lipídica por palmitato (AP) u oleico (AO) (se hicieron un mínimo de 4 experimentos independientes). Las proteínas de interés o las candidatas a biomarcadores seleccionadas fueron ceruloplasmina, mimecan y la proteína transformante ig-h3 inducida por el factor de crecimiento (TGFBI) (Figura 35). Además, también se identificaron la proteína perilipina-1 (sugerida como marcador de VEs de tejido adiposo), caveolina-1 y marcadores exosomales/endosomales como sintenina-1, Alix (proteína que interactúa con la proteína de la muerte celular programada 6, PDC6I) y CD81 (Figura 35).

Curiosamente, se observó que los marcadores de VEs como sintenina-1, Alix y CD81 varían con los insultos metabólicos (Figura 35 A). Además, se observó que perilipina-1 estaba regulada al alza en las VEs de adipocitos hipertrofiados por lípidos (Figura 35 A, E). En cambio, el marcador de balsas lipídicas, caveolina-1, se halló en niveles similares, sin variaciones estadísticamente significativas, en las VEs secretadas por los adipocitos control y patológicos (Figura 35 A, F).

Confirmando el análisis DIA-SWATH/MS, se observó una llamativa elevación de TGFBI exclusivamente en aquellas vesículas liberadas por adipocitos resistentes a la insulina (VEs HG/HI) en comparación con las VEs aisladas de adipocitos control (VEs ADIPO), y especialmente en relación con las vesículas de adipocitos hipertrofiados por lípidos (VEs AP, VEs AO) las cuales presentaban niveles ínfimos de esta proteína (Figura 35 A, C, H). Por otro lado, ceruloplasmina se encontró elevada en aquellas vesículas procedentes de adipocitos tratados con AP y especialmente con AO en comparación con los adipocitos con HG/HI o de

células control (Figura 35 A, B, G). Además, la proteína mimecan, se halló elevada en las VEs de los adipocitos con hipertrofia lipídica en comparación con las VEs ADIPO y HG/HI (Figura 35 A, D, I).

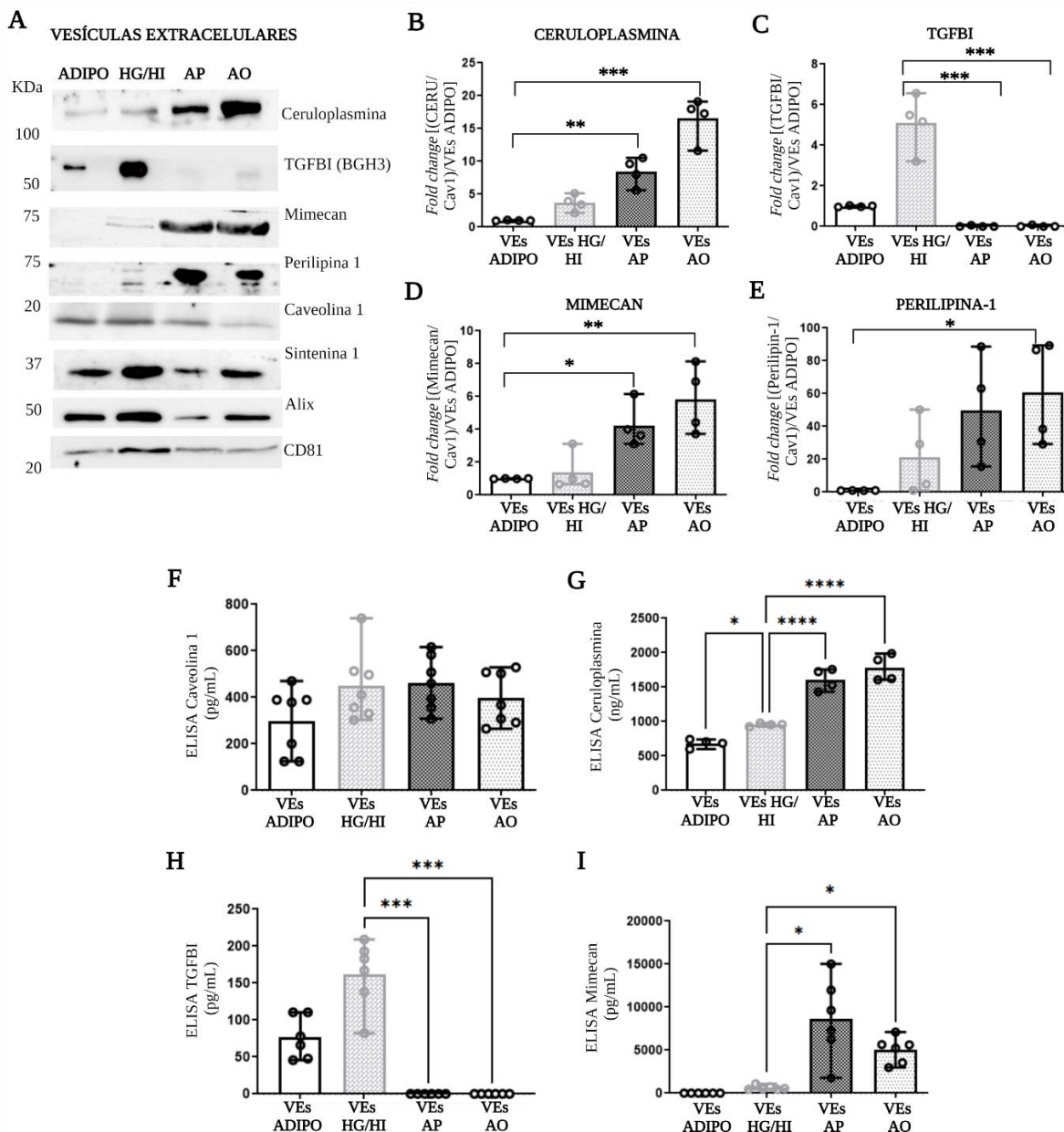


Figura 35. Validación por Western Blot y ELISA de las proteínas identificadas como posibles candidatas a biomarcadores de la obesidad y de sus comorbilidades en el análisis DIA-SWATH/MS (adquisición de ventanas secuenciales de todos los iones de fragmentos teóricos) en las VEs desprendidas por los adipocitos C3H10T1/2 [253]. Se muestran imágenes representativas de la inmunodetección (A) y gráficos de la cuantificación de las bandas para ceruloplasmina (B), proteína ig-h3 inducida por el factor de crecimiento transformante (TGFBI) (C), mimecan (D), perilipina-1 (E), caveolina-1, sintenina-1, Alix y CD81 (A) en vesículas aisladas de todos los modelos celulares (n = 4 lisados independientes). Se muestran gráficos de la cuantificación por ELISA de las proteínas caveolina-1(F), ceruloplasmina (G), TGFBI (H) y mimecan (I) en las VEs murinas (n >6 lisados independientes por cada tipo de muestra; duplicado técnico de cada muestra). Las diferencias se analizaron mediante la prueba de One-Way Anova-Kruskall Wallis, seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn (p ≤ 0,05 se consideró estadísticamente significativo: * p < 0,05, ** p < 0,01, * p < 0,001 y **** p < 0,0001). VEs ADIPO: vesículas extracelulares aisladas de adipocitos C3H10T1/2 control; VEs HG/HI: VEs de los adipocitos con resistencia insulínica mediante el tratamiento con alta glucosa/alta insulina; VEs AP: VEs secretadas por adipocitos con hipertrofia lipídica mediante palmitato; VEs AO: VEs liberadas por adipocitos con hipertrofia lipídica mediante ácido oleico.**

Además, estas proteínas fueron validadas mediante la plataforma ExoView para observar la colocalización de biomarcadores. Así, las muestras de secretoma se incubaron directamente en chips individuales que inmunocapturaron las VEs mediante los anticuerpos CD81 y CD9; y posteriormente se observaron las proteínas TGFBI (Alexa Fluor® 647), ceruloplasmina (Alexa Fluor® 594) y mimecan (Alexa Fluor® 488) mediante inmunofluorescencia (Tabla 8, Figura 17). Como se mostró en la Figura 20, el número de partículas capturadas por las tetraspaninas CD81 y CD9 fue similar en todas las condiciones. Por este motivo, el número de partículas positivas para cada una de las proteínas se corrigió por el número de vesículas capturadas en cada muestra (VEs ADIPO, VEs HG/HI, VEs AP, VEs AO). Cabe destacar que este análisis corroboró los datos obtenidos mediante DIA-SWATH/MS, *Western Blot* y ELISA. Por lo tanto, se observó, de forma estadísticamente no significativa, que las vesículas de adipocitos con resistencia insulínica (VEs HG/HI) tenían un incremento de los niveles de TGFBI (Figura 36 A) y una disminución de ceruloplasmina (Figura 36 B) y mimecan (Figura 36 C), a diferencia de lo que ocurre en las vesículas de los adipocitos hipertrofiados (VEs AP y AO) (Figura 36 A-C). Sin embargo, las vesículas de los adipocitos control muestran un perfil más parecido a las VEs HG/HI que a las de AP o AO (Figura 36 D). Cabe mencionar que las vesículas de los adipocitos hipertrofiados, especialmente las VEs AO, tienen una mayor colocalización de las proteínas TGFBI/ceruloplasmina y ceruloplasmina/mimecan que las vesículas control y HG/HI (Figura 36 D, E). Además, se observó una mayor colocalización de CD9 con ceruloplasmina y mimecan que con la tetraspanina CD81. Curiosamente, también se halló que las VEs de adipocitos con resistencia insulínica (HG/HI) positivas para TGFBI muestran un mayor tamaño que el resto de las vesículas (Figura 36 E).

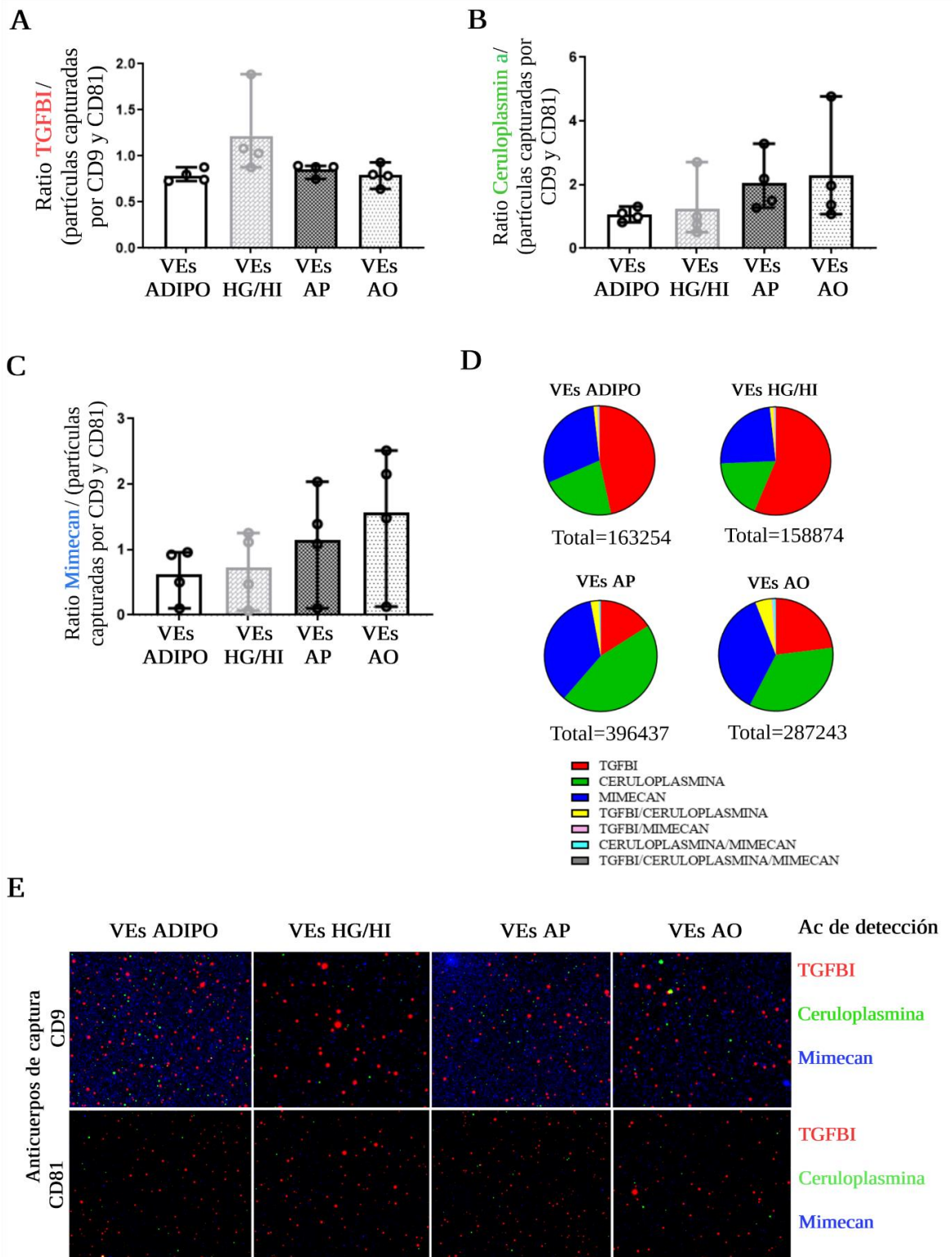


Figura 36. Validación de las proteínas candidatas a biomarcadores (TGFB1, ceruloplasmina y mimecan) mediante la plataforma ExoView a partir de la inmunocaptura con CD9 y CD81 de las VEs de secretoma celular de adipocitos C3H10T1/2 control (VEs ADIPO), con resistencia insulínica (HG/HI) e hipertrofiados con palmitato (VEs AP) u oleico (VEs AO). El análisis mediante la tecnología ExoView permitió observar el número de partículas positivas para cada una de las muestras y la colocalización de estas proteínas (Tabla 8, Figura 17). Se muestra el número de partículas positivas para TGFB1 (Alexa Fluor 647, rojo) (A), ceruloplasmina (Alexa Fluor 594, verde) (B) y mimecan (Alexa Fluor 488, azul) (C) corregido por el número de partículas capturadas para cada tipo de muestra (Figura 20). Se observa la colocalización de estos marcadores en (D). Además, se muestran imágenes representativas de la inmunofluorescencia en (E). Se

realizaron 4 ensayos independientes para cada condición, y las diferencias se analizaron mediante *One-Way Anova-Kruskall Wallis* seguido de la prueba *Dunn* de múltiples comparaciones, $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Ac: anticuerpo (Creado con BioRender.com).

4.2.1.2 Validación de biomarcadores de obesidad según la localización anatómica del tejido adiposo blanco (subcutáneo, visceral)

Para confirmar el análisis proteómico cuantitativo (DIA-SWATH/MS), y para determinar el papel potencial de las proteínas identificadas como biomarcadores del tipo de tejido adiposo según su localización anatómica, se validaron las proteínas sintenina-1, TGFBI y mimecan en las VEs aisladas de 1 gramo de explante de tejido adiposo visceral (TAV) y subcutáneo (TAS) de pacientes independientes con obesidad mórbida ($n = 16$; 16 TAS y 16 TAV) y de pacientes con peso normal a sobrepeso ($n = 4$; 4 TAS y 4 TAV) mediante inmunodetección y ELISA. Además, también se validaron proteínas clásicas relacionadas con la acumulación y transporte de lípidos como FAS (sintetasa de ácidos grasos), FABP4 (proteína de unión a ácidos grasos 4 en adipocitos), caveolina-1, perilipina-1 y marcadores exosomales/endosomales como Alix y CD81 (Figura 37 A). A pesar de observar variabilidad muestral, se confirmaron los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas en los cuales las proteínas TGFBI y mimecan son características de las vesículas del TAV, y sintenina-1 de las del TAS. Mediante inmunodetección, se confirmó que la proteína sintenina-1 se encontraba elevada en las VEs de tejido subcutáneo obeso en comparación con el visceral (Figura 37 A, D). Sin embargo, en el tejido adiposo visceral se halló una elevación estadísticamente significativa de las proteínas TGFBI y mimecan mediante inmunodetección y ELISA (Figura 37 B, C, F, G). Cabe destacar que estas 3 proteínas se validaron también en VEs de donantes más delgados; observando así que la sintenina-1 está disminuida en las VEs del TAV obeso en comparación con las del TAV delgado y, sin embargo, TGFBI y mimecan están elevadas en las vesículas del TAV obeso en comparación con las del delgado (Figura 38). Por otro lado, las proteínas FAS, FABP4 y perilipina-1 se encontraban reguladas al alza en las vesículas de origen visceral (Figura 37 A). Además, los marcadores vesiculares, Alix y CD81 variaban según la localización anatómica de estas vesículas, especialmente Alix que se encontró elevado en las vesículas del tejido adiposo subcutáneo en comparación con las viscerales (Figura 37 A). Es importante destacar que no se hallaron diferencias en la concentración de la proteína caveolina-1 en las vesículas de ambos depósitos de grasa tanto por inmunodetección como por ELISA (Figura 37 A, E).

Además, estas proteínas características de las VEs del tejido adiposo obeso en función de su localización anatómica fueron validadas mediante la plataforma ExoView. Las muestras de secretoma se incubaron directamente en chips individuales, y las VEs fueron capturadas mediante las tetraspaninas CD81, CD63 y CD9 para posteriormente observar mediante inmunofluorescencia las proteínas TGFBI (Alexa Fluor® 647), perilipina-1 (Alexa Fluor® 594) y mimecan (Alexa Fluor® 488) (Tabla 8, Figura 17 A). Como se mostró en la Figura 24, se capturó de forma estadísticamente significativa un mayor número de VEs del tejido adiposo visceral que del subcutáneo. Por esta razón, se decidió corregir el número de vesículas positivas para perilipina-1 con el número total de vesículas capturadas en cada depósito de grasa. De esta forma, se observó que la ratio de VEs positivas para perilipina-1 para el número de vesículas

capturadas era similar en las subcutáneas y viscerales (Figura 39 A). Por lo tanto, se usó esta ratio para corregir los niveles de las proteínas TGFBI y mimecan. Así, se volvió a confirmar que las vesículas viscerales contenían una mayor ratio de partículas positivas para TGFBI (Figura 39 B) y mimecan (Figura 39 C) que las de origen subcutáneo. Cabe mencionar que la colocalización de estos biomarcadores es similar en ambas poblaciones de vesículas, destacando una baja colocalización de TGFBI y mimecan (Figura 39 D). Curiosamente, también se observó que las VEs capturadas con CD81 contienen una menor proporción de vesículas inmunodetectadas con perilipina-1 que las capturadas con CD63 y CD9 (Figura 39 D, E).

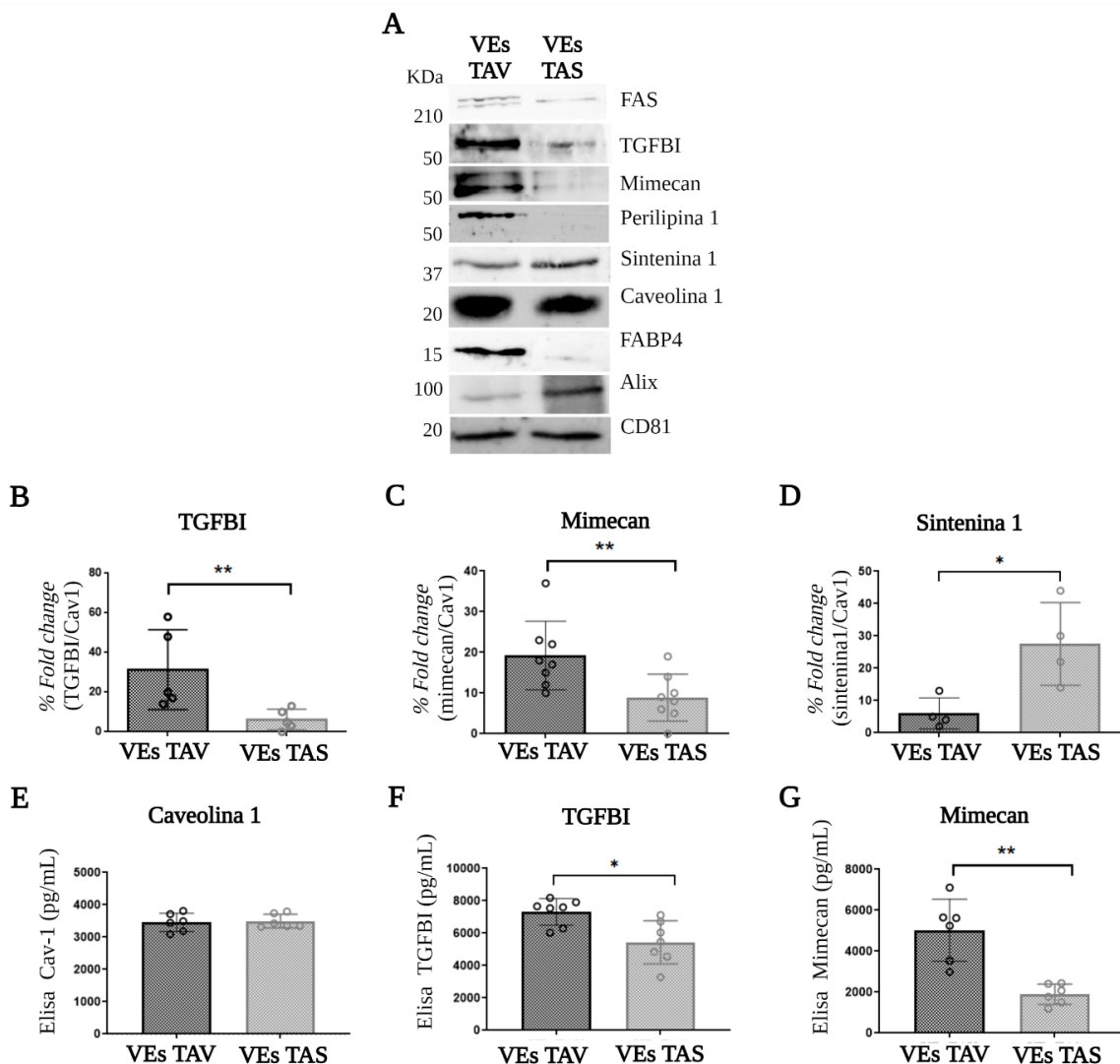


Figura 37. Validación por *Western Blot* y ELISA de las proteínas identificadas como posibles candidatas a biomarcadores de la obesidad y de sus comorbilidades en el análisis DIA-SWATH/MS (adquisición de ventanas secuenciales de todos los iones de fragmentos teóricos) en las VEs secretadas por los explantes de tejido adiposo obeso subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) humano. Se muestran imágenes representativas de la inmunodetección (A) y gráficos de la cuantificación de las bandas para las proteínas ig-h3 inducida por el factor de crecimiento transformante TGFBI (B), mimecan (C), sintenina-1 (D), FAS, FABP4 perilipina-1, caveolina-1, Alix y CD81 (A) en vesículas aisladas de 1 gramo de tejido de cada condición (n >4 individuos independientes). Se muestran gráficos de la cuantificación por ELISA de las proteínas caveolina-1(E), TGFBI (F) y mimecan (G) (n>6 lisados independientes por cada tipo de muestra; duplicado técnico de cada muestra). Las diferencias se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney, (p ≤0,05 se consideró estadísticamente significativo: * p <0,05, ** p <0,01).

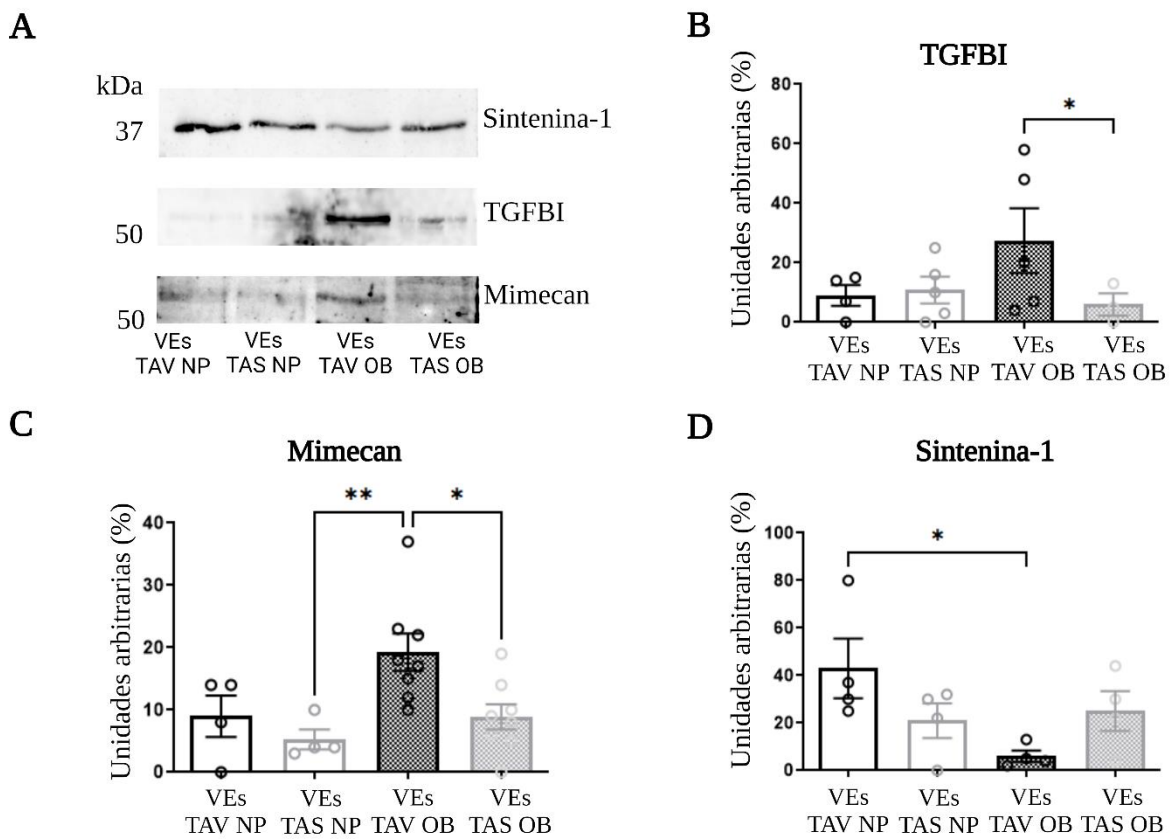


Figura 38. Validación por *Western Blot* de las proteínas identificadas como posibles candidatas a biomarcadores de la obesidad en el análisis DIA-SWATH/MS en las VEs secretadas por los explantes de tejido adiposo subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) de pacientes con peso normal a sobrepeso [254]. Se muestran imágenes representativas de la inmunodetección (A) y gráficos de la cuantificación de las bandas para las proteínas ig-h3 inducida por el factor de crecimiento transformante TGFBI (B), mimecan (C), sintenina-1 (D), en vesículas aisladas de 1 gramo de tejido de cada condición (n >4 individuos independientes). Las diferencias se evaluaron mediante la prueba de *One-way Anova-Kruskall-Wallis*, considerando estadísticamente significativo $p < 0,05$ (*: 0,05; **: 0,001). NP: delgado; OB: obeso.

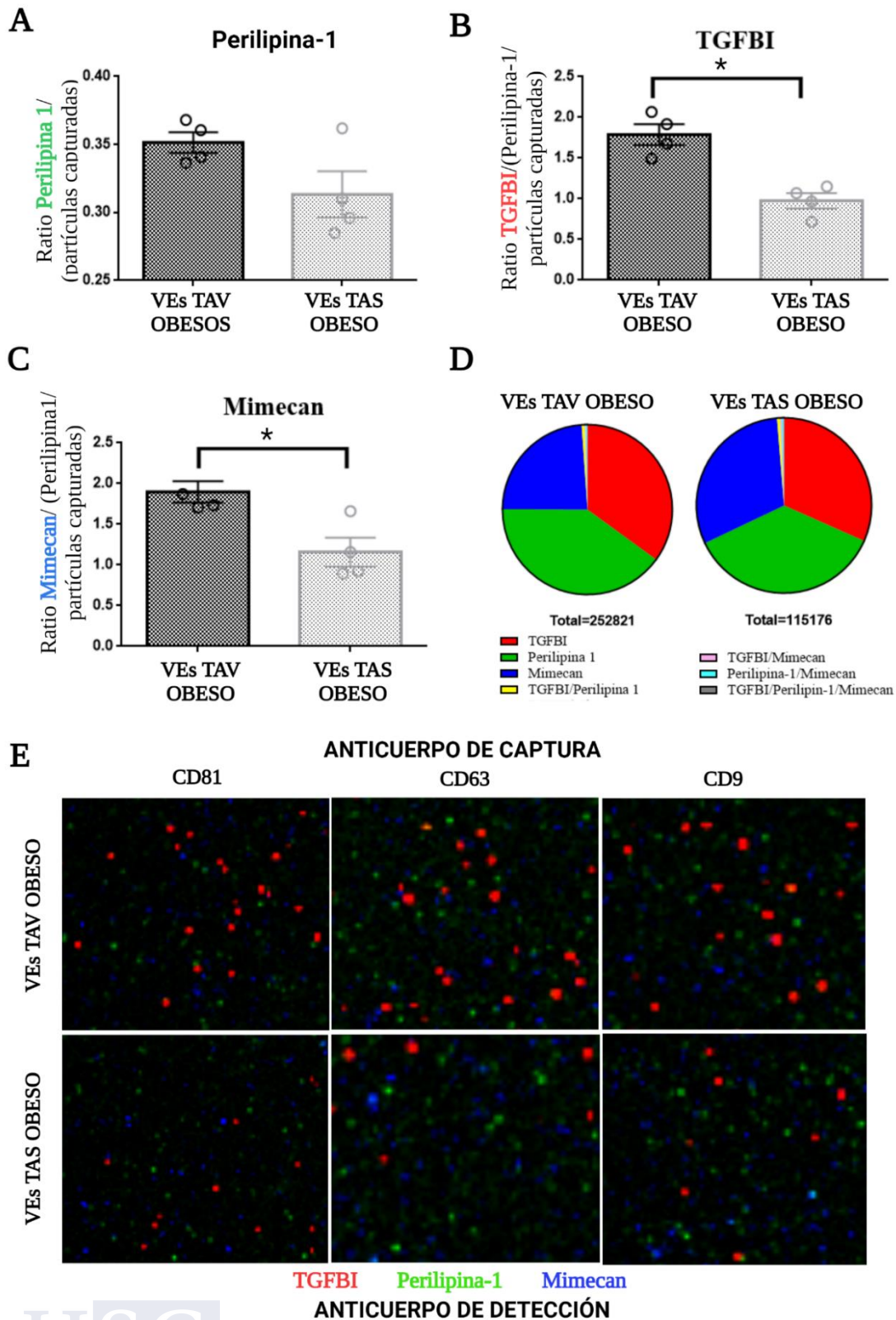


Figura 39. Validación de las proteínas candidatas a biomarcadores del tejido adiposo subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) (TGFBI, perilipina-1 y mimecan) mediante la plataforma ExoView a partir de la captura con CD81, CD63 y CD9 de las VEs aisladas del secretoma de explantes de 1 gramo de tejido adiposo obeso humano. El análisis mediante la tecnología ExoView permitió observar el número de partículas positivas y la colocalización de estas proteínas para cada una de las muestras (Tabla 8, Figura 17 A). Se muestra el número de partículas

positivas para perilipina-1 (Alexa Fluor 594, verde) corregido por el número de partículas capturadas (Figura 24) (A), TGFBI (Alexa Fluor 647, rojo) (B) y mimecan (C) (Alexa Fluor 488, azul) corregido por perilipina-1/número de partículas. Se observa la colocalización de estos marcadores en (D). Además, se muestran imágenes representativas de la inmunofluorescencia detectada para cada tipo de muestra y captura en (E). Se realizaron 4 ensayos independientes para cada condición, y las diferencias se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney, (p-valor $\leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo: * p < 0,05, ** p < 0,01) (Creado con BioRender.com).

Dado que el perfil de tetraspaninas varía dependiendo de la localización anatómica del tejido adiposo, decidimos capturar estas vesículas mediante proteínas características de la grasa como perilipina-1 y caveolina-1 [242]. Por lo tanto, las vesículas liberadas por el tejido adiposo subcutáneo y visceral de pacientes con obesidad fueron capturadas en chips funcionalizados con anticuerpos contra perilipina-1 y caveolina-1 mediante la plataforma de análisis ExoView (Tabla 8, Figura 17 B). Este análisis permitió observar la colocalización de las vesículas positivas para TGFBI (Alexa Fluor® 647), sintenina-1 (Alexa Fluor® 594) y mimecan (DyLight® 755), mediante inmunofluorescencia, que fueron capturadas por estos marcadores (Tabla 8, Figura 17 B). De forma paralela a los resultados anteriores, se observó que la cantidad de partículas positivas para TGFBI y mimecan es mayor en las VEs liberadas por el tejido adiposo visceral en comparación con el tejido adiposo subcutáneo de pacientes con obesidad (Figura 40 A, B). Por el contrario, se observó una tendencia negativa en la cantidad de partículas positivas para sintenina-1 liberadas por el TAV en comparación con el TAS de individuos con obesidad (Figura 40 C). Cabe mencionar que, en las VEs liberadas por el TAS, se observó una mayor colocalización de estos biomarcadores, destacando la colocalización de TGFBI/sintenina-1 (Figura 40 D, E).

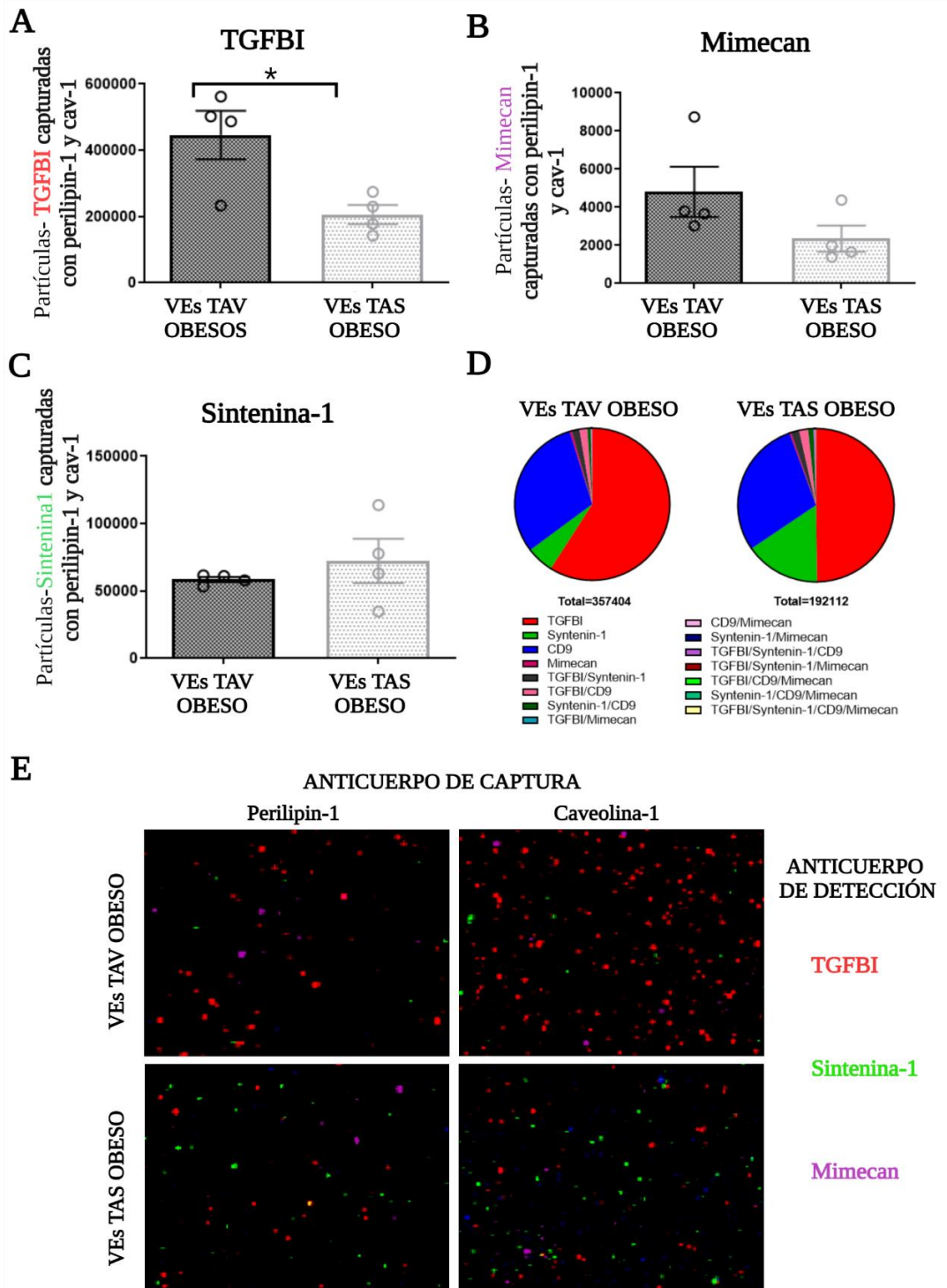


Figura 40. Validación de las proteínas candidatas a biomarcadores del tejido adiposo subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) (TGFBI, mimecan, sintenina-1) mediante la plataforma ExoView a partir de la captura con perilipina-1 y caveolina-1 de las VEs aisladas del secretoma de explantes de 1 gramo de tejido adiposo obeso humano. El análisis mediante la tecnología ExoView permitió observar el número de partículas positivas y la colocalización de estas proteínas para cada una de las muestras (Tabla 8, Figura 17 B). Se muestra el número de partículas positivas para TGFBI (Alexa Fluor 647) (A), mimecan (DyLight 755) (B) y sintenina-1 (Alexa Fluor 594) (C). Se observa la colocalización de estos marcadores en (D). Además, se muestran imágenes representativas de la inmunofluorescencia detectada para cada tipo de muestra y captura en (E). Se realizaron 4 ensayos independientes para cada condición, y las diferencias se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney, ($p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) (Creado con BioRender.com).

4.2.1.3 Validación de los biomarcadores vesiculares del tejido adiposo pardo y blanco obeso y normopeso

Para confirmar el análisis proteómico cuantitativo (DIA-SWATH/MS) de las VEs aisladas de 1 gramo de tejido adiposo subcutáneo (TAS), visceral (TAV) y pardo (TAP) de ratas obesas y normopeso ($n = 8$ animales independientes para cada condición), se validaron las proteínas vesiculares candidatas a biomarcadores de grasa parda que mejor separaran al TAP de animales con obesidad de los animales normopeso como UCP1 (proteína desacoplante mitocondrial de la grasa parda 1), ACLY (ATP-citrato sintasa), CD14 y ceruloplasmina (Figura 41). También se confirmaron, mediante inmunodetección, proteínas que diferencian las VEs de la grasa parda de la blanca como vimentina, FAS (sintetasa de ácidos grasos) y FABP4 (proteína de unión a ácidos grasos 4 en adipocitos); además de los marcadores de tejido adiposo como perilipina-1, caveolina-1, y las proteínas vesiculares Alix y CD81 (Figura 41 A).

Confirmando los resultados de espectrometría de masas, la proteína ACLY se encontró elevada en las vesículas secretadas por el TAP de animales control en comparación con las liberadas por el mismo tejido en animales con obesidad (Figura 41 C). Cabe mencionar, que la proteína UCP1 se halló elevada en las vesículas del TAP especialmente, de forma estadísticamente significativa, en las vesículas de ratas obesas (Figura 41 H). Además, la proteína FABP4 se observó elevada principalmente en estas mismas vesículas (Figura 41 J). Se observó también que la proteína FAS se encontraba elevada de forma estadísticamente significativa en las vesículas liberadas por el TAP tanto de ratas obesas como normopeso en comparación a las vesículas del TAS y TAV tanto obeso como normopeso (Figura 41 B). Por otro lado, se observó que las proteínas perilipina-1, ceruloplasmina y caveolina-1 mostraban una tendencia a aumentar con la obesidad, especialmente en las VEs del TAP de animales obesos (Figura 41 D, E, I). Cabe destacar, que la proteína vimentina se encontró elevada en las vesículas TAV obeso en comparación con las vesículas de otros depósitos de grasa tanto en animales obesos como control (Figura 41 F). A mayores, la proteína CD14 se encontró elevada de forma estadísticamente significativa en las vesículas del TAS de animales control en comparación con el resto (Figura 41 G). Cabe destacar, que las proteínas vesiculares CD81 y Alix se observaron disminuidas en las VEs del TAP tanto obeso como control (Figura 41 A).

Además, las proteínas UCP1, FABP4 y caveolina-1 fueron validadas mediante la plataforma ExoView (Figura 42). Las muestras de secretoma se incubaron directamente en chips individuales, y las VEs fueron capturadas mediante las tetraspaninas CD81 y CD9 para posteriormente observar mediante inmunofluorescencia las proteínas UCP1 (Alexa Fluor® 647), FABP4 (Alexa Fluor® 594) y caveolina (Alexa Fluor® 488) (Tabla 8, Figura 17). A pesar de que el número de VEs capturadas fue distinto dependiendo del tipo tisular (Figura 30), se observó una tendencia al alza de las proteínas UCP1 y FABP4 en las vesículas del TAP de animales con obesidad (Figura 42 A, B), a diferencia de la caveolina-1 (Figura 42 C). Cabe destacar que las proteínas UCP1 y FABP4 colocalizan de forma similar en VEs del TAS, TAV y TAP de animales obesos y control/normopeso (Figura 42 D, E).

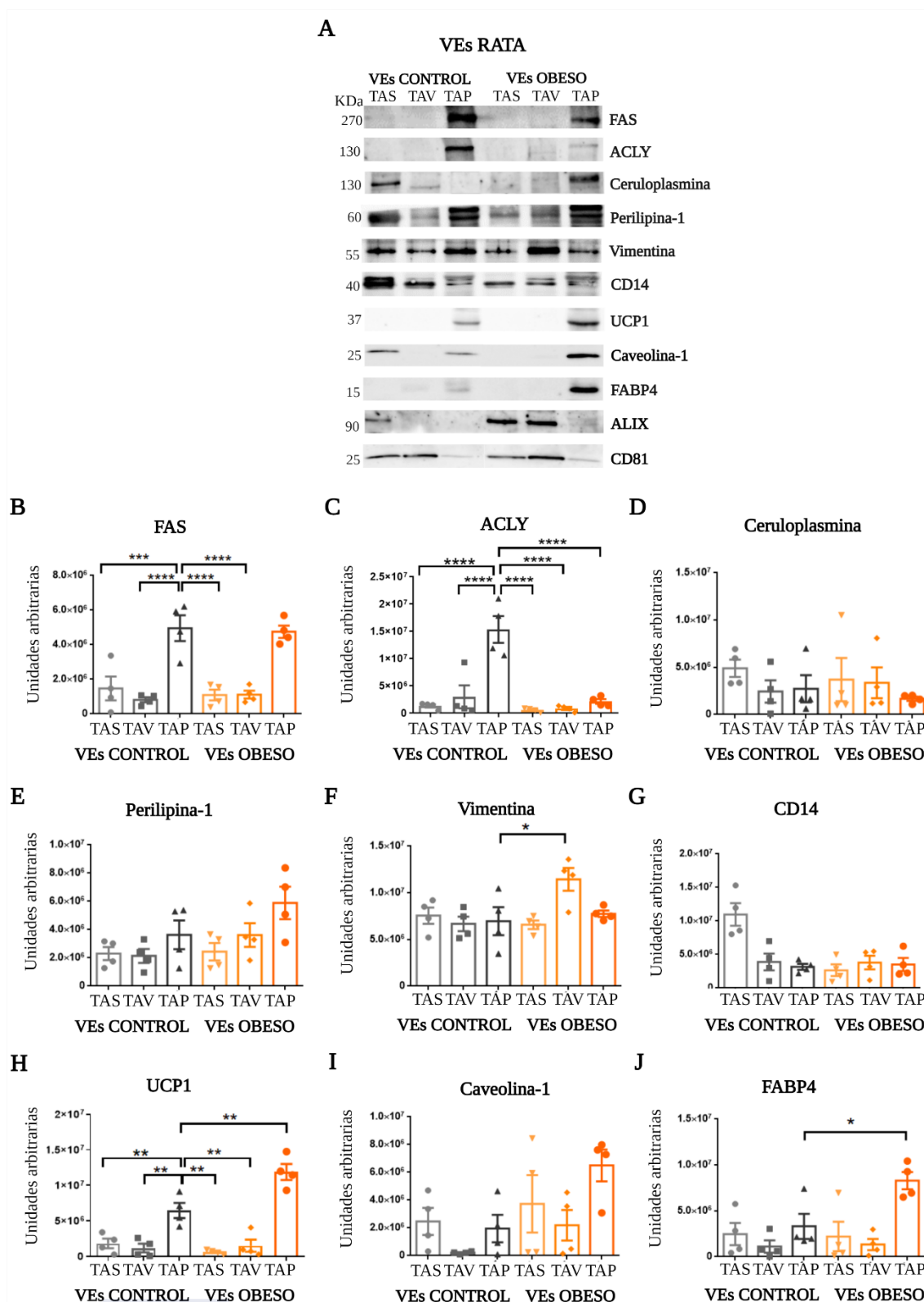


Figura 41. Validación por inmunodetección de las proteínas vesiculares identificadas como posibles candidatas a biomarcadores de la grasa parda (TAP) y blanca en el análisis DIA-SWATH/MS (adquisición de ventanas secuenciales de todos los iones de fragmentos teóricos) en las VEs secretadas de 1 gramo de TA de animales con obesidad y normopeso. Se muestran imágenes representativas de la inmunodetección (A) y gráficos de la cuantificación de las bandas para la proteína FAS (sintetasas de ácidos grasos) (B), ACLY (ATP-citrato sintasa) (C), ceruloplasmina (D), perilipina-1 (E), vimentina (F), CD14 (G), UCP1 (proteína desacoplante mitocondrial de

la grasa parda 1) (H), caveolina-1 (I) y FABP4 (proteína de unión a ácidos grasos 4 en adipocitos) (J) (n = 4 lisados independientes por cada tipo de muestra). Las diferencias se analizaron mediante la prueba de *One-Way Anova-Kruskall Wallis*, seguida de la prueba de comparación múltiple de *Dunn* ($p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$). VEs TAS: VEs del tejido adiposo subcutáneo; VEs TAV: VEs del tejido adiposo visceral; VEs TAP: VEs del tejido adiposo pardo.

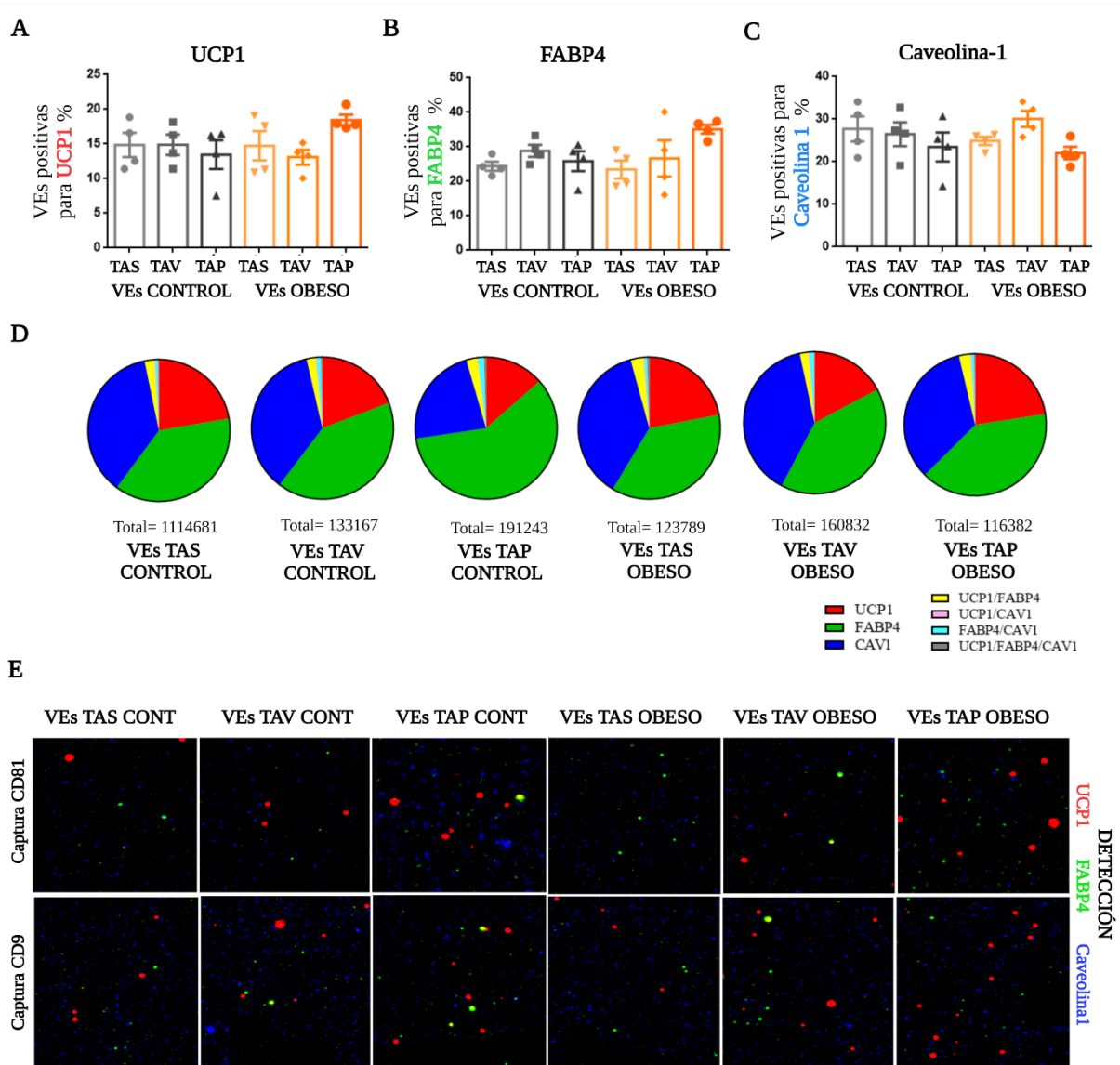


Figura 42. Validación de las proteínas candidatas a biomarcadores (UCP1, FABP4 y caveolina-1) del tejido adiposo subcutáneo (TAS), visceral (TAV) y pardo (TAP) mediante la plataforma ExoView a partir de la captura con CD81 y CD9 de las VEs aisladas del secretoma de 1 gramo de tejido adiposo de animales obesos y normopeso. El análisis mediante la tecnología ExoView permitió observar el número de partículas positivas y la colocalización de estas proteínas para cada una de las muestras (Tabla 8, Figura 17). Se muestra el porcentaje de partículas positivas para UCP1 (Alexa Fluor 647, rojo) (A), FABP4 (Alexa Fluor 594, verde) (B) y caveolina-1 (Alexa Fluor, azul) (C). Se observa la colocalización de estos marcadores en (D). Además, se muestran imágenes representativas de la inmunofluorescencia en (E). Se realizaron 4 ensayos independientes para cada condición, y las diferencias se analizaron mediante la prueba *One-Way Anova-Kruskall Wallis*, seguida de la prueba de comparación múltiple de *Dunn* ($p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo) (Creado con BioRender).

4.2.2 Valoración de la proteína TGFBI como biomarcador de resistencia a insulina y mimecan como biomarcador de adiposidad central a nivel circulante

En resumen, la validación del panel de proteínas candidatas a biomarcadores obtenidas por espectrometría de masas, nos mostró que diversas proteínas se regulaban al alza o disminuían su valor dependiendo de la localización anatómica del tejido de origen, de los insultos metabólicos y del estado nutricional de los individuos. Así, una vez determinados estos biomarcadores, quisimos validarlos a nivel circulante en vesículas de plasma de pacientes obesos ($n = 14$, $IMC >35 \text{ Kg/m}^2$) y de donantes normopeso ($n = 14$; $IMC >26$) (en la Tabla 6 se observan los datos individuales). Como se muestra en la tabla 6 y 16, los donantes normopeso y obesos, que se emplearon en la validación a nivel circulante, se emparejaron según la edad y el sexo. Los donantes delgados eran el 50 % hombres, con una edad promedio de 46 años, y un IMC promedio de $23,01 \text{ kg/m}^2$, y no diabéticos. Los obesos, también, eran el 50 % hombres, con una edad promedio de 46 años, y a diferencia de los normopeso, con IMC promedio de $48,44 \text{ kg/m}^2$. Dentro de los obesos se distinguieron dos grupos: diabéticos ($n = 7$) y no diabéticos ($n = 7$). Los diabéticos tenían en promedio un 6,31 % de hemoglobina glicosilada (HbA1c) en comparación con los no diabéticos que tenían un promedio de 5,61 % de HbA1c (Tabla 6, 16).

Tabla 16. Datos clínicos de los pacientes que donaron muestras de plasma para la validación de biomarcadores vesiculares circulantes mediante ELISA. Se muestra el promedio junto la desviación estándar de los siguientes datos clínicos: sexo, edad, IMC (Índice de Masa Corporal), HbA1c (hemoglobina glicosilada) y si padecen diabetes (Tabla 6).

VALIDACIÓN BIOMARCADORES					
Tipo de muestras	Sexo	Edad (años)	IMC (Kg/m^2)	Diabetes	Hemoglobina glicosilada (HbA1c) %
VEs de plasma delgado ($n = 14$)	50 % Hombres 50 % Mujeres	46 +/-11	23, 0157 +/- 2,11	No	No
VEs de plasma obeso ($n = 14$)	50 % Hombres 50 % Mujeres	46 +/- 11	48,44 +/- 7,43	DM2 ($n = 7$)	6,31+/-0,73
				No DM2 ($n = 7$)	5,61 +/- 0,19

Estas vesículas aisladas mediante ultracentrifugación del plasma (**apartado 3.4**, Figura 16), tanto de donantes obesos como delgados, se caracterizaron mediante el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) e inmunodetección contra marcadores vesiculares o endosomales (Figura 43). Se observó que las vesículas de plasma de individuos delgados tenían un tamaño y concentración de partículas ligeramente superior que las de plasma de individuos con obesidad, sobre $127,7 \text{ nm}$ y $4,46 \cdot 10^9$ partículas/mL (Figura 43 A, C), frente a $119,7 \text{ nm}$ y $3,27 \cdot 10^9$ partículas/mL en el plasma obeso (Figura 43 B, C). Además, se identificaron los marcadores Alix, CD63 y CD81 en ambos tipos de vesículas (Figura 43 D). Cabe destacar que la proteína CD81 se observó principalmente en las vesículas circulantes de plasma de pacientes con obesidad en comparación con las de donantes delgados (Figura 43 D).

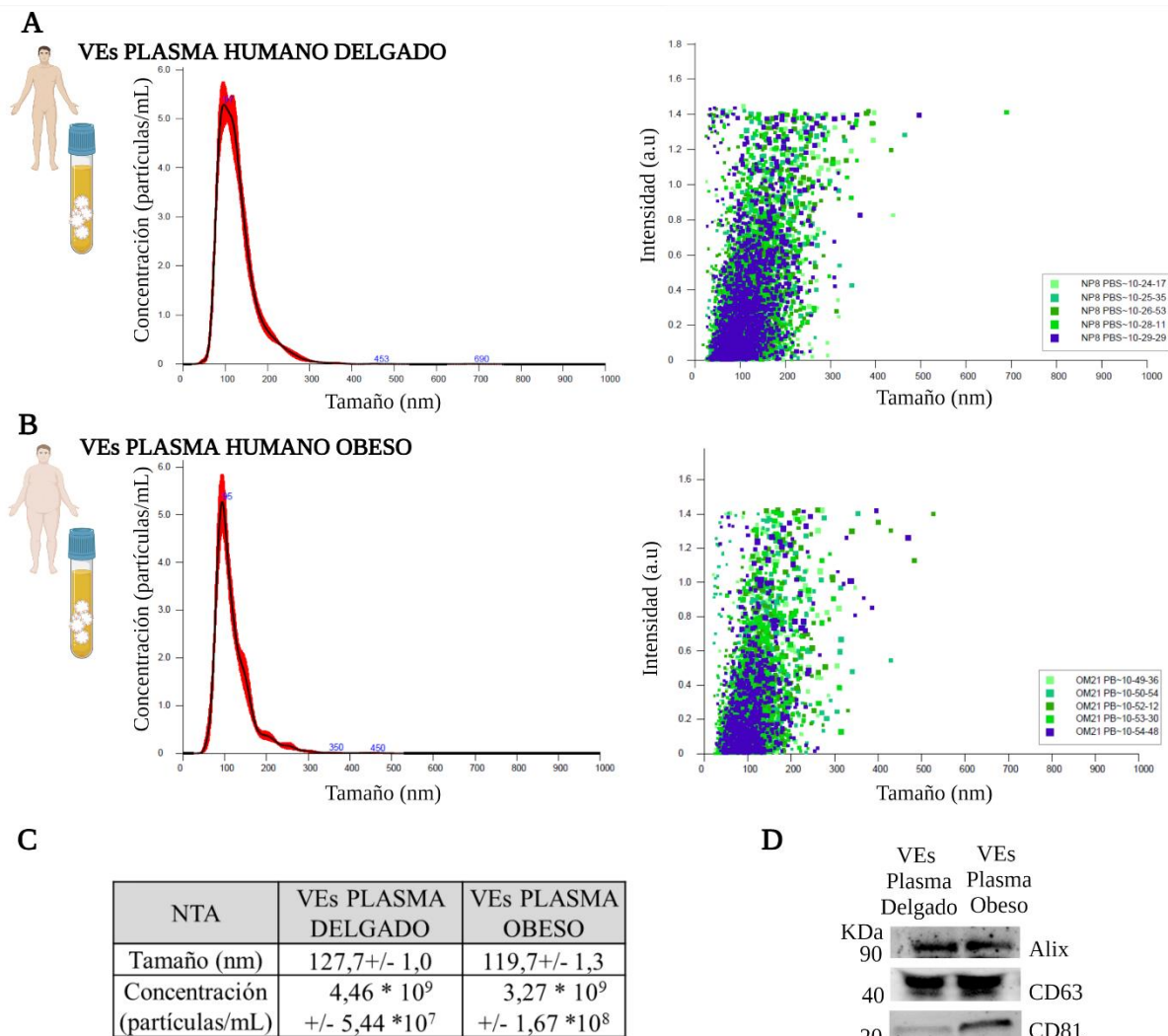


Figura 43. Caracterización de las VEs aisladas de plasma humano de obesos mórbidos y donantes delgados (Tabla 6) mediante NTA e inmunodetección para marcadores vesiculares [254]. Se representan gráficamente la concentración de partículas/mL (10^9) y la intensidad según el tamaño (nm) de las VEs liberadas al plasma de donantes delgados (A) y obesos (B) obtenido mediante el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). También se resume el promedio junto a la desviación estándar del tamaño (nm) y la concentración de estas partículas (partículas/mL) (C). Imágenes representativas de inmunodetección para los marcadores vesiculares Alix, CD63 y CD81 en (D) (Creado con BioRender.com).

Entre las posibles proteínas candidatas a biomarcadores, nos resultaron interesantes TGFBI y mimecan. Como se mostró en los apartados anteriores, TGFBI (proteína ig-h3 inductora del factor de crecimiento transformante) se encontró elevada, de forma casi exclusiva, en las vesículas de los adipocitos con resistencia a insulina (HG/HI), comparada con los adipocitos con hipertrofia lipídica, y en la grasa visceral de obesos mórbidos en comparación con el tejido subcutáneo de estos mismos pacientes. Por el contrario, la adipoquina mimecan, también elevada en las vesículas de tejido adiposo visceral obeso, se halló regulada al alza en las vesículas de adipocitos con hipertrofia lipídica mediante el tratamiento con palmitato (AP) o ácido oleico (AO) en comparación a las VEs HG/HI. Además, cabe destacar que los niveles de la proteína caveolina-1 se mantuvieron similares en todas las vesículas liberadas por los adipocitos o el tejido adiposo. Esto nos llevó a validar mediante ELISA las proteínas TGFBI,

mimecan y caveolina-1 (Figura 44). Los niveles de caveolina-1 en las vesículas circulantes se usaron para discernir entre las vesículas procedentes del tejido adiposo de las de otros depósitos, y corregir así los niveles de las proteínas TGFBI y mimecan (Figura 44). Cabe destacar que las vesículas del plasma de individuos delgados contenían una mayor ratio de caveolina-1 que la de los obesos, tanto en los diabéticos como en los no diabéticos (Figura 44 A). Este análisis mostró que el nivel de TGFBI vesicular era estadísticamente significativo elevado en los pacientes obesos diabéticos en comparación con los individuos obesos no diabéticos (Figura 44 B). Por otro lado, se encontró una elevación significativa de mimecan en las vesículas de plasma de pacientes obesos no diabéticos en comparación con los voluntarios sanos y delgados (Figura 44 C).

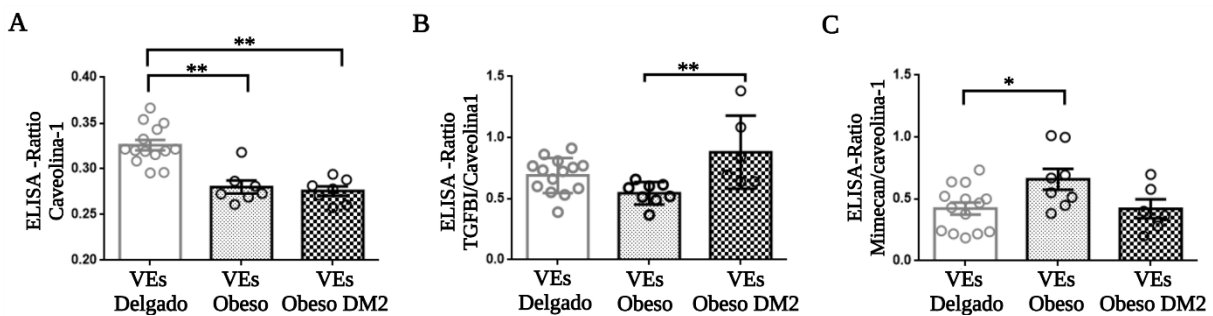


Figura 44. Validación por ELISA de las proteínas TGFBI y mimecan como posibles candidatas a biomarcadores de la obesidad y de sus comorbilidades en las VEs circulantes del plasma de donantes sanos y delgados (n = 14) y obesos diabéticos (DM2, n = 7) y no diabéticos (n = 7) [254]. Se muestran gráficas de la cuantificación por ELISA de la ratio de las proteínas caveolina-1(A), TGFBI/caveolina (B) y mimecan/caveolina (C) (n >7 lisados independientes por cada tipo de muestra; duplicado técnico de cada muestra). Las diferencias se analizaron mediante la prueba *One-Way* Anova-Kruskall Wallis, seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn, ($p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Además, se observó la distribución de los valores de TGFBI y mimecan a nivel circulante con datos clínicos como el IMC (Índice de Masa Corporal) y HbA1c (hemoglobina glicosilada) (%) de estos donantes (Figura 45 A, B). Cabe destacar que se observó una tendencia positiva entre los valores de hemoglobina glicosilada (HbA1c %) con la ratio de TGFBI/caveolina-1 (Figura 45 B). Curiosamente, se encontró una correlación moderada entre los niveles de mimecan y el IMC (Pearson = 0,390*), siendo especialmente fuerte en los obesos con diabetes (DM2) (Pearson = 0,816*) (Figura 45 C-F).

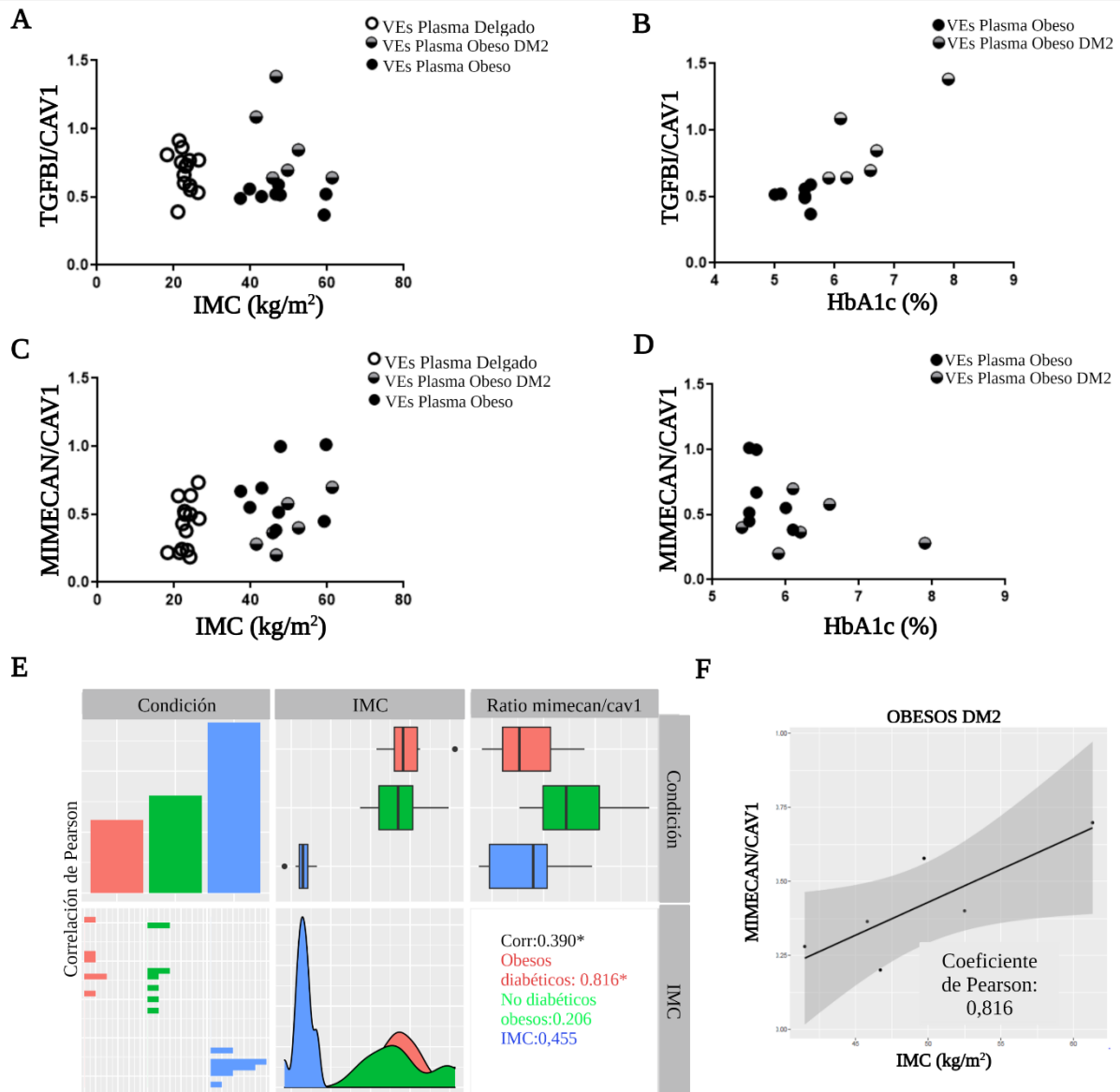


Figura 45. Correlación de la ratio de TGFB1/caveolina y mimecan/caveolina en VEs con los datos clínicos de HbA1c % y IMC de los donantes obesos diabéticos (DM2) y no diabéticos [254]. Se muestran las gráficas de la distribución de la ratio de TGFB1/caveolina-1 (A, B) y mimecan/caveolina1 (C, D) para el IMC (A, C) y el porcentaje HbA1c (B, D). Se muestra el análisis estadístico de la correlación de Pearson para la ratio de mimecan/caveolina con el IMC de todos los donantes (E) y solo de los donantes obesos (F). HbA1c %: porcentaje de hemoglobina glicosilada; IMC: Índice de Masa Corporal.

4.2.3 Resumen de la validación del panel de biomarcadores identificados en VEs aisladas de los adipocitos en diferentes situaciones metabólicas

La validación del panel de proteínas candidatas a biomarcadores confirmó los resultados obtenidos por espectrometría de masas (**Capítulo 1**), y mostró que los niveles de las proteínas candidatas a biomarcadores se regulaban según la localización anatómica del tejido de origen, de los insultos metabólicos y del estado nutricional (obeso o delgado). En resumen, se observó que los valores de TGFB1 eran elevados en las vesículas procedentes de adipocitos con resistencia insulínica, y en las vesículas procedentes de tejido visceral obeso [253,254]. Además, sus valores circulantes se relacionaban positivamente con pacientes con antecedentes

diabéticos, especialmente con aquellos que tenían un elevado porcentaje de Hb1Ac (hemoglobina glicosilada) (Tabla 17). Sin embargo, los niveles de mimecan se correlacionaban con la adiposidad central, ya que se observaron valores elevados en las vesículas circulantes de pacientes obesos con un mayor IMC (Índice de Masa Corporal), en las vesículas de adipocitos con hipertrofia lipídica y en las de origen visceral de pacientes con obesidad (Tabla 17) [254]. Cabe destacar, que la proteína ceruloplasmina se relaciona positivamente con aquellas vesículas procedentes de depósitos de grasa que tienen una mayor acumulación de lipídica. Por otro lado, se observó que las proteínas FAS, FABP4 y perilipina-1 variaban según la adiposidad, es decir, aumentaban los valores de estas proteínas en condiciones de mayor adiposidad (Tabla 17). Sin embargo, la proteína caveolina-1 se observó bastante homogénea en las vesículas procedentes del tejido adiposo en diversas situaciones. Cabe destacar, que UCP1 y ACLY se correlacionan con los depósitos de grasa parda, siendo así unos buenos marcadores de este tipo de grasa, permitiendo diferenciar a las vesículas procedentes de este tejido de otros depósitos de grasa (Tabla 17). Concretamente se observó una tendencia positiva entre los niveles vesiculares de UCP1 con la grasa parda de ratas con obesidad, a diferencia de ACLY que se halló elevada en las VEs de grasa parda de animales normopeso.

Tabla 17. Proteínas postuladas como biomarcadores de vesículas de tejido adiposo obeso y de sus comorbilidades. Se resumen las principales proteínas validadas mediante inmunodetección y su papel biomarcador en patologías de la obesidad. VEs: vesículas extracelulares.

Potenciales Biomarcadores Vesiculares	Patología
Caveolina-1	Marcador de las VEs procedentes del tejido adiposo
Perilipina-1	
Ceruloplasmina	Adiposidad y obesidad
FABP4	
FAS	
Mimecan	
Vimentina	
TGFBI	Obesidad visceral
ACLY	Diabetes
UCP1	Marcador de VEs procedentes de tejido adiposo pardo

4.3 CAPÍTULO 3: PAPEL FUNCIONAL DE LAS VESÍCULAS OBESAS EN LA OBESIDAD Y EN SUS COMORBILIDADES

Una vez caracterizadas las vesículas extracelulares (VEs) liberadas por los adipocitos/tejido adiposo, y observadas sus diferencias a nivel proteico dependiendo de la localización anatómica y del estado metabólico, decidimos observar si estas diferencias a nivel del cargo proteico se mostraban a nivel funcional; ya que estudios recientes postulan que las vesículas liberadas por el tejido adiposo podrían participar en procesos patogénicos como el desarrollo de enfermedades metabólicas [255]. Por lo tanto, en este capítulo se estudió el papel funcional de las VEs patológicas como posibles participantes no solo en el desarrollo y evolución de la obesidad, sino como implicadas en las comorbilidades de la misma. Para ello, se aislaron VEs de los adipocitos murinos con hipertrofia lipídica y resistencia insulínica (VEs patológicas), y VEs de origen subcutáneo y visceral (VEs obesas humanas). Se observó el papel de estas VEs como mensajeros celulares a nivel del propio tejido adiposo o a nivel endocrino en la comunicación con hepatocitos, macrófagos, células de mama normales o tumorales.

4.3.1 Estudios funcionales con las VEs secretadas por los adipocitos murinos con hipertrofia lipídica y resistentes a la insulina (RI)

4.3.1.1 Estudios funcionales de diferenciación e hipertrofia adipocitaria

Se diseñaron ensayos funcionales para evaluar si las VEs secretadas por los adipocitos participan o modulan la diferenciación de los propios adipocitos, y también para discernir si este efecto, en su caso, se ve alterado por el estado patológico de las células de origen. Se siguieron las recomendaciones de la MISEV [113] para determinar la concentración fisiológica de VEs adecuada para la realización de los experimentos funcionales; es decir, se trataron las células con la misma cantidad de VEs liberadas de esa misma densidad celular, estableciendo así una relación 1:1 (**apartado 3.8**). Así, se diferenciaron adipocitos “sanos” como control en presencia de vesículas aisladas de modelos de adipocitos hipertrofiados por lípidos (palmitato/ácido oleico) y RI (alta glucosa/alta insulina; HG/HI) a tiempo real (Figura 18 A). La monitorización en tiempo real de la diferenciación de los adipocitos mostró que las VEs de adipocitos tratados con ácido oleico (AO), palmitato (AP) y HG/HI alteran la diferenciación de las células sanas en comparación con las que no tienen estas vesículas (Figura 46 A-F). Así, se observó una reducción del índice celular (IC) en aquellas células diferenciadas en presencia de las VEs patológicas, siendo estadísticamente significativa a partir del día 2 de diferenciación para las de AP y HG/HI, y en el día 4 en los tres escenarios experimentales (Figura 46 A-F). Además, en el día 4 de diferenciación se observó que la acumulación lipídica mediante la cuantificación de la tinción *Oil Red O* era mayor en los adipocitos sanos tratados con las vesículas patológicas que los controles, siendo estadísticamente significativa en los adipocitos sanos tratados con AP y AO (Figura 46 G, H). Cabe destacar, que el ensayo de cuantificación de triglicéridos en el día 4 de diferenciación mostró una mayor ratio de la concentración de triglicéridos en los adipocitos tratados con las VEs aisladas de adipocitos con el tratamiento de AP (Figura 46 I).

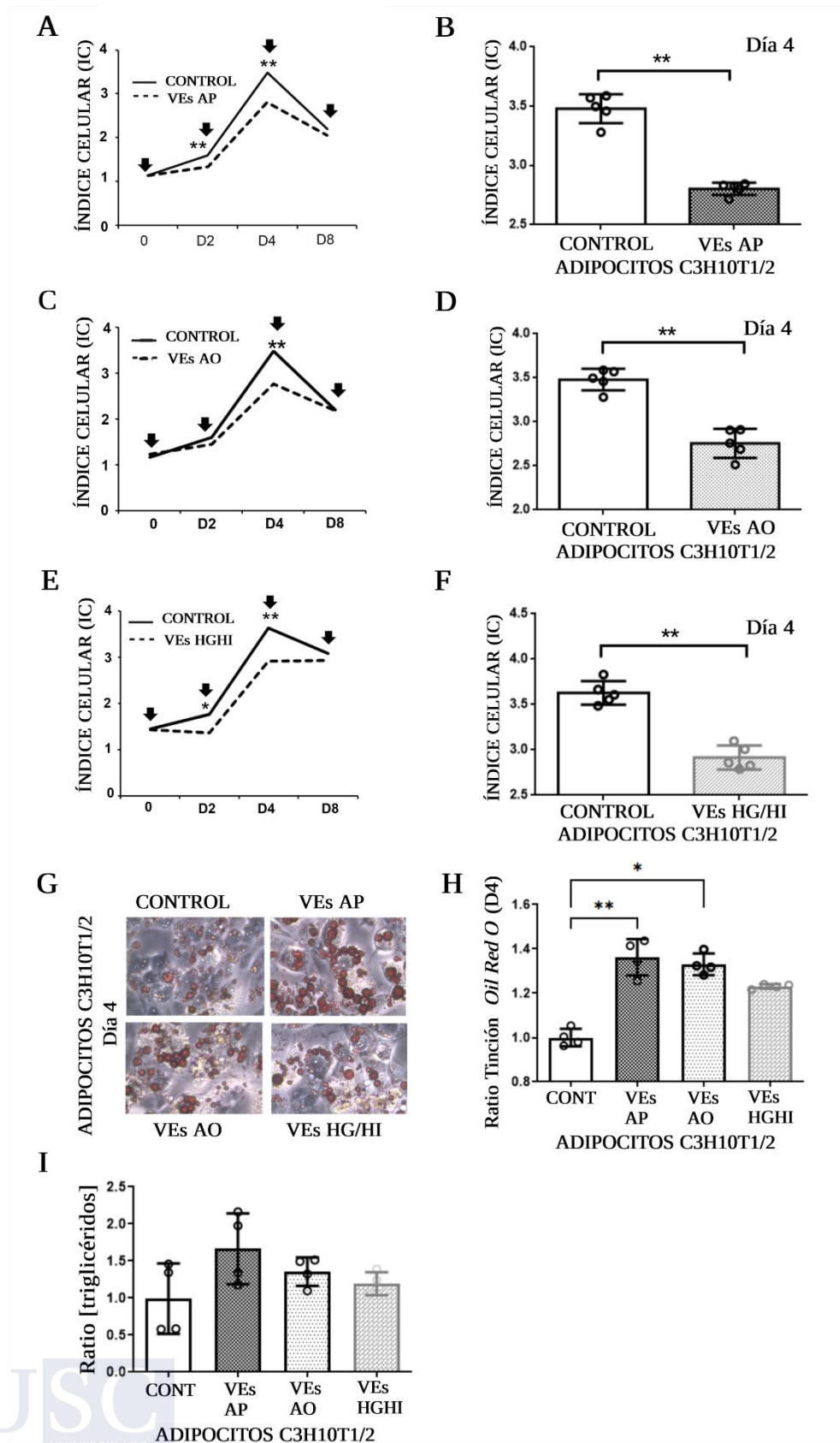


Figura 46. Las VEs secretadas por adipocitos hipertrofiados y RI estimulan la diferenciación e hipertrofia de adipocitos control [253]. Se muestra la diferenciación en tiempo real de

preadipocitos C3H10T1/2 incubados con vesículas patológicas murinas (Figura 18 A): VEs de adipocitos tratado con palmitato (AP) (A, B); VEs de adipocitos tratados con ácido oleico (AO) (C, D); VEs de adipocitos tratados con alta glucosa /alta insulina (HG/HI) (E, F) aisladas de una cantidad equivalente de células (vesículas aisladas de la misma cantidad de células tratadas). Se muestran los gráficos del índice celular (IC) desde el día 0 hasta el 8 de la diferenciación (5 experimentos independientes con 4 réplicas por experimento). Las vesículas se refrescaron cada 48 horas; los días 0, 2, 4, 6 y 8 de la diferenciación se indican con una flecha negra (A, C, E). Se muestran los diagramas de caja que muestran el índice celular (IC) en el día 4 de diferenciación para los adipocitos tratados con VEs patológicas (B, D, F). Además, se muestran imágenes representativas (G) y la cuantificación de la tinción *Oil red O* (H), y la medición de triglicéridos (I) en el día 4 de diferenciación. Las comparaciones entre dos grupos se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney y entre varios grupos mediante *One-Way Anova-Kruskall Wallis*, seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn; ($p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativa: * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$). RI: resistencia a la insulina (Creado con BioRender.com).

4.3.1.2 Estudios funcionales de resistencia a insulina en adipocitos

En el sexto día de diferenciación, los adipocitos C3H10T1/2 control fueron incubados durante 24 horas con una concentración fisiológica de VEs (**apartado 3.8**) liberadas de adipocitos patológicos (hipertrofiados por lípidos y/o con resistencia insulínica); para observar la vía de señalización de la insulina tras la estimulación con 100 nM de insulina durante 10 minutos siguiendo el protocolo ya establecido en el grupo (Figura 18 A) [75]. Se usaron lisados de células sin el estímulo de insulina como control negativo. Así, el tratamiento con VEs liberadas por adipocitos patológicos inhibió la estimulación de la vía de la insulina en adipocitos “sanos”, tal como se evaluó mediante la fosforilación de Akt (Ser 473). Es decir, se observó una disminución significativa de la fosforilación de Akt en los adipocitos control incubados durante 24 horas con vesículas patológicas seguidas de una estimulación de insulina (100 nM) durante 10 minutos (Figura 47 A-C). Este efecto fue especialmente intenso en el caso de las VEs de adipocitos con resistencia insulínica (HG/HI), produciendo una disminución similar que el propio tratamiento de HG/HI (Figura 47 C). Además, observamos que la combinación de los modelos celulares patológicos, es decir, el tratamiento que provoca hipertrofia (palmitato/oleico) seguido del tratamiento con HG/HI, exacerbaban el efecto deletéreo. Sin embargo, la combinación de las VEs aisladas de estos modelos patológicos no provocó un efecto tan potente como los tratamientos en la reducción de los niveles de P-Akt/Akt (Figura 47 D, E).

Además, como se sabe de la literatura, la resistencia insulínica (RI) en la obesidad puede deberse al estado inflamatorio del tejido adiposo [23]. Por ese motivo, se analizó la expresión de genes relacionados con la RI mediante la inflamación, la lipotoxicidad, el metabolismo mitocondrial y la sensibilización a la insulina (Figura 48). Curiosamente, se observó que las vesículas liberadas por adipocitos hipertrofiados con AO y AP provocaron una elevación estadísticamente significativa de la expresión de *FAS* (sintetasa de ácidos grasos) en adipocitos sanos; siendo más potente este efecto que el provocado por el tratamiento directo con AP y AO (Figura 48 A- C). Además, se observó que estas vesículas patológicas promovían la expresión de *TNF α* (factor de necrosis tumoral α) en comparación con los adipocitos sin tratar (CONT) (Figura 48 D-F). Sorprendentemente, se vio una disminución de la expresión de *PPAR γ* (receptor γ del proliferador de peroxisomas) en los adipocitos sanos tratados con HG/HI y con las VEs de adipocitos con RI, a diferencia de los tratados con las vesículas aisladas de los adipocitos con hipertrofia lipídica (AP, AO) (Figura 48 G-I). En cambio, no se encontraron

cambios en la expresión de *PPARα* (receptor α del proliferador de peroxisomas) en los adipocitos sanos tratados con las VEs patológicas, a diferencia de los adipocitos resistentes a insulina (HGHI) e hipertrofiados (AP, AO) en donde se mostró una disminución estadísticamente significativa de *PPARα* en comparación con los adipocitos sanos control (Figura 48 J-L).

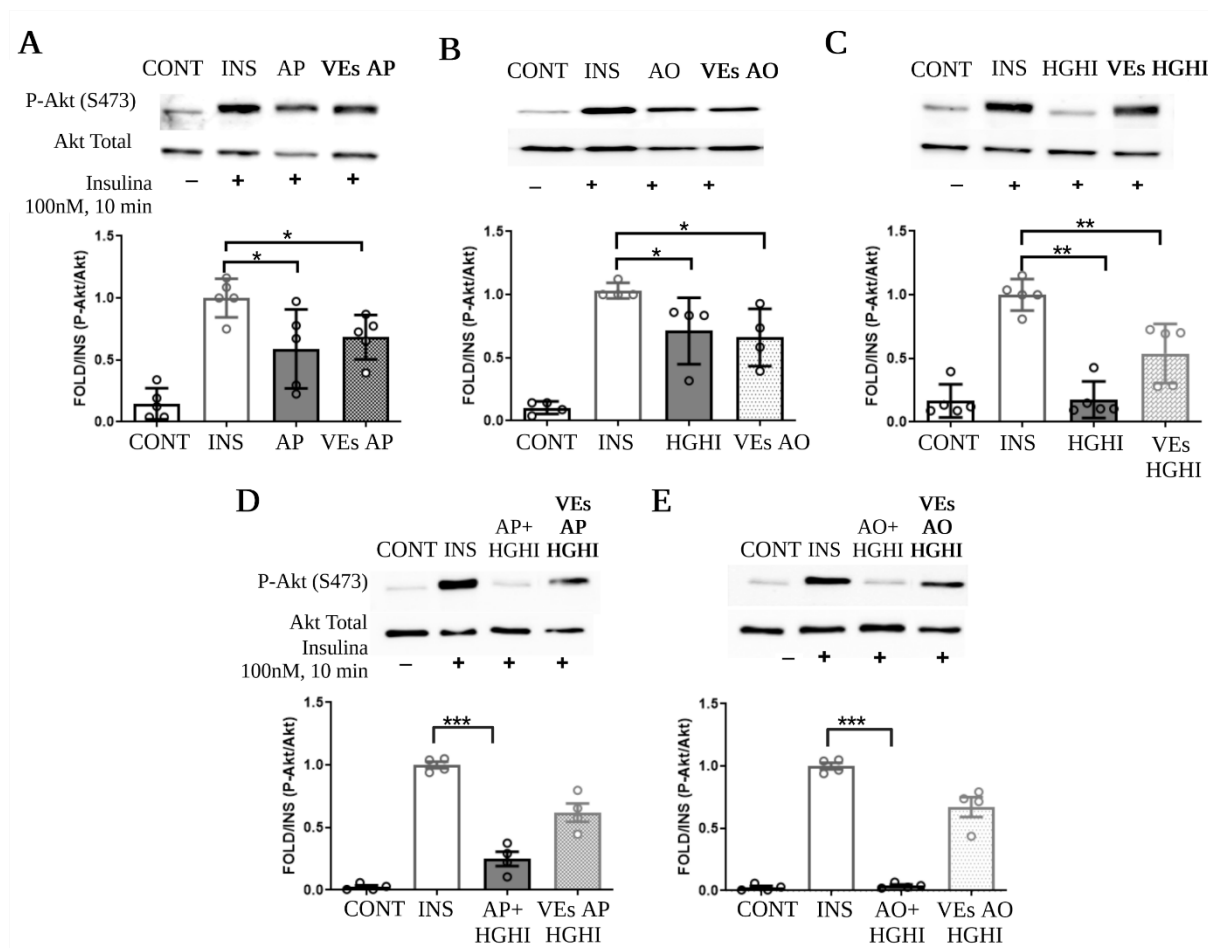


Figura 47. Las VEs liberadas por los adipocitos patológicos ejercen resistencia a la insulina en los adipocitos sanos [253]. Efecto de las VEs de adipocitos hipertrofiados (palmitato-AP/oleico-AO) (A, B), resistentes a la insulina (HGHI) (C) y de la combinación de las VEs AP/AO con las VEs HG/Hi (D, E) sobre la vía de la insulina en adipocitos control (Figura 18 A). Imágenes representativas y densitometría de las bandas expresadas de la ratio P-Akt/AktTotal en comparación con los adipocitos con el estímulo de insulina (INS; 100 nM, 10 min de estímulo) ($n \geq 4$ lisados independientes) (A-E). Las diferencias se analizaron mediante el test *One-Way* Anova-Kruskall Wallis seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn (se consideró $p \leq 0,05$ estadísticamente significativo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$). CONT: adipocitos diferenciados sin estimulación de insulina; INS: adipocitos estimulados con 100 nM de insulina durante 10 min; AP/AO/HGHI: adipocitos tratados con palmitico/oleico/HGHI y estimulados con 100 nM insulina durante 10 min; VEs AP/AO/HGHI: adipocitos tratados (24 h) con VEs secretadas por AP o AO, o por adipocitos HG/Hi y luego estimulados con 100 nM de insulina durante 10 min; VEs AP HGHI: adipocitos tratados (24 h) con VEs secretadas por células hipertrofiadas por AP, seguidos de un tratamiento con VEs HGHI (otras 24 h), y luego estimulados con 100 nM de insulina durante 10 min; VEs AO HGHI: adipocitos tratados (24 h) con VEs secretadas por adipocitos AO, seguidas de un tratamiento con VEs HGHI (otras 24 h), y luego estimuladas con 100 nM de insulina durante 10 min (Creado con BioRender.com).

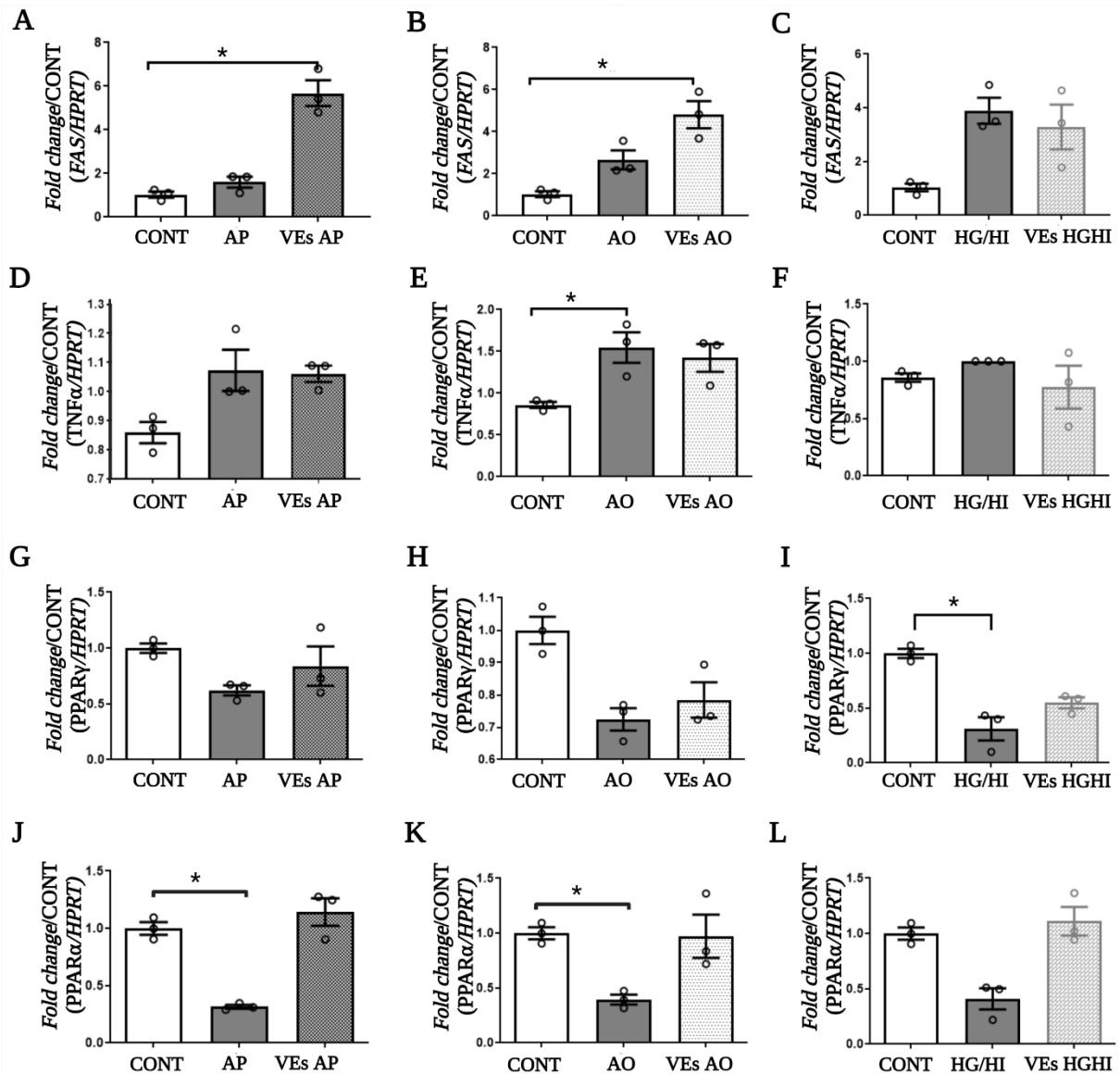


Figura 48. Las VEs secretadas por los adipocitos patológicos ejercen cambios en la expresión de genes relacionados con la resistencia a la insulina (RI) en los adipocitos sanos. Efecto de las VEs de adipocitos hipertrofiados (palmitato-AP/oleico-AO) y resistentes a la insulina (HGHI) sobre la expresión de genes relacionados con la inflamación y lipotoxicidad (Figura 18 A) como *FAS* (sintetasa de ácidos grasos) (A-C) y *TNFα* (factor de necrosis tumoral α) (D-F) y con el metabolismo mitocondrial y la sensibilización a la insulina como *PPARγ* (receptor y activado por el proliferador de peroxisomas) (G-I) y *PPARα* (receptor α activado por el proliferador de peroxisomas) (J-L) en adipocitos sanos. Se usó como gen constitutivo *HPRT* (hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa) ($n = 3$ lisados independientes con triplicados técnicos para cada muestra). Las diferencias se analizaron mediante el test *One-Way Anova-Kruskall Wallis* seguida de la prueba de comparación múltiple de *Dunn* (se consideró $p \leq 0,05$ estadísticamente significativo: * $p < 0,05$). CONT: adipocitos diferenciados con el vehículo (PBS, tampón de fosfato salino). VEs AP: vesículas dependidas por los adipocitos tratados con AP; VEs AO: vesículas dependidas por los adipocitos tratados con AO; VEs HGHI: vesículas dependidas por adipocitos tratados con HGHI.

4.3.1.3 Estudios funcionales de resistencia a insulina en hepatocitos en cultivo

Para analizar el posible efecto de las VEs liberadas por el tejido adiposo sobre otros órganos periféricos, y dado que se han postulado interacciones entre las VEs de la grasa con el hígado [111], nos propusimos hacer un análisis del efecto de las VEs patológicas sobre células hepáticas. Una vez descubierto que las VEs de adipocitos patológicos inducían la resistencia insulínica (RI) en adipocitos control, quisimos ver si ejercían el mismo efecto en hepatocitos, e

incluso ver si de alguna manera potenciaban la esteatosis hepática. Por ese motivo, se incubó una concentración fisiológica de VEs (ratio 1:1; **apartado 3.8**), secretadas de los adipocitos C3H10T1/2 control y de los que presentan hipertrofia por lípidos y/o resistencia a la insulina, durante 24 horas en un cultivo primario de hepatocitos murinos (**apartado 3.2.3**) extraídos mediante perfusión hepática de un ratón C57BL/6 (Figura 18 A) [236]. Para observar la vía de señalización de la insulina, se realizó un estímulo de 100 nM de insulina durante 5 minutos en las células tratadas, siguiendo el protocolo establecido en el grupo del Dr. Juan Manuel Pérez Falcón [237].

El tratamiento con las VEs secretadas por adipocitos patológicos inhibió la estimulación de la vía de la insulina en hepatocitos sanos, tal como se evaluó mediante la fosforilación de Akt (Ser 473) y la proteína ribosomal 6S (Ser 240/244) (Figura 49 A). Así, observamos una disminución significativa de la fosforilación de Akt en los hepatocitos sanos incubados durante 24 horas con vesículas patológicas seguidas de una estimulación de insulina a 100 nM durante 5 minutos (Figura 49 B-D). Este efecto fue especialmente intenso en el caso de los hepatocitos tratados con las vesículas de adipocitos hipertrofiados con AP (palmitato) y AO (ácido oleico). Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de P-Akt en los hepatocitos incubados con el tratamiento combinado de ácidos grasos (AP/AO) o con las VEs de adipocitos sanos (VEs ADIPO) (Figura 49 E). También, se observó que solo las VEs AP y AO provocaban una disminución estadísticamente significativa de los niveles de P-6S en los hepatocitos sanos (Figura 49 F, G), a diferencia del tratamiento combinado de palmitato y oleico (AP/AO) o de las VEs ADIPO (Figura 49 H, I).

Además de forma paralela, se analizó la expresión de genes relacionados con la resistencia a la insulina mediante la inflamación, la lipotoxicidad, el metabolismo mitocondrial, la lipólisis, la gluconeogénesis, el transporte de ácidos grasos y glucosa, y la sensibilización a la insulina (Figura 50). Curiosamente, se observó que solo las vesículas liberadas por adipocitos hipertrofiados con AO y AP provocaban una disminución estadísticamente significativa de la expresión de *FAS* (sintetasa de ácidos grasos), *FATP2* (transportador de ácidos grasos 2) y *PLIN3* (perilipina-3) en hepatocitos sanos (Figura 50 A, C, D). Por el contrario, la expresión de *FBP1* (fructosa bisfosfatasa 1) estaba elevada de forma estadísticamente significativa en los hepatocitos tratados con las VEs liberadas por los adipocitos tratados con AP, a diferencia del resto de las VEs patológicas, de las VEs ADIPO o de los hepatocitos con el tratamiento de AP/AO (Figura 50 B). Cabe destacar, que las VEs patológicas no indujeron cambios en la expresión de *PLIN2* (perilipina-2) en hepatocitos sanos, al contrario que el tratamiento combinado con AP/AO (Figura 50 E). Además, se observó que la expresión del gen *NONO* estaba disminuida en los hepatocitos tratados con el tratamiento de AP/AO y con las VEs AP y AO (Figura 50 F). Curiosamente, se observó una tendencia a aumentar la expresión de *IL-6* (interleuquina-6) en los hepatocitos tratados con las VEs del modelo de hipertrofia lipídica, al igual que en los hepatocitos incubados con el tratamiento combinado de AP/AO (Figura 50 H). Sin embargo, no se observó esta elevación en la expresión de *TNF α* (factor de necrosis tumoral α) (Figura 50 G). Cabe destacar que la expresión de *GLUT1* (transportador de glucosa 1) estaba disminuida de forma estadísticamente significativa en los hepatocitos tratados con AP/AO y con las VEs AP y AO; siendo más potente el efecto provocado por las VEs hipertrofiadas que

por el tratamiento directo con AP y AO en los hepatocitos sanos (Figura 50 I). Además, se observó que solo las vesículas de los adipocitos hipertrofiados (VEs AP y AO) provocaban la disminución de la expresión de *PDK1* (piruvato deshidrogenasa quinasa isoforma 1), *PPAR γ* (receptor γ de proliferador de peroxidasa) y *PPAR α* (receptor α de proliferador de peroxidasa) en hepatocitos sanos, a diferencia de las VEs HG/HI y ADIPO (Figura 50 J-L).

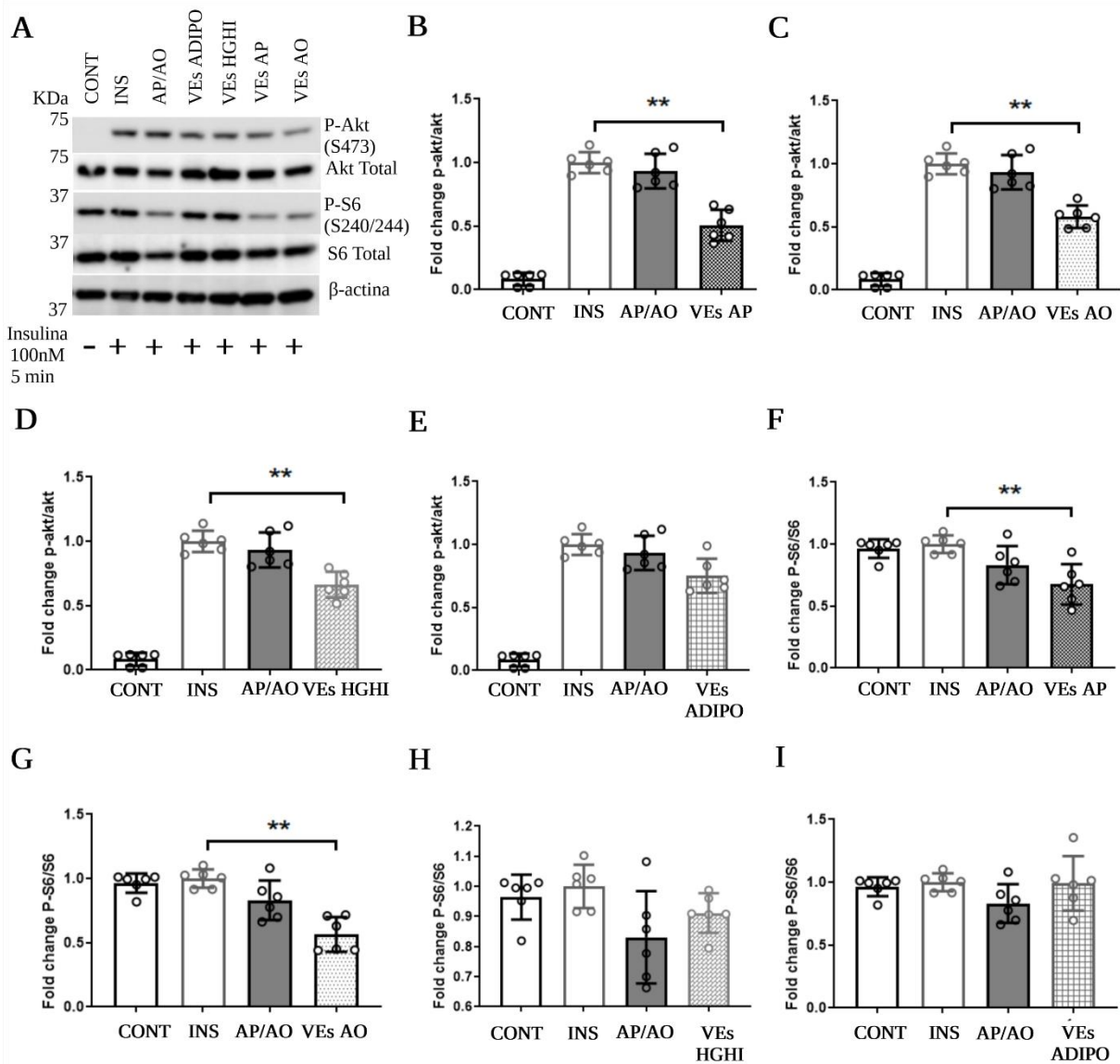


Figura 49. Las VEs secretadas por los adipocitos patológicos ejercen resistencia a la insulina en los hepatocitos sanos en cultivo. Efecto de las VEs de adipocitos hipertrofiados (palmitato-AP/oleico-AO) y resistentes a la insulina (HGHI) sobre la vía de la insulina en un cultivo primario de hepatocitos sanos de un ratón C57BL/6 (Figura 18). Imágenes representativas (A) y densitometría de las bandas expresadas del *fold change* P-Akt/Akt Total (B-E) y P-6S/S6 Total (F-I) en comparación con los hepatocitos con el estímulo de insulina (INS; 100 nM, 5 min de estímulo) ($n = 6$ lisados independientes). Las diferencias se analizaron mediante el test *One-Way Anova-Kruskall Wallis* seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn (se consideró $p \leq 0,05$ estadísticamente significativo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). CONT: hepatocitos sin estimulación de insulina; INS: hepatocitos estimulados con 100 nM de insulina durante 5 min; AP/AO: hepatocitos tratados con AP y AO durante 24 horas (Creado con BioRender.com).

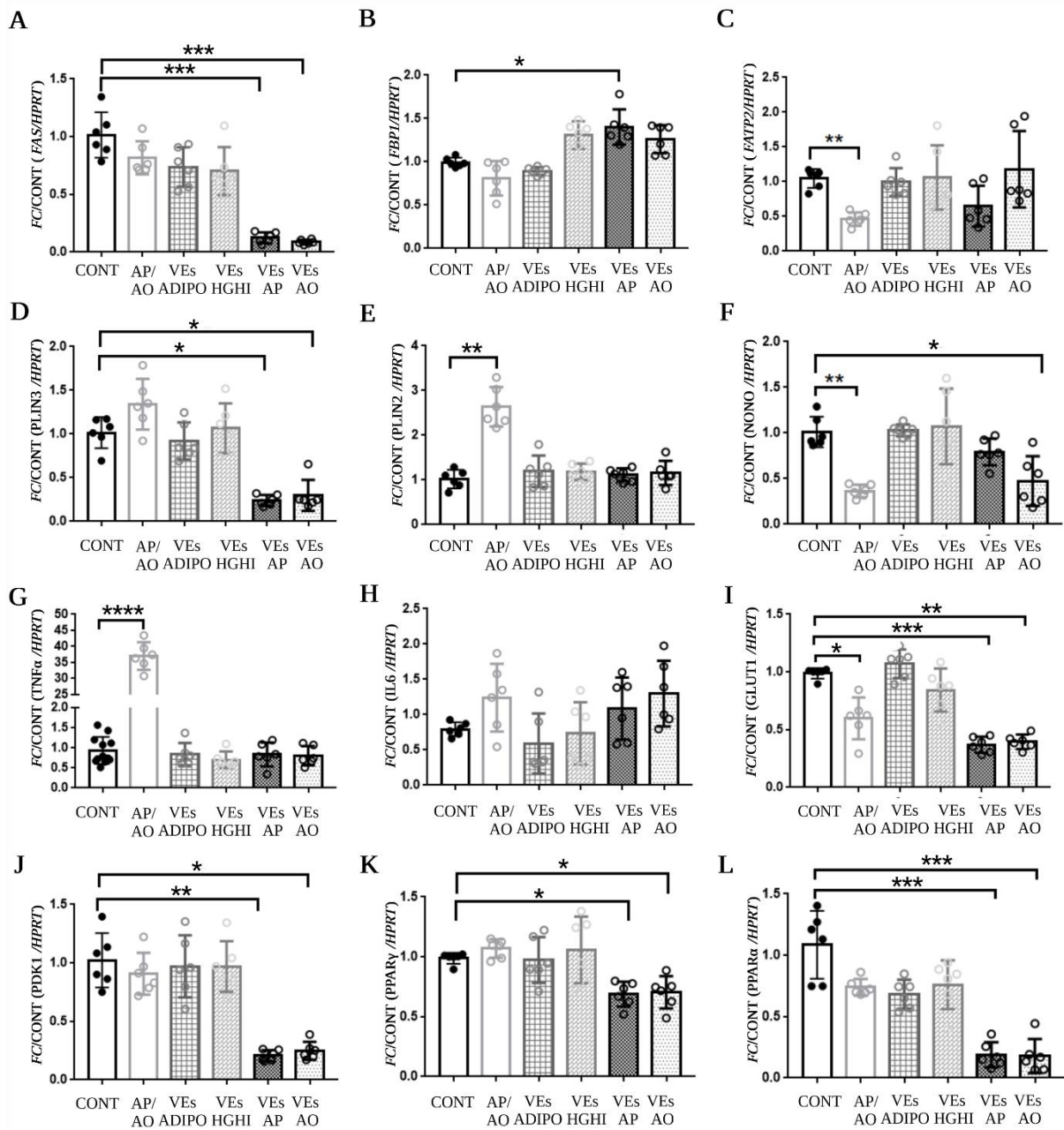


Figura 50. Las VEs liberadas por los adipocitos patológicos ejercen cambios en la expresión de genes relacionados con la resistencia a la insulina en los hepatocitos sanos en cultivo. Efecto de las VEs de adipocitos hipertrofiados (palmitato-AP/oleico-AO) y resistentes a la insulina (HGHI) sobre hepatocitos primarios en cultivo (Figura 18 A). Se analizó la expresión de genes como *FAS* (sintetasa de ácidos grasos) (A), *FBP1* (fructosa bisfosfatasa 1) (B), *FATP2* (transportador de ácidos grasos 2) (C), *PLIN3* (perilipina-3) (D), *PLIN2* (perilipina-2) (E), *NONO* (F), *TNF α* (factor de necrosis tumoral α) (G), *IL6* (interleuquina-6) (H), *GLUT1* (transportador de glucosa 1) (I), *PDK1* (piruvato deshidrogenasa quinasa isoforma 1) (J), *PPAR γ* (receptor y activado por el proliferador de peroxisomas) (K) y *PPAR α* (receptor α activado por el proliferador de peroxisomas) (L) en hepatocitos sanos. Los gráficos muestran el *fold change* (FC) con respecto a los hepatocitos control sin ningún estímulo (vehículo con tampón fosfato salino) corregido por el gen constitutivo *HPRT* (n = 6 lisados independientes con triplicados técnicos para cada muestra). Las diferencias se analizaron mediante la prueba *One-Way Anova-Kruskall Wallis* seguida de la prueba de comparación múltiple de *Dunn* (se consideró $p \leq 0,05$ estadísticamente significativo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). CONT: hepatocitos con el vehículo (PBS, tampón de fosfato salino); AP/AO: hepatocitos tratados con palmitato y oleico 24 horas (Creado con BioRender.com).

4.3.1.4 Estudios funcionales de inflamación en macrófagos

Para dilucidar el papel funcional de las VEs liberadas por el tejido adiposo en condiciones de obesidad con la inflamación, se incubaron los macrófagos Raw 264.7 con las VEs liberadas de los adipocitos patológicos, observando así la expresión de genes relacionados con la inflamación y el perfil de citoquinas inflamatorias de estas células tratadas (Figura 18 A). Para ello, previamente se comprobó la capacidad inflamatoria de estas células mediante el tratamiento con LPS (lipopolisacárido, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 51 A, B). Una vez confirmada la inflamación de los macrófagos, decidimos incubar dichas células durante 24 horas con diferentes concentraciones de VEs liberadas de los adipocitos control, de los hipertrofiados (AP, AO) y/o resistentes a insulina (RI). Las concentraciones usadas fueron: la concentración fisiológica (tratando las células con la misma cantidad de VEs liberadas de esa misma densidad celular; ratio 1:1), la mitad (0,5 de la ratio 1:1) y el doble (2 veces la ratio 1:1).

Se observó que las VEs de los adipocitos hipertrofiados (AP, AO) inducían un aumento significativo de la inflamación estimada mediante la expresión de *TNF α* (factor de necrosis tumoral α) e *IL-6* (interleuquina-6) (Figura 51 C-F). Curiosamente, mientras que la dosis fisiológica de VEs de AP (palmitato) fue suficiente para inducir una inflamación significativa de los macrófagos (Figura 51 C, D), fue necesaria una cantidad doble de VEs de AO (oleico) para obtener un efecto similar en los macrófagos (Figura 51 E, F). Cabe destacar que no se observó inflamación al tratar a los macrófagos con las VEs de adipocitos con resistencia a la insulina (HG/HI) ni con las vesículas aisladas de adipocitos sanos (ADIPO) (Figura 51 G, H).

Además, se observó el perfil de citoquinas y proteínas inflamatorias (*array* de inflamación murina) en 1 mL de secretoma de los macrófagos Raw 264.7 tratados con la concentración fisiológica de VEs AP y el doble de VEs AO (Figura 52), ya que como se comentó en el párrafo anterior, las VEs AO producen un menor efecto que las VEs AP (Figura 51). Se analizaron un total de 39 proteínas de las cuales la mayoría se hallaron elevadas en el secretoma de los macrófagos tratados con VEs AP y AO comparado con los macrófagos sanos, siendo este efecto más potente en los macrófagos tratados con las VEs AP que el doble de concentración de las VEs AO (Figura 52 A, B). Por ejemplo, $\text{IFN}\gamma$ (interferón γ), las interleuquinas 6 y 10 (IL-6, IL-10), la citoquina 11 (I-TAC), y la citoquina 9 con motivo C-X-C (MIG) se hallaron estadísticamente elevadas en los macrófagos tratados con las VEs patológicas (Figura 52 A-F). Además, otras proteínas inflamatorias como la proteína tisular inhibidora de las metaloproteinasas 2 (TIMP2) o el factor de necrosis tumoral α (TNF α) se encontraron elevadas en los macrófagos tratados con las VEs liberadas de adipocitos tratados con AP (Figura 52 B, G, H). Por el contrario, también se hallaron citoquinas más aumentadas en el secretoma de los macrófagos tratados con las VEs de adipocitos con el tratamiento con AO que con AP como la citoquina 1 atrayente de linfocitos B (BLC), factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF) y eotaxina 2 (proteína quimiotáctica de los eosinófilos 2) (Figura 52 A).

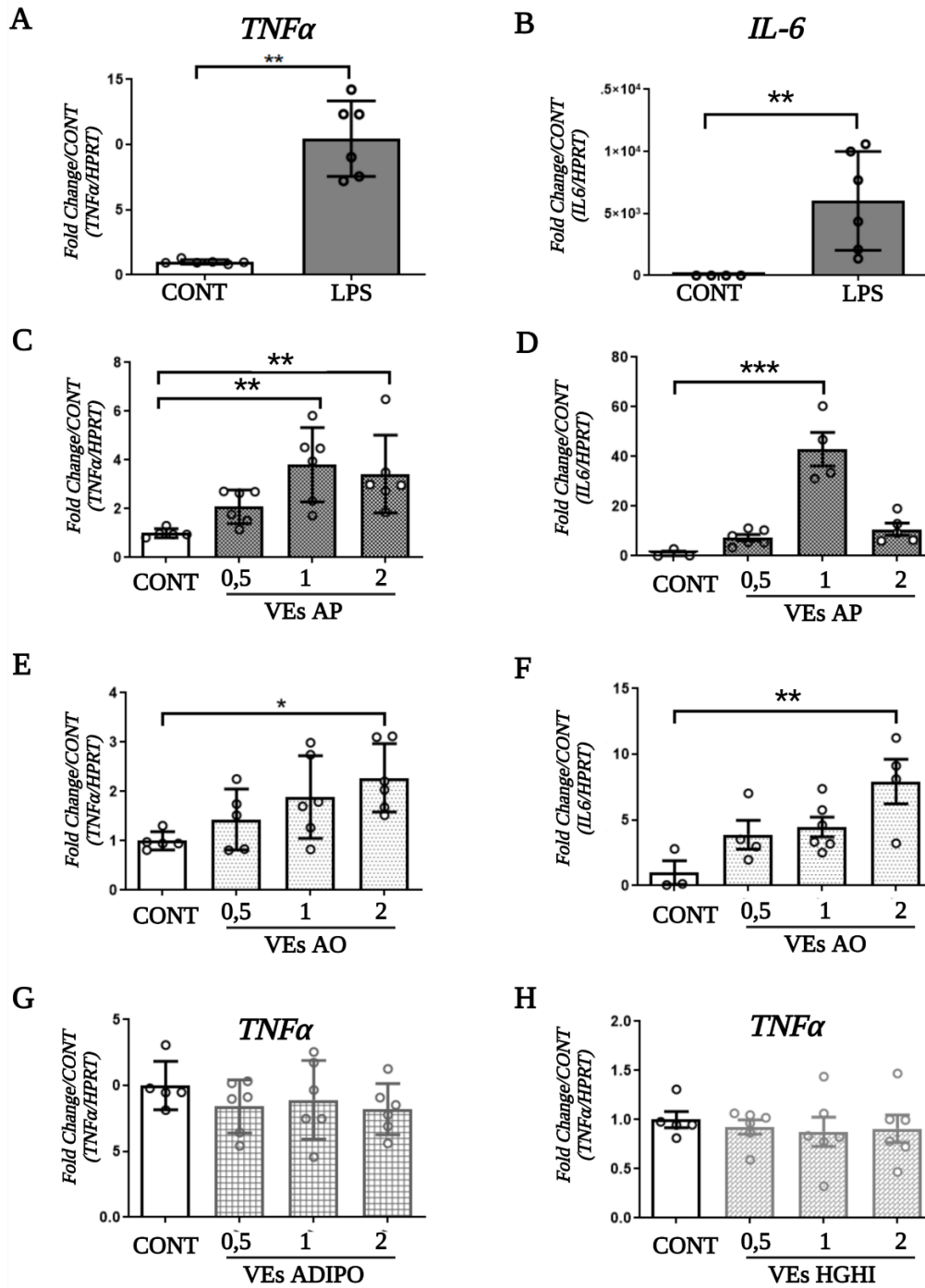


Figura 51. Las VEs secretadas por los adipocitos hipertrofiados ejercen inflamación en macrófagos [253]. Las VEs procedentes de adipocitos hipertrofiados con palmitato (AP) u oleico (AO), resistentes a la insulina (HG/HI) y de adipocitos sanos (ADIPO) se incubaron a diferentes concentraciones [fisiológica (1), media (0,5) y doble dosis (2)] sobre los macrófagos sanos no inflamados (Figura 18 A). Se muestra la comprobación de la inflamación de los macrófagos mediante el estímulo con LPS (1 µg/mL) mediante la expresión de *TNFα* (factor de necrosis tumoral α) (A) e *IL-6* (interleuquina-6) (B). También, se analizó la expresión de *TNFα* en los macrófagos tratados con VEs AP (C), VEs AO (E), VEs ADIPO (G) y VEs HG/HI (H); y de la expresión de *IL-6* en los macrófagos tratados con VEs AP (D) y con VEs AO (F). Los gráficos muestran el *fold change* con respecto a los macrófagos control sin ningún estímulo (vehículo con tampón fosfato salino) corregido por *HPRT* (al menos 4 experimentos independientes; n = 3 réplicas/experimento). Las diferencias se analizaron mediante la prueba de Anova-Kruskall Wallis de una vía, seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn para más de dos grupos; y la prueba U de Mann-Whitney para dos grupos (p ≤ 0,05 se consideró estadísticamente significativa: * p < 0,05, ** p < 0,01 y *** p < 0,001) (Creado con BioRender.com).

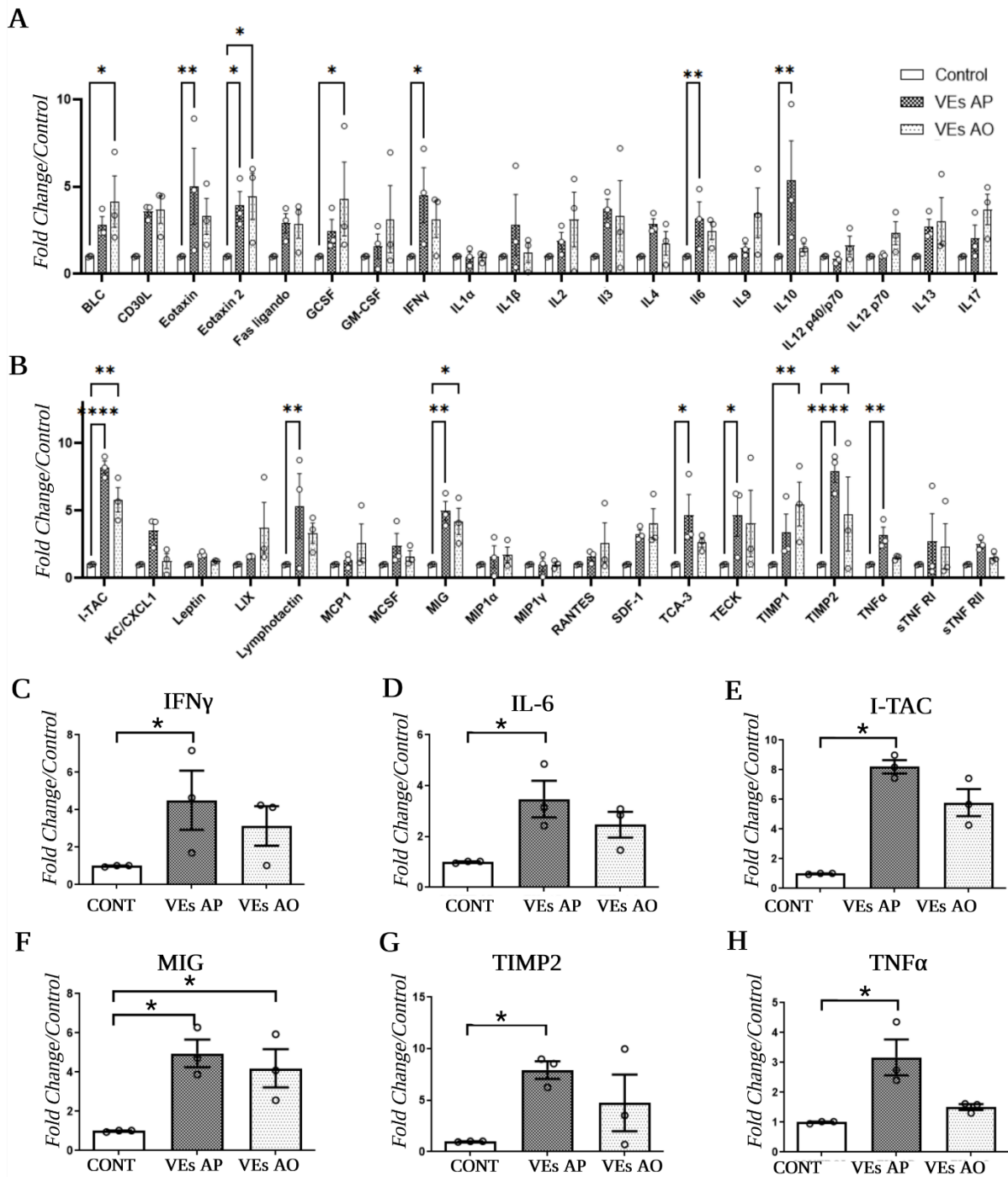


Figura 52. Las VEs liberadas por los adipocitos hipertrofiados promueven la secreción de citoquinas inflamatorias en macrófagos sanos. Las VEs procedentes de adipocitos hipertrofiados con palmitato (AP) u oleico (AO) se incubaron sobre los macrófagos sanos no inflamados (Figura 18 A). Se muestra gráficamente el perfil de citoquinas y proteínas inflamatorias (*array* inflamación murino) analizadas a partir de 1 mL de secretoma de macrófagos Raw 264.7 tratados con vesículas de adipocitos hipertrofiados con palmitato (AP; concentración fisiológica) y ácido oleico (AO; el doble de la concentración fisiológica) (A, B). Entre estas proteínas, se observó IFN γ (interferón γ) (C), IL-6 (interleuquina-6) (D), I-TAC (citoquina 11) (E), MIG (citoquina 9 con motivo C-X-C) (F), TIMP2 (proteína tisular inhibidor de las metaloproteinasas 2) (G) y TNF α (factor de necrosis tumoral α) (H). Los gráficos muestran el *fold change* con respecto a los macrófagos control (CONT) sin ningún estímulo (vehículo con tampón fosfato salino), (n = 3 experimentos independientes). Las diferencias se analizaron mediante la prueba *Two-way* y *One-Way* de Anova-Kruskall Wallis seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn ($p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$) (Creado con BioRender.com).

4.3.2 Estudios funcionales con las VEs secretadas por los explantes de tejido adiposo subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) obeso humano

Por último, teniendo en cuenta las crecientes evidencias que muestran una relación entre la obesidad y el cáncer, nos pareció interesante analizar el efecto de las vesículas extracelulares (VEs) secretadas por el tejido adiposo según su localización anatómica en la proliferación celular de las células de mama no tumorales (MCF10), tumorales (MCF7), y en las células de melanoma (B16F1) mediante la monitorización a tiempo real (Figura 18 B). Las muestras de VEs aisladas de explantes de tejido adiposo subcutáneo (TAS, n = 17) y visceral (TAV, n = 17) se recogieron mayoritariamente de donantes mujeres sometidas a cirugía bariátrica, con un IMC promedio entre 44 a 48, con una edad media ente los 49 y 51 años y la mayoría de ellas eran diabéticas (Tabla 18).

Tabla 18. Datos clínicos de los pacientes que donaran explantes de tejido adiposo para los estudios funcionales de proliferación con las células MCF10A, MCF7 y B16F1. Se muestra el promedio junto a la desviación estándar de los siguientes datos clínicos: sexo, edad, IMC (Índice de Masa Corporal) y si padecen diabetes (DM2) (Tabla 6).

	Sexo	Edad (años)	IMC (Kg/m ²)	Diabetes
MCF10A (n = 6)	83,3 % mujeres	51+/- 5	48,17+/-6,8	100 % DM2
MCF7A (n = 9)	100 % mujeres	49 +/-10	47,3 +/- 7,03	67 % DM2
B16F1 (n = 6)	100 % mujeres	49+/-11	44,97+/-8,2	72 % DM2

Aunque se observó bastante variación entre pacientes, los ensayos de proliferación a tiempo real en los tres tipos celulares mostraron una tendencia positiva en las células cultivadas con las vesículas del tejido adiposo subcutáneo (TAS) y del visceral (TAV) después de 24 horas de incubación en comparación con el control (CONT, vesículas artificiales vacías diluidas en tampón fosfato salino como vehículo) (Figura 53 A, D, G). Esta estimulación fue especialmente producida con las VEs de TAS sobre la línea tumoral de mama MCF7 (Figura 53 D). Sin embargo, este efecto se perdió después de las 48 horas (Figura 53 E). Sorprendentemente, las VEs TAV de ciertos pacientes inhiben la proliferación tanto de las células de mama no tumorales (Figura 53 B, C), tumorales (Figura 53 E, F) y de las de melanoma (Figura 53 H, I), siendo estadísticamente significativo en la línea MCF7 después de las 72 horas de incubación (Figura 53 F). Además, se observó que el sobrenadante empobrecido de exosomas, tras el aislamiento de estas VEs, no tenía un efecto paralelo al de las vesículas en algunos de los pacientes (**Anexo IV**-Figuras S5-S7).

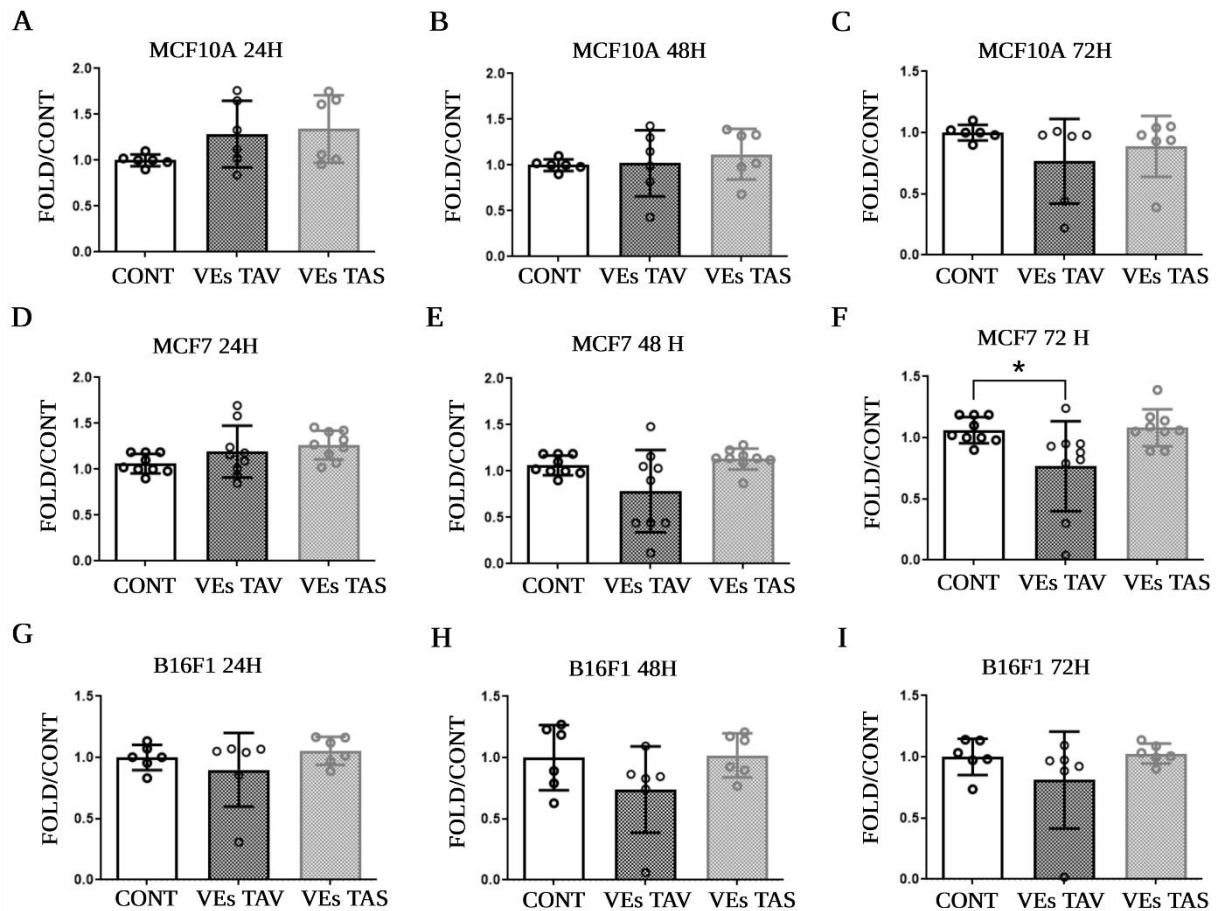


Figura 53. Las vesículas secretadas por el tejido adiposo visceral (TAV) y subcutáneo (TAS) de pacientes con obesidad alteran la proliferación de las células de mama y de melanoma (Anexo IV-Figura S5-S7). Las vesículas extracelulares (VEs) secretadas por el tejido adiposo según su localización anatómica (subcutáneo y visceral) se incubaron con las células de mama no tumorales (MCF10), tumorales (MCF7), y en las células de melanoma (B16F1) mediante la monitorización a (Figura 18 B). La proliferación en tiempo real de las células de mama MCF10 no tumorales (A-C), MCF7 tumorales (D-F) y B16F1 de melanoma (G-I) en presencia de vesículas aisladas de 1 gramo de TAV (tejido adiposo visceral) y TAS (tejido adiposo subcutáneo) obeso se representa como *fold change* en frente al control (CONT, vesículas artificiales vacías) durante 24, 48 y 72 horas [n = 6, n = 9; n = 6 pacientes independientes respectivamente (Tabla 5, 18), realizado por triplicado]. Las diferencias se analizaron mediante la prueba de *One-Way Anova-Kruskall Wallis*, seguida de la prueba de comparación múltiple de *Dunn*; $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo (* $p < 0,05$). H: horas (Creado con BioRender.com).

4.3.3 Resumen del papel funcional de las VEs obesas en la obesidad y en sus comorbilidades

En este capítulo, se observó que las VEs secretadas por los adipocitos patológicos y el tejido adiposo completo de pacientes con obesidad podrían jugar un papel importante en el desarrollo de patologías asociadas a la obesidad. Concretamente, se mostró que las VEs de los adipocitos hipertrofiados con el tratamiento de palmitato (VEs AP) y oleico (VEs AO) promovían la diferenciación adipocitaria y la acumulación lipídica en adipocitos sanos (Figura 46) [253]. Además, estas VEs de adipocitos hipertrofiados y las VEs de adipocitos resistentes a insulina (VEs HG/HI) provocaron alteraciones metabólicas en la vía de la señalización de la insulina mediante la disminución de la ratio P-Akt/Akt total que indica resistencia insulínica (RI) en adipocitos (Figura 47) [253] y hepatocitos en cultivo (Figura 48). Al mismo tiempo en los hepatocitos se observaron cambios en la expresión de genes relacionados con la RI como

TNF α (factor de necrosis tumoral α), *FAS* (sintetasa de ácidos grasos), *PLIN3* (perilipina-3), *PPAR γ* y *PPAR α* (receptor γ y α del proliferador de peroxisomas), *FABP4* (gen de la proteína de unión a ácidos grasos 4), entre otros (Figura 50). Sorprendentemente, solo las VEs liberadas por adipocitos hipertrofiados por lípidos, a diferencia de las VEs aisladas de adipocitos con resistencia a insulina (HG/HI), promovieron la inflamación en macrófagos al comprobar el aumento de la expresión de *TNF α* e *IL6* (interleuquina-6) (Figura 51) y de la secreción de diversas citoquinas inflamatorias (Figura 52) [253]. Además, las VEs aisladas de explantes de tejido adiposo subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) de algunos pacientes con obesidad fueron capaces de alterar la proliferación a tiempo real de células de mama no tumorales (MCF10A), tumorales (MCF7) y de melanoma (B16F1) (Figura 53).

5. DISCUSIÓN

5.DISCUSIÓN

En los últimos años, la elevada incidencia de la obesidad está aumentando la morbilidad y la mortalidad, provocando un gran coste económico en los diferentes sistemas sanitarios del mundo, además del deterioro en la salud individual de quien la padece. En concreto, en España, el porcentaje de obesidad y sobrepeso es del 53,6 %, así, se estima que el coste actual para el Sistema Nacional de Salud producido por los problemas relacionados con la obesidad es ya de 2000 millones de euros [2,256]. Este problema no solo afecta a los adultos, sino que se extiende a la población infantil; en concreto en la comunidad gallega, la obesidad y el sobrepeso infantil se ha triplicado desde el año 1979, encontrando en este momento que uno de cada 3 niños (6-15 años) presenta sobrepeso u obesidad [257]. Las consecuencias más graves del sobrepeso y de la obesidad para la salud incluyen el desarrollo de enfermedades asociadas como la diabetes tipo 2 (DM2), enfermedades cardiovasculares, y ciertos tipos de cáncer, entre otras [1]. Además, el tratamiento de esta epidemia es muy limitado y poco exitoso, siendo la cirugía bariátrica junto con la dieta y el ejercicio físico el tratamiento más eficaz hasta el momento [9]. Así pues, para paliar esta enfermedad es necesario un mayor conocimiento sobre los mecanismos moleculares implicados en la regulación del metabolismo, y su alteración con el aumento de peso; hallando los mecanismos responsables de que las personas con sobrepeso y obesidad presenten un mayor riesgo de padecer comorbilidades, y una menor esperanza de vida. Además, es necesario encontrar biomarcadores que ayuden a monitorizar el estado metabólico de los pacientes con obesidad, así como poder predecir de manera temprana las enfermedades asociadas, y también evaluar la efectividad de los tratamientos, para poder identificar aquellas personas que no van a responder a las intervenciones para la reducción de peso (dieta/ejercicio/cirugía).

En este contexto, surge el redescubrimiento de las vesículas extracelulares (VEs) y su papel en la fisiología normal y patológica, que está cambiando el paradigma en muchos aspectos de la investigación biomédica. Concretamente, en el estudio de las enfermedades metabólicas, las VEs y los exosomas, emergen como una nueva vía de comunicación celular, independiente de la vía clásica de secreción de hormonas y metabolitos, que necesita ser explorada [258]. La presente tesis se basa en la hipótesis de que las VEs secretadas por todas las células y órganos endocrinos, o liberadas por todos aquellos órganos implicados en el metabolismo, establecen una interrelación participando en la regulación del metabolismo del organismo. En concreto, en esta tesis doctoral, nos hemos centrado en el aislamiento y caracterización de las VEs liberadas por el tejido adiposo, dado su papel primordial en la desregulación del metabolismo en la obesidad. Nuestro objetivo fue establecer los protocolos necesarios para el aislamiento de las VEs liberadas por el tejido adiposo, caracterizar el perfil de estas vesículas secretadas, estudiar su contenido proteico en función de la localización anatómica y el estado metabólico, e intentar elucidar su rol funcional tanto en condiciones fisiológicas, como tras las alteraciones

metabólicas asociadas a la obesidad. Así, nos propusimos aislar las VEs liberadas por el tejido adiposo humano completo, tanto a nivel subcutáneo, como visceral, ya que existen muchas evidencias que otorgan al tejido adiposo visceral, un rol mucho más deletéreo que el subcutáneo en la desregulación metabólica, relacionada directamente con su aumento de tamaño y volumen [48]. Además, caracterizamos la composición de las VEs aisladas del tejido adiposo pardo (TAP) de animales con obesidad o normopeso, y de cultivos de adipocitos en diferentes condiciones metabólicas como la resistencia a la insulina (RI) o la hipertrofia por lípidos.

A pesar de que las vesículas extracelulares han surgido recientemente como nuevos mediadores de la comunicación celular fisiológica y metabólica, lo que ha generado grandes expectativas [111]; se sabe muy poco sobre las vesículas secretadas por el tejido adiposo y su composición. Sin embargo, investigaciones recientes han comenzado a arrojar luz sobre esta cuestión al describir las VEs circulantes como biomarcadores del metabolismo de los lípidos y la glucosa en humanos [219], o al estudiar las vesículas liberadas por explantes de tejido adiposo humano y murino y líneas celulares [202,259]. Así, trabajos anteriores con vesículas aisladas del cultivo primario del TA aislado de pacientes con SGBS (Síndrome de Simpson y Behmel) mostraron una estimulación proinflamatoria recíproca entre adipocitos y macrófagos, con el potencial de agravar la resistencia insulínica local y sistémica [110]. En la misma dirección, Eguchi y colaboradores han sugerido recientemente que las microvesículas liberadas por cultivo de adipocitos murinos y humanos, especialmente en condiciones de hipertrofia, tienen un papel promotor en la migración de los macrófagos [222]. Además, se ha demostrado que las VEs procedentes de explantes de TAS de determinados pacientes (con un IMC medio de 25,8 Kg/m²) causan alteraciones en la señalización de la insulina de los hepatocitos HepG2 [110]. También, recientemente se ha demostrado que las VEs derivadas de adipocitos murinos pueden regular la expresión de POMC a través de la señalización hipotalámica de mTOR *in vivo* e *in vitro*, afectando a la ingesta energética corporal [204]. Además, diferentes investigaciones estudiaron la composición génica (microARNs, ARNm) de las VEs derivadas de adipocitos, ya que pueden ejercer una regulación postranscripcional en las células/tejidos diana tanto a nivel fisiológico como patológico [69,223]. Por ejemplo, el estudio de Ogawa y colaboradores identificaron 7000 ARNm en las VEs aisladas de adipocitos murinos 3T3-L1, y estas VEs eran capaces de transferir estas secuencias específicas a células diana como los macrófagos [209,224]. Por lo tanto, teniendo en cuenta estas evidencias funcionales, creemos que existe la necesidad de describir la carga proteica de las VEs desprendidas por adipocitos o por el tejido adiposo en el contexto de la obesidad. Hasta donde sabemos, esta es la primera caracterización del proteoma de las vesículas liberadas por el tejido adiposo completo de personas con obesidad, convirtiéndose en un importante punto de partida para entender el papel de estas vesículas en el contexto de esta enfermedad. En informes anteriores se ha descrito la caracterización del proteoma de los diferentes subtipos de vesículas extracelulares secretadas por las células adipocitarias 3T3-L1 murinas, y también el proteoma de los exosomas secretados por la línea celular 3T3-F442A murina [205,215]. Dichos estudios fueron pioneros en el campo, pero se realizaron en líneas celulares de adipocitos murinos que carecen de información sobre la localización anatómica, y sobre toda la fisiología del tejido adiposo, omitiendo aquellas vesículas secretadas por otros constituyentes celulares, su interacción, y su relación con la

matriz extracelular (MEC). Los resultados de este trabajo de tesis muestran el análisis de las VEs liberadas a partir de explantes de TA visceral y subcutáneo humano que comprenden aquellas vesículas secretadas por los adipocitos maduros, pero también las liberadas por la fracción vascular estromal (SVF) incluyendo los preadipocitos, las células endoteliales y las células del sistema inmune innato como los macrófagos, los cuales son característicos del tejido adiposo obeso inflamado [55]. Aunque este enfoque puede considerarse complicado de manejar y puede implicar un mayor riesgo de contaminantes, realmente creemos que se asemeja bastante a la fisiología del TA, manteniendo la estructura 3D y la comunicación intercelular, incluyendo señales inflamatorias y la interacción de las células con la MEC la cual se ve característicamente afectada en la obesidad [260]. La mayor parte de lo anterior también se aplica a los datos descritos en un estudio previo que muestran el proteoma de las VEs liberadas por adipocitos humanos que se diferenciaron *in vitro* a partir de preadipocitos del TAS; estos hallazgos pueden atribuirse a un solo tipo de célula y a una localización anatómica y, además, se extrajeron de mujeres delgadas a moderadamente obesas [110]. Por lo tanto, la comparación de la carga proteica de las VEs secretadas por el TA humano completo en el presente trabajo de tesis muestra proteínas comunes a las descritas previamente en adipocitos cultivados, pero, además, identificamos muchas otras proteínas que no fueron descritas previamente. Curiosamente, ciertas proteínas parecen distinguir las vesículas liberadas por el tejido adiposo según su procedencia anatómica (subcutáneo, visceral y pardo) y su estado metabólico, lo que las sugiere como candidatas a biomarcadores de depósito/obesidad. Por lo tanto, esta información tanto a nivel del contenido de estas VEs, como a nivel funcional, podría proporcionar información útil en la consulta de endocrinología mediante la monitorización metabólica de la obesidad, incluyendo el desarrollo temprano de comorbilidades y la efectividad de los tratamientos; abriendo así un nuevo paradigma en relación con las enfermedades metabólicas para identificar dianas farmacológicas y tratamientos innovadores, así como biomarcadores dinámicos que proporcionarán el tratamiento óptimo para cada paciente con una clara aplicación clínica.

5.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS VES SECRETADAS POR ADIPOCITOS EN DIFERENTES SITUACIONES METABÓLICAS

Una de las problemáticas del estudio de las VEs, como ya se ha mencionado en la introducción, es la falta de un protocolo estandarizado para el aislamiento de estas partículas de forma reproducible y que permita obtener VEs puras y que estas mantengan sus características funcionales [113,190]. En la presente tesis, hemos optimizado el protocolo de aislamiento de las VEs liberadas por explantes completos de TA siguiendo los protocolos de obtención de secretoma tisular/celular ya establecidos en el grupo [49,238]. Diversos estudios anteriores muestran la optimización de la obtención de VEs de cultivo de adipocitos murinos o humanos o a partir de células madre mesenquimales aisladas de TA subcutáneo humano [200,261]. Cabe destacar el estudio de Jeurissen y colaboradores donde pusieron a punto el aislamiento de VEs a partir de 250 mg/mL de secretoma de TA asociado al epitelio mamario tumoral humano [262]. A diferencia de este estudio, y según nuestro conocimiento hasta el momento, esta tesis es el primer trabajo en el que se aíslan VEs a partir del secretoma de 48 horas de 1 gramo de TA subcutáneo, visceral y pardo. Siguiendo las recomendaciones de la ISEV (Sociedad

Internacional de Vesículas Extracelulares) [113], las VEs aisladas en esta tesis fueron caracterizadas mediante diversas técnicas: NTA (análisis de seguimiento de nanopartículas), TEM (microscopía electrónica de transmisión), espectrometría de masas, análisis mediante la plataforma ExoView y mediante inmunodetección con anticuerpos específicos contra proteínas vesiculares; para así validar el método de aislamiento utilizado en esta tesis, la ultracentrifugación.

En esta tesis se observó que el tejido adiposo visceral (TAV) obeso humano secreta un mayor número de VEs que el tejido adiposo subcutáneo (TAS). Este resultado concuerda con estudios anteriores del grupo, en donde se observa que el TAV secreta un mayor número de proteínas, citoquinas y otros metabolitos que el tejido adiposo subcutáneo [49]. Curiosamente, también se observó que los adipocitos control sanos secretan una mayor concentración de VEs que los adipocitos patológicos (hipertrofiados y resistentes a la insulina) [253]. Estos resultados fueron inesperados, ya que se ha demostrado que la presencia de estrés o patología, incluida la obesidad, induce un aumento de las vesículas circulantes [220]. Sin embargo, estudios previos de caracterización de las VEs de la línea celular murina 3T3-L1, han mostrado una disminución en la cantidad de secreción de partículas medida por NTA desde el día 0 al 15 de la diferenciación de los adipocitos [263]. Cabe destacar que hemos observado que la concentración proteica, a partir de la misma concentración celular/tisular inicial, es mayor en las VEs aisladas de adipocitos patológicos y de TAV de pacientes con obesidad que en las vesículas de adipocitos control sanos o del TAS, lo que puede indicar diferencias en la cantidad de carga proteica para cada situación metabólica.

Las VEs aisladas de los adipocitos o del TA completo en diferentes situaciones metabólicas tenían un tamaño promedio en torno a los 50-80 nm o alrededor a 75-175 nm, dependiendo de la técnica de caracterización. Estas diferencias en el tamaño y también en la concentración de partículas dependiendo de la tecnología usada, ExoView o NTA, se puede deber a que las VEs analizadas mediante ExoView son una población selectiva de partículas que contienen marcadores clásicos de vesículas pequeñas/endosomales, y que además la interferometría permite analizar unas partículas con un tamaño mínimo de 50 nm, a diferencia del NTA el cual detecta poblaciones heterogéneas de partículas con un tamaño superior a los 100 nm [264]. En resumen, nuestros resultados muestran que la concentración de partículas obtenida por el análisis NTA no se correlaciona con la cantidad de proteínas cuantificadas tras la lisis de las VEs, ni con el número de partículas capturadas con las tetraspaninas mediante la tecnología ExoView. Cabe destacar que también las VEs liberadas por el TA o los adipocitos contenían marcadores de pequeñas vesículas y endosomales tanto por espectrometría de masas, como por inmunodetección, lo que permitió confirmar que el método de aislamiento de VEs usado en esta tesis era eficiente para dicho propósito. Por ejemplo, se observó que las VEs liberadas tanto de adipocitos, como del TA, en las diferentes situaciones metabólicas eran positivas para alguno de los diferentes marcadores vesiculares como CD81, CD9, CD63, Alix, sintenina-1 y/o glicoproteína de membrana asociada al lisosoma 1 (LAMP1); por lo tanto, podemos afirmar que el TA desprende vesículas de varios tamaños. Esto nos sugiere que las poblaciones y la cinética de las vesículas secretadas son dinámicas y también están moduladas por la fisiología de la célula de origen.

5.2 CARACTERIZACIÓN DE LA CARGA PROTEICA DE LAS VES SECRETADAS POR EL TEJIDO ADIPOSO/ADIPOCITOS EN DIFERENTES SITUACIONES METABÓLICAS; PANEL DE BIOMARCADORES - VES

Hasta donde sabemos, esta es la primera caracterización del proteoma de forma cualitativa (DDA) y cuantitativa (DIA-SWATH/MS) mediante espectrometría de masas [253] de las vesículas liberadas de adipocitos patológicos en cultivo, de explantes completos de tejido adiposo (TAS-subcutáneo y TAV-visceral) de pacientes con obesidad mórbida, y del tejido adiposo pardo (TAP) murino en diferentes situaciones metabólicas; convirtiéndose en un punto de partida importante para entender el papel de estas vesículas en el contexto de la obesidad. La tecnología (DIA-SWATH/MS) ha surgido como un nuevo método de cuantificación preciso y reproducible, validada como una herramienta útil y versátil para la cuantificación de proteínas en una variedad de órganos y situaciones patológicas [247]. Como se comentó al principio de la discusión, los principales estudios proteómicos de las VEs liberadas por adipocitos que había hasta la fecha, se realizaron a partir de líneas celulares murinas de adipocitos 3T3-L1 y 3T3-F442A [205,215], y también de cultivo primario de adipocitos de TAS humano de pacientes delgados a moderadamente obesos [265]. Si comparamos nuestro estudio con los anteriores, encontramos proteínas comunes en las VEs estudiadas, sin embargo, identificamos muchas otras proteínas, como la leptina, que no se habían descrito anteriormente. Curiosamente, se observaron, por distintas técnicas, diferencias en la composición proteica de estas VEs según el estado metabólico de la célula/tejido de origen y la localización anatómica del tejido TAS, TAV o TAP. Esto concuerda con la literatura, ya que el tejido adiposo según su localización anatómica tiene una función metabólica y genética distinta; por lo que su perfil secretor también varía [48]. Así, estas diferencias a nivel proteómico dependiendo del insulto metabólico, la procedencia celular y el estado nutricional del individuo sugieren la utilidad de estas proteínas vesiculares como biomarcadores de patologías.

Un estudio anterior del grupo donde se realiza esta tesis doctoral, en el cual se caracterizó por espectrometría de masas el secretoma del TA completo obeso humano, anticipó que el secretoma del TAS y TAV incluían un gran número de proteínas de naturaleza exosomal/endosomal [49]. Así, de manera paralela, las VEs del TAV y TAS obeso analizadas en esta tesis contenían algunas proteínas halladas en el secretoma descrito anteriormente. Hemos elaborado los primeros mapas proteómicos de referencia para las VEs liberadas por el TA humano según su localización anatómica y estado metabólico, que creemos que ayudan a responder a las preguntas abiertas que se han planteado en la literatura acerca de la necesidad de caracterizar la carga proteica de las VEs en el contexto de la obesidad [111]. Así, mostramos que las vesículas liberadas por el TA obeso en diferentes situaciones anatómicas y metabólicas comparten proteínas vesiculares estructurales, pero también contienen componentes específicos del depósito y del estado metabólico.

En el contexto de la obesidad, entre las proteínas comunes a las VEs liberadas por el tejido adiposo/adipocitos en diferentes situaciones metabólicas y anatómicas, observamos proteínas estructurales y del citoesqueleto como las anexinas A1/A6, las cuales modulan los procesos antiinflamatorios y podrían estar alteradas en la DM2 (diabetes tipo 2) asociada a la obesidad [266]; e histonas como la H4 de la cual se sabe que, cambios epigenéticos como la acetilación

de la lisina, desencadena trastornos metabólicos en ratones con obesidad inducida por la dieta (DIO) [267]. Además, es interesante destacar que en todas las VEs analizadas se identificaron proteínas relacionadas con la síntesis o transporte de ácidos grasos o con la adiposidad como es el caso de las proteínas caveolina-1 (cav-1), sintetasa de ácidos grasos (FAS), la proteína de unión a ácidos grasos adipocitaria (FABP4) o perilipinas (perilipina-1). Cabe destacar que las proteínas cav-1 y perilipina-1 ya habían sido propuestas en la literatura como biomarcadores vesiculares del tejido adiposo [268], y especialmente la perilipina-1, que fue identificada como biomarcador para detectar VEs derivadas de adipocitos en la circulación [222]. Además, la proteína perilipina-1 es una de las proteínas más abundantes de los adipocitos, que tiene un papel clave en la regulación del metabolismo y la glucosa, y se ha asociado con el peso corporal y las complicaciones relacionadas de la obesidad [269]. Así, hallamos que la proteína perilipina-1 se encuentra en una mayor ratio en las VEs liberadas de los depósitos de grasa en condiciones de obesidad, especialmente de la grasa visceral y parda. Por ello, este resultado es coherente con informes anteriores que describen que perilipina-1 está significativamente aumentada a nivel circulante en ratones C57BL con obesidad inducida por dieta [222]. A mayores, un estudio reciente muestra que la asociación de diversos microARNs circulantes con el gen *PLIN1* (perilipina-1) se correlaciona con el riesgo de desarrollar obesidad infantil [270]. Por otra parte, la proteína caveolina-1 se halló elevada en las VEs de TAP de ratas obesas en comparación a las delgadas; y en general se encontraba al alza en las VEs desprendidas de los diferentes depósitos obesos. Se sabe que las VEs que portan esta proteína están implicadas en la comunicación entre diferentes tipos celulares dentro del tejido adiposo, concretamente entre las células endoteliales y adipocitos [268]. Además, estudios recientes muestran que esta proteína está relacionada con alteraciones metabólicas y puede influir en el desarrollo o la progresión del tumor mediante el control del metabolismo a través de la glucólisis, el metabolismo de ácidos grasos o en vías mitocondriales [271].

Por otro lado, la proteína FABP4 se halló elevada en las VEs liberadas por el TAP y TAV en condiciones de obesidad en comparación con las VEs liberadas de depósitos de grasa subcutánea y en condiciones de normopeso. Esta proteína, FABP4, la cual actúa como una proteína chaperona de lípidos, es una hormona secretada que tienen diversas funciones en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Se sabe que el aumento de los niveles circulantes de esta proteína, FABP4, se correlaciona con la incidencia de enfermedades metabólicas, y la reducción de estos niveles se asocia con una mejora de la salud metabólica [272]. Otra proteína que se halló en las VEs secretadas por el tejido adiposo en individuos con obesidad fue la proteína FAS. Se sabe que esta proteína puede contribuir al deterioro de la sensibilidad a la insulina y a la disfunción del TA en la obesidad [273].

En este mismo contexto, también es significativo el enriquecimiento de proteínas transmembrana y antígenos en las vesículas liberadas por el TA en la obesidad, y a partir de ellas, se puede dilucidar la liberación de las vesículas por otros componentes del TA como células mesenquimales o inmunitarias. Además, es de interés el conjunto de proteínas clasificadas como secretadas o pertenecientes a la MEC (matriz extracelular). Informes recientes han descrito factores de crecimiento y otras moléculas solubles (TNF- α , EGF, EGF y sus receptores) unidos a la membrana de los exosomas, lo que sugiere un papel en el transporte

de factores solubles [274]. Así pues, las VEs desprendidas por los adipocitos inflamados e hipertrofiados podrían participar en la remodelación de la MEC asociada a la obesidad. En este sentido, mostramos que las vesículas humanas del TA obeso contienen constituyentes de la MEC (colágenos, trombosponina 1), modificadores de la MEC (MMP-1, 2, 9, 14, proteína asociada a la remodelación de la matriz 5, TIMP-1), y receptores de la MEC (integrina β 2, CD44, CD36) previamente asociados con la obesidad y la resistencia a la insulina [275]. Precisamente, las vesículas liberadas por el TAV de pacientes con obesidad mostraron proteínas específicas de la MEC, como la MMP1, la proteína de la matriz 5 y biblicano. El biblicano es un componente no fibrilar de la MEC, que se libera de los macrófagos, promoviendo la secreción de citoquinas proinflamatorias [276]. Por otra parte, las VEs liberadas de depósitos de grasa subcutánea de individuos obesos se caracterizaron por proteínas de la MEC, y también proteínas de interés como GDF-15, considerado un agente antiobesidad [277]. Por último, llama la atención la identificación de las proteínas FetuA y elastasa de neutrófilos en las vesículas de ambos depósitos en pacientes con obesidad, ya que ambas proteínas están relacionadas con la resistencia a la insulina en esta enfermedad [278]. Además, destacar la identificación de diferentes proteínas Rab, que pueden sugerir un mecanismo para que las vesículas del TA se acoplen y se fusionen con la membrana celular de células diana, como se ha descrito anteriormente [279]. Las moléculas específicas capaces de dirigir las VEs del TA a un determinado tipo de célula o tejido siguen siendo una cuestión sin resolver; sin embargo, la identificación de diferentes integrinas y tetraspaninas de las VEs liberadas por el TA pueden sugerir un mecanismo para interactuar con la MEC y dirigirse así a tejidos seleccionados.

A mayores, cabe destacar que en esta tesis hemos demostrado que, dependiendo de la localización anatómica y del estado metabólico, las VEs tienen una diferente carga proteica, reflejando así la composición de la célula/tejido de origen. En ese sentido, hemos observado que las VEs secretadas por los depósitos de grasa visceral de pacientes con obesidad mostraban una mayor variedad de proteínas, y estas, se encontraron previamente relacionadas con el TA, la obesidad y la inflamación asociada. Este es el caso de la leptina [99], IL-6 (interleuquina-6) [201], CXCL5 (quimiocina 5 con motivo C-X-C) [280], GRP78 (chaperona del retículo endoplásmico BiP) [281], septina 11 [282], DDP-4 (dipeptidil-peptidasa 4) [283], syntaxina-8 [284], PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno) [285] o HSL (lipasa sensible a hormonas) [286] entre otras, identificadas exclusivamente en las vesículas liberadas por el TAV o por adipocitos con resistencia a la insulina (RI) y/o con hipertrofia lipídica. La presencia de leptina y otras adipoquinas conocidas en las vesículas del TA puede sugerir una nueva forma de comunicación endocrina para la regulación metabólica, y además pueden llegar a ser buenos candidatos a biomarcadores no invasivos de adiposidad que reflejen la disfunción del TA en el desarrollo de la obesidad.

En consecuencia, a partir de nuestro estudio, también es interesante la identificación de nuevas adipoquinas en las vesículas del TAV de pacientes con obesidad, y también en las VEs liberadas de adipocitos con hipertrofia lipídica, como la DDP4, mimecan y ceruloplasmina. La presencia de la glicoproteína transmembrana DDP4 en las vesículas del TAV obeso es significativa; además de su papel como inhibidor de la incretina (GLP-1 y GIP), esta proteína se ha identificado recientemente como una adipoquina liberada en mayor grado por el TAV y,

en particular, en los pacientes obesos y resistentes a la insulina, por lo que se ha sugerido como biomarcador de la obesidad visceral, la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico [283]. Además, esta proteína se identificó previamente en las VEs liberadas por adipocitos humanos del depósito subcutáneo diferenciados *in vitro* [265]. Del mismo modo, hemos demostrado que el TAV de pacientes con obesidad, y también los adipocitos con hipertrofia lipídica, secretan un mayor número de VEs positivas para la proteína mimecan. Esta adipoquina se expresa abundantemente en el TA y se considera una hormona de la saciedad, ya que inhibe la ingesta de alimentos independientemente de la señalización de la leptina al inducir la expresión de IL-1B e IL6 en el hipotálamo [287]. Aunque no se ha descrito, nuestra hipótesis es que, al igual que ocurre con la leptina, esta adipoquina puede ser secretada de manera incrementada como compensación al desarrollo de la obesidad, y probablemente parte de esta secreción se produce a través de las VEs, como se ha observado en la presente tesis. En esta misma línea, la proteína ceruloplasmina se halló elevada en las VEs liberadas a partir del tejido adiposo en condiciones de obesidad e hipertrofia lipídica, en especial en los depósitos de grasa visceral y parda. Cabe destacar que esta proteína se postuló como un biomarcador de la obesidad previamente; ya que se ha observado un aumento significativo a nivel circulante de esta proteína en individuos con obesidad en comparación con los delgados [288]. Además, se ha demostrado que esta proteína está enriquecida en diferentes líneas celulares de cáncer asociado a la obesidad incluidas en la base de datos FANTOM5 [289]. Por lo tanto, nuestra hipótesis es que esta proteína se secreta en las VEs en una mayor proporción durante el desarrollo de la obesidad.

Curiosamente, el hallazgo más notable fue encontrar la proteína TFGBI (proteína ig-h3 inducida por el factor de crecimiento transformante) vesicular asociada al depósito de grasa visceral en condiciones de obesidad, y de manera casi exclusiva presente en las VEs de adipocitos con resistencia a la insulina (RI). TFGBI es una proteína inducible por TFG- β que es secretada por muchas células, y se demostró que se une al colágeno formando parte de la matriz extracelular siendo capaz de interactuar con las integrinas de la superficie celular [290]. Cabe destacar que el gen que codifica a esta proteína, *TGFBI*, se ha descrito como un gen de riesgo de diabetes tanto en ratones como en humanos [291]. Por lo tanto, nuestra hipótesis es que la proteína TGFBI asociada a VEs podría ser una buena candidata a biomarcador de la RI y de la evolución de la misma.

Además, también observamos que las proteínas AHNAK, CD14 y vimentina están en una mayor ratio en las VEs procedentes de depósitos de grasa visceral de pacientes con obesidad mórbida en comparación con las vesículas de grasa subcutánea. La proteína AHNAK desempeña un papel crucial en la acumulación de grasa corporal al regular el desarrollo del tejido adiposo y estando implicada en la homeostasis metabólica [292]. La proteína CD14, también elevada en las vesículas del TAP de animales con obesidad en comparación con las mismas de normopeso, se ha relacionado previamente con la infiltración de macrófagos en el TA provocando un mayor estado inflamatorio de este tejido [293]. La proteína vimentina, juega un papel clave en la plasticidad del TA, y se ha observado que está implicada también en la obesidad y en la DM2 [294].

Por el contrario, se observó la disminución de la proteína sintenina-1 en las VEs desprendidas por el TAV obeso humano en comparación con las VEs del TAS. También, otras

proteínas estructurales y/o de biogénesis de pequeñas vesículas (CD316, Alix, CD98, lactadherina entre otras) se detectaron en una mayor ratio en las VEs del TAS obeso humano en comparación con las presentes en VEs del tejido visceral obeso [215]. También es interesante señalar la presencia de IL-8 en las vesículas del TAS de pacientes con obesidad, ya que los niveles de esta citoquina están positivamente correlacionados con parámetros asociados con la obesidad como el IMC (Índice de Masa Corporal), la CC (circunferencia de cintura) y la proteína C reactiva [295]. Estos hallazgos pueden explicarse si se considera que las VEs varían en función de la localización y del tipo de TA, ya que las VEs se moldean según los cambios fisiológicos y patológicos de la célula o el tejido de origen. Así, se ha descrito que el TA visceral de individuos con obesidad está más inflamado que el subcutáneo [296], y por tanto, invadido por macrófagos y otras células inmunes, que también liberan VEs y pueden alterar el tipo, la cantidad y la liberación dinámica de estas partículas. Por lo tanto, postulamos que las proteínas reguladas en las vesículas del TAV obeso se asocian más con la obesidad y sus comorbilidades; y por el contrario las vesículas del TAS se caracterizan mayoritariamente por proteínas más de tipo estructural.

Además, a nivel celular hemos demostrado que la composición proteica de las VEs varía acorde a los estímulos/tratamientos que reciba la célula de origen. Así, el número de proteínas diferentes identificadas en las VEs de adipocitos aumentó seis veces en comparación con las de los preadipocitos, lo que podría tener sentido debido a los cambios drásticos promovidos por el cóctel de diferenciación adipocitaria. Es interesante destacar la identificación de adipoquinas y proteínas relacionadas con la diferenciación adipocitaria y la maduración de adipocitos en las VEs de las células diferenciadas en comparación con las indiferenciadas. Este es el caso de la adiponectina, la proteína asociada a la caveola 1, FAS, la endoplasmína-Grp94, la Grp75, la proteína de unión al potenciador de adipocitos 1, la proteína asociada a la membrana plasmática de los adipocitos, acetoacetil-CoA sintetasa, la lipoproteína lipasa (LPL), glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, y quimerina entre otras. También es interesante mencionar las proteínas cuya presencia era elevada en las VEs de preadipocitos en comparación con los adipocitos. Así, detectamos que la proteína pentraxina-3 está siete veces elevada en las vesículas de las células mesenquimales en comparación con las mismas células tras su diferenciación. Esta proteína tiene un papel protector en la inflamación inducida por LPS y por una dieta alta en grasas en el tejido adiposo murino [297], por lo que puede sugerir un papel funcional antiinflamatorio de esas vesículas secretadas por las células mesenquimales como se ha descrito previamente [298].

Por otro lado, los adipocitos con hipertrofia lipídica y/o RI secretan VEs que mostraron ser portadoras de proteínas que previamente fueron descritas como relacionadas con la obesidad y la RI, a diferencia de las VEs secretadas por adipocitos sanos/control. Además de forma concreta, los adipocitos con RI o hipertrofia lipídica secretan VEs con proteínas exclusivas para cada condición. En este sentido, hemos demostrado que, entre las proteínas elevadas en las vesículas secretadas de adipocitos hipertrofiados por lípidos, se encontraron otros potenciales biomarcadores de la obesidad, como la cadena pesada del inhibidor de la inter- α -tripsina H3 (ITIH3), Glut4, catepsina B, osteopontina, CD36, el factor tisular, PARK7/DJ1 o MMP-14 (metaloproteínasa de matriz 14). De forma curiosa, la ITIH3 fue la proteína con mayor elevación (*fold-change*) en las VEs de los adipocitos hipertrofiados. Esta proteína pertenece a

la familia de proteínas ITH que están fuertemente asociadas a la inflamación [299]. Por otro lado, la elevada presencia de Glut4 en estas vesículas nos lleva a especular que la secreción de este transportador de glucosa a través de las VEs podría ser una forma de participar en la resistencia a la insulina. Sin embargo, esta proteína, Glut4, no fue identificada en las vesículas de los adipocitos con RI tras el tratamiento con alta glucosa e insulina, por lo que esto requerirá un análisis más profundo. En el caso de la catepsina B, se sabe que la secreción de esta proteína aumenta durante el desarrollo de la obesidad con la hipertrofia de los adipocitos; contribuyendo al síndrome metabólico mediante un aumento excesivo de la autofagia, la inflamación y la infiltración de macrófagos en el TA [300]. Otra proteína de interés es la osteopontina, ya que está altamente regulada en el TA humano y murino durante el desarrollo de la obesidad, y se ha implicado funcionalmente en la patogénesis de la inflamación del tejido adiposo inducida por la obesidad y la resistencia a la insulina [301]. En esta tesis, se detectó que esta proteína está elevada en las VEs de adipocitos con hipertrofia lipídica; por tanto, demostramos que no solo los macrófagos del tejido adiposo secretan esta proteína, sino que los propios adipocitos son capaces de liberar esta citoquina inflamatoria a través de las VEs. En la misma dirección se encuentra el antígeno CD36, el cual genera un bucle inflamatorio paracrino entre los adipocitos y los macrófagos facilitando la inflamación crónica y contribuyendo a la RI [302]. Además, cabe mencionar la proteína del factor tisular, ya que se ha comprobado que la inflamación y los cambios metabólicos durante el desarrollo de la obesidad, aumentan esta proteína en los adipocitos y macrófagos del tejido adiposo obeso [303]. A mayores, la proteína DJ-1 está implicada en la regulación del estrés oxidativo, entre otras funciones, pero también se ha descrito su participación en la adipogénesis y en la inflamación inducida por la obesidad [304]. Además, se ha descubierto que la MMP-14 está sobreexpresada en el tejido adiposo obeso, participando en el metabolismo anormal de los lípidos y la resistencia a la insulina [305]. Por el contrario, la metaloproteinasas de matriz 2 (MMP-2) se halló al alza en las VEs de los adipocitos con RI, pero no en las VEs de los adipocitos con hipertrofia por lípidos. La MMP-2 se ha descrito como elevada a nivel circulante en humanos obesos [306] y, además, se ha observado que está implicada en la resistencia a la leptina en ratones con obesidad [307]. Por lo tanto, esto demuestra que las VEs son una buena representación de la célula de origen, incluyendo su estado metabólico y la alteración patológica.

Por otro lado, la grasa parda, a pesar de tener un papel metabólico distinto que la grasa blanca (TAB), juega un papel importante en la comunicación celular, al igual que el TAB, mediante la secreción de diversas batoquinas o moléculas peptídicas o no peptídicas como microARNs y lípidos [308]. Hasta el momento, la primera caracterización proteómica de las VEs secretadas por el TAP de ratas obesas y control, estudiando así su composición según la localización anatómica del tejido y su estado nutricional, ha sido realizada en esta tesis. Estudios recientes han caracterizado el perfil proteómico mediante espectrometría de masas del secretoma del tejido adiposo pardo murino [309] y de cultivo primario de adipocitos a partir de tejido adiposo pardo de la región supraclavicular [310]. El estudio de Deshmukh y colaboradores mostró que las proteínas identificadas tienen un origen vesicular, pero no analizan la composición de estas VEs, además de que ofrece una visión solo del propio adipocito y no de la relación conjunta del tejido adiposo, ni de la influencia del estado

nutricional; a diferencia de nuestro análisis. Por otro lado, hay estudios recientes sobre el papel de los microARNs secretados por el TAP. Se ha postulado como biomarcador de la actividad del TAP el miR-99b; ya que se ha observado que las VEs liberadas por el TAP activado que contienen este microARN reprime la expresión de *Fgf21* a nivel hepático [311]. Además, el estudio de Kariba y colaboradores muestra que miR-132-3p de VEs liberadas por el TAP en condiciones de estrés atenúa la expresión de genes lipogénicos suprimiendo la expresión de *Srebf1* a nivel hepático [312].

Curiosamente en nuestro estudio, las VEs del TAP tanto obeso como delgado tenían un importante componente mitocondrial (40-45 %), a diferencia de las VEs liberadas por el tejido adiposo blanco. Se observó que las vesículas pardas contenían proteínas relacionadas con el metabolismo mitocondrial del tejido pardo, y con rutas energéticas. Por primera vez, hemos identificado el marcador de termogénesis del TAP, UCP1 (proteína desacoplante mitocondrial de la grasa parda 1), en las VEs de origen pardo. Además, cabe destacar que esta proteína, UCP1, se halló elevada en las VEs de TAP en comparación con las VEs procedentes del TAB (subcutáneo y visceral); curiosamente regulada al alza en las VEs de tejido pardo de animales con obesidad en comparación con las VEs del mismo tejido en animales normopeso/control. Este resultado parece no concordar con la literatura, ya que a pesar de que el TAP presenta una mayor resistencia a la inflamación que el tejido adiposo blanco, se sabe que, en la obesidad, la secreción de citoquinas proinflamatorias, parece alterar la función termogénica del TAP con la reducción de los niveles de expresión de UCP1 y de otros marcadores de termogénesis [64]. En modelos murinos de obesidad genética, se ha informado de una disminución de la activación del TAP probablemente como consecuencia de la reducción de la expresión de *UCP1* [313]. Sin embargo, en los modelos de obesidad inducida por la dieta (DIO), algunos estudios indican que los niveles de UCP1 se mantienen estables o, como en el trabajo de Alcalá M. y colaboradores, los niveles de la proteína UCP1 aumentan en los ratones obesos tras una dieta rica en ácidos grasos (HFD) durante 20 semanas [314]. Por lo tanto, nuestra hipótesis es que las VEs del TAP refleja el estado adaptativo de este tejido el cuál desencadena una respuesta termogénica adaptativa inducida por la dieta, lo que conlleva a un aumento de los niveles proteicos de UCP1. Sin embargo, aún está por confirmar si se trata de un efecto sensible al tiempo, ya que en esta tesis la dieta alta en grasa (HFD) se mantuvo durante nueve semanas, a diferencia de los estudios anteriores. Además, nuestros resultados muestran que las VEs del TAV de animales con obesidad contienen una mayor ratio de UCP1 en comparación con las del TAS de animales normopeso y con obesidad. Este resultado concuerda con otros informes, en los que se observa un mayor nivel de la expresión génica de *UCP1* en el TAV de pacientes con obesidad en comparación con el TAS de pacientes delgados y obesos [315]. Además, en las VEs de origen pardo hemos identificado proteínas del complemento como C3/C4, y citoquinas proinflamatorias como MIF1 (factor inhibidor de la migración de macrófagos). Estas proteínas fueron halladas también en el secretoma murino y humano del TAP [308]. Por otro lado, identificamos y observamos que la proteína ATP citrato sintetasa (ACLY) se encontraba aumentada en las VEs del TAP de animales normopeso/control en comparación con este mismo en animales con obesidad. La ATP citrato sintasa es una enzima que participa en la lipogénesis, y se sabe que durante el desarrollo de la obesidad se produce una disminución de la actividad

de esta proteína [316]. Por lo tanto, cabe destacar que hemos observado que las VEs de origen pardo tienen diferente carga proteica según el estado metabólico y la localización del tejido de origen; reflejando de forma dinámica los cambios de la célula de origen y portando biomarcadores de la actividad mitocondrial del TAP, la inflamación y el estrés oxidativo durante el desarrollo de la obesidad.

5.3 BIOMARCADORES VESICULARES CON POTENCIAL USO TRASLACIONAL

Además, en esta tesis, a nivel traslacional, hemos dado un interesante paso al aislar e identificar vesículas circulantes secretadas por el TA que contienen caveolina-1 (cav-1) en plasma de donantes obesos (diabéticos y no diabéticos) y delgados mediante ELISA. Se observó que las VEs circulantes de los donantes delgados/control contienen una mayor ratio de cav-1 que los donantes obesos; lo cual concuerda con estudios anteriores en los cuales se observó que los niveles de expresión de cav-1 eran más bajos en los ratones obesos que en los delgados [317]. Además, la deficiencia de cav-1 se ha asociado con el aumento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), y con la lipodistrofia e hipertrigliceridemia hereditaria [318]. Cabe destacar que también hemos confirmado los resultados del análisis proteómico a nivel circulante, cuantificando las vesículas que contienen TGFBI y mimecan en el plasma de una cohorte independiente de individuos delgados y obesos. Curiosamente, estos hallazgos muestran que las VEs-TGFBI pueden facilitar la monitorización de la DM2 (diabetes tipo 2) en pacientes con obesidad. Concretamente, hemos observado que los pacientes con DM2, con un mayor porcentaje de hemoglobina glicosilada (% HbA1c), presentaban una mayor ratio de TGFBI/Cav-1, por lo tanto, nuestra hipótesis es que este biomarcador puede ayudar en el control y la evolución de la diabetes en la práctica clínica. Por otra parte, hemos observado una correlación positiva entre el IMC (Índice de Masa Corporal) y los niveles de mimecan vesicular; por lo tanto, postulamos que las VEs que contienen mimecan pueden ser útiles para rastrear la adiposidad, y más precisamente, la obesidad visceral. Hay que tener en cuenta, que los pacientes obesos diabéticos estaban bajo el tratamiento antidiabético; y que no pudimos obtener los datos clínicos de los donantes delgados usados como controles. Por lo tanto, dado que las vesículas plasmáticas pueden ser secretadas por cualquier célula o tejido, es necesario ahora encontrar un método fiable para aislar las vesículas circulantes específicas del TA, y poder así ensayar y monitorizar biomarcadores de obesidad. En este sentido, esta investigación ha aportado una buena base de datos de proteínas de interés capaz de distinguir las vesículas del TA del resto, y más precisamente, discernir el depósito de origen y la patología. Creemos que las proteínas identificadas en este trabajo pueden ayudar a monitorizar dinámicamente el desarrollo de esta enfermedad, obesidad, y sus comorbilidades, y, además, a controlar la eficacia de la intervención terapéutica (cirugía, fármacos, dieta y ejercicio) de forma no invasiva mediante las VEs a nivel circulante.

5.4 PAPEL FUNCIONAL DE LAS VES SECRETADAS POR EL TEJIDO ADIPOSO/ADIPOCITOS EN CONDICIONES DE OBESIDAD

Después de observar que la localización anatómica y el estado metabólico provocaban cambios en la composición proteica de las VEs aisladas de adipocitos patológicos (hipertrofiados con

lípidos y/o resistentes a la insulina-RI), y de las VEs liberadas por los explantes de TA (subcutáneo-TAS, visceral-TAV, pardo-TAP) humano obeso y murino, quisimos evaluar si estas diferencias se observaban a nivel funcional. Para ello, realizamos experimentos funcionales *in vitro* para dilucidar el papel de estas vesículas en la comunicación paracrina/endocrina entre los adipocitos y otras células/tejidos diana relacionados con la obesidad. Así, describimos por primera vez que las VEs procedentes de adipocitos C3H10T1/2 hipertrofiadas y resistentes a insulina (RI) inducen y estimulan la diferenciación e hipertrofia lipídica de los adipocitos, tal y como se observa en la disminución del índice celular (asociado a los cambios morfológicos de la diferenciación) y con el aumento de la concentración de lípidos tanto por tinción *Oil red O* como por la medición de la concentración de triglicéridos. Tanto el seguimiento en tiempo real, como la disminución del índice celular que indica la diferenciación celular, son sistemas bien establecidos y documentados previamente en la literatura [82]. Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se demuestra que las VEs desprendidas por los adipocitos hipertrofiados y RI aceleran la diferenciación e hipertrofia de los adipocitos sanos. Además, demostramos que estas mismas vesículas promueven la RI al inhibir la vía de señalización de la insulina individualmente, y cuando se combinan las VEs de adipocitos con hipertrofia (tratamiento con palmitato-AP/ tratamiento con oleico-AO) seguidas de las VEs aisladas de los adipocitos RI (tratamiento con alta glucosa e insulina-HG/HI). Este fenómeno se observó previamente en la línea celular de hepatocitos HepG2 y en los miotubos C2C12; así, Kranendonk y colaboradores encontraron que las VEs del tejido adiposo subcutáneo de algunos individuos inhiben la fosforilación de Akt en las células hepáticas y musculares [110]. Además, otros han descrito que las vesículas del tejido adiposo median en la activación de la resistencia a la insulina inducida por los macrófagos [201]. Además, la reducción de la fosforilación de Akt observada en esta tesis iba acompañada de un incremento de la expresión de *FASN* (sintetasa de ácidos grasos), *TNF α* (factor de necrosis tumoral α) en los adipocitos tratados con las VEs liberadas por adipocitos hipertrofiados (AP/AO), y una reducción de la expresión de *PPAR γ* (receptor γ del proliferador de peroxisomas). Se sabe que el desarrollo anómalo de la adipogénesis y la acumulación de grasa debido a alteraciones en la ruta de la lipogénesis están relacionadas con la dislipidemia, la RI, la carga oxidativa, la hiperglucemia, entre otros [319]. También, se sabe que el tratamiento con ácidos grasos en los adipocitos promueve la lipólisis mediante el aumento de la expresión de los receptores nucleares del proliferador de peroxisomas (*PPAR*) [320,321]. Por lo tanto, nuestra hipótesis es que las VEs de los modelos patológicos producen un estado de RI en adipocitos sanos, que promueve el aumento de la lipogénesis *de novo* (aumenta la expresión de *FASN*) y la disminución de la lipólisis (*PPAR*) lo que conlleva a un estado de estrés oxidativo que causa un aumento de la inflamación (*TNF α*). En esta misma línea, también hemos demostrado, que estas VEs secretadas por adipocitos patológicos promovían la RI en los hepatocitos murinos primarios, ya que observamos una disminución en la fosforilación de la proteína Akt y de la proteína ribosomal S6. Además paralelamente a esta menor sensibilidad a la insulina en los hepatocitos tratados con las VEs patológicas, se observó una disminución de la expresión de *PDK1* y *Glut1*, confirmando así una disminución de la movilización de la glucosa como se ha observado en estudios anteriores [322]. Sin embargo, los hepatocitos tratados con las VEs

liberadas de adipocitos con hipertrofia lipídica expresan una disminución de *FASN* y *PLIN3*, lo que puede sugerir una disminución en la expresión de rutas relacionadas con la acumulación y transporte de lípidos, y con la lipogénesis de *novo* como ya se ha descrito previamente en la literatura [323–325]. Además, se observó una disminución de *NONO* en los hepatocitos tratados con las VEs liberadas de adipocitos patológicos. Se sabe que los ratones deficientes en *NONO* presentan un deterioro de la tolerancia a la glucosa y un nivel más bajo de glucógeno y lípidos a nivel hepático [326]. Por lo tanto, nuestra hipótesis es que las VEs liberadas por los adipocitos patológicos, principalmente de los adipocitos hipertrofiados, portan ácidos grasos, adipoquinas o microARNs que promueven la RI mediante una supresión de la señalización de la insulina debido, por ejemplo, a) a la inflamación con el aumento de la expresión de *IL-6* (interleuquina-6); b) la regulación de la transcripción y del metabolismo de lípidos a través de la disminución de la expresión de *PPAR*; y c) mediante la activación de la gluconeogénesis con la expresión de *FBP1* (gen de la proteína fructosa-1,6-bisfosfatasa 1) que aumenta la concentración de glucosa 6 fosfato, lo que supone una disminución de la captación de glucosa y un estado de resistencia a la insulina como ya se ha demostrado anteriormente [319,327–329]. El estudio de Ferrante y colaboradores ha demostrado que las VEs liberadas por adipocitos obesos transfieren microARNs que se dirigen a genes implicados en las vías de señalización inflamatoria y fibrótica, como por ejemplo miR-141-3p, el cual es responsable de la fosforilación normal de la proteína Akt tras la estimulación con insulina [330]. También se ha observado que la disminución de la expresión de miR-22 en las VEs del suero se correlaciona negativamente con los marcadores de adipogénesis y sensibilidad a la insulina, como *PPAR* a nivel hepático [331].

En este contexto, también observamos la capacidad de las VEs secretadas por los adipocitos hipertrofiados para inducir la inflamación en los macrófagos sanos. Se han probado diferentes dosis (fisiológicas, la mitad y el doble) de VEs, mostrando que era necesario aplicar una dosis doble de VEs secretadas por los adipocitos hipertrofiados con el tratamiento con AO para inducir la inflamación; a diferencia de las VEs de adipocitos hipertrofiados con AP que con la dosis fisiológica fue suficiente para inducir una expresión significativa de *TNF α* e *IL-6* y un aumento de la secreción de citoquinas/proteínas inflamatorias en los macrófagos sanos. Entre las citoquinas elevadas encontramos varias interleuquinas (*IL1*, *IL4*, *IL6*, *IL10*), quimiocinas (*MIG*, *I-TAC*), o *IFN γ* (interferón gamma), entre otras. Por otra parte, se observó que las VEs del modelo celular de RI (HG/HI) no promovían la inflamación en los macrófagos; lo que sugiere la necesidad de la hipertrofia lipídica en este proceso, como se ha descrito previamente a nivel celular [332]. Nuestros resultados concuerdan con estudios anteriores en donde se ha descrito que los exosomas derivados del TA, en especial los derivados de la grasa visceral tienen un efecto proinflamatorio en los macrófagos [200]. El estudio de Deng y colaboradores ha mostrado que las VEs de adipocitos de ratones obesos aumentaban la producción del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), *IL6* y *TNF- α* en macrófagos murinos primarios [201]. En otro estudio, las VEs aisladas de los macrófagos del tejido adiposo de ratones obesos provocaban un deterioro de la tolerancia a la glucosa y de la sensibilidad a la insulina en los ratones delgados [333]. Además, se sabe que cuando los macrófagos se exponen a estímulos inflamatorios secretan citoquinas como *TNF- α* , *IL-1*, *IL-4* o *IL-6* [334], o quimiocinas como *MIG* (monoquina inducida por interferón gamma o *CXCL9*) o *I-TAC* (quimioatrayente de

células T alfa inducible por interferón o CXCL11) que promueven el reclutamiento de células T al lugar de la inflamación [335]. En un estudio anterior, se observó que las VEs aisladas de células madre mesenquimales con actividad inmunosupresora, en las cuales se identificaron diferentes citoquinas como IFN γ , promovían la diferenciación de las células T reguladoras [336]. De forma curiosa, también en este trabajo de tesis se ha detectado la proteína leptina en el secretoma de los macrófagos inflamados con las VEs liberadas de los adipocitos con hipertrofia por lípidos. Este resultado concuerda con el estudio previo de Ogawa y colaboradores, en el cual se observó que los macrófagos tratados con VEs liberadas de adipocitos expresaban transcritos específicos de adipocitos como la adiponectina y resistina, y esto se debía principalmente a la transferencia de microARNs [224]. Por otro lado, cabe destacar que las VEs liberadas de adipocitos patológicos presentan diferencias funcionales dependiendo del insulto metabólico de la célula de origen, lo cual se puede deber a las diferencias en la composición proteica o molecular de estas vesículas.

Además, hemos demostrado de forma preliminar que las VEs aisladas del TA obeso producen cambios en la proliferación celular de la línea de mama (MCF10A), de mama tumoral (MCF7) y de melanoma (B16F1) de forma previsiblemente dependiente del paciente. Se observó una tendencia positiva en la proliferación en las células cultivadas con las VEs de TAS y TAV después de 24 horas; sin embargo, este efecto se perdió después de las 48 horas, en donde las VEs secretadas por el TAV de ciertos pacientes inhiben la proliferación, en concreto en la línea MCF7. El hecho de que las VEs de TAS tengan un efecto promotor en la proliferación de dichas células concuerda con informes anteriores, los cuales muestran que el medio condicionado de explantes de TA o adipocitos, y las VEs aisladas de TA humano de donantes con obesidad promueven la proliferación de las MCF7 y de otras líneas tumorales de mama a las 24 horas de tratamiento [337,338]. También nuestro trabajo es coherente con los informes que muestran que los exosomas de adipocitos promueven la agresividad del melanoma [205,339]. Además, cabe destacar el hecho de que el sobrenadante empobrecido en VEs no sea paralelo al efecto de las vesículas aisladas en este trabajo de tesis, sugiriendo así un efecto intrínseco de las vesículas; sin embargo, esto tendría que estudiarse en más profundidad. Dado que, efectivamente, la inflamación se ha descrito como un promotor central de la tumorigénesis, debemos tener en cuenta que el tejido adiposo utilizado en este trabajo puede no estar tan inflamado como suponemos para un individuo obeso debido a la dieta hipocalórica que precede a la cirugía bariátrica. Además, el tiempo de exposición o la dosis de vesículas pueden no ser fisiológicos. No obstante, teniendo en cuenta nuestros resultados, el papel de las vesículas liberadas por el TAS en la promoción de la proliferación celular debería estudiarse más a fondo, ya que este tipo de grasa se utiliza actualmente para el injerto autólogo en la reconstrucción mamaria en mujeres con cáncer de mama [340]. Así, sería necesario para futuros estudios, tener en cuenta el IMC o el porcentaje de grasa visceral a la hora de realizar este tipo de reconstrucción para poder determinar si esta condición supone un riesgo de recidivas, y en caso positivo, valorar la prescripción de pérdida de peso antes de realizar este tipo de cirugía.

5.5 LIMITACIONES DE ESTE TRABAJO DE TESIS Y RESUMEN

Algunas de las limitaciones de este estudio residen en el propio modelo celular murino que puede no representar a los adipocitos obesos hipertrofiados o con RI (resistencia a la insulina). Además, en estos modelos no estamos considerando la interacción con otros tipos celulares normalmente presentes en el tejido adiposo como la fracción del estroma vascular, o las células inmunes que característicamente invaden el tejido adiposo obeso. Sin embargo, el estudio de las vesículas liberadas por los explantes de TA humano y de rata son de gran interés, pero la cantidad de muestra es limitada; por lo que nos ha impedido realizar varios ensayos con la misma muestra. Además, este tipo de muestras, en concreto las de origen humano, presentan bastante variabilidad. A mayores, las VEs deprendidas de muestras de TA de donantes delgados son difíciles de obtener; ya que este tipo de muestra no se recoge de forma rutinaria, y se hace principalmente a partir de colecistectomía/hernioplastia. Por otra parte, hay que tener en cuenta las limitaciones de la metodología, que incluyen el arduo protocolo de aislamiento de las vesículas y también la propia espectrometría de masas; que, en el caso de ciertas proteínas, aunque se detectaron diferencias en el análisis cuantitativo (DIA-SWATH/MS) no se identificaron por el análisis cualitativo (DDA). Otro punto a tener en cuenta es que estamos analizando un grupo heterogéneo de VEs, cómo se ha demostrado mediante las técnicas de caracterización NTA, TEM, plataforma ExoView, inmunodetección o por espectrometría de masas, siguiendo las recomendaciones de la MISEV2018 [113]. Sin embargo, creemos que esta heterogeneidad muestra una imagen fisiológica de las vesículas secretas por el TA.

En resumen (Figura 54), creemos que esta tesis ha descrito por primera vez, tanto cualitativamente como cuantitativamente, la carga proteica de las VEs liberadas de adipocitos sometidos a diferentes insultos metabólicos, y del TA humano y de ratas según el tipo y localización anatómica de este tejido. Este estudio es un punto de partida importante para un mejor conocimiento de esta forma alternativa de comunicación en el contexto de las enfermedades metabólicas. Además, el conocimiento de estas proteínas puede ser muy valioso como biomarcadores de enfermedades, ya que hemos demostrado que el contenido de las VEs varía dependiendo de la condición patológica, del tipo, de la localización anatómica del depósito de grasa (TAS, TAV y TAP) y del IMC del individuo (obeso o delgado). Así, sugerimos varias proteínas candidatas a biomarcadores de carácter predictivo o de seguimiento de las comorbilidades asociadas a la obesidad, y del estado metabólico del paciente, que serán validadas a nivel clínico en un futuro próximo. Por otro lado, los ensayos funcionales realizados en la presente tesis muestran que los adipocitos RI/hipertrofiados y el TA liberan vesículas, tipo caballo de Troya, capaces de inducir alteraciones metabólicas en células sanas, probablemente exacerbando la enfermedad una vez establecida, lo cual merece una mayor investigación.

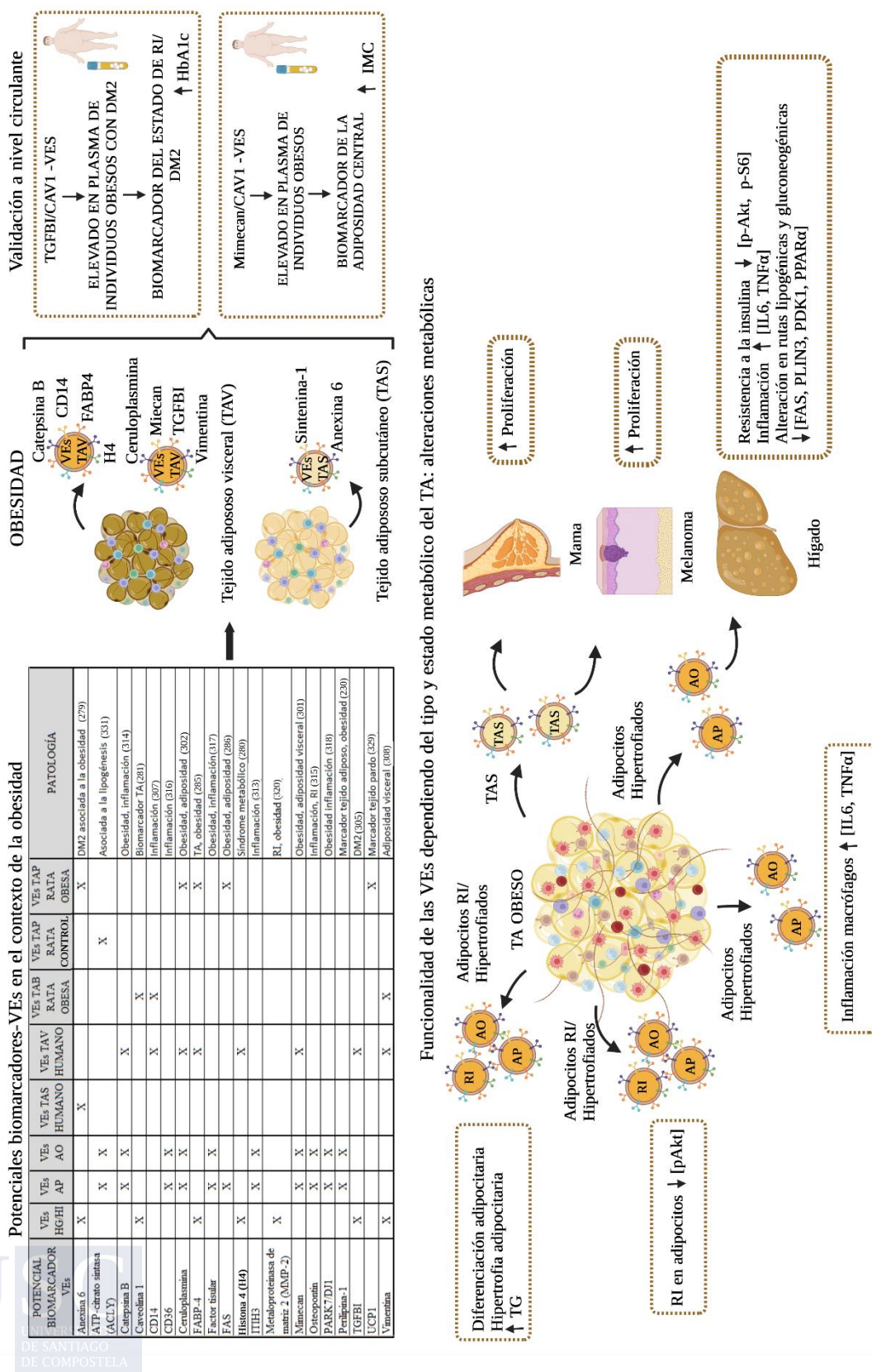


Figura 54. Resumen gráfico de la presente tesis doctoral (Creado con BioRender.com) [253,254].

6. CONCLUSIONES

6.CONCLUSIONES

1. Los adipocitos murinos con hipertrofia lipídica y/o con resistencia a insulina (RI) secretan VEs de naturaleza exosomal cuyo tamaño y concentración varía con los insultos metabólicos.
2. El tejido adiposo subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) de pacientes con obesidad secretan VEs de naturaleza endosomal/exosomal que varían en el tamaño y composición dependiendo de la localización anatómica de este tejido.
3. El tejido adiposo visceral (TAV) de individuos con obesidad secreta un mayor número de VEs, y con un tamaño mayor que el subcutáneo (TAS).
4. El tejido adiposo pardo (TAP) libera una mayor concentración de VEs de naturaleza exosomal, que los depósitos de grasa blanca (TAB).
5. El contenido proteico de las VEs secretadas por los adipocitos varía y está alterado según el insulto metabólico; concretamente, las VEs liberadas por adipocitos con hipertrofia lipídica y resistencia a insulina contienen proteínas relacionadas con la obesidad central y la diabetes respectivamente.
6. El contenido proteico de las VEs difiere en cuanto a la localización anatómica del tejido, concretamente las VEs secretadas por el tejido adiposo visceral portan adipoquinas clásicas como la leptina y otras muchas adipoquinas, estando un gran porcentaje relacionadas con la adiposidad visceral/central; mientras que las VEs liberadas por el tejido adiposo subcutáneo se caracterizan por contener proteínas de carácter estructural y pertenecientes a la matriz extracelular como anexinas y tubulinas.
7. Las VEs liberadas por el tejido adiposo pardo (TAP) portan proteínas relacionadas con la β -oxidación, y con rutas metabólicas mitocondriales como la proteína desacoplante mitocondrial 1 (UCP1).
8. Las VEs liberadas por el tejido adiposo en el contexto de la obesidad se caracterizan por la elevación de adipoquinas como ceruloplasmina, mimecan o vimentina, y además por proteínas relacionadas con la obesidad y el tejido adiposo como perilipina-1, caveolina-1, la proteína de unión a ácidos grasos adipocitaria (FABP4) y la proteína sintetasa de ácidos grasos (FAS) entre otras.
9. La proteína TGFBI se encuentra característicamente elevada en las VEs de adipocitos con resistencia a insulina.
10. Las adipoquinas mimecan y ceruloplasmina se encuentran especialmente elevadas en las VEs liberadas por adipocitos con hipertrofia lipídica en comparación con las VEs liberadas de adipocitos con resistencia a insulina.
11. Las proteínas TGFBI, mimecan y ceruloplasmina son características de las VEs liberadas por los depósitos de grasa visceral de donantes con obesidad en comparación

- con las liberadas por el tejido adiposo subcutáneo, que se caracterizan por una mayor presencia de las proteínas sintenina-1 y anexina 6.
12. La proteína TGBI se encuentra característicamente elevada en las VEs circulantes del plasma de obesos diabéticos, lo que sugiere una relación de esta proteína a nivel vesicular con la resistencia insulínica
 13. La proteína mimecan característica de la grasa visceral, se encuentra en una mayor ratio en las VEs circulantes de pacientes obesos, postulándose como un biomarcador vesicular de adiposidad central.
 14. La proteína UCP1 se identifica como un biomarcador de las VEs liberadas por el tejido adiposo pardo en condiciones de obesidad, a diferencia de la proteína ACLY (ATP-citrato sintasa), que caracteriza a las VEs liberadas por este mismo tejido en animales de peso normal.
 15. Las VEs liberadas por los adipocitos hipertrofiados, y con resistencia a insulina provocan alteraciones funcionales en células sanas promoviendo la diferenciación adipocitaria, la hipertrofia, y alterando rutas metabólicas implicadas en la señalización de la insulina que provoca un estado de resistencia insulínica, además de promover la inflamación de macrófagos.
 16. Las VEs liberadas por el tejido adiposo subcutáneo de personas con obesidad estimulan la proliferación de las células de mama tumorales, y de melanoma cutáneo durante las primeras 24 horas de incubación.

En resumen, las VEs liberadas por el tejido adiposo en el contexto de la obesidad se postulan como estructuras de comunicación intercelular muy sofisticadas y dinámicas, que además de tener capacidad funcional induciendo o exacerbando la patología, portan diferentes biomarcadores de esta enfermedad y sus comorbilidades. Dado que dichos biomarcadores vesiculares varían dependiendo de la localización anatómica, y del estado metabólico de la célula/tejido de origen, se posicionan como una herramienta útil para la biopsia líquida en la práctica clínica; así, los resultados de este trabajo de tesis postulan:

- a. Las VEs liberadas por el tejido adiposo son una fuente rica de biomarcadores que probablemente permitirá clasificar y monitorizar metabólicamente a las personas con obesidad, incluyendo el desarrollo temprano de comorbilidades como la inflamación sistémica, la resistencia a la insulina y la enfermedad del hígado graso.
- b. Los biomarcadores vesiculares podrían ser útiles para evaluar la eficacia de las intervenciones de tratamiento de la obesidad, incluidos los efectos beneficiosos de la dieta, ejercicio, fármacos o cirugía, permitiendo detectar aquellos pacientes resistentes a la pérdida de peso, y predecir los pacientes con alto riesgo de recaída.
- c. El análisis del contenido de las vesículas secretadas por el tejido adiposo podría suponer una fuente de dianas terapéuticas para futuros tratamientos, y para controlar el riesgo de obesidad y sus comorbilidades, así como realizar un tratamiento personalizado óptimo para cada paciente.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care* 2016;22:s176–85.
- [2] Hernández Á, Zomeño MD, Dégano IR, Pérez-Fernández S, Goday A, Vila J, et al. Excess weight in Spain: current situation, projections for 2030, and estimated direct extra cost for the Spanish Health System. *Rev Española Cardiol (English Ed)* 2019;72:916–24.
- [3] Mohammed MS, Sendra S, Lloret J, Bosch I. Systems and WBANs for controlling obesity. *J Healthc Eng* 2018:1564748.
- [4] 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 y Nutr* 2017;64(1):15–22.
- [5] Finkelstein EA, Khavjou OA, Thompson H, Trogdon JG, Pan L, Sherry B, et al. Obesity and severe obesity forecasts through 2030. *Am J Prev Med* 2012;42:563–70.
- [6] Di Cesare M, Sorić M, Bovet P, Miranda JJ, Bhutta Z, Stevens GA, et al. The epidemiological burden of obesity in childhood: A worldwide epidemic requiring urgent action. *BMC Med* 2019;17:212.
- [7] Pérez-Rodrigo C, Bartrina JA, Majem LS, Moreno B, Rubio AD. Epidemiology of obesity in Spain. Dietary guidelines and strategies for prevention. *Int J Vitam Nutr Res* 2006;76:163–71.
- [8] 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(6):579-587.
- [9] Arteaga-González IJ, Martín-Malagón AI, Ruiz de Adana JC, de la Cruz Vigo F, Torres-García AJ, Carrillo-Pallares AC. Bariatric surgery waiting lists in Spain. *Obes Surg* 2018;28:3992–6.
- [10] Andolfi C, Fisichella PM. Epidemiology of obesity and associated comorbidities. *J Laparoendosc Adv Surg Tech* 2018;28:919–24.
- [11] López De La Torre M, Bellido Guerrero D, Vidal Cortada J, Soto González A, García Malpartida K, Hernandez-Mijares A. Distribución de la circunferencia de la cintura y de la relación circunferencia de la cintura con respecto a la talla según la categoría del índice de masa corporal en los pacientes atendidos en consultas de endocrinología y nutrición. *Endocrinol y Nutr* 2010;57:479–85.
- [12] Xu W, Shubina M, Goldberg SI, Turchin A. Body mass index and all-cause mortality in patients with hypertension. *Obesity* 2015;23:1712–20.
- [13] Guglielmi V, Sbraccia P. Obesity phenotypes: Depot-differences in adipose tissue and their clinical implications. *Eat Weight Disord* 2018;23:3–14.
- [14] McNeely MJ, Boyko EJ, Shofer JB, Newell-Morris L, Leonetti DL, Fujimoto WY. Standard definitions of overweight and central adiposity for determining diabetes risk in Japanese Americans. *Am J Clin Nutr* 2001;74:101–7.
- [15] Jura M, Kozak LP. Obesity and related consequences to ageing. *Age (Omaha)* 2016;38

- (1):23.
- [16] Kokkoris P, Pi-Sunyer FX. Obesity and endocrine disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003;32:895–914.
- [17] Wasim M, Awan FR, Najam SS, Khan AR, Khan HN. Role of leptin deficiency, inefficiency, and leptin receptors in Obesity. *Biochem Genet* 2016;54:565–72.
- [18] Fawcett KA, Barroso I. The genetics of obesity: FTO leads the way. *Trends Genet* 2010;26:266–74.
- [19] Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN, Heindel JJ. Effects of endocrine disruptors on obesity. *Int J Androl* 2008;31:201–8.
- [20] Cena H, Chiovato L, Nappi RE. Obesity, polycystic ovary syndrome, and infertility: a new avenue for GLP-1 receptor agonists. *J Clin Endocrinol Metab* 2020;105:2695-2709.
- [21] Kerner W, Brückel J. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2014;122:384–6.
- [22] Wu H, Ballantyne CM. Metabolic inflammation and insulin resistance in Obesity. *Circ Res* 2020:1549–64.
- [23] Pedersen DJ, Guilherme A, Danai L V., Heyda L, Matevossian A, Cohen J, et al. A major role of insulin in promoting obesity-associated adipose tissue inflammation. *Mol Metab* 2015;4:507–18.
- [24] Zhang XQ, Xu CF, Yu CH, Chen WX, Li YM. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;20:1768–76.
- [25] Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev* 2007;87:507–20.
- [26] Rodríguez-Benot A, Gómez-Marqués G, Alonso-Hernández A, Bernal G, Bravo J, et al. Etiopatogenia de las alteraciones del metabolismo óseo y mineral del trasplante renal. *Nefrol Sup Ext* 2013;4:19–26.
- [27] Khavandi K, Khavandi A, Asghar O, Greenstein A, Withers S, Heagerty AM, et al. Diabetic cardiomyopathy - a distinct disease? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009;23:347–60.
- [28] Murugan AT, Sharma G. Obesity and respiratory diseases. *Chron Respir Dis* 2008;5:233–42.
- [29] Grewal G, Joshi GP. Obesity and obstructive sleep apnea in the ambulatory patient. *Anesthesiol Clin* 2019;37:215–24.
- [30] Thomas EL, Saeed N, Hajnal J V., Brynes A, Goldstone AP, Frost G, et al. Magnetic resonance imaging of total body fat. *J Appl Physiol* 1998;85:1778–85.
- [31] Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2548–56.
- [32] Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 2010;316:129–39.
- [33] Esteve Ràfols M. Tejido adiposo: Heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinol y Nutr* 2014;61:100–12.
- [34] Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cint S. White, brown and pink adipocytes: The extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol* 2014;170:159-71.
- [35] Chun K-H. Mouse model of the adipose organ: the heterogeneous anatomical characteristics. *Arch Pharm Res* 2021;44:857–75.
- [36] Scheja L, Heeren J. Metabolic interplay between white, beige, brown adipocytes and the liver. *J Hepatol* 2016;64:1176–86.

- [37] Scheja L, Heeren J. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nat Rev Endocrinol* 2019;15:507–24.
- [38] Stern JH, Rutkowski JM, Scherer PE. Adiponectin, leptin, and fatty acids in the maintenance of metabolic homeostasis through adipose tissue crosstalk. *Cell Metab* 2016;23:770–84.
- [39] Wasim M. Role of leptin in Obesity. *J Obes Weight Loss Ther* 2015;05:12–4.
- [40] Friedman JM. Leptin and the endocrine control of energy balance. *Nat Metab* 2019;1:754–64.
- [41] McGown C, Birerdinc A, Younossi ZM. Adipose tissue as an endocrine organ. *Clin Liver Dis* 2014;18:41–58.
- [42] Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: A growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12:722–34.
- [43] Yang W, Yuan W, Peng X, Wang M, Xiao J, Wu C, et al. PPAR γ /Nnat/NF- κ B axis involved in promoting effects of adiponectin on preadipocyte differentiation. *Mediators Inflamm* 2019;2019:5618023.
- [44] Yang W, Yang C, Luo J, Wei Y, Wang W, Zhong Y. Adiponectin promotes preadipocyte differentiation via the PPAR γ pathway. *Mol Med Rep* 2018;17:428–35.
- [45] Cinti S. The adipose organ at a glance. *DMM Dis Model Mech* 2012;5:588–94.
- [46] Herbst KL. Subcutaneous adipose tissue diseases: Dercum Disease, lipedema, familial multiple lipomatosis, and madelung disease. *Endotext* 2019;2000:1–40.
- [47] Gesta S, Blüher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, et al. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6676–81.
- [48] Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* 2010;11:11–8.
- [49] Roca-Rivada A, Belen Bravo S, Pérez-Sotelo D, Alonso J, Isabel Castro A, Baamonde I, et al. CILAIR-based secretome analysis of obese visceral and subcutaneous adipose tissues reveals distinctive ECM remodeling and inflammation mediators. *Sci Rep* 2015;5:12214.
- [50] McNamara JP, Huber K. Metabolic and endocrine role of adipose tissue during lactation. *Annu Rev Anim Biosci* 2018;6:177–95.
- [51] Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 2001;60:329–39.
- [52] Burhans MS, Hagman DK, Kuzma JN, Schmidt KA, Kratz M. Contribution of adipose tissue inflammation to the development of type 2 diabetes mellitus. *Compr Physiol* 2018;9:1.
- [53] Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2017;127:1–4.
- [54] Seravalle G, Grassi G. Obesity and hypertension. *Pharmacol Res* 2017;122:1–7.
- [55] Cinkajzlová A, Mráz M, Haluzík M. Adipose tissue immune cells in obesity, type 2 diabetes mellitus and cardiovascular diseases. *J Endocrinol* 2021;252:1–22.
- [56] Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: A primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1304–10.
- [57] Kuchay MS, Choudhary NS, Mishra SK. Pathophysiological mechanisms underlying MAFLD. *Diabetes Metab Syndr* 2020;14:1875–87.
- [58] Smith U. Abdominal obesity: A marker of ectopic fat accumulation. *J Clin Invest*

- 2015;125:1790–2.
- [59] Contreras C, Nogueiras R, Diéguez C, Rahmouni K, López M. Traveling from the hypothalamus to the adipose tissue: The thermogenic pathway. *Redox Biol* 2017;12:854–63.
- [60] Kajimura S, Spiegelman BM, Seale P. Brown and beige fat: Physiological roles beyond heat generation. *Cell Metab* 2015;22:546–59.
- [61] Singh R, Barrios A, Dirakvand G, Pervin S. Human brown adipose tissue and metabolic health: Potential for therapeutic avenues. *Cells* 2021;10:3030.
- [62] Hilton C, Karpe F, Pinnick KE. Role of developmental transcription factors in white, brown and beige adipose tissues. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2015;1851:686–96.
- [63] Gulyaeva O, Dempersmier J, Sul HS. Genetic and epigenetic control of adipose development. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2019;1864:3–12.
- [64] Villarroya F, Cereijo R, Gavaldà-Navarro A, Villarroya J, Giralt M. Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease. *J Intern Med* 2018;284:492–504.
- [65] Ali Khan A, Hansson J, Weber P, Foehr S, Krijgsveld J, Herzig S, et al. Comparative secretome analyses of primary murine white and brown adipocytes reveal novel adipokines. *Mol Cell Proteomics* 2018;17:2358–70.
- [66] Scheele C, Wolfrum C. Brown adipose crosstalk in tissue plasticity and human metabolism. *Endocr Rev* 2020;41:53–65.
- [67] C S, S N. Metabolic regulation and the anti-obesity perspectives of human brown fat. *Redox Biol* 2017;12:770–75.
- [68] Cypess AM, Kahn CR. Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010;17:143–9.
- [69] Kahn CR, Wang G, Lee KY. Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2019;129:3990–4000.
- [70] Thyagarajan B, Foster MT. Beiging of white adipose tissue as a therapeutic strategy for weight loss in humans. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2017;31(2).
- [71] Sanchez-Gurmaches J, Hung CM, Guertin DA. Emerging complexities in adipocyte origins and identity. *Trends Cell Biol* 2016;26:313–26.
- [72] Kaisanlahti A, Glumoff & T. Browning of white fat: agents and implications for beige adipose tissue to type 2 diabetes. *J Physiol Biochem* 2019;75:1–10.
- [73] Pilkington A-C, Paz HA, Wankhade UD. Adipose Tissue Identification and Marker Specificity-Overview. *Front Endocrinol* 2021;12:599134.
- [74] Ikeda K, Maretich P, Kajimura S. The common and distinct features of brown and beige adipocytes. *Trends Endocrinol Metab* 2018;29:191–200.
- [75] Pérez-Sotelo D, Roca-Rivada A, Baamonde I, Baltar J, Castro AI, Domínguez E, et al. Lack of adipocyte-Fndc5/Irisin expression and secretion reduces thermogenesis and enhances adipogenesis. *Sci Rep* 2017;7:1–15.
- [76] Cuevas-Ramos D, Mehta R, Aguilar-Salinas CA. Fibroblast growth factor 21 and browning of white adipose tissue. *Front Physiol* 2019;10:37.
- [77] Gavaldà-Navarro A, Villarroya J, Cereijo R, Giralt M, Villarroya F. The endocrine role of brown adipose tissue: An update on actors and actions. *Rev Endocr Metab Disord* 2022;23:31–41.
- [78] Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation 2008. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958–69.
- [79] Cai L, Wang Z, Ji A, Meyer JM, van der Westhuyzen DR. Scavenger receptor CD36

- expression contributes to adipose tissue inflammation and cell death in diet-induced obesity. *PLoS One* 2012;7: 36785.
- [80] Arner P, Spalding KL. Fat cell turnover in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;396:101-4.
- [81] Petrus P, Mejhert N, Corrales P, Lecoutre S, Li Q, Maldonado E, et al. Transforming growth factor- β 3 regulates adipocyte number in subcutaneous white adipose tissue. *Cell Rep* 2018;25:551-560.
- [82] Kramer AH, Joos-Vandewalle J, Edkins AL, Frost CL, Prinsloo E. Real-time monitoring of 3T3-L1 preadipocyte differentiation using a commercially available electric cell-substrate impedance sensor system. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;443:1245–50.
- [83] 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.
- [84] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
- [85] Geering B, Stoeckle C, Conus S, Simon HU. Living and dying for inflammation: Neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol* 2013;34:398–409.
- [86] Pearce EL, Pearce EJ. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity* 2013;38:633–43.
- [87] Watanabe Y, Nagai Y, Honda H, Okamoto N, Yanagibashi T, Ogasawara M, et al. Bidirectional crosstalk between neutrophils and adipocytes promotes adipose tissue inflammation. *FASEB J* 2019;33:11821–35.
- [88] Charrière G, Cousin B, Arnaud E, André M, Bacou F, Pénicaud L, et al. Preadipocyte conversion to macrophage: Evidence of plasticity. *J Biol Chem* 2003;278:9850–5.
- [89] Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Rep* 2014;6:13.
- [90] Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004;25:677–86.
- [91] Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, et al. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 2007;447:1116–20.
- [92] Coats BR, Schoenfelt KQ, Barbosa-Lorenzi VC, Peris E, Cui C, Hoffman A, et al. Metabolically Activated adipose tissue macrophages perform detrimental and beneficial functions during diet-induced obesity. *Cell Rep* 2017;20:3149–61.
- [93] Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007;117:175–84.
- [94] Caspar-Bauguil S, Cousin B, Galinier A, Segafredo C, Nibbelink M, André M, et al. Adipose tissues as an ancestral immune organ: Site-specific change in obesity. *FEBS Lett* 2005;579:3487–92.
- [95] Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 2009;15:921–9.
- [96] Palomer X, Pizarro-Delgado J, Barroso E, Vázquez-Carrera M. Palmitic and Oleic Acid: The yin and yang of fatty acids in type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 2018;29:178–90.
- [97] Cinkajzlová A, Lacinová Z, Kloučková J, Kaválková P, Trachta P, Kosák M, et al. An alternatively activated macrophage marker CD163 in severely obese patients: The influence of very low-calorie diet and bariatric surgery. *Physiol Res* 2017;66:641–52.

- [98] Bertolini F, Petit J-Y, Kolonin MG. Stem cells from adipose tissue and breast cancer: hype, risks and hope. *Br J Cancer* 2015;112:419–23.
- [99] Obradovic M, Sudar-Milovanovic E, Soskic S, Essack M, Arya S, Stewart AJ, et al. Leptin and Obesity: Role and clinical implication. *Front Endocrinol* 2021;12:585887.
- [100] Semple RK, Crowley VC, Sewter CP, Laudes M, Christodoulides C, Considine RV, Vidal-Puig A, O'Rahilly S. Expression of the thermogenic nuclear hormone receptor coactivator PGC-1alpha is reduced in the adipose tissue of morbidly obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28:176-9.
- [101] Acar MB, Ayaz-Güner S, Bernardo G Di, Güner H, Murat A, Peluso G, et al. Obesity induced by high-fat diet is associated with critical changes in biological and molecular functions of mesenchymal stromal cells present in visceral adipose tissue. *Aging* 2020;12:24894–913.
- [102] Van Heek M, Compton DS, France CF, Tedesco RP, Fawzi AB, Graziano MP, et al. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest* 1997;99:385–90.
- [103] Funcke JB, Scherer PE. Beyond adiponectin and leptin: Adipose tissue-derived mediators of inter-organ communication. *J Lipid Res* 2019;60:1648–97.
- [104] Achari AE, Jain SK. Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction. *Int J Mol Sci* 2017;18:1321.
- [105] Tumminia A, Vinciguerra F, Parisi M, Graziano M, Sciacca L, Baratta R, et al. Molecular sciences adipose tissue, obesity and adiponectin: Role in endocrine cancer risk. *Int J Mol Sci* 2019;20:2863.
- [106] Engin A, Engin A. Adiponectin-resistance in Obesity. *Adv Exp Med Biol* 2017;960:415-41.
- [107] Kennedy A, Martinez K, Chuang CC, Lapoint K, Mcintosh M. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: Mechanisms of action and implications. *J Nutr* 2009;139:1–4.
- [108] Díaz-Ruiz A, Guzmán-Ruiz R, Moreno NR, García-Rios A, Delgado-Casado N, Membrives A, et al. Proteasome dysfunction associated to oxidative stress and proteotoxicity in adipocytes compromises insulin sensitivity in human obesity. *Antioxidants Redox Signal* 2015;23:597–612.
- [109] Sadeghabadi ZA, Ziamajidi N, Abbasalipourkabar R, Mohseni R, Borzouei S. Palmitate-induced IL6 expression ameliorated by chicoric acid through AMPK and SIRT1-mediated pathway in the PBMCs of newly diagnosed type 2 diabetes patients and healthy subjects. *Cytokine* 2019;116:106–14.
- [110] Kranendonk MEG, Visseren FLJ, Van Herwaarden JA, Nolte-'t Hoen ENM, De Jager W, Wauben MHM, et al. Effect of extracellular vesicles of human adipose tissue on insulin signaling in liver and muscle cells. *Obesity* 2014;22:2216–23.
- [111] Huang-Doran I, Zhang CY, Vidal-Puig A. Extracellular Vesicles: Novel Mediators of Cell Communication In Metabolic Disease. *Trends Endocrinol Metab* 2017;28:3–18.
- [112] Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006;3-22.
- [113] Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018;7:1535750.
- [114] Russell AE, Sneider A, Witwer KW, Bergese P, Bhattacharyya SN, Cocks A, et al. Biological membranes in EV biogenesis, stability, uptake, and cargo transfer: an ISEV

- position paper arising from the ISEV membranes and EVs workshop. *J Extracell Vesicles* 2019;8:1684862.
- [115] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013;200:373–83.
- [116] Meldolesi J. Exosomes and ectosomes in intercellular communication. *Curr Biol* 2018;28:R435–44.
- [117] Abels ER, Breakefield XO. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. *Cell Mol Neurobiol* 2016;36:301.
- [118] Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol* 2013;113:1.
- [119] Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014;30:255–89.
- [120] Toribio V, Yáñez-Mó M. Tetraspanins interweave EV secretion, endosomal network dynamics and cellular metabolism. *Eur J Cell Biol* 2022;101:151229.
- [121] Mizenko RR, Brostoff T, Rojalin T, Koster HJ, Swindell HS, Leiserowitz GS, et al. Tetraspanins are unevenly distributed across single extracellular vesicles and bias sensitivity to multiplexed cancer biomarkers. *J Nanobiotechnology* 2021;19:250.
- [122] Teng F, Fussenegger M. Shedding light on extracellular vesicle biogenesis and bioengineering. *Adv Sci* 2020;8:2003505.
- [123] Pegtel DM, Gould SJ. Exosomes. *Annu Rev Biochem* 2019;88:487–514.
- [124] Colombo M, Moita C, Van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci* 2013;126:5553–65.
- [125] Hill CP, Babst M. Structure and function of the membrane deformation AAA ATPase Vps4. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2012;1823:172–81.
- [126] Andreu Z, Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol* 2014;5:442.
- [127] Abdullah M, Nakamura T, Ferdous T, Gao Y, Chen Y, Zou K, et al. Cholesterol Regulates Exosome Release in Cultured Astrocytes. *Front Immunol* 2021;12:4242.
- [128] Catalano M, O'Driscoll L. Inhibiting extracellular vesicles formation and release: a review of EV inhibitors. *J Extracell Vesicles* 2020;9:1703244.
- [129] Essandoh K, Yang L, Wang X, Huang W, Qin D, Hao J, et al. Blockade of exosome generation with GW4869 dampens the sepsis-induced inflammation and cardiac dysfunction. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2015;1852:2362–71.
- [130] van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L, Saftig P, et al. The tetraspanin CD63 regulates escrt-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell* 2011;21:708–21.
- [131] György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:2667–88.
- [132] Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci* 2016;113:E968-77.
- [133] Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci* 2018;75:193–208.
- [134] Webber JP, Spary LK, Sanders AJ, Chowdhury R, Jiang WG, Steadman R, et al. Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes.

- Oncogene 2015;34:319–33.
- [135] Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 2012;18:883–91.
- [136] Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:513–25.
- [137] Yu Z, Shi M, Stewart T, Fernagut PO, Huang Y, Tian C, et al. Reduced oligodendrocyte exosome secretion in multiple system atrophy involves SNARE dysfunction. *Brain* 2021;143:1780–97.
- [138] Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells* 2019;8:727.
- [139] Aharon A, Tamari T, Brenner B. Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. *Thromb Haemost* 2008;100:878–85.
- [140] Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol* 2009;19:1875–85.
- [141] Nabhan JF, Hu R, Oh RS, Cohen SN, Lu Q. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:4146–51.
- [142] Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002;2:569–79.
- [143] Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal* 2021;19:47.
- [144] Simpson RJ, Kalra H, Mathivanan S. ExoCarta as a resource for exosomal research. *J Extracell Vesicles* 2012;1.
- [145] Pathan M, Fonseka P, Chitti S V., Kang T, Sanwani R, Van Deun J, et al. Vesiclepedia 2019: A compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res* 2019;47:516–9.
- [146] Suárez H, Andreu Z, Mazzeo C, Toribio V, Pérez-Rivera AE, López-Martín S, et al. CD9 inhibition reveals a functional connection of extracellular vesicle secretion with mitophagy in melanoma cells. *J Extracell Vesicles* 2021;10:12082.
- [147] Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Sullivan MLG, Stolz DB, Papworth GD, et al. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 2004;104:3257–66.
- [148] Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, De Milito A, et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* 2009;284:34211–22.
- [149] Nazarenko I, Rupp AK, Altevogt P. Exosomes as a potential tool for a specific delivery of functional molecules. *Methods Mol Biol* 2013;1049:495–511.
- [150] Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: Trafficking, sorting, and function. *Genomics, Proteomics Bioinforma* 2015;13:17–24.
- [151] Ohno SI, Drummen GPC, Kuroda M. Focus on extracellular vesicles: Development of extracellular vesicle-based therapeutic systems. *Int J Mol Sci* 2016;17:172.
- [152] Samanta S, Rajasingh S, Drosos N, Zhou Z, Dawn B, Rajasingh J. Exosomes: new molecular targets of diseases. *Acta Pharmacol Sin* 2018;39:501–13.
- [153] Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in

- human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:5003–8.
- [154] Vickers KC, Remaley AT. Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication. *Curr Opin Lipidol* 2012;23:91–7.
- [155] Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R, Martínez MC. Microvesicles: intercellular vectors of biological messages. *Mol Interv* 2011;11:88–94.
- [156] Segura E, Nicco C, Lombard B, Véron P, Raposo G, Batteux F, et al. ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* 2005;106:216–23.
- [157] Barrès C, Blanc L, Bette-Bobillo P, André S, Mamoun R, Gabius HJ, et al. Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood* 2010;115:696–705.
- [158] Urabe F, Kosaka N, Ito K, Kimura T, Egawa S, Ochiya T. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *Am J Physiol - Cell Physiol* 2020;318:C29–39.
- [159] Barile L, Vassalli G. Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. *Pharmacol Ther* 2017;174:63–78.
- [160] Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan MLG, Karlsson JM, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 2012;119:756–66.
- [161] Joshi BS, de Beer MA, Giepmans BNG, Zuhorn IS. Endocytosis of extracellular vesicles and release of their cargo from endosomes. *ACS Nano* 2020;14:4444–55.
- [162] Costa Verdera H, Gitz-Francois JJ, Schiffelers RM, Vader P. Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *J Control Release* 2017;266:100–8.
- [163] Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 2014;3:24641.
- [164] Fernanda Altei W, Cruz Pachane B, Karina dos Santos P, Sobreiro Selistre de Araújo H, Altei WF, Pachane BC, et al. Extracellular vesicles and integrins: partners in cancer progression. *Role Exosomes Biol Commun Syst* 2021:293–310.
- [165] Nogués L, Benito-Martin A, Hergueta-Redondo M, Peinado H. The influence of tumour-derived extracellular vesicles on local and distal metastatic dissemination. *Mol Aspects Med* 2018;60:15–26.
- [166] Koumangoye RB, Sakwe AM, Goodwin JS, Patel T, Ochieng J. Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading. *PLoS One* 2011;6:24234.
- [167] Phuyal S, Hessvik NP, Skotland T, Sandvig K, Llorente A. Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins. *FEBS J* 2014;281:2214–27.
- [168] Qin J, Xu Q. Functions and applications of exosomes. *Acta Pol Pharm - Drug Res* 2014;71:537–43.
- [169] Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, Briggs HA, Vojtech LN, Hughes SM, et al. Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc Natl Acad Sci* 2014;111:14888–93.
- [170] Ratajczak MZ, Ratajczak J. Horizontal transfer of RNA and proteins between cells by extracellular microvesicles: 14 years later. *Clin Transl Med* 2016;5:7.
- [171] Piffoux M, Volatron J, Silva AKA, Gazeau F. Thinking quantitatively of rna-based information transfer via extracellular vesicles: Lessons to learn for the design of rna-loaded EVs. *Pharmaceutics* 2021;13:1931.
- [172] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes.

- Science 2020;367:6977.
- [173] Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006;20:847–56.
- [174] Williams AM, Dennahy IS, Bhatti UF, Halaweish I, Xiong Y, Chang P, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes provide neuroprotection and improve long-term neurologic outcomes in a swine model of traumatic brain injury and hemorrhagic shock. *J Neurotrauma* 2019;36:54-60.
- [175] Ciferri MC, Quarto R, Tasso R. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic tools: From pre-clinical to clinical applications. *Biology (Basel)* 2021;10:359.
- [176] Camino T, Lago-Baameiro N, Martis-Sueiro A, Couto I, Santos F, Baltar J, et al. Deciphering adipose tissue extracellular vesicles protein cargo and its role in obesity. *Int J Mol Sci* 2020;21:1–16.
- [177] Simeone P, Bologna G, Lanuti P, Pierdomenico L, Guagnano MT, Pieragostino D, et al. Extracellular vesicles as signaling mediators and disease biomarkers across biological barriers. *Int J Mol Sci* 2020;21:2514.
- [178] Qian JY, Tan YL, Zhang Y, Yang YF, Li XQ. Prognostic value of glypican-1 for patients with advanced pancreatic cancer following regional intra-arterial chemotherapy. *Oncol Lett* 2018;16:1253–8.
- [179] Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, Honma Y, Yamada Y, Furuta K, et al. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PLoS One* 2014;9: 92921.
- [180] Guan M, Chen X, Ma Y, Tang L, Guan L, Ren X, et al. MDA-9 and GRP78 as potential diagnostic biomarkers for early detection of melanoma metastasis. *Tumor Biol* 2015;36:2973–82.
- [181] Wei F, Cao C, Xu X, Wang J. Diverse functions of miR-373 in cancer. *J Transl Med* 2015;13:162.
- [182] Shah R, Patel T, Freedman JE. Circulating extracellular vesicles in human disease. *N Engl J Med* 2018;379:958–66.
- [183] Thietart S, Rautou PE. Extracellular vesicles as biomarkers in liver diseases: A clinician’s point of view. *J Hepatol* 2020;73:1507–25.
- [184] Hogan MC, Bakeberg JL, Gainullin VG, Irazabal M V., Harmon AJ, Lieske JC, et al. Identification of biomarkers for PKD1 using urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol* 2015;26:1661–70.
- [185] de la Torre Gomez C, Goreham R V., Bech Serra JJ, Nann T, Kussmann M. “Exosomics”-A review of biophysics, biology and biochemistry of exosomes with a focus on human breast milk. *Front Genet* 2018;9:92.
- [186] Lee S, Mankhong S, Kang JH. Extracellular vesicle as a source of alzheimer’s biomarkers: Opportunities and challenges. *Int J Mol Sci* 2019;20:1728.
- [187] Logozzi M, De Milito A, Lugini L, Borghi M, Calabrò L, Spada M, et al. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* 2009;4:5219.
- [188] Stam J, Bartel S, Bischoff R, Wolters JC. Isolation of extracellular vesicles with combined enrichment methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2021;1169:122604.
- [189] Thierry, Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants. *Curr Protoc Cell Biol* 2006;3:1–29.
- [190] Royo F, Théry C, Falcón-Pérez JM, Nieuwland R, Witwer KW. Methods for separation

- and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey performed by the isev rigor and standardization subcommittee. *Cells* 2020;9:1955.
- [191] Witwer KW, Goberdhan DCI, O’Driscoll L, Théry C, Welsh JA, Blenkiron C, et al. Updating MISEV: Evolving the minimal requirements for studies of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2021;10:12182.
- [192] Zhao R, Zhao T, He Z, Cai R, Pang W. Composition, isolation, identification and function of adipose tissue-derived exosomes. *Adipocyte* 2021;10:587–604.
- [193] Lobb RJ, Becker M, Wen SW, Wong CSF, Wiegman AP, Leimgruber A, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles* 2015;4:1–11.
- [194] Xu R, Greening DW, Zhu H, Takahashi N, Simpson RJ. Extracellular vesicle isolation and characterization : toward clinical application. *Clin Invest* 2016;126:1152–62.
- [195] Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* 2017;7:789–804.
- [196] Sidhom K, Obi PO, Saleem A. A review of exosomal isolation methods: Is size exclusion chromatography the best option? *Int J Mol Sci* 2020;21:1–19.
- [197] Shtam T, Evtushenko V, Samsonov R, Zabrodskaia Y, Kamyshinsky R, Zabegina L, et al. Evaluation of immune and chemical precipitation methods for plasma exosome isolation. *PLoS One* 2020;15:e0242732.
- [198] Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov A V., Laktionov PP. Isolation of extracellular vesicles: General methodologies and latest trends. *Biomed Res Int* 2018;2018:8545347.
- [199] Huang Z, Xu A. Adipose extracellular vesicles in intercellular and inter-organ crosstalk in metabolic health and diseases. *Front Immunol* 2021;12:608680.
- [200] Kranendonk MEG, Visseren FLJ, Van Balkom BWM, Nolte-T Hoen ENM, Van Herwaarden JA, De Jager W, et al. Human adipocyte extracellular vesicles in reciprocal signaling between adipocytes and macrophages. *Obesity* 2014;22:1296–308.
- [201] Deng Z Bin, Poliakov A, Hardy RW, Clements R, Liu C, Liu Y, et al. Adipose tissue exosome-like vesicles mediate activation of macrophage-induced insulin resistance. *Diabetes* 2009;58:2498–505.
- [202] Koeck ES, Iordanskaia T, Sevilla S, Ferrante SC, Hubal MJ, Freishtat RJ, et al. Adipocyte exosomes induce transforming growth factor beta pathway dysregulation in hepatocytes: a novel paradigm for obesity-related liver disease. *J Surg Res* 2014;192:268–75.
- [203] Eguchi A, Mulya A, Lazic M, Radhakrishnan D, Berk MP, Povero D, et al. Microparticles Release by Adipocytes Act as “Find-Me” Signals to Promote Macrophage Migration. *PLoS One* 2015;10:e0123110.
- [204] Gao J, Li X, Wang Y, Cao Y, Yao D, Sun L, et al. Adipocyte-derived extracellular vesicles modulate appetite and weight through mTOR signalling in the hypothalamus. *Acta Physiol* 2020;228:e13339.
- [205] Lazar I, Clement E, Dauvillier S, Milhas D, Ducoux-Petit M, LeGonidec S, et al. Adipocyte exosomes promote melanoma aggressiveness through fatty acid oxidation: A novel mechanism linking obesity and cancer. *Cancer Res* 2016;76:4051–7.
- [206] Chen Y, Buyel JJ, Hanssen MJW, Siegel F, Pan R, Naumann J, et al. Exosomal microRNA miR-92a concentration in serum reflects human brown fat activity. *Nat Commun* 2016 71 2016;7:1–9.
- [207] Booth A, Magnuson A, Foster M. Detrimental and protective fat: Body fat distribution and its relation to metabolic disease. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2014;17:13–27.
- [208] Ruiz-Ojeda FJ, Méndez-Gutiérrez A, Aguilera CM, Plaza-Díaz J. Extracellular matrix

- remodeling of adipose tissue in obesity and metabolic diseases. *Int J Mol Sci* 2019;20:4888.
- [209] Rome S, Blandin A, Lay S Le. Adipocyte-derived extracellular vesicles: State of the art. *Int J Mol Sci* 2021;22:1–19.
- [210] Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, Konishi M, Sakaguchi M, Wolfrum C, et al. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature* 2017;542:450–5.
- [211] Meng Y, Eirin A, Zhu XY, O'Brien DR, Lerman A, Van Wijnen AJ, et al. The metabolic syndrome modifies the mRNA expression profile of extracellular vesicles derived from porcine mesenchymal stem cells. *Diabetol Metab Syndr* 2018;10:58.
- [212] Rosina M, Ceci V, Turchi R, Chuan L, Borcharding N, Sciarretta F, et al. Ejection of damaged mitochondria and their removal by macrophages ensure efficient thermogenesis in brown adipose tissue. *Cell Metab* 2022;34:533.
- [213] Eirin A, Zhu XY, Puranik AS, Woollard JR, Tang H, Dasari S, et al. Comparative proteomic analysis of extracellular vesicles isolated from porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Sci Rep* 2016;6:36120.
- [214] Jayabalan N, Lai A, Ormazabal V, Adam S, Guanzon D, Palma C, et al. Adipose tissue exosomal proteomic profile reveals a role on placenta glucose metabolism in gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;104:1735–52.
- [215] Durcin M, Fleury A, Taillebois E, Hilairet G, Krupova Z, Henry C, et al. Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicle subtypes identifies distinct protein and lipid signatures for large and small extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2017;6:1305677.
- [216] Lee JE, Moon PG, Lee IK, Baek MC. Proteomic Analysis of extracellular vesicles released by adipocytes of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Protein J* 2015;34:220–35.
- [217] Xing X, Han S, Cheng G, Ni Y, Li Z, Li Z. Proteomic analysis of exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells: A novel therapeutic strategy for tissue injury. *Biomed Res Int* 2020;2020: 6094562.
- [218] Zhang Y, Yu M, Dong J, Wu Y, Tian W. Identification of novel adipokines through proteomic profiling of small extracellular vesicles derived from adipose tissue. *J Proteome Res* 2020;19:3130–42.
- [219] Kobayashi Y, Eguchi A, Tempaku M, Honda T, Togashi K, Iwasa M, et al. Circulating extracellular vesicles are associated with lipid and insulin metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2018;315:E574–82.
- [220] Amosse J, Durcin M, Mallocci M, Vergori L, Fleury A, Gagnadoux F, et al. Phenotyping of circulating extracellular vesicles (EVs) in obesity identifies large EVs as functional conveyors of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Mol Metab* 2018;18:134–42.
- [221] Aryani A, Denecke B. Exosomes as a nanodelivery system: a Key to the future of neuromedicine? *Mol Neurobiol* 2016;53:818–34.
- [222] Eguchi A, Lazic M, Armando AM, Phillips SA, Katebian R, Maraka S, et al. Circulating adipocyte-derived extracellular vesicles are novel markers of metabolic stress. *J Mol Med* 2016;94:1241–53.
- [223] Kim Y, Kim OK. Potential roles of adipocyte extracellular vesicle-derived mirnas in obesity-mediated insulin resistance. *Adv Nutr* 2021;12:566–74.
- [224] Ogawa R, Tanaka C, Sato M, Nagasaki H, Sugimura K, Okumura K, et al. Adipocyte-derived microvesicles contain RNA that is transported into macrophages and might be secreted into blood circulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;398:723–9.

- [225] Zhang Y, Mei H, Chang X, Chen F, Zhu Y, Han X. Adipocyte-derived microvesicles from obese mice induce M1 macrophage phenotype through secreted miR-155. *J Mol Cell Biol* 2016;8:505–17.
- [226] Phoonsawat W, Aoki-Yoshida A, Tsuruta T, Sonoyama K. Adiponectin is partially associated with exosomes in mouse serum. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;448:261–6.
- [227] Connolly KD, Wadey RM, Mathew D, Johnson E, Rees DA, James PE. Evidence for adipocyte-derived extracellular vesicles in the human circulation. *Endocrinology* 2018;159:3259–67.
- [228] Kranendonk MEG, de Kleijn DPV, Kalkhoven E, Kanhai DA, Uiterwaal CSPM, van der Graaf Y, et al. Extracellular vesicle markers in relation to obesity and metabolic complications in patients with manifest cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol* 2014;13:37.
- [229] Witezak JK, Min T, Prior SL, Stephens JW, James PE, Rees A. Bariatric surgery is accompanied by changes in extracellular vesicle-associated and plasma fatty acid binding protein 4. *Obes Surg* 2018;28:767–74.
- [230] Zhang Y, Yu M, Dai M, Chen C, Tang Q, Jing W, et al. miR-450a-5p within rat adipose tissue exosome-like vesicles promotes adipogenic differentiation by targeting WISP2. *J Cell Sci* 2017;130:1158–68.
- [231] Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:9607–11.
- [232] Kim JI, Huh JY, Sohn JH, Choe SS, Lee YS, Lim CY, et al. Lipid-overloaded enlarged adipocytes provoke insulin resistance independent of inflammation. *Mol Cell Biol* 2015;35:1686.
- [233] Malodobra-Mazur M, Cierzniak A, Dobosz T. Oleic acid influences the adipogenesis of 3T3-L1 cells via DNA Methylation and may predispose to obesity and obesity-related disorders. *Lipids Health Dis* 2019;18:230.
- [234] Renström F, Burén J, Svensson M, Eriksson JW. Insulin resistance induced by high glucose and high insulin precedes insulin receptor substrate 1 protein depletion in human adipocytes. *Metabolism* 2007;56:190–8.
- [235] Kraus NA, Ehebauer F, Zapp B, Rudolphi B, Kraus BJ, Kraus D. Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture. *Adipocyte* 2016;5:351.
- [236] Shen L, Hillebrand A, Wang DQH, Liu M. Isolation and Primary culture of rat hepatic cells. *J Vis Exp* 2012;64:3917.
- [237] Rodríguez-Suárez E, Gonzalez E, Hughes C, Conde-Vancells J, Rudella A, Royo F, et al. Quantitative proteomic analysis of hepatocyte-secreted extracellular vesicles reveals candidate markers for liver toxicity. *J Proteomics* 2014;103:227–40.
- [238] Alvarez-Llamas G, Szalowska E, de Vries MP, Weening D, Landman K, Hoek A, et al. Characterization of the human visceral adipose tissue secretome. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:589–600.
- [239] Pardo M, Roca-Rivada A, Seoane LM, Casanueva FF. Obesidomics: Contribution of adipose tissue secretome analysis to obesity research. *Endocrine* 2012;41:374–83.
- [240] Roca-Rivada A, Alonso J, Al-Massadi O, Castelao C, Peinado JR, Seoane LM, et al. Secretome analysis of rat adipose tissues shows location-specific roles for each depot type. *J Proteomics* 2011;74:1068–79.
- [241] Hoover BM, Murphy RM. Evaluation of nanoparticle tracking analysis for the detection of rod-shaped particles and protein aggregates. *J Pharm Sci* 2020;109:452–63.
- [242] Itabe H, Yamaguchi T, Nimura S, Sasabe N. Perilipins: a diversity of intracellular lipid

- droplet proteins. *Lipids Health Dis* 2017;16:83.
- [243] Olson BJSC. Assays for determination of protein concentration. *Curr Protoc Pharmacol* 2016;73:A.3A.1-A.3A.32.
- [244] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Jensen ON, Podtelejnikov A V., Neubauer G, et al. A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone. *Biochem Soc Trans* 1996;24:893–6.
- [245] Shilov I V., Seymour SL, Patel AA, Loboda A, Tang WH, Keating SP, et al. The paragon algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:1638–55.
- [246] Shilov I V., Seymour SL, Patel AA, Loboda A, Tang WH, Keating SP, et al. The paragon algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:1638–55.
- [247] Meyer JG, Schilling B. Clinical applications of quantitative proteomics using targeted and untargeted data-independent acquisition techniques. *Expert Rev Proteomics* 2017;14:419–29.
- [248] Pathan M, Keerthikumar S, Ang CS, Gangoda L, Quek CYJ, Williamson NA, et al. FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics* 2015;15:2597–601.
- [249] Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD. Large-scale gene function analysis with the panther classification system. *Nat Protoc* 2013;8:1551–66.
- [250] Fabregat A, Sidiropoulos K, Garapati P, Gillespie M, Hausmann K, Haw R, et al. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 2016;44:D481–7.
- [251] Bird C, Kirstein S. Real-time, label-free monitoring of cellular invasion and migration with the xCELLigence system. *Nat Methods* 2009;6:5–7
- [252] Llorente A, Skotland T, Sylvänne T, Kauhanen D, Róg T, Orłowski A, et al. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2013;1831:1302–9.
- [253] Tamara C, Nerea L-B, Belén B, Aurelio S, Iván C, Fernando S, et al. Vesicles Shed by pathological murine adipocytes spread pathology: Characterization and functional role of insulin resistant/hypertrophied adiposomes. *Int J Mol Sci* 2020;21:2252.
- [254] Camino T, Lago-Baameiro N, Bravo SB, Molares-Vila A, Sueiro A, Couto I, et al. Human obese white adipose tissue sheds depot-specific extracellular vesicles and reveals candidate biomarkers for monitoring obesity and its comorbidities. *Transl Res* 2022;239:85–102.
- [255] Li CJ, Fang QH, Liu ML, Lin JN. Current understanding of the role of adipose-derived extracellular vesicles in metabolic homeostasis and diseases: Communication from the distance between cells/tissues. *Theranostics* 2020;10:7422.
- [256] Pérez-Rodrigo C, Hervás Bárbara G, Gianzo Citores M, Aranceta-Bartrina J. Prevalencia de obesidad y factores de riesgo cardiovascular asociados en la población general española: estudio ENPE. *Rev Española Cardiol* 2022;75:232–41.
- [257] Pérez-Ríos M, Santiago-Pérez MI, Leis R, Martínez A, Malvar A, Hervada X, et al. Exceso ponderal y obesidad abdominal en niños y adolescentes gallegos. *An Pediatría* 2018;89:302–8.
- [258] Akbar N, Azzimato V, Choudhury RP, Aouadi M. Extracellular vesicles in metabolic disease. *Diabetologia* 2019;62:2179–87.
- [259] Gao X, Salomon C, Freeman DJ. Extracellular vesicles from adipose tissue-A potential

- role in obesity and type 2 diabetes? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017;8:202.
- [260] Datta R, Podolsky MJ, Atabai K. Fat fibrosis: friend or foe? *JCI Insight* 2018;3:122289.
- [261] Franquesa M, Hoogduijn MJ, Ripoll E, Luk F, Salih M, Betjes MGH, et al. Update on controls for isolation and quantification methodology of extracellular vesicles derived from adipose tissue mesenchymal stem cells. *Front Immunol* 2014;5:525.
- [262] Jeurissen S, Vergauwen G, Van Deun J, Lapeire L, Depoorter V, Miinalainen I, et al. The isolation of morphologically intact and biologically active extracellular vesicles from the secretome of cancer-associated adipose tissue. *Cell Adhes Migr* 2017;11:196–204.
- [263] Connolly KD, Guschina IA, Yeung V, Clayton A, Shazli Draman M, Von Ruhland C, et al. Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicles released pre- and post-adipogenesis. *J Extracell Vesicles* 2015;4:1–10.
- [264] Bachurski D, Schuldner M, Nguyen PH, Malz A, Reiners KS, Grenzi PC, et al. Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis – An accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView. *J Extracell Vesicles* 2019;8:1596016.
- [265] Hartwig S, De Filippo E, Göddeke S, Knebel B, Kotzka J, Al-Hasani H, et al. Exosomal proteins constitute an essential part of the human adipose tissue secretome. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 2019;1867:140172.
- [266] Pietrani NT, Ferreira CN, Rodrigues KF, Perucci LO, Carneiro FS, Bosco AA, et al. Proresolving protein Annexin A1: The role in type 2 diabetes mellitus and obesity. *Biomed Pharmacother* 2018;103:482–9.
- [267] Pessoa Rodrigues C, Chatterjee A, Wiese M, Stehle T, Szymanski W, Shvedunova M, et al. Histone H4 lysine 16 acetylation controls central carbon metabolism and diet-induced obesity in mice. *Nat Commun* 2021;12:6212.
- [268] Crewe C, Joffin N, Rutkowski JM, Kim M, Zhang F, Towler DA, et al. An endothelial-to-adipocyte extracellular vesicle axis governed by metabolic state. *Cell* 2018;175:695–708.
- [269] Smith CE, Ordovás JM. Update on perilipin polymorphisms and obesity. *Nutr Rev* 2012;70:611–21.
- [270] Yllmaz SG, Bozkurt H, Ndadza A, Thomford NE, Karaođlan M, Keskin M, et al. Childhood obesity risk in relationship to perilipin 1 (PLIN1) gene regulation by circulating microRNAs. *OMICS* 2020;24:43–50.
- [271] Nwosu ZC, Ebert MP, Dooley S, Meyer C. Caveolin-1 in the regulation of cell metabolism: a cancer perspective. *Mol Cancer* 2016;15:71.
- [272] Prentice KJ, Saksi J, Hotamisligil GS. Adipokine FABP4 integrates energy stores and counterregulatory metabolic responses. *J Lipid Res* 2019;60:734–40.
- [273] Blüher M, Klötting N, Wueest S, Schoenle EJ, Schön MR, Dietrich A, et al. Fas and FasL expression in human adipose tissue is related to obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E36–44.
- [274] Zhang H-G, Liu C, Su K, Yu S, Zhang L, Zhang S, et al. A membrane form of TNF- α presented by exosomes delays t cell activation-induced cell death. *J Immunol* 2006;176:7385–93.
- [275] Lin D, Chun TH, Kang L. Adipose extracellular matrix remodelling in obesity and insulin resistance. *Biochem Pharmacol* 2016;119:8–16.
- [276] Kim J, Lee SK, Shin JM, Jeoun UW, Jang YJ, Park HS, et al. Enhanced biglycan gene expression in the adipose tissues of obese women and its association with obesity-related genes and metabolic parameters. *Sci Rep* 2016;6:30609.

- [277] Chrysovergis K, Wang X, Kosak J, Lee SH, Kim JS, Foley JF, et al. NAG-1/GDF-15 prevents obesity by increasing thermogenesis, lipolysis and oxidative metabolism. *Int J Obes* 2014;38:1555–64.
- [278] Talukdar S, Oh DY, Bandyopadhyay G, Li D, Xu J, McNelis J, et al. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med* 2012;18:1407–12.
- [279] Blanc L, Vidal M. New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion. *Small GTPases* 2018;9:95–106.
- [280] Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:911–9.
- [281] Zhu G, Ye R, Jung DY, Barron E, Friedline RH, Benoit VM, et al. GRP78 plays an essential role in adipogenesis and postnatal growth in mice. *FASEB J* 2013;27:955–64.
- [282] Moreno-Castellanos N, Rodríguez A, Rabanal-Ruiz Y, Fernández-Vega A, López-Miranda J, Vázquez-Martínez R, et al. The cytoskeletal protein septin 11 is associated with human obesity and is involved in adipocyte lipid storage and metabolism. *Diabetologia* 2017;60:324–35.
- [283] Lamers D, Famulla S, Wronkowitz N, Hartwig S, Lehr S, Ouwens DM, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes* 2011;60:1917–25.
- [284] Lancha A, López-Garrido S, Rodríguez A, Catalán V, Ramírez B, Valentí V, et al. Expression of syntaxin 8 in visceral adipose tissue is increased in obese patients with type 2 diabetes and related to markers of insulin resistance and inflammation. *Arch Med Res* 2015;46:47–53.
- [285] Correia MLG, Haynes WG. A role for plasminogen activator inhibitor-1 in obesity: From pie to PAI? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2183–5.
- [286] Cruz MM, Simão JJ, de Sá RDCC, Farias TSM, da Silva VS, Abdala F, et al. Palmitoleic acid decreases non-alcoholic hepatic steatosis and increases lipogenesis and fatty acid oxidation in adipose tissue from obese mice. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:537061.
- [287] Cao HM, Ye XP, Ma JH, Jiang H, Li SX, Li RY, et al. Mimecan, a hormone abundantly expressed in adipose tissue, reduced food intake independently of leptin signaling. *EBioMedicine* 2015;2:1718–24.
- [288] Kim OY, Shin MJ, Moon J, Chung JH. Plasma ceruloplasmin as a biomarker for obesity: A proteomic approach. *Clin Biochem* 2011;44:351–6.
- [289] Arner E, Forrest ARR, Ehrlund A, Mejhert N, Itoh M, Kawaji H, et al. Ceruloplasmin is a novel adipokine which is overexpressed in adipose tissue of obese subjects and in obesity-associated cancer cells. *PLoS One* 2014;9:e80274.
- [290] Hanssen E, Reinboth B, Gibson MA. Covalent and non-covalent interactions of β 1g-h3 with collagen VI: β 1g-h3 is covalently attached to the amino-terminal region of collagen VI in tissue microfibrils. *J Biol Chem* 2003;278:24334–41.
- [291] Fain JN, Tichansky DS, Madan AK. Transforming Growth Factor β 1 release by human adipose tissue is enhanced in obesity. *Metabolism* 2005;54:1546–51.
- [292] Shin JH, Kim IY, Kim YN, Shin SM, Roh KJ, Lee SH, et al. Obesity resistance and enhanced insulin sensitivity in *Ahnak*^{-/-} mice fed a high fat diet are related to impaired adipogenesis and increased energy expenditure. *PLoS One* 2015;10:e0139720.
- [293] Curat CA, Wegner V, Sengenès C, Miranville A, Tonus C, Busse R, et al. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia* 2006;49:744–7.

- [294] Kim SY, Kim I, Cho W, Oh GT, Park YM. Vimentin deficiency prevents high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Diabetes Metab J* 2021;45:97–108.
- [295] Kim C-S, Park H-S, Kawada T, Kim J-H, Lim D, Hubbard NE, et al. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int J Obes* 2006;30:1347–55.
- [296] Verboven K, Wouters K, Gaens K, Hansen D, Bijnen M, Wetzels S, et al. Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese humans. *Sci Rep* 2018;8:4677.
- [297] Guo H, Qiu X, Deis J, Lin TY, Chen X. Pentraxin 3 deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced inflammation in adipose tissue. *Int J Obes* 2020;44:525–38.
- [298] Guillén MI, Platas J, Pérez del Caz MD, Mirabet V, Alcaraz MJ. Paracrine anti-inflammatory effects of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in human monocytes. *Front Physiol* 2018;9:661.
- [299] Fries E, Kaczmarczyk A. Inter- α -inhibitor, hyaluronan and inflammation. *Acta Biochim Pol* 2003;50:735–42.
- [300] Araujo TF, Cordeiro A V., Vasconcelos DAA, Vitzel KF, Silva VRR. The role of cathepsin B in autophagy during obesity: A systematic review. *Life Sci* 2018;209:274–81.
- [301] Zeyda M, Gollinger K, Todoric J, Kiefer FW, Keck M, Aszmann O, et al. Osteopontin is an activator of human adipose tissue macrophages and directly affects adipocyte function. *Endocrinology* 2011;152:2219–27.
- [302] Kennedy DJ, Kuchibhotla S, Westfall KM, Silverstein RL, Morton RE, Febbraio M. A CD36-dependent pathway enhances macrophage and adipose tissue inflammation and impairs insulin signalling. *Cardiovasc Res* 2011;89:604–13.
- [303] Badeanlou L, Furlan-Freguia C, Yang G, Ruf W, Samad F. Tissue factor-protease-activated receptor 2 signaling promotes diet-induced obesity and adipose inflammation. *Nat Med* 2011;17:1490–7.
- [304] Kim JM, Jang HJ, Choi SY, Park SA, Kim IS, Yang YR, et al. DJ-1 contributes to adipogenesis and obesity-induced inflammation. *Sci Rep* 2014;4:4805.
- [305] Li X, Zhao Y, Chen C, Yang L, Lee H, Wang Z, et al. Critical role of matrix metalloproteinase 14 in adipose tissue remodeling during obesity. *Mol Cell Biol* 2020;40:e00564-19
- [306] Derosa G, Ferrari I, D'Angelo A, Tinelli C, Salvadeo SAT, Ciccarelli L, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 levels in obese patients. *Endothel J Endothel Cell Res* 2008;15:219–24.
- [307] Mazar R, Friedmann-Morvinski D, Alsaigh T, Kleinfeld O, Kistler EB, Rousso-Noori L, et al. Cleavage of the leptin receptor by matrix metalloproteinase-2 promotes leptin resistance and obesity in mice. *Sci Transl Med* 2018;10:6324.
- [308] Villarroya F, Gavaldà-Navarro A, Peyrou M, Villarroya J, Giralt M. Brown adipokines. *Handb Exp Pharmacol* 2019;251:239–56.
- [309] Villarroya J, Cereijo R, Gavaldà-Navarro A, Peyrou M, Giralt M, Villarroya F. New insights into the secretory functions of brown adipose tissue. *J Endocrinol* 2019;243(2):R19-R27.
- [310] Deshmukh AS, Peijs L, Beaudry JL, Jespersen NZ, Nielsen CH, Ma T, et al. Proteomics-based comparative mapping of the secretomes of human brown and white adipocytes reveals EPDR1 as a novel batokine. *Cell Metab* 2019;30:963-975.
- [311] Goody D, Pfeifer A. BAT exosomes: Metabolic crosstalk with other organs and biomarkers for BAT activity. *Handb. Exp. Pharmacol* 2019;251:337–46.

- [312] Kariba Y, Yoshizawa T, Sato Y, Tsuyama T, Araki E, Yamagata K. Brown adipocyte-derived exosomal miR-132-3p suppress hepatic Srebf1 expression and thereby attenuate expression of lipogenic genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;530:500–7.
- [313] Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 Ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* 2009;9:203–9.
- [314] Alcalá M, Calderon-Dominguez M, Bustos E, Ramos P, Casals N, Serra D, et al. Increased inflammation, oxidative stress and mitochondrial respiration in brown adipose tissue from obese mice. *Sci Reports* 2017 71 2017;7:1–12.
- [315] Lim J, Park HS, Kim J, Jang YJ, Kim JH, Lee YJ, et al. Depot-specific UCP1 expression in human white adipose tissue and its association with obesity-related markers. *Int J Obes (Lond)* 2020;44:697–706.
- [316] Boll M, Weber LWD, Stampfl A. Nutritional regulation of the activities of lipogenic enzymes of rat liver and brown adipose tissue. *Z Naturforsch C* 1996;51:859–69.
- [317] Peng H, Mu P, Li H, Lin S, Lin C, Lin K, et al. Caveolin-1 is essential for the improvement of insulin sensitivity through AKT activation during glargine treatment on diabetic mice. *J Diabetes Res* 2021;2021:9943344.
- [318] Fernández-Real JM, Catalán V, Moreno-Navarrete JM, Gómez-Ambrosi J, Ortega FJ, Rodríguez-Hermosa JJ, et al. Study of caveolin-1 gene expression in whole adipose tissue and its subfractions and during differentiation of human adipocytes. *Nutr Metab* 2010;7:20.
- [319] Bedi O, Aggarwal S, Trehanpati N, Ramakrishna G, Krishan P. Molecular and pathological events involved in the pathogenesis of diabetes-associated Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Exp Hepatol* 2019;9:607–18.
- [320] Bolsoni-Lopes A, Festuccia WT, Farias TSM, Chimin P, Torres-Leal FL, Derogis PBM, et al. Palmitoleic acid (n-7) increases white adipocyte lipolysis and lipase content in a PPAR α -dependent manner. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 2013;305:E1093-102.
- [321] Cruz MM, Lopes AB, Crisma AR, De Sá RCC, Kuwabara WMT, Curi R, et al. Palmitoleic acid (16:1n7) increases oxygen consumption, fatty acid oxidation and ATP content in white adipocytes. *Lipids Health Dis* 2018;17:55.
- [322] Hosseini Khorami SA, Mutalib MSA, Feili Shiraz M, Abdullah JA, Rejali Z, Ali RM, et al. Genetic determinants of obesity heterogeneity in type II diabetes. *Nutr Metab* 2020;17:55.
- [323] Dorn C, Riener MO, Kirovski G, Saugspier M, Steib K, Weiss TS, et al. Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2010;3:505–14.
- [324] Bedi O, Srivastava N, Parsad D, Krishan P. Fatty acid synthase inhibition ameliorates diabetes induced liver injury in rodent experimental model. *Eur J Pharmacol* 2021;901:174078.
- [325] Tai ES, Ordovas JM. The role of perilipin in human obesity and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* 2007;18:152–6.
- [326] Benegiamo G, Mure LS, Erikson G, Le HD, Moriggi E, Brown SA, et al. The RNA-binding protein NONO coordinates hepatic adaptation to feeding. *Cell Metab* 2018;27:404-418.
- [327] Haluzík MM, Haluzík M. PPAR-alpha and insulin sensitivity. *Physiol Res* 2006;55:115–22.
- [328] Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes* 2005;54 Suppl 2:S114-24.

- [329] Jagannathan L, Socks E, Balasubramanian P, McGowan R, Herdt TM, Kianian R, et al. Oleic acid stimulates monoamine efflux through PPAR- α : Differential effects in diet-induced obesity. *Life Sci* 2020;255:117867.
- [330] Ferrante SC, Nadler EP, Pillai DK, Hubal MJ, Wang Z, Wang JM, et al. Adipocyte-derived exosomal miRNAs: a novel mechanism for obesity-related disease. *Pediatr Res* 2015;77:447–54.
- [331] Dorairaj V, Sulaiman SA, Abu N, Murad NAA. Extracellular Vesicles in the development of the Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: An Update. *Biomolecules* 2020;10:1–24.
- [332] Cullberg KB, Larsen JO, Pedersen SB, Richelsen B. Effects of LPS and dietary free fatty acids on MCP-1 in 3T3-L1 adipocytes and macrophages in vitro. *Nutr Diabetes* 2014;4:e113.
- [333] Ying W, Riopel M, Bandyopadhyay G, Dong Y, Birmingham A, Seo JB, et al. Adipose tissue macrophage-derived exosomal miRNAs can modulate in vivo and in vitro insulin sensitivity. *Cell* 2017;171:372-384.
- [334] Duque GA, Descoteaux A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* 2014;5:491.
- [335] Comerford I, McColl SR. Mini-review series: Focus on chemokines. *Immunol Cell Biol* 2011;89:183–4.
- [336] Zhang Q, Fu L, Liang Y, Guo Z, Wang L, Ma C, et al. Exosomes originating from MSCs stimulated with TGF- β and IFN- γ promote Treg differentiation. *J Cell Physiol* 2018;233:6832–40.
- [337] Clement E, Lazar I, Attané C, Carrié L, Dauvillier S, Ducoux-Petit M, et al. Adipocyte extracellular vesicles carry enzymes and fatty acids that stimulate mitochondrial metabolism and remodeling in tumor cells. *EMBO J* 2020;39:e102525.
- [338] Ramos-Andrade I, Moraes J, Brandão-Costa RM, da Silva SV, de Souza A, da Silva C, et al. Obese adipose tissue extracellular vesicles raise breast cancer cell malignancy. *Endocr Relat Cancer* 2020;27:571–82.
- [339] Moraes JA, Encarnação C, Franco VA, Botelho LGX, Rodrigues GP, Ramos-Andrade I, et al. Adipose tissue-derived extracellular vesicles and the tumor microenvironment: Revisiting the hallmarks of cancer. *Cancers* 2021;13:3328.
- [340] Piffer A, Aubry G, Cannistra C, Popescu N, Nikpayam M, Koskas M, et al. Breast reconstruction by exclusive lipofilling after total mastectomy for breast cancer: Description of the technique and evaluation of quality of life. *J Pers Med* 2022;12:153.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

ANEXO I: AUTORIZACIÓN DE LA EDITORIAL PARA LA REPRODUCCIÓN EN ESTA TESIS DE LOS RESULTADOS PUBLICADOS

Camino T, Lago-Baameiro N, Bravo SB, Molares-Vila A, Sueiro A, Couto I, *et al.* Human obese white adipose tissue sheds depot-specific extracellular vesicles and reveals candidate biomarkers for monitoring obesity and its comorbidities. *Transl Res.* 1 de enero de 2022; 239:85-102.

Re: Obtain permission request - Journal (1278566) [220621-018255]



Rights and Permissions (ELS) <Permissions@elsevier.com>

22/06/2022 19:46

Para: tamara_cm_10294@hotmail.es

Dear Tamara Camino,

We hereby grant you permission to reprint the material below at no charge in your thesis subject to the following conditions:

1. If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies.
2. Suitable acknowledgment to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:
 "This article was published in Publication title, Vol number, Author(s), Title of article, Page Nos, Copyright Elsevier (or appropriate Society name) (Year)."
3. Your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form.
4. Reproduction of this material is confined to the purpose for which permission is hereby given.
5. This permission is granted for non-exclusive world English rights only. For other languages please reapply separately for each one required. Permission excludes use in an electronic form other than submission. Should you have a specific electronic project in mind please reapply for permission.
6. As long as the article is embedded in your thesis, you can post/share your thesis in the University repository.
7. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.
8. Posting of the full article/ chapter online is not permitted. You may post an abstract with a link to the Elsevier website www.elsevier.com, or to the article on ScienceDirect if it is available on that platform.

Kind regards,

Roopa Lingayath
 Senior Copyrights Coordinator
 ELSEVIER | HCM - Health Content Management



ANEXO II: AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA PARA LOS ESTUDIOS EN HUMANOS Y EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

1. Autorización del Comité de Bioética para los estudios en humanos, y consentimiento informado.



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Ana Estany Gestal, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 17 de noviembre de 2020 el estudio:

Título: Papel funcional y aplicación a la clínica de biomarcadores exosomales liberados por el tejido adiposo al estudio y monitorización de la obesidad

Versión: 2.0

Promotor/a: María Pardo Pérez

Código de Registro: 2020/497

Y que este Comité, tomando en consideración la pertinencia del estudio, el conocimiento disponible, los requisitos legales aplicables y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité, emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del citado estudio.

Documento escaneado digitalmente por:
Ana Estany Gestal (29/11/2020 06:36)
<https://sede.xunta.gal/ov?doce=SACC-HICA-BDAH-OFHO-TA9P-7LP3-ZF8T-B160-6613-7812-48>



NOTA: Se le recuerda que en el caso de que en este estudio se recluten pacientes, el equipo investigador debe tener disponible el Documento de Consentimiento Informado (Hojas de Información y Hojas de Firma) tanto en *galego* como en castellano en el momento de comenzar el reclutamiento.





Y HACE CONSTAR QUE:

- 1.- El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo cumple tanto en su composición como en sus PNTs los requisitos legales vigentes.
- 2.- La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo es:

Presidente

Juan Manuel Vázquez Lago. Médico especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública. Área Sanitaria de Santiago de Compostela e Barbanza.

Vicepresidenta

Pilar Rodríguez Ledo. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área Sanitaria de Lugo, a Mariña e Monforte de Lemos.

Secretaria

Ana Estany Gestal. Licenciada en Farmacia. Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.

Vicesecretaria

María Mercedes Rodicio García. Médico especialista en Pediatría. Área Sanitaria de Lugo, a Mariña e Monforte de Lemos.

Vocales

Francisco Campos Pérez. Biólogo. Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.

Catalina Caamaño Isorna. Farmacéutica de Atención Primaria. Área Sanitaria de Lugo, a Mariña e Monforte de Lemos.

Jesús Fernández Álvarez. Miembro lego.

Ricardo García Martínez. Licenciado en Derecho. Área Sanitaria de Lugo, a Mariña e Monforte de Lemos.

Jaime Gulín Dávila. Farmacéutico especialista en Farmacia Hospitalaria. Área Sanitaria de Lugo, a Mariña e Monforte de Lemos.

Guillermo José Prada Ramallal Médico especialista en Farmacología Clínica. Área Sanitaria de Santiago de Compostela e Barbanza.

Jesús Prego Domínguez. Enfermero. Área Sanitaria de Santiago de Compostela e Barbanza.

Lorenzo Armenteros del Olmo. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área Sanitaria de Lugo, a Mariña e Monforte de Lemos.

Eva Marcos Doldán. Analista-programadora. Servizo de Protección de Datos e Xestión do Servizo de Tecnoloxías da Información

Carlos Rodríguez Moreno. Médico especialista en Farmacología Clínica. Área Sanitaria de Santiago de Compostela e Barbanza.

Para que conste donde proceda, y a petición de quien proceda, en Santiago de Compostela,

La Secretaria del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,

Documento asinado dixitalmente por:
Ana Estany Gestal (29/11/2020 02:36)
<https://sede.xunta.gal/ovetidev=SAOC-H4C4-BOAH-OFHO-TA9P-7LP3-ZF8T-B160-6613-7812-48>



Hoja de información y consentimiento informado

TÍTULO DO ESTUDO: Papel funcional e aplicación á clínica de biomarcadores exosomales liberados por el tejido adiposo al estudio y monitorización de la obesidad.

INVESTIGADOR: *MARÍA PARDO PÉREZ*

CENTRO: HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE SANTIAGO

Este documento ten por obxecto ofrecerlle información sobre un **estudo de investigación** no que se lle invita a participar. Este estudo foi aprobado polo Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo. Se decide participar no mesmo debe recibir información personalizada do investigador, **ler antes este documento** e facer todas as preguntas que precise para comprender os detalles sobre o mesmo. Se así o desexa pode levar o documento, consúltalo con outras persoas, e tomar o tempo necesario para decidir se participar ou non.

A participación neste estudo é completamente **voluntaria**. Vd. pode decidir non participar ou, se acepta facelo, cambiar de parecer retirando o consentimento en calquera momento sen obriga de dar explicacións. Asegurámoslle que esta decisión non afectará á relación cos profesionais sanitarios que lle atenden nin á asistencia sanitaria á que Vd. ten dereito.

Cal é a finalidade do estudo?

A obesidade e as enfermidades asociadas sufriron un aumento extraordinario na poboación nos últimos tempos facendo prioritaria a busca da orixe destas patoloxías. O principal obxectivo desta liña de investigación é identificar novos sinais de comunicación do tecido graxo humano con outros tecidos. Sábese que a graxa acumulada durante o desenvolvemento da obesidade libera sinais que manteñen esta enfermidade, impiden a perda de peso, e que ademais participan nas complicacións asociadas ao exceso de peso como a diabetes, problemas cardiovasculares e incluso inducendo cancro. Un mellor coñecemento destes sinais e da súa alteración durante a obesidade, permitiríanos atopar dianas para un mellor tratamento conseguindo unha maior perda de peso.

Por que me ofrecen participar a min?

Vostede é convidado a participar neste estudo por ser candidato/a para intervención de cirurxía de obesidade ou outra cirurxía segundo o protocolo asistencial, ou porque cumpra os requisitos do estudo aínda que non se someta a cirurxía, ou se é grupo control porque non padece o problema/enfermidade obxecto de estudo.

En que consiste a miña participación?

Pedímoslle permiso para recoller unha mostra do seu sangue de aproximadamente 4 tubos e/ou unha mostra de tecido graxo visceral e/ou subcutáneo extraído durante a cirurxía. Se vostede acorda doar estas mostras para o proxecto de investigación, é necesario que asine este formulario de consentimento. As mostras serán enviadas ao Laboratorio de investigación nº3 do Hospital Clínico de Santiago de Compostela, onde serán procesadas e almacenadas. As mostras serán oportunamente codificadas e serán conxeladas a -80 °C. No caso de que se producira un desenvolvemento comercial dos coñecementos xerados, os posibles beneficios que se puideran recibir serán integramente destinados a satisfacer obxectivos científicos do grupo de investigación e ao seu mantemento. Asinando este formulario de consentimento, vostede renuncia aos seus dereitos sobre calquera uso comercial relacionado coa información ou as mostras que nos doou. De forma paralela á toma de mostras procederase á recollida de datos antropométricos e clínicos da súa historia clínica, que se asociarán ás súas mostras biolóxicas. Estes datos serán os estritamente necesarios para o desenvolvemento desta investigación. Excepcionalmente, e sempre que así o autorice, poderíase volver a contactar con vostede para solicitar información adicional. A súa participación terá a duración propia dunha extracción de sangue, que non será mais que uns minutos. No caso de doar tecido adiposo, este extraerase durante o procedemento cirurxica, polo que forma parte da práctica clínica habitual e non sería necesario ningún procedemento extraordinario ao propio da súa cirurxía. O investigador pode decidir finalizar o estudo antes do previsto ou interrompera a súa participación. En todo caso informaráselle dos motivos da súa retirada.

Que molestias ou inconvenientes ten?

A extracción da mostra non suporá ningún coste económico para vostede. O risco para a súa saúde dunha extracción de sangue é moi pequeno, pero pode incluír as molestias habituais de dita extracción: dor de menor importancia, pel contusionada, sangrado por onde entra a agulla, ou a ansiedade fronte as agullas. Tomaranse precaucións para evitar estes inconvenientes. No caso de que vostede se someta a cirurxía, a extracción de mostra de tecido graxo para a realización deste proxecto non suporá ningunha acción adicional á propia cirurxía en si.

Obtereire algún beneficio por participar?

Non se espera que Vd. obteña beneficio directo por participar no estudo. A investigación pretende descubrir aspectos descoñecidos ou pouco claros sobre a obesidade. Esta información poderá ser de utilidade nun futuro para outras persoas.

Recibirei a información que se obteña do estudo?

Se Vd. o desexa, facilitaráselle un resumo dos resultados do estudo. Tamén poderá recibir os resultados das probas que se realicen coas súas mostras se así o solicita dirixíndose ao investigador. Estes resultados poden non ter aplicación clínica nin unha interpretación clara, polo que, se quere dispor deles, deberían ser comentados co médico/científico do estudo.

Publicaranse os resultados deste estudo?

Os resultados deste estudo serán remitidos a publicacións científicas para a súa difusión, pero non se transmitirá ningún dato que poida levar á identificación dos participantes.

Información referente aos seus datos/mostras:

A obtención, tratamento, conservación, comunicación e cesión dos seus datos/mostras farase conforme ao disposto Regulamento Xeral de Protección de Datos (Regulamento UE 2016-679 do Parlamento europeo e do Consello, de 27 de abril de 2016), a normativa española sobre protección de datos de carácter persoal vixente, a Lei 14/2007 de investigación biomédica e o RD 1716/2011. A institución na que se desenvolve esta investigación é a responsable do tratamento dos seus datos, podendo contactar co Delegado/a de Protección de datos a través dos seguintes medios: enderezo electrónico: Delegado.Proteccion.Datos@sergas.es. Os datos/mostras necesarios para levar a cabo este estudo serán recollidos e conservados de xeito:

- **Seudonimizados (Codificados)**, a seudonimización é o tratamento de datos persoais de tal maneira que non poden atribuírse a un/a interesado/a sen que se empregue información adicional. Neste estudo só o equipo investigador coñecerá o código que permitirá saber a súa identidade.

A normativa que rexe o tratamento de datos de persoas, outórgalle dereito a acceder aos seus datos, opoñerse, corríxilos, cancelalos, limitar o seu tratamento, restrinxir ou solicitar a supresión dos seus datos. Tamén pode solicitar unha copia dos mesmos ou que esta sexa remitida a un terceiro (dereito de portabilidade). Para exercer estes dereitos pode vostede dirixirse ao Delegado/a de Protección de Datos do centro a través dos medios de contacto antes indicados ou ao investigador/a principal deste estudo no enderezo electrónico: maria.pardo.perez@sergas.es e/ou tfno.:981 955071. Así mesmo, vostede ten dereito a interpoñer unha reclamación ante a Axencia Española de Protección de Datos, cando considere que algún dos seus dereitos non foi respectado. So o equipo investigador e as autoridades sanitarias, que teñen deber de gardar a confidencialidade, terán acceso a todos os datos recollidos no estudo. Poderase transmitir a terceiros información que non poida ser identificada. No caso de que algunha información sexa transmitida a outros países, realizarase cun nivel de protección dos datos equivalentes, como mínimo, ao esixido pola normativa española e europea. Ao rematar o estudo, e conforme á normativa, as súas mostras biolóxicas e os seus datos serán:

- **Seudonimizados (Codificados)**. *En canto as mostras é pouco probable que queden remanentes. No caso de que quedara algún, conservaranse seudonimizado no conxelador indicado a ese cometido. Neste*

caso as mostras/datos poderán ser utilizadas para outros estudos na mesma liña de investigación previo informe favorable dun Comité de Ética da Investigación.

- *Vd. terá a súa disposición, se así o solicita ao investigador/a toda a información sobre os estudos de investigación nos que se utilice a mostra/datos. Un Comité de Ética decidirá en que casos será imprescindible que se lle envíe información de maneira individualizada.*
- *Os seus datos e mostras quedarán baixo a custodia do responsable da colección, e só terán acceso a datos que o identifiquen o responsable e o seu equipo. As mostras só poderán ser cedidas a outros grupos de investigación co seu consentimento.*
- *Vd. pode restrinxir o uso do seus datos e mostras dirixíndose ao responsable da colección*

Vostede poderá solicitar a destrución ou anonimización da súa mostra en calquera momento, dirixíndose ao investigador principal. Ten que saber que isto non será de aplicación aos datos resultantes das análises que xa foran feitos.

Existen intereses económicos neste estudo?

Esta investigación é promovida polo Instituto de Saúde Carlos III con fondos aportados polo Ministerio de Ciencia e Tecnoloxía, Goberno de España. O investigador non recibirá retribución específica pola dedicación ao estudo. Vd. non será retribuído por participar. É posible que dos resultados do estudo se deriven produtos comerciais ou patentes; neste caso, Vd. non participará dos beneficios económicos orixinados.

Como contactar co equipo investigador deste estudo?

Vd. pode contactar con María Pardo Pérez no teléfono 981 955071 e/ou enderezo electrónico maria.pardo.perez@sergas.es

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA A PARTICIPACIÓN NUN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: IDENTIFICACIÓN DE NOVOS SINAIS LIBERADOS POLO TECIDO ADIPOSO HUMANO E A SUA IMPLICACIÓN NA OBESIDADE

Eu, _____

- Lin a folla de información ao participante do estudo arriba mencionado que se me entregou, puiden conversar con _____ e facer todas as preguntas sobre o estudo necesarias.
- Comprendo que a miña participación é voluntaria, e que podo retirarme do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercute nos meus coidados médicos.
- Accedo a que se utilicen os meus datos e mostras nas condicións detalladas na folla de información ao participante.
- Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.

Ao rematar o estudo, os DATOS/MOSTRAS, acepto que sexan:

1. Conservados seudonimizados en el laboratorio de investigación

RESTRICCIÓN DE USO: Non autorizo a empregar a miñas mostras en investigacións e desexo que sean destruídas



Asinado.: O/a participante,

Asinado.: O/a investigador/a que solicita o consentimento

2. Autorización del Comité de Bioética para los estudios en animales de experimentación.



XUNTA DE GALICIA
DELEGACIÓN TERRITORIAL
DA CORUÑA
Xefatura Territorial da Consellería do
Medio Rural e do Mar

Edificio Administrativo Manelós
Vicente Ferrer, 2
15071 A Coruña



REXISTRO XERAL DA XUNTA DE GALICIA
REXISTRO DO EDIFICIO ADMINISTRATIVO DA CORUÑA
A CORUÑA

SAÍDA 174511 / RX 1755490

Data: 20/12/2015 09:59:33



José Manuel Cifuentes
Departamento de Anatomía
Facultade de Veterinaria
Campus Universitario
27002 Lugo

NOTIFICACIÓN DE RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15005/2015/003

Data de inicio: xaneiro de 2016

Interesado: Felipe Casanueva Brejjo

Forma de inicio: solicitude do interesado

Procedemento: resolución de autorización

Notifícolle que con data 23 de decembro de 2015, o xefe territorial da Consellería do Medio Rural emitiu unha resolución de autorización do proxecto de experimentación animal, cuxo texto íntegro é o seguinte:

ANTECEDENTES

O interesado, como representante do centro da Facultade de Medicina da Universidade de Santiago de Compostela presentou, con data 14.7.2015 e rexistro de entrada 83463 RX 1343433, unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal, cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: Modelos experimentais para o estudo da obesidade

Nome do centro usuario: Animalario da Facultade de Medicina

Persoa responsable do proxecto: Felipe Casanueva Brejjo

Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Departamento de Fisioloxía da Facultade de Medicina da Universidade de Santiago de Compostela

Clasificación do proxecto: Tipo I Tipo II Tipo III

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1. O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE núm. 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.
2. O artigo 89 da Lei 30/1992, de 26 de novembro, do réxime xurídico das administracións públicas e do procedemento administrativo común (BOE núm. 285, 27 de novembro de 1992), modificada pola Lei 4/1999, de 14 de xaneiro, establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.

ANEXO III: TABLA SUPLEMENTARIA DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR EL ANÁLISIS PROTEÓMICO CUALITATIVO (DDA/MS)

Tabla S1. Proteínas totales identificadas por espectrometría de masas (análisis cualitativo-DDA/MS) en las VEs liberadas por el tejido adiposo subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) de pacientes con obesidad; por el tejido blanco (TAS, TAV) y pardo (TAP) de animales con obesidad inducida por dieta (DIO) y normopeso (NP); y de preadipocitos y adipocitos diferenciados y sometidos a diferentes tratamientos. VEs: vesículas extracelulares; PREADIPO: preadipocitos; ADIPO: adipocitos control; HG/HI: adipocitos tratados con alta glucosa/alta insulina; AP: adipocitos tratados con ácido palmítico, AO: adipocitos tratados con ácido oleico; OB: obeso; H: humano.

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADIPO	VEs ADIPO	VEs HG/HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB-H	VEs TAV OB-H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
1,4-alpha-glucan-branching enzyme							X						
10 kDa heat shock protein, mitochondrial			X					X	X			X	X
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component		X		X									
14-3-3 protein beta/alpha		X	X	X	X		X		X				
14-3-3 protein epsilon	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	
14-3-3 protein gamma		X	X	X			X	X	X	X	X	X	
14-3-3 protein theta		X	X	X			X						
14-3-3 protein zeta/delta	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
14-3-3 protein zeta/delta O							X						
1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase ABHD5		X	X	X									
1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase alpha							X						
1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase beta		X		X									
1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase gamma		X											
2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial		X	X	X	X			X	X				
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1		X		X	X								
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11		X	X	X	X								
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12		X		X	X								
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13		X	X	X									
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14		X	X	X	X								
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2		X	X	X	X								
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3		X	X	X	X								
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4		X											
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5		X											
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6		X	X	X									
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7		X		X									
26S proteasome regulatory subunit 10B		X	X	X	X								
26S proteasome regulatory subunit 4		X	X	X	X								
26S proteasome regulatory subunit 6A		X	X	X	X								

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB-H	VEs TAV OB-H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
26S proteasome regulatory subunit 6B		X		X									
26S proteasome regulatory subunit 7		X	X	X	X								
26S proteasome regulatory subunit 8		X		X	X								
2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial								X	X				
39S ribosomal protein L12, mitochondrial			X										
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2		X	X	X				X					
3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial		X		X				X	X				
3-ketoacyl-CoA thiolase A, peroxisomal		X											
3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial		X	X	X				X	X			X	
3-mercaptopyruvate sulfurtransferase		X						X	X				
40S ribosomal protein S10		X	X	X	X								
40S ribosomal protein S11		X		X									
40S ribosomal protein S12			X										
40S ribosomal protein S13		X	X	X	X								
40S ribosomal protein S14		X		X	X								
40S ribosomal protein S15a		X	X	X									
40S ribosomal protein S16		X	X	X	X			X	X	X		X	
40S ribosomal protein S17		X	X	X	X								
40S ribosomal protein S18		X	X	X	X				X				
40S ribosomal protein S19		X	X	X	X								
40S ribosomal protein S2	X	X	X	X	X								
40S ribosomal protein S20		X	X	X									
40S ribosomal protein S23		X	X	X	X								
40S ribosomal protein S24		X		X	X								
40S ribosomal protein S25		X	X	X	X								
40S ribosomal protein S26		X	X	X	X								
40S ribosomal protein S3		X	X	X	X	X	X		X				
40S ribosomal protein S3a		X	X	X	X								
40S ribosomal protein S4, X isoform	X	X	X	X	X		X		X			X	
40S ribosomal protein S5		X							X				
40S ribosomal protein S6	X	X	X	X									
40S ribosomal protein S7		X	X	X	X								
40S ribosomal protein S8	X	X	X	X	X	X							
40S ribosomal protein S9		X	X	X	X				X				
40S ribosomal protein S16A		X	X	X	X		X	X	X	X		X	
4F2 cell-surface antigen heavy chain	X	X	X	X	X	X	X			X	X		

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	
5-demethoxyubiquinone hydroxylase, mitochondrial (Fragment)								X	X				
5'-nucleotidase						X	X		X	X	X	X	X
60 kDa heat shock protein, mitochondrial		X	X	X	X			X	X	X		X	
60S acidic ribosomal protein P0		X	X	X	X			X	X	X	X	X	X
60S acidic ribosomal protein P1								X	X	X		X	
60S acidic ribosomal protein P2		X	X							X	X		X
60S ribosomal protein L10		X	X	X									
60S ribosomal protein L10a		X	X	X				X	X	X	X	X	
60S ribosomal protein L11		X	X	X									
60S ribosomal protein L12		X	X	X	X			X	X	X	X	X	
60S ribosomal protein L13	X	X	X	X	X								
60S ribosomal protein L13a		X	X										
60S ribosomal protein L14	X	X	X	X	X	X			X			X	
60S ribosomal protein L15	X	X	X										
60S ribosomal protein L17		X	X	X									
60S ribosomal protein L18	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	
60S ribosomal protein L18a		X	X	X									
60S ribosomal protein L21		X	X										
60S ribosomal protein L22		X	X	X									
60S ribosomal protein L23		X	X	X	X								
60S ribosomal protein L23a			X	X	X								
60S ribosomal protein L24		X	X	X									
60S ribosomal protein L26		X	X	X	X								
60S ribosomal protein L27		X	X	X					X				
60S ribosomal protein L27a		X	X	X	X								
60S ribosomal protein L28		X											
60S ribosomal protein L29				X	X								
60S ribosomal protein L3		X	X	X									
60S ribosomal protein L30							X						
60S ribosomal protein L31				X	X								
60S ribosomal protein L34		X	X										
60S ribosomal protein L35				X	X								
60S ribosomal protein L35a		X											
60S ribosomal protein L36a				X									
60S ribosomal protein L4	X	X	X	X		X							
60S ribosomal protein L5		X	X	X	X				X				

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
60S ribosomal protein L6		X	X	X	X	X	X						
60S ribosomal protein L7	X	X	X	X	X	X				X			
60S ribosomal protein L7a	X	X	X	X	X				X				
60S ribosomal protein L8	X	X	X	X		X							
60S ribosomal protein L9		X		X									
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating		X	X	X	X		X		X	X		X	
72 kDa type IV collagenase			X				X			X			
78 kDa glucose-regulated protein							X						
Acetoacetyl-CoA synthetase		X	X	X	X								
Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic		X	X										
Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial		X	X	X				X	X				
Acetyl-CoA carboxylase 1		X	X	X	X			X	X				
Acid ceramidase		X	X			X							
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A				X									
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B		X											
Aconitate hydratase, mitochondrial		X	X	X	X			X	X				
Actin, alpha skeletal muscle	X	X		X	X			X	X	X		X	X
Actin, cytoplasmic 1							X			X	X		
Actin, cytoplasmic 2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
Actin-like protein 6A		X											
Actin-related protein 2		X	X	X			X					X	
Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B		X		X			X						
Actin-related protein 2/3 complex subunit 2		X	X	X			X						
Actin-related protein 2/3 complex subunit 3		X		X									
Actin-related protein 2/3 complex subunit 4		X	X	X			X						
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5			X							X			
Actin-related protein 3		X	X	X			X						
Actin-related protein 3B							X						
Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15				X									
Acylamino-acid-releasing enzyme		X											
Acyl-CoA-binding protein			X										
Acyl-coenzyme A thioesterase 13				X									
Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial			X					X	X				
Acyl-protein thioesterase 1									X				

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Acylpyruvase FAHD1, mitochondrial								X	X				
Adenine phosphoribosyltransferase		X							X	X	X	X	
Adenosylhomocysteinase		X	X	X	X	X	X	X	X			X	
Adenylate kinase 2, mitochondrial			X										
Adenylosuccinate lyase		X	X	X	X								
Adenylyl cyclase-associated protein 1		X	X			X	X			X		X	
Adhesion G-protein coupled receptor G1						X							
Adipocyte enhancer-binding protein 1		X	X	X									
Adipocyte plasma membrane- associated protein		X				X	X						
Adiponectin		X	X	X									
ADP/ATP translocase 2		X	X	X					X	X			
ADP/ATP translocase 3						X	X						
ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP- ribose hydrolase 2						X	X						
ADP-ribosylation factor 1		X	X	X	X	X	X			X	X		
ADP-ribosylation factor 4		X	X	X									
ADP-ribosylation factor 5		X		X		X	X		X				
ADP-ribosylation factor 6		X	X	X		X							
ADP-ribosylation factor-like protein 8B		X	X	X									
Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2		X		X					X				
Aggrin						X							
Alanine aminotransferase 1									X				
Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic		X	X	X	X								
Alcohol dehydrogenase [NAD(+)]		X	X						X	X		X	
Alcohol dehydrogenase 1	X												
Alcohol dehydrogenase 1B						X	X						
Alcohol dehydrogenase class-3		X					X						
Aldehyde dehydrogenase family 3 member B2		X		X									
Aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1		X											
Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial		X					X	X	X				
Aldehyde oxidase 2		X											
Aldo-keto reductase family 1 member C1						X	X						
Aldose reductase		X	X	X	X			X	X	X	X	X	X
Aldose reductase-related protein 2		X											
All-trans-retinol 13,14-reductase							X						
Alpha-1-antichymotrypsin							X						

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB-H	VEs TAV OB-H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Alpha-1-antiproteinase										X	X		
Alpha-1-antitrypsin						X	X						
Alpha-1-inhibitor 3								X	X	X	X		X
Alpha-1-macroglobulin									X	X	X		
Alpha-2-HS-glycoprotein	X	X				X	X	X	X	X	X		
Alpha-2-macroglobulin						X	X						
Alpha-2-macroglobulin-P	X	X	X										
Alpha-actinin-1		X	X	X		X	X				X	X	X
Alpha-actinin-2					X								
Alpha-actinin-4		X	X			X	X	X	X	X			
Alpha-adducin							X						
Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase								X	X				
Alpha-centractin		X					X		X				
Alpha-crystallin B chain							X						
Alpha-enolase	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Alpha-fetoprotein						X							
Alpha-galactosidase A		X											
Alpha-N-acetylgalactosaminidase		X	X	X									
Alpha-soluble NSF attachment protein		X	X	X									
Amine oxidase [flavin-containing] A							X						
Amine oxidase [flavin-containing] B							X						
Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1		X											
Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2		X		X									
Aminoacylase-1A									X				
Aminopeptidase B		X							X				
Aminopeptidase N		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ammonium transporter Rh type A							X						
Ammonium transporter Rh type A OS						X							
Angiopoietin-related protein 4		X	X										
Angiotensin-converting enzyme										X	X		
Anionic trypsin-1								X	X	X	X	X	X
Anionic trypsin-2			X										
Ankyrin-1						X	X						
Annexin A1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Annexin A11	X	X	X	X	X	X	X						
Annexin A2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Annexin A3	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X
Annexin A4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Annexin A5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Annexin A6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Annexin A7	X	X	X	X	X		X						
Annexin A8										X			
Anoctamin-6		X	X				X						
Antigen-presenting glycoprotein CD1d										X			
Antigen-presenting glycoprotein CD1d2		X	X										
Antithrombin-III	X	X											
AP-1 complex subunit beta-1							X						
AP-2 complex subunit alpha-1		X					X						
AP-2 complex subunit alpha-2		X	X	X									
AP-2 complex subunit beta		X	X	X			X						
AP-2 complex subunit mu		X											
AP-3 complex subunit beta-1		X		X									
AP-3 complex subunit delta-1		X											
Apolipoprotein A-I	X	X				X	X						
Apolipoprotein A-II							X						
Apolipoprotein B-100		X					X						
Apolipoprotein C-I						X							
Apolipoprotein D						X	X						
Apolipoprotein E						X		X	X	X	X		
Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial		X		X				X	X				
Apoptosis-inducing factor 2		X											
Aquaporin-1	X	X	X	X									
Aquaporin-7		X		X	X								
Arachidonate 5-lipoxygenase							X						
Arginase-1						X	X						
Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic		X	X	X	X								
Argininosuccinate synthase							X						
Arylsulfatase A		X	X	X									
Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]		X	X	X	X				X				
Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic		X	X	X									
Aspartate aminotransferase, mitochondrial								X	X				
Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic		X	X	X	X								
Aspartyl aminopeptidase		X											

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase							X						
Atlastin-3		X		X									
ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial							X						
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial		X	X	X			X		X	X	X	X	
ATP synthase subunit beta, mitochondrial		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ATP synthase subunit delta, mitochondrial			X										
ATP synthase subunit O, mitochondrial			X	X									
ATPase Asna1		X											
ATP-binding cassette sub-family A member 8							X						
ATP-binding cassette sub-family E member 1		X											
ATP-binding cassette sub-family G member 2		X	X										
ATP-citrate synthase		X	X	X	X			X	X	X		X	
ATP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase		X											
ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type		X	X	X	X								
ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type		X		X	X								
ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type		X											
ATP-dependent RNA helicase A		X		X									
ATP-dependent RNA helicase DDX3X		X		X	X								
Atrial natriuretic peptide receptor 2		X											
Azurocidin						X	X						
Bactericidal permeability-increasing protein						X							
Band 3 anion transport protein						X	X			X		X	X
Band 4.1-like protein 2							X						
Barrier-to-autointegration factor			X										X
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	X	X	X	X		X	X						
Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1		X											
Basigin	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
B-cell receptor-associated protein 31		X	X	X			X						
Beta-1,4-galactosyltransferase 5			X										
Beta-2-glycoprotein 1						X	X			X			
Beta-2-microglobulin			X				X			X		X	
Beta-2-syntrophin		X	X										
Beta-centractin		X		X	X								
Beta-enolase				X	X								

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Beta-galactosidase		X	X	X	X								
Beta-glucuronidase		X											
Beta-hexosaminidase subunit alpha		X	X										
Bifunctional glutamate/proline-- tRNA ligase		X	X	X	X								
Bifunctional purine biosynthesis protein PURH		X	X	X	X								
Biglycan	X	X	X				X			X	X	X	X
Biliverdin reductase A		X											
Bleomycin hydrolase		X	X										
Blood group Rh(D) polypeptid						X							
Blood group Rh(D) polypeptide							X						
Bone marrow stromal antigen 2							X						
Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial		X	X	X									
BRO1 domain-containing protein BROX		X	X			X							
BTB/POZ domain-containing protein KCTD12							X						
C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic		X											
C4b-binding protein alpha chain						X	X						
CAD protein		X											
Calcineurin B homologous protein 1		X	X										
Calmodulin-3	X	X	X	X			X						
Calmodulin-like protein 5						X	X						
Calmodulin-regulated spectrin- associated protein 3						X							
Calnexin						X	X			X			
Calpain small subunit 1		X		X									
Calpain-1 catalytic subunit							X			X			
Calpain-2 catalytic subunit		X	X	X			X			X	X		
Calreticulin			X	X		X	X				X		
cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha		X	X	X	X		X						
cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta		X		X	X								
cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit		X											
cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit		X	X	X	X			X	X	X			
Carbonic anhydrase 1						X	X						
Carbonic anhydrase 2									X	X		X	X
Carbonic anhydrase 3								X	X	X	X	X	X
Carbonyl reductase [NADPH] 1		X	X	X			X			X		X	X
Carbonyl reductase [NADPH] 2		X	X	X	X								
Carbonyl reductase [NADPH] 3		X		X									

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Carboxylesterase 1D										X	X		X
Carboxypeptidase E			X										
Carboxypeptidase M						X							
Carboxypeptidase Q				X	X				X				
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1						X							
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8						X							
Carnitine O-acetyltransferase		X		X									
Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial		X		X				X					
Cartilage-associated protein		X											
Caspase-14						X							
Catalase		X		X		X	X		X	X		X	
Catechol O-methyltransferase		X		X									
Catenin beta-1		X											
Cathelicidin antimicrobial peptide						X	X						
Cathepsin B		X		X									
Cathepsin D		X	X	X		X	X	X	X	X			
Cathepsin G						X	X						
Cathepsin L1			X										X
Cathepsin Z						X							
Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor		X	X	X	X		X		X	X	X		
Cationic amino acid transporter 2			X										
Cationic trypsin-3								X				X	
Cation-independent mannose-6-phosphate receptor		X											
Caveolae-associated protein 1		X	X	X			X	X	X	X		X	X
Caveolin-1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Caveolin-2		X	X			X	X	X	X	X	X		
CCR4-NOT transcription complex subunit 1		X											
CD151 antigen		X	X							X			
CD276 antigen						X							
CD2-associated protein						X							
CD44 antigen						X	X					X	
CD59 glycoprotein						X	X		X	X	X		X
CD63 antigen		X	X	X	X	X	X				X		
CD81 antigen	X	X	X	X	X	X	X			X	X		
CD82 antigen	X	X	X								X		
CD9 antigen		X				X	X		X	X	X	X	
Cell adhesion molecule 3										X	X		

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB-H	VEs TAV OB-H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Cell division control protein 42 homolog		X	X	X	X		X			X	X		
Cell surface glycoprotein MUC18						X	X			X			
Ceruloplasmin				X	X		X		X	X	X	X	X
Charged multivesicular body protein 2a			X										
Charged multivesicular body protein 4b	X	X	X			X							
Charged multivesicular body protein 6		X											
Chloride intracellular channel protein 1		X	X	X			X			X		X	
Chloride intracellular channel protein 4		X	X	X									
Choline transporter-like protein 1		X	X	X	X					X			
Choline transporter-like protein 2		X	X	X			X						
Chondroitin sulfate proteoglycan 4		X	X										
Chymase							X						
Citramalyl-CoA lyase, mitochondrial								X	X				
Citrate synthase, mitochondrial		X	X	X	X			X	X			X	
Clathrin heavy chain 1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Clathrin light chain A		X			X								
Clustered mitochondria protein homolog		X											
Clusterin		X	X	X			X			X		X	
Coagulation factor V		X											
Coagulation factor XIII A chain							X			X			
Coatomer subunit alpha		X	X	X	X								
Coatomer subunit beta		X	X	X	X								
Coatomer subunit beta'		X	X						X				
Coatomer subunit delta		X											
Coatomer subunit gamma-1		X					X						
Coatomer subunit gamma-2		X											
Cofilin-1	X	X	X	X	X	X	X			X	X		
Coiled-coil domain-containing protein 80						X							
Collagen alpha-1(I) chain	X	X	X	X	X		X			X	X	X	X
Collagen alpha-1(II) chain	X												
Collagen alpha-1(III) chain			X	X									
Collagen alpha-1(IV) chain		X	X			X							
Collagen alpha-1(VI) chain		X	X	X	X	X	X						
Collagen alpha-1(XI) chain						X							
Collagen alpha-1(XIV) chain							X						
Collagen alpha-1(XV) chain		X	X				X						

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB-H	VEs TAV OB-H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Collagen alpha-1(XVIII) chain						X							
Collagen alpha-2(I) chain	X	X	X	X	X		X		X	X	X	X	X
Collagen alpha-2(IV) chain		X		X		X							
Collagen alpha-2(VI) chain		X	X	X	X	X	X						
Collagen alpha-3(VI) chain						X	X						
Complement C1q subcomponent subunit B						X							
Complement C1q subcomponent subunit C							X						
Complement C1r subcomponent							X						
Complement C1s subcomponent							X						
Complement C3	X	X				X	X			X			
Complement C4										X	X	X	X
Complement C4-A							X						
Complement C4-B						X	X						
Complement component C9						X							
Complement component receptor 1-like protein										X	X		
Complement factor B							X						
COP9 signalosome complex subunit 1		X											
COP9 signalosome complex subunit 2		X											
COP9 signalosome complex subunit 4		X		X									
Copine-1		X	X	X									
Copine-2		X	X				X						
Copine-3	X	X	X	X		X	X						
Copine-9										X	X		
Core histone macro-H2A.1							X					X	X
Core histone macro-H2A.2							X						
Corneodesmosin						X	X						
Coronin-1A												X	
Coronin-1B		X	X	X									
Coronin-1C							X						
Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1		X					X						
C-reactive protein										X			
Creatine kinase B-type							X		X	X	X	X	
Creatine kinase M-type								X	X				
Creatine kinase S-type, mitochondrial				X	X								
C-terminal-binding protein 1		X											
CTP synthase 2		X		X									
C-type lectin domain family 10 member A										X	X		

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
C-type lectin domain family 2 member D		X	X										
C-type lectin domain family 2 member D11										X	X		
C-type mannose receptor 2										X			
Cullin-2		X											
Cullin-4A		X											
Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1		X	X	X	X		X					X	
C-X-C motif chemokine 5							X						
Cyclin-dependent kinase 4		X											
Cystatin-A						X	X						
Cystatin-B							X						
Cystatin-C		X	X							X	X		X
Cystatin-SN							X						
Cysteine sulfinic acid decarboxylase		X		X	X							X	
Cytochrome b reductase 1						X	X						
Cytochrome b-245 heavy chain						X	X						
Cytochrome b5		X											
Cytochrome b5 type B		X		X									
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial							X	X					
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial								X	X				
Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial									X				
Cytochrome c oxidase subunit 2									X				
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial								X					
Cytochrome c, somatic		X	X										
Cytochrome P450 2F2		X	X	X									
Cytoplasmic aconitate hydratase		X	X	X	X		X	X	X	X		X	
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1		X	X	X	X		X						
Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2		X											
Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1		X											
Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1		X	X	X									
Cytoskeleton-associated protein 4							X						
Cytosol aminopeptidase		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	
Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase							X						
Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase		X											
Cytosolic non-specific dipeptidase		X	X	X						X	X		
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	X	X	X	X	X								

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Decorin							X	X	X	X	X	X	X
Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial								X	X				
Delta-aminolevulinic acid dehydratase		X											
Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1		X		X									
Dermcidin						X	X						
Desmocollin-1							X						
Desmoglein-1						X	X						
Desmoplakin						X	X						
Dextrin										X	X		
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial			X					X	X				
Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial		X		X	X			X	X				
Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial						X	X	X	X	X	X	X	X
Dihydropteridine reductase		X	X										
Dihydropyrimidinase-related protein 2		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Dihydropyrimidinase-related protein 3							X						
Dipeptidase 1		X							X	X	X	X	X
Dipeptidyl peptidase 2									X	X	X		
Dipeptidyl peptidase 4						X	X			X	X	X	X
Disco-interacting protein 2 homolog B		X	X			X							
Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10			X			X							
DNA damage-binding protein 1		X		X					X				
DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase		X											
DnaJ homolog subfamily A member 1	X	X	X			X							
DnaJ homolog subfamily A member 2	X	X	X	X									
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit						X	X						
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1						X	X			X			
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2							X						
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A							X						

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Dynactin subunit 1		X											
Dynamamin-1-like protein		X	X	X									
Dynamamin-2		X		X									
Dynamamin-like 120 kDa protein, mitochondrial		X		X									
Dystroglycan			X										
E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4		X	X	X	X					X	X		
E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4-like						X							
E3 ubiquitin-protein ligase RNF13				X									
E3 ubiquitin-protein ligase UBR4		X											
E3 UFM1-protein ligase 1		X											
Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1						X							
Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2								X	X	X	X	X	X
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesteras e family member 2			X										
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesteras e family member 3										X	X	X	X
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1						X	X						
EGF-like repeat and discoidin I- like domain-containing protein 3	X	X	X										
EH domain-containing protein 1	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	
EH domain-containing protein 2		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	
EH domain-containing protein 4		X	X			X							
eIF-2-alpha kinase activator GCN1		X											
Elastin													X
Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial		X	X	X				X	X				
Electron transfer flavoprotein subunit beta		X	X	X				X	X				
Electron transfer flavoprotein- ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial								X	X				
Elongation factor 1-alpha 1	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
Elongation factor 1-beta			X										
Elongation factor 1-delta		X	X	X	X								
Elongation factor 1-gamma		X	X	X	X		X		X			X	
Elongation factor 2	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	
Elongation factor Tu, mitochondrial		X											
Elongator complex protein 1		X											
EMILIN-1							X						
Endogenous retrovirus group K member 24 Gag polyprotein						X							

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Endogenous retrovirus group K member 8 Env polyprotein						X							
Endoglin							X						
Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1							X						
Endoplasmic reticulum chaperone BiP		X	X	X	X					X	X	X	X
Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1							X						
Endoplasmic reticulum chaperone BiP		X	X	X			X			X	X	X	X
Endothelial protein C receptor							X						
Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial		X	X	X				X	X			X	
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial								X	X				
Eosinophil cationic protein						X							
Ephrin type-A receptor 2						X							
Epoxide hydrolase 1		X	X	X	X	X	X		X				
Equilibrative nucleoside transporter 1	X	X	X	X	X					X			
ER lumen protein-retaining receptor 1				X			X						
ER lumen protein-retaining receptor 2		X		X									
Erlin-1							X						
Erlin-2							X						
ERO1-like protein alpha		X	X	X									
Erythrocyte band 7 integral membrane protein	X	X	X	X	X	X	X						
Erythrocyte membrane protein band 4.2						X	X						
ES1 protein homolog, mitochondrial								X	X				
Ethylmalonyl-CoA decarboxylase			X				X	X	X				
Eukaryotic initiation factor 4A-I		X	X	X	X		X						
Eukaryotic initiation factor 4A-II		X							X	X		X	
Eukaryotic initiation factor 4A-III		X											
Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1		X											
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1		X		X									
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2				X									
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3, X-linked		X		X									
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A		X	X	X	X								
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B		X											
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C		X	X	X									
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D		X		X									

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB-H	VEs TAV OB-H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E		X		X	X								
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F		X		X	X								
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I		X											
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L		X	X	X	X		X						
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1		X											
Eukaryotic translation initiation factor 5				X									
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1		X	X										
Excitatory amino acid transporter 1		X	X	X									
Exportin-1		X		X	X								
Exportin-2		X											
Exportin-7		X											
Extended synaptotagmin-1		X		X			X			X			
Extracellular matrix protein 1						X							
Ezrin							X						
F-actin-capping protein subunit alpha-1		X					X						
F-actin-capping protein subunit alpha-2		X	X	X	X				X	X		X	
F-actin-capping protein subunit beta		X				X	X			X	X	X	
Farnesyl pyrophosphate synthase		X	X	X									
Fascin		X	X	X								X	
Fatty acid synthase		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
Fatty acid-binding protein, adipocyte		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fatty acid-binding protein, epidermal		X	X	X		X	X						
Fermitin family homolog 2		X					X						
Ferritin heavy chain		X	X	X			X			X			
Ferritin light chain						X	X						
Ferritin light chain 1		X	X	X	X								
Fetuin-B										X			
Fibrillin-1						X							
Fibrinogen alpha chain						X	X			X	X		X
Fibrinogen beta chain						X	X		X	X	X	X	X
Fibrinogen gamma chain						X	X	X	X	X	X	X	X
Fibronectin	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
Fibulin-1						X	X						
Fibulin-2		X	X	X		X							
Fibulin-5						X	X						X
Filaggrin						X	X						

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Filaggrin-2						X	X						
Filamin-A		X	X	X	X	X	X						
Filamin-B		X	X	X									
Filamin-C			X										
Flavin reductase (NADPH)							X						
Flotillin-1		X	X	X		X	X						
Flotillin-2		X	X	X		X	X						
Folate receptor beta						X	X						
Follistatin-related protein 1			X										
Four and a half LIM domains protein 1						X	X						
Fructose-bisphosphate aldolase A		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fumarate hydratase, mitochondrial								X	X				
Fumarylacetoacetase				X	X				X	X		X	
Galactokinase		X	X	X									
Galectin-1	X	X	X	X		X	X			X	X		X
Galectin-3		X	X	X						X	X		
Galectin-3-binding protein		X	X	X	X	X	X					X	X
Galectin-5									X				
Galectin-7						X	X						
Gamma-adducin							X						
Gamma-glutamylcyclotransferase							X						
Gamma-synuclein			X							X	X	X	X
GDP-L-fucose synthase		X											
GDP-mannose 4,6 dehydratase		X											
Gelsolin	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Gem-associated protein 5	X												
General vesicular transport factor p115		X		X									
Glia-derived nexin	X		X			X							
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase X		X	X	X	X								
Glucose-6-phosphate isomerase		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Glucosidase 2 subunit beta							X						
Glucosylceramidase						X							
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial		X	X	X				X	X	X	X	X	
Glutaminase kidney isoform, mitochondrial							X						
Glutamine synthetase								X	X	X			
Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1		X											
Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 2										X			

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Glutamine--tRNA ligase		X											
Glutamyl aminopeptidase		X	X	X						X		X	X
Glutathione hydrolase 5 proenzyme						X	X						
Glutathione peroxidase 3										X			
Glutathione S-transferase A1	X												
Glutathione S-transferase alpha-3										X			
Glutathione S-transferase Mu 1		X	X	X						X	X		
Glutathione S-transferase Mu 2		X		X	X		X	X	X	X	X	X	X
Glutathione S-transferase Mu 3							X						
Glutathione S-transferase omega- 1		X	X	X					X				
Glutathione S-transferase P						X	X	X	X	X		X	
Glutathione S-transferase P 1		X	X	X	X								
Glutathione S-transferase theta-1							X						
Glutathione S-transferase theta-2								X	X			X	
Glutathione S-transferase Yb-3									X				
Glutathione synthetase		X							X				
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Glycerol kinase									X				
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic		X	X	X	X		X	X	X	X	X		X
Glycine--tRNA ligase		X	X	X	X								
Glycogen [starch] synthase, muscle		X	X	X	X				X				
Glycogen phosphorylase, brain form		X	X	X		X	X						
Glycogen phosphorylase, liver form							X	X	X	X			
Glycogen phosphorylase, muscle form								X					
Glycophorin-C							X						
Glycylpeptide N- tetradecanoyltransferase 1		X		X	X								
Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase		X	X	X									
Glypican-1		X											
Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	X	X	X	X		X	X						
GPI transamidase component PIG-S							X						
G-protein coupled receptor 143						X							
G-protein coupled receptor family C group 5 member B						X							
Grancalcin						X							
Granulocyte colony-stimulating factor							X						

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB-H	VEs TAV OB-H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Growth arrest-specific protein 8					X								
Growth/differentiation factor 15						X							
GrpE protein homolog 1, mitochondrial								X	X				
GTPase HRas		X	X										
GTP-binding nuclear protein Ran		X	X	X	X								
GTP-binding protein Di-Ras2							X						
GTP-binding protein SAR1a		X											
GTP-binding protein SAR1b		X	X	X									
Guanine deaminase								X	X	X	X	X	X
Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1							X						
Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	X	X	X	X		X	X			X	X	X	X
Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(s)/G(o) subunit gamma-12							X						
Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(s)/G(t) subunit beta-1	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	
Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(s)/G(t) subunit beta-2				X		X	X			X	X	X	
Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha						X	X			X			
Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha		X	X										
Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha							X						
Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas		X	X				X						
Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11		X	X				X						
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4							X						
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4		X											
Haptoglobin						X	X	X					
Heat shock 70 kDa protein 12A							X						
Heat shock 70 kDa protein 1A		X	X										
Heat shock 70 kDa protein 1B						X	X			X		X	X
Heat shock 70 kDa protein 4		X	X	X	X								
Heat shock cognate 71 kDa protein	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Heat shock protein beta-1						X	X						X
Heat shock protein beta-6							X						
Heat shock protein HSP 90-alpha		X	X	X		X	X			X			
Heat shock protein HSP 90-beta	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Heat shock-related 70 kDa protein 2						X							
Hematopoietic progenitor cell antigen CD34						X	X						

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB-H	VEs TAV OB-H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Heme oxygenase 1			X		X								
Hemoglobin subunit alpha	X	X	X		X	X	X						
Hemoglobin subunit alpha-1/2								X	X	X	X	X	X
Hemoglobin subunit beta						X	X						
Hemoglobin subunit beta-1								X	X	X	X	X	X
Hemoglobin subunit beta-2	X	X		X	X			X	X	X	X	X	X
Hemoglobin subunit beta-H1					X								
Hemoglobin subunit delta						X	X						
Hemopexin						X	X			X	X		
Heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase			X										
Heparin cofactor 2							X						
Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate		X	X		X								
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B		X	X										
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3		X											
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0		X											
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F		X		X									
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H		X											
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K		X		X	X								
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q		X		X									
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U		X		X									
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2				X									
Hexokinase-1		X	X	X	X								
Hexokinase-2		X											
High affinity cationic amino acid transporter 1						X							
High mobility group protein B1				X									
Histidine triad nucleotide-binding protein 1		X	X						X	X			
Histone H1.0		X	X	X									
Histone H1.1		X	X	X									
Histone H1.2		X	X	X		X							
Histone H1.3	X	X	X	X			X						
Histone H1.4		X	X	X				X	X	X	X	X	X
Histone H1.5	X	X	X	X						X		X	
Histone H2A type 1-A						X	X						
Histone H2A type 1-C							X						
Histone H2A type 1-F								X					
Histone H2A type 1-K			X										

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Histone H2A type 2-A			X	X						X	X	X	X
Histone H2A.J	X					X	X						
Histone H2A.V		X	X	X			X						
Histone H2A.Z												X	
Histone H2AX				X									
Histone H2B type 1								X	X	X	X	X	X
Histone H2B type 1-C/E/G	X												
Histone H2B type 1-L						X							
Histone H2B type 1-M						X	X						
Histone H2B type 1-P		X	X										
Histone H2B type 2-E						X	X						
Histone H2B type 3-A					X								
Histone H3.1							X	X	X	X	X	X	X
Histone H3.2		X	X	X		X	X						
Histone H3.3					X		X						
Histone H4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
HLA class I histocompatibility antigen, A-11 alpha chain						X							
HLA class I histocompatibility antigen, A-29 alpha chain							X						
HLA class I histocompatibility antigen, A-34 alpha chain							X						
HLA class I histocompatibility antigen, A-69 alpha chain						X	X						
HLA class I histocompatibility antigen, A-74 alpha chain							X						
HLA class I histocompatibility antigen, B-18 alpha chain							X						
HLA class I histocompatibility antigen, B-45 alpha chain							X						
HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha 1 chain							X						
HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain						X	X						
HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-1 beta chain							X						
HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-11 beta chain							X						
HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-14 beta chain							X						
HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-15 beta chain							X						
HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-7 beta chain						X							
HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-8 beta chain						X							
Hormone-sensitive lipase		X	X	X	X		X		X				
Hornerin							X						
Hsc70-interacting protein		X	X	X						X			
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial			X					X	X				

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase		X								X			
Ig gamma-1 chain C region										X			
Ig gamma-2A chain C region										X	X		
Ig gamma-2B chain C region										X			
Ig kappa chain C region, B allele										X			
IgG receptor FcRn large subunit p51		X					X						
Immunoglobulin alpha-2 heavy chain							X						
Immunoglobulin gamma-1 heavy chain						X	X						
Immunoglobulin heavy constant alpha 1						X	X						
Immunoglobulin heavy constant gamma 2						X	X						
Immunoglobulin heavy constant mu						X	X						
Immunoglobulin heavy variable 3-23							X						
Immunoglobulin heavy variable 3-7							X						
Immunoglobulin kappa constant							X						
Immunoglobulin kappa light chain						X							
Immunoglobulin kappa variable 2-30							X						
Immunoglobulin kappa variable 3-15							X						
Immunoglobulin kappa variable 3-20							X						
Immunoglobulin lambda constant 3						X	X						
Immunoglobulin lambda-1 light chain							X						
Immunoglobulin superfamily member 3						X							
Immunoglobulin superfamily member 8						X							
Importin subunit beta-1		X	X	X	X		X		X				
Importin-4				X									
Importin-5		X		X									
Inorganic pyrophosphatase		X	X	X									
Insulin-1			X										
Insulin-like growth factor-binding protein 2						X							
Integral membrane protein 2B			X	X									
Integrin alpha-3						X							
Integrin alpha-5	X	X	X	X									
Integrin alpha-6		X	X			X							
Integrin alpha-7							X			X	X		
Integrin alpha-IIb						X	X						
Integrin alpha-M						X	X						

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Integrin alpha-V		X	X			X	X						
Integrin beta-1	X	X	X	X		X	X			X	X	X	X
Integrin beta-2						X	X						
Integrin beta-3						X							
Integrin beta-5							X						
Inter alpha-trypsin inhibitor, heavy chain 4	X												
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	X	X				X	X						
Interferon-induced transmembrane protein 2		X	X	X									
Interferon-induced transmembrane protein 3										X	X		
Interleukin-1 receptor antagonist protein		X	X										
Interleukin-11							X						
Interleukin-6							X						
Interleukin-8						X							
Interstitial collagenase							X						
Isochorismatase domain-containing protein 1									X				
Isochorismatase domain-containing protein 2								X	X				
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial		X	X	X				X	X				
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial								X					
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma 1, mitochondrial		X		X				X	X				
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic		X	X	X	X		X		X	X	X	X	
Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial		X		X	X								
Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic		X		X									
Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial								X					
IST1 homolog	X	X	X			X							
Junction plakoglobin						X	X	X					X
Keratin, type I cuticular Ha4	X												
Keratin, type I cytoskeletal 10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Keratin, type I cytoskeletal 13						X	X						
Keratin, type I cytoskeletal 14						X	X						
Keratin, type I cytoskeletal 16	X		X			X	X						
Keratin, type I cytoskeletal 17	X		X			X	X	X	X	X	X	X	X
Keratin, type I cytoskeletal 18							X						
Keratin, type I cytoskeletal 19							X	X		X		X	X
Keratin, type I cytoskeletal 42	X		X					X	X	X	X		
Keratin, type I cytoskeletal 9						X	X						
Keratin, type II cuticular Hb1	X	X	X	X									

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Keratin, type II cuticular Hb5	X		X										
Keratin, type II cytoskeletal 1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Keratin, type II cytoskeletal 1b						X	X						
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	X	X	X	X		X							
Keratin, type II cytoskeletal 4						X	X						
Keratin, type II cytoskeletal 5	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
Keratin, type II cytoskeletal 6A						X	X	X	X	X	X	X	X
Keratin, type II cytoskeletal 6B						X	X						
Keratin, type II cytoskeletal 6C						X	X						
Keratin, type II cytoskeletal 75								X			X		
Keratin, type II cytoskeletal 78						X	X						
Keratin, type II cytoskeletal 79	X	X	X	X	X								
Keratin, type II cytoskeletal 8							X	X	X	X	X	X	X
Keratinocyte proline-rich protein							X						
Ketosamine-3-kinase		X											
Kininogen-1							X						
Kynurenine--oxoglutarate transaminase 1, mitochondrial									X				
Kynurenine--oxoglutarate transaminase 3								X	X				
Lactadherin	X	X	X	X		X				X	X	X	
Lactotransferrin						X	X						
Lactoylglutathione lyase		X	X										
Laminin subunit alpha-1						X							
Laminin subunit alpha-4		X	X			X	X						
Laminin subunit beta-1		X	X										
Laminin subunit beta-2						X	X			X			
Laminin subunit gamma-1		X	X			X	X						
LanC-like protein 1							X						
Lanosterol synthase		X											
Large neutral amino acids transporter small subunit 1	X	X	X			X							
Legumain										X			
Leptin							X						
Leucine-rich repeat-containing protein 59		X	X										
Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic		X											
Leucyl-cystinyl aminopeptidase		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Leukocyte elastase inhibitor						X	X						
Leukocyte surface antigen CD47		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB-H	VEs TAV OB-H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Lipopolysaccharide-binding protein							X						
Lipoprotein lipase		X	X	X	X					X		X	X
Liver carboxylesterase 1						X	X						
L-lactate dehydrogenase A chain		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
L-lactate dehydrogenase B chain		X	X			X	X	X	X	X	X	X	X
Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial		X	X	X				X	X				
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-c							X						
Lumican						X	X	X		X	X	X	X
Lupus La protein homolog		X		X	X								
L-xylulose reductase		X											
Lysine--tRNA ligase		X											
Lysosomal acid phosphatase		X	X	X	X								
Lysosomal alpha-glucosidase				X									
Lysosomal protective protein			X										
Lysosomal Pro-X carboxypeptidase		X											
Lysosome membrane protein 2		X	X	X	X	X	X						
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1		X	X	X	X	X	X			X	X		
Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	X	X	X	X	X	X					X		
Lysozyme C						X	X						
Macrophage mannose receptor 1							X						
Macrophage migration inhibitory factor		X					X	X	X	X	X	X	
Macrophage-capping protein		X	X				X			X		X	X
Major facilitator superfamily domain-containing protein 10							X						
Major vault protein		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Malate dehydrogenase, cytoplasmic		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Malate dehydrogenase, mitochondrial		X	X	X	X			X	X	X	X	X	X
Malectin							X						
Maleylacetoacetate isomerase		X	X	X									
Mannose-P-dolichol utilization defect 1 protein			X	X									
Mas-related G-protein coupled receptor member F							X						
Mast cell carboxypeptidase A							X						
Mast cell carboxypeptidase A (Fragment)													X
Mast cell protease 1									X	X			X
Matrilin-2			X										
Matrix Gla protein				X	X							X	

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB-H	VEs TAV OB-H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Matrix metalloproteinase-14		X	X			X				X			
Matrix metalloproteinase-9						X	X						
Matrix-remodeling-associated protein 5							X						
Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial		X	X	X	X			X	X				
Melanocyte protein PMEL						X							
Membrane primary amine oxidase		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Membrane-associated progesterone receptor component 2							X						
Mesoderm-specific transcript homolog protein							X						
Metalloproteinase inhibitor 1						X	X			X		X	
Metalloreductase STEAP3										X	X	X	X
Metalloreductase STEAP4							X			X			
Methanethiol oxidase		X		X				X	X	X		X	X
Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta		X											
Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic		X											
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial								X	X				
Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial		X		X				X					
Methylmalonyl-CoA mutase, mitochondrial		X											
Methyltransferase-like protein 7A							X						
Microfibril-associated glycoprotein 4						X	X						
Microsomal glutathione S-transferase 1						X	X						
Microsomal glutathione S-transferase 3							X						
Mimecan			X				X						
Misshapen-like kinase 1						X							
Mitochondrial brown fat uncoupling protein 1									X				
Mitochondrial carrier homolog 2							X						
Mitochondrial fission 1 protein			X										
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44			X										
Mitogen-activated protein kinase 1		X										X	
Mitogen-activated protein kinase 3		X											
Mitotic checkpoint protein BUB3		X											
Moesin	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
Monocarboxylate transporter 1	X	X	X	X	X					X	X		
Monocarboxylate transporter 4						X							

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Monocyte differentiation antigen CD14										X	X	X	X
Monoglyceride lipase		X					X		X				
Murinoglobulin-1	X	X							X	X	X		
Myb-binding protein 1A		X											
Myelin proteolipid protein						X							
Myeloblastin						X							
Myeloid-associated differentiation marker	X	X	X	X	X	X	X			X	X		
Myeloperoxidase						X	X						
Myoferlin		X	X	X		X	X						
Myosin light polypeptide 6		X	X	X	X					X	X		
Myosin regulatory light chain 12B		X	X	X						X			
Myosin-1				X	X								
Myosin-10		X		X	X		X						
Myosin-2						X							
Myosin-3				X	X								
Myosin-4				X	X			X	X				
Myosin-7						X							
Myosin-8				X	X								
Myosin-9	X	X	X	X	X	X	X			X		X	
Myosin-binding protein C, fast-type				X									
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	X	X	X	X	X		X			X	X		
N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2							X			X	X		
Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1			X										
N-acetylglucosamine-6-sulfatase		X	X										
N-acylglucosamine 2-epimerase		X											
NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1		X		X	X		X						
NAD(P)H-hydrate epimerase									X				
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial									X				
NADH-cytochrome b5 reductase 3		X	X	X			X			X	X		
NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial								X	X				
NADP-dependent malic enzyme							X	X	X	X		X	
NADPH:adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial		X											
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form				X									
Nck-associated protein 1		X		X									

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Neprilysin		X	X	X	X	X				X	X		
Nestin			X					X	X		X		
Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK						X	X						
Neurogranin									X				
Neurolysin, mitochondrial									X				
Neuronal membrane glycoprotein M6-b						X							
Neuropilin-1							X						
Neuroplastin							X			X	X	X	
Neurosecretory protein VGF						X							
Neutral alpha-glucosidase AB		X	X	X			X						
Neutral amino acid transporter A	X	X	X			X							
Neutral amino acid transporter B						X							
Neutral amino acid transporter B(0)		X	X	X									
Neutrophil defensin 3						X	X						
Neutrophil elastase						X	X						
Niban-like protein 1		X	X	X									
Nicastrin		X	X	X	X	X	X						
Nicotinamide phosphoribosyltransferase			X										
Nidogen-1		X	X			X							
Nidogen-1 (Fragment)										X		X	X
Nidogen-2	X	X	X	X		X				X			
Non-POU domain-containing octamer-binding protein		X											
Non-specific lipid-transfer protein			X										
NPC intracellular cholesterol transporter 1		X	X	X									
Nuclear cap-binding protein subunit 1		X											
Nucleolar protein 56		X											
Nucleolar protein 58		X											
Nucleolin		X	X	X	X								
Nucleophosmin		X	X	X	X								
Nucleoside diphosphate kinase A			X					X	X				X
Nucleoside diphosphate kinase B	X	X	X	X	X					X	X		
Nucleosome assembly protein 1-like 1		X											
Nucleosome assembly protein 1-like 4		X		X									
Obg-like ATPase 1		X		X	X								
Olfactomedin-4						X	X						
Olfactomedin-like protein 1							X						
Olfactomedin-like protein 3													X

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Omega-amidase NIT2								X	X				
Ornithine aminotransferase, mitochondrial		X		X									
Osteopontin				X									
Oxysterol-binding protein-related protein 9		X											
P2X purinoceptor 4		X	X	X									
P2X purinoceptor 7						X							
Pantetheinase				X	X								
Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2		X											
Pefflin		X	X										
Pentraxin-related protein PTX3	X	X											
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	X		X				X			X	X		
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C		X	X										
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10			X										
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A							X						
Perilipin-1		X	X	X	X	X	X	X	X				
Perilipin-4		X	X	X	X		X						
Periostin		X	X				X						
Peroxidasin homolog			X			X	X						
Peroxiredoxin-1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Peroxiredoxin-2		X	X			X	X	X	X	X	X	X	X
Peroxiredoxin-4							X						
Peroxiredoxin-5, mitochondrial			X					X	X	X		X	
Peroxiredoxin-6			X			X	X			X			
Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1		X											
Peroxisomal bifunctional enzyme		X											
Peroxisomal multifunctional enzyme type 2		X		X									
Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit		X		X	X								
Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit		X											
Phosphate carrier protein, mitochondrial		X	X										
Phosphatidate cytidyltransferase 2							X						
Phosphatidylethanolamine- binding protein 1			X				X		X	X	X		
Phosphatidylinositide phosphatase SAC1		X											
Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein		X											

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial		X											
Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP]								X	X				
Phosphoethanolamine/phosphocholine phosphatase		X	X		X								
Phosphoglucomutase-1		X	X	X	X		X		X				
Phosphoglucomutase-like protein 5							X						
Phosphoglycerate kinase 1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Phosphoglycerate mutase 1		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
Phospholipase B-like 1									X				
Phospholipase D3						X							
Phospholipid phosphatase 1		X	X	X	X		X						
Phospholipid phosphatase 3		X	X	X			X			X	X		
Phospholipid scramblase 3		X	X										
Phospholipid scramblase 4							X						
Phospholipid transfer protein		X	X				X						
Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 1		X											
Phosphoribosylformylglycinamide synthase		X											
Phosphoserine aminotransferase		X	X	X	X								
Pigment epithelium-derived factor	X	X											
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1		X	X							X			
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4						X	X						
Plasma protease C1 inhibitor							X			X			
Plasminogen activator inhibitor 1							X			X		X	X
Plasminogen activator inhibitor 2							X						
Plastin-2						X	X						
Platelet factor 4										X			
Platelet glycoprotein 4		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
Platelet-activating factor acetylhydrolase 1B subunit alpha		X											
Platelet-activating factor acetylhydrolase 1B subunit beta										X		X	
Platelet-derived growth factor receptor alpha										X			
Platelet-derived growth factor receptor beta		X	X										
Plectin		X	X	X			X						
Plexin-B2		X	X	X									
Poly(rC)-binding protein 1		X	X										
Poly(rC)-binding protein 2		X	X										
Polyadenylate-binding protein 1		X	X										

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB-H	VEs TAV OB-H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Polyubiquitin-C								X	X	X	X	X	X
PRA1 family protein 3							X						
Pregnancy zone protein						X							
Prelamin-A/C		X	X	X		X	X						
Pre-mRNA-processing factor 19		X		X									
Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15		X											
Prenylcysteine oxidase		X	X	X									
Prenylcysteine oxidase 1						X	X						
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17		X											
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5		X	X	X	X								
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6		X											
Probable lysosomal cobalamin transporter				X									
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X		X											
Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	X	X	X	X									
Procollagen galactosyltransferase 1		X											
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1		X	X	X									
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3		X											
Profilin-1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Programmed cell death 6-interacting protein	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X
Programmed cell death protein 6	X	X	X	X		X							
Progressive ankylosis protein			X	X									
Prohibitin-2							X						
Prolactin-inducible protein						X	X						
Prolargin		X	X	X	X		X			X			
Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1		X	X				X						
Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1		X	X	X									
Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2		X	X	X									
Prolyl endopeptidase		X											
Prominin-1						X							
Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial								X	X				
Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial								X	X				
Prosaposin		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
Prostacyclin synthase							X						
Prostaglandin E synthase 2		X		X									
Prostaglandin F2 receptor negative regulator	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADIPO	VEs ADIPO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB-H	VEs TAV OB-H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1		X											
Proteasome activator complex subunit 1		X										X	
Proteasome activator complex subunit 2		X					X						
Proteasome adapter and scaffold protein ECM29		X		X									
Proteasome subunit alpha type-1		X	X	X									
Proteasome subunit alpha type-2		X		X	X								
Proteasome subunit alpha type-3		X					X			X			
Proteasome subunit alpha type-4		X	X	X									
Proteasome subunit alpha type-5		X		X						X			
Proteasome subunit alpha type-6		X	X	X	X		X			X			
Proteasome subunit alpha type-7		X								X			
Proteasome subunit beta type-1		X											
Proteasome subunit beta type-2		X					X		X				
Proteasome subunit beta type-3		X		X	X								
Proteasome subunit beta type-5		X		X			X						
Proteasome subunit beta type-6		X		X	X								
Protein arginine N-methyltransferase 1		X		X									
Protein cornichon homolog 4				X									
Protein disulfide-isomerase		X	X	X	X	X	X			X	X		
Protein disulfide-isomerase A3		X	X	X			X			X	X	X	X
Protein disulfide-isomerase A6		X	X	X			X			X	X	X	X
Protein ERGIC-53							X			X			
Protein FAM234A			X										
Protein kinase C and casein kinase II substrate protein 3		X											
Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2			X	X									
Protein lifeguard 3							X						
Protein MAL2							X						
Protein MEMO1		X											
Protein NDRG1		X	X	X									
Protein NDRG2									X				
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7		X											
Protein S100-A10		X	X	X		X	X		X	X	X		X
Protein S100-A11		X	X	X		X	X			X	X	X	
Protein S100-A4	X	X	X	X		X	X						X
Protein S100-A6			X	X			X	X		X	X		
Protein S100-A7						X	X						
Protein S100-A8						X	X						

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Protein S100-A9						X	X						
Protein SET				X									
Protein Shroom3						X	X						
Protein transport protein Sec23A		X											
Protein transport protein Sec31A		X		X									
Protein tweety homolog 2		X	X	X	X								
Protein tweety homolog 3		X	X	X		X							
Protein XRP2						X							
Protein/nucleic acid deglycase DJ-1			X				X		X	X			
Proteolipid protein 2	X	X	X	X			X			X	X		X
Prothrombin		X					X						
Purine nucleoside phosphorylase		X	X					X	X	X	X	X	
Puromycin-sensitive aminopeptidase		X	X	X	X		X						
Putative adenosylhomocysteinase 3		X											
Putative elongation factor 1-alpha-like 3							X						
Putative lysozyme C-2								X					
Putative phospholipase B-like 2		X	X	X									
Putative protein FAM10A4						X	X						
Putative RNA-binding protein Luc7-like 2				X									
Putative trypsin-6						X							
Pyridoxal kinase							X						
Pyroline-5-carboxylate reductase 3			X						X				
Pyruvate carboxylase, mitochondrial		X	X	X	X			X					
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial		X						X					
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial		X											
Pyruvate kinase PKM	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Rab GDP dissociation inhibitor alpha		X											
Rab GDP dissociation inhibitor beta		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
Radixin		X	X			X							
Ragulator complex protein LAMTOR1			X	X									
Rano class II histocompatibility antigen, B-1 beta chain										X	X	X	
Rano class II histocompatibility antigen, D-1 beta chain										X	X		
Ras GTPase-activating protein 3		X											
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1		X	X	X		X	X						

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Ras suppressor protein 1							X						
Ras-like protein family member 10A				X	X								
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1			X	X						X	X	X	
Ras-related GTP-binding protein A		X		X									
Ras-related GTP-binding protein C		X	X	X									
Ras-related protein Rab-10		X	X	X									
Ras-related protein Rab-11A				X					X	X		X	
Ras-related protein Rab-11B		X	X				X						
Ras-related protein Rab-11B OS						X							
Ras-related protein Rab-14		X	X	X									
Ras-related protein Rab-15						X	X						
Ras-related protein Rab-1A			X	X			X			X	X		
Ras-related protein Rab-1B		X				X							
Ras-related protein Rab-2A		X	X	X	X					X	X		
Ras-related protein Rab-2B							X						
Ras-related protein Rab-35		X											
Ras-related protein Rab-5A		X									X		
Ras-related protein Rab-5B		X		X									
Ras-related protein Rab-5C		X	X	X	X		X						
Ras-related protein Rab-6B			X										
Ras-related protein Rab-7a	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	
Ras-related protein Rab-8A						X				X			
Ras-related protein Ral-A		X				X	X						
Ras-related protein Ral-B				X									
Ras-related protein Rap-1A						X	X						
Ras-related protein Rap-1b		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
Ras-related protein Rap-2b						X							
Ras-related protein R-Ras		X	X	X			X			X			
Ras-related protein R-Ras2	X												
Receptor expression-enhancing protein 5		X	X	X				X	X	X	X	X	
Receptor of activated protein C kinase 1		X	X	X	X		X	X	X	X		X	
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C										X		X	
Redox-regulatory protein FAM213A						X	X						
Regulator of microtubule dynamics protein 1									X				
Regulator of nonsense transcripts 1		X											
Regulatory-associated protein of mTOR		X											

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Renin receptor			X										
Reticulon-3		X	X	X	X		X	X	X		X		
Reticulon-4		X	X	X		X	X	X	X	X	X		
Retinal dehydrogenase 1							X						
Retinoic acid receptor responder protein 2		X	X										
Retinoic acid-induced protein 3						X							
Retinoid-inducible serine carboxypeptidase		X	X	X									
Retinol-binding protein 4										X			
Rho family-interacting cell polarization regulator 2									X	X	X	X	X
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	X	X	X	X			X			X	X		
Rho GTPase-activating protein 1		X											
Ribonuclease inhibitor							X			X			
RNA-binding protein 39		X											
rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarlin		X		X									
RT1 class I histocompatibility antigen, AA alpha chain										X	X		
RuvB-like 1		X		X									
RuvB-like 2		X											
S-adenosylhomocysteine hydrolase-like protein 1				X									
S-adenosylmethionine synthase isoform type-2		X											
Scavenger receptor class B member 1			X	X		X							
Sec1 family domain-containing protein 1		X											
Secernin-2							X						
Secretory carrier-associated membrane protein 3		X											
Selenium-binding protein 1							X						
Selenium-binding protein 2			X										
Sepiapterin reductase		X											
Septin-11							X						
Septin-2		X	X	X	X		X			X	X	X	
Septin-7		X					X		X		X	X	
Septin-8		X								X			
Septin-9		X	X	X	X								
Serine hydrolase-like protein		X											
Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic		X											
Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial		X	X	X									
Serine incorporator 5						X							
Serine protease HTRA1							X			X	X	X	X

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Serine protease inhibitor A3K										X	X		
Serine protease inhibitor A3L								X	X	X	X		
Serine protease inhibitor A3N										X	X	X	X
Serine/arginine-rich splicing factor 1				X	X								
Serine/arginine-rich splicing factor 2				X	X								
Serine/arginine-rich splicing factor 7				X									
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform		X		X									
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B delta isoform							X						
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit gamma isoform		X											
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform		X	X	X	X		X						
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform		X											
Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform			X	X					X				
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit		X											
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit		X				X	X						
Serine-threonine kinase receptor-associated protein		X											
Serine--tRNA ligase, cytoplasmic		X	X	X	X								
Serotransferrin	X					X	X			X	X		X
Serpin B12						X	X						
Serpin B3						X							
Serpin B4						X							
Serpin B6		X	X	X			X						
Serpin H1		X	X	X			X			X	X	X	X
Serrate RNA effector molecule homolog				X									
Serum albumin	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Serum amyloid P-component						X							
Serum paraoxonase/arylesterase 1							X						
S-formylglutathione hydrolase		X		X			X						
Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial		X		X									
Sialic acid synthase		X		X									
Signal recognition particle subunit SRP68		X		X									

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Signal transducer and activator of transcription 1		X											
Signal transducer and activator of transcription 3		X											
Single-pass membrane and coiled-coil domain-containing protein 2						X							
Skin-specific protein 32						X	X						
Slit homolog 3 protein													X
S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase		X	X	X	X								
Sodium- and chloride-dependent taurine transporter			X										
Sodium bicarbonate cotransporter 3						X							
Sodium/myo-inositol cotransporter		X	X	X									
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2						X							
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1		X	X			X	X						
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	X	X	X			X	X		X	X	X	X	X
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1						X							
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2		X	X	X									
Solute carrier family 12 member 4		X	X										
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1		X	X	X		X	X						
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 14						X	X						
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4		X	X	X	X				X		X		
Sorcin		X	X										
Sortilin							X						
SPARC			X							X	X		
Spectrin alpha chain, erythrocytic 1						X							
Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1			X			X	X	X	X	X	X	X	X
Spectrin beta chain, erythrocytic							X						
Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1		X	X			X	X						
Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2									X				
Spermidine synthase		X											
Spliceosome RNA helicase Ddx39b		X	X	X									
Splicing factor 3B subunit 1		X		X									
Splicing factor U2AF 35 kDa subunit				X									
Splicing factor, proline- and glutamine-rich		X											
Stanniocalcin-1							X						

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1		X	X	X									
Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating		X											
Stress-70 protein, mitochondrial		X	X	X									
Stromal interaction molecule 2						X							
Stromelysin-1										X	X		
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial		X		X	X			X	X				
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial				X				X	X				
Succinate--CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial							X	X					
Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial				X									
Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial		X	X	X	X			X	X				
Sulfhydryl oxidase 1			X										
Sulfite oxidase, mitochondrial									X				
Superoxide dismutase [Cu-Zn]		X	X	X	X								
Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial								X	X				
Surfeit locus protein 4							X						
Sushi domain-containing protein 2							X						
Sushi repeat-containing protein SRPX						X							
Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1		X	X										X
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Synaptogyrin-2		X	X	X	X		X						
Synaptophysin-like protein 1						X	X						
Syntaxin-7						X	X						
Syntenin-1	X	X	X	X	X	X	X			X		X	
Talin-1		X	X	X	X		X						
Talin-2							X						
T-complex protein 1 subunit alpha		X	X	X	X								
T-complex protein 1 subunit beta		X	X	X	X							X	
T-complex protein 1 subunit delta		X	X	X	X								
T-complex protein 1 subunit epsilon		X	X	X	X								
T-complex protein 1 subunit eta		X	X	X	X		X						
T-complex protein 1 subunit gamma		X	X	X	X					X			
T-complex protein 1 subunit theta		X	X	X	X								

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
T-complex protein 1 subunit zeta		X	X	X	X								
Telomerase protein component 1									X				
Tenascin			X			X							
Tenascin-X							X						
Testis-expressed protein 2				X									
Tetraspanin-14				X		X							
Tetraspanin-15			X										
Tetraspanin-3		X	X	X									
Tetraspanin-4	X	X											
Tetraspanin-6		X	X	X		X							
Tetraspanin-7		X											
Thioredoxin		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
Thioredoxin domain-containing protein 5							X						
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial			X					X	X				
Thiosulfate sulfurtransferase		X						X	X			X	
Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic		X	X	X									
Thrombospondin-1	X					X	X						
Thrombospondin-2							X						
Thy-1 membrane glycoprotein						X	X		X	X	X	X	X
Thymidine phosphorylase							X						
Thyroglobulin						X	X						
Tissue alpha-L-fucosidase		X							X				
Tissue factor	X		X										
Titin				X	X	X							
Toll-interacting protein						X							
Trafficking regulator of GLUT4 1										X	X		
Transaldolase		X	X	X	X		X	X	X				
Transcription elongation factor SPT6		X											
Transcriptional activator protein Pur-alpha		X											
Transferrin receptor protein 1		X	X			X	X						
Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3		X	X			X	X						
Transforming protein RhoA		X	X				X			X	X		
Transgelin							X						
Transgelin-2	X	X	X						X	X	X	X	X
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Transketolase		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Translationally-controlled tumor protein		X	X	X						X			

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB-H	VEs TAV OB-H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Translin							X						
Translocon-associated protein subunit delta							X						
Transmembrane 9 superfamily member 2		X											
Transmembrane 9 superfamily member 3		X											
Transmembrane 9 superfamily member 4		X	X										
Transmembrane emp24 domain-containing protein 10		X	X				X			X	X		
Transmembrane emp24 domain-containing protein 2							X						
Transmembrane emp24 domain-containing protein 7							X						
Transmembrane emp24 domain-containing protein 9							X			X			
Transmembrane protein 106A		X		X									
Transmembrane protein 106B		X		X									
Transmembrane protein 109						X	X						
Transmembrane protein 119							X						
Transmembrane protein 33							X						
Transmembrane protein 43						X	X						
Transportin-2		X											
Transthyretin										X			
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial				X				X	X				
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial		X		X				X	X				
Trimethyllysine dioxygenase, mitochondrial									X				
Triosephosphate isomerase		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Tripartite motif-containing protein 47	X	X	X	X	X								
Tripeptidyl-peptidase 1		X	X	X									
Tripeptidyl-peptidase 2		X											
tRNA-splicing ligase RtcB homolog		X		X									
Tropomyosin alpha-4 chain						X							
Trypsin-1						X	X						
Trypsin-2							X						
Trypsin-3						X							
Tryptase alpha/beta-1							X						
Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic		X		X			X						
Tsukushin		X											
Tubulin alpha-1A chain		X		X	X		X			X			
Tubulin alpha-1B chain						X	X	X	X	X	X	X	X
Tubulin alpha-1C chain	X	X	X	X	X	X	X						
Tubulin alpha-4A chain									X				

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Tubulin beta chain						X	X						
Tubulin beta-1 chain		X											
Tubulin beta-2A chain		X								X	X		
Tubulin beta-2B chain				X	X								
Tubulin beta-4B chain		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Tubulin beta-5 chain	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	
Tubulin beta-6 chain		X											
Tubulin-specific chaperone D		X		X									
Tubulin--tyrosine ligase-like protein 12		X		X									
Tumor suppressor candidate 5 homolog		X	X	X									
Tumor susceptibility gene 101 protein	X	X	X			X							
Type 2 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 4-phosphatase		X	X										
U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa		X											
U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase		X											
Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial								X	X				
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5		X	X	X									
Ubiquitin-60S ribosomal protein L40		X	X	X	X	X	X						
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N			X										
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1		X	X	X	X	X	X		X				
UDP-glucose 6-dehydrogenase		X	X	X	X					X			
UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase-like protein 1		X	X										
Unconventional myosin-Ic	X	X	X	X	X	X	X			X	X		
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase		X	X		X	X	X						
Vacuolar protein sorting-associated protein 13C		X											
Vacuolar protein sorting-associated protein 35		X	X	X	X		X						
Vacuolar protein sorting-associated protein 4B						X							
Valine--tRNA ligase		X		X	X								
Vascular non-inflammatory molecule 2						X							
Vascular non-inflammatory molecule 3					X								
Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial		X		X				X	X				
Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 2							X						
Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase		X											
Vesicle-associated membrane protein 2		X							X	X	X		

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	VEs PRE ADI PO	VEs ADI PO	VEs HG/ HI	VEs AP	VEs AO	VEs TAS OB- H	VEs TAV OB- H	VEs TAP NP	VEs TAP OB	VEs TAS NP	VEs TAP OB	VEs TAV NP	VEs TAV OB
Vesicle-fusing ATPase		X											
Vesicular integral-membrane protein VIP36							X						
Vimentin	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Vinculin	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Vitamin D-binding protein										X	X		
Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like protein 1							X						
Vitronectin		X				X	X						
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1		X	X	X			X		X				
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2		X	X	X		X	X						
Voltage-dependent anion-selective channel protein 3		X	X	X		X	X						
Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1							X						
Vomeronal type-1 receptor 5						X							
von Willebrand factor						X							
V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1		X	X	X									
V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit		X	X	X	X								
V-type proton ATPase catalytic subunit A		X	X	X	X								
V-type proton ATPase subunit B, brain isoform		X	X	X	X								
V-type proton ATPase subunit D		X	X										
V-type proton ATPase subunit d 1		X	X	X									
V-type proton ATPase subunit E 1		X	X	X									
V-type proton ATPase subunit H		X	X	X									
WASH complex subunit 4		X	X	X									
WASH complex subunit 5		X		X									
WD repeat-containing protein 1		X	X	X		X	X		X	X		X	
WW domain-binding protein 2			X										
Xaa-Pro aminopeptidase 1		X	X										
Xaa-Pro aminopeptidase 2										X			
Xanthine dehydrogenase/oxidase		X							X	X	X	X	X
X-ray repair cross-complementing protein 5						X							
X-ray repair cross-complementing protein 6						X							
Zinc transporter ZIP14						X							
Zinc-alpha-2-glycoprotein						X	X						
Total general	138	825	590	580	292	404	575	212	286	326	231	200	165

ANEXO IV: FIGURAS SUPLEMENTARIAS

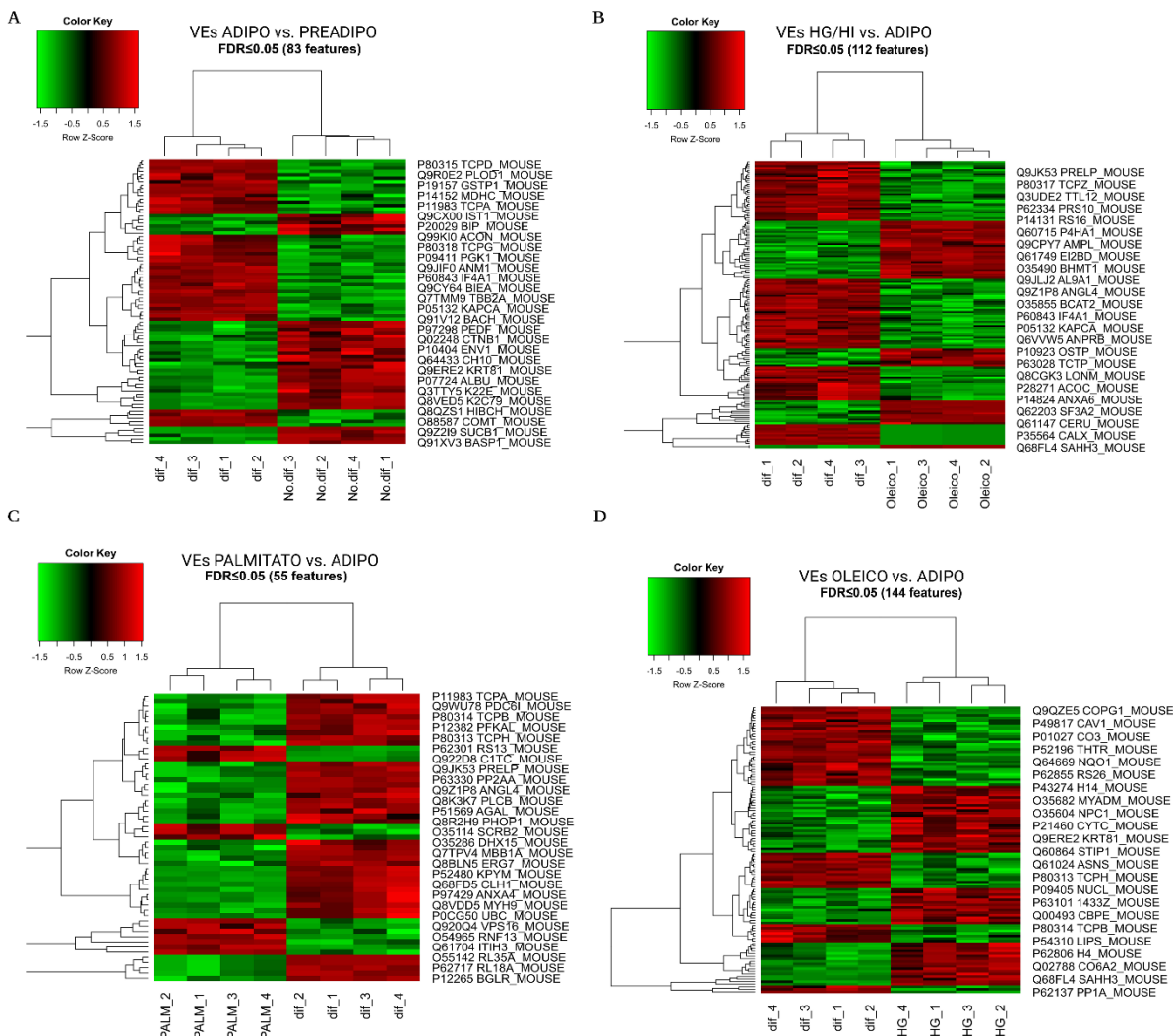


Figura S1. Mapas de calor del análisis DIA-SWATH/MS de las VEs liberadas por los adipocitos C3H10T1/2. Se muestra el análisis de grupos de las proteínas con un *fold change* >1,5 y un p-valor ≤ 0,05 en las VEs ADIPO frente PREADIPO (A); en las VEs HG/HI frente VEs ADIPO (B); en VEs PALMITATO frente VEs ADIPO (C); y en las VEs OLEICO frente las VEs ADIPO (D). VEs PREADIPO: VEs liberadas por los preadipocitos C3H10T1/2; VEs ADIPO: VEs liberadas por los adipocitos control; VEs HG/HI: VEs liberados por los adipocitos tratados con el tratamiento con alta glucosa e insulina; VEs PALMITATO: VEs liberadas por los adipocitos tratados con ácido palmítico (AP); VEs OLEICO: VEs liberadas por los adipocitos tratados con ácido oleico (AO).

A

Función Molecular- Panther	Entidades	Entidades
	en VEs TAV	en VEs TAS
Actividad catalítica (GO:0003824)	175	100
Unión (GO:0005488)	158	109
Actividad de moléculas estructurales (GO:0005198)	43	27
Actividad transportadora (GO:0005215)	23	25
Actividad receptora (GO:0004872)	15	16
Actividad transductora de señales (GO:0004871)	15	6
Actividad antioxidante (GO:0016209)	8	6
Actividad reguladora de la traducción (GO:0045182)	3	2
Actividad reguladora de canales (GO:0016247)	0	1

B

REACTOME –VEs (Versión 6.4)	Entidades encontradas	
	TAV	TAS
Nombre de la vía		
Sistema inmunitario	268	148
Sistema inmunitario innato	162	117
Hemostasia	104	76
Organización de la matriz extracelular	59	56
Activación, señalización y agregación de las plaquetas	56	42
Degranulación plaquetaria	38	35
Respuesta a la elevación del Ca ²⁺ citosólico de las plaquetas	38	35
Regulación del transporte y la captación del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) mediante las proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP)	30	24
Sistema inmunitario adaptativo	119	
Señalización de citoquinas en el sistema inmunitario	113	
Degranulación de los neutrófilos	113	
Biología del desarrollo		77
Procesamiento y presentación de antígenos mediada por el MHC de clase I	65	
Señalización del interferón	65	
Señalización del interferón gamma	61	
Procesamiento de antígenos-Presentación cruzada	59	
Interacciones inmunorreguladoras entre una célula linfoide y una no linfoide	58	
Vía ER-Fagosoma	54	
Presentación de antígenos: Plegado, ensamblaje y carga de péptidos del MHC de clase I	51	
Vía endosomal/vacuolar	46	
Señalización del interferón alfa/beta	45	
Interacciones de la superficie celular con las integrinas		29
Degradación de la matriz extracelular		24
Formación de la envoltura cornificada		23
Fosforilación postraduccional de proteínas		22
Proteoglicanos de la MEC		19
Interacciones membrana-ECM no integrinas		18
Interacciones de laminina		14
Interacciones de basigina		11
GRB2:SOS se vincula a la señalización MAPK de las integrinas		9
La vinculación de p130Cas con la señalización de MAPK para las integrinas		9

Figura S2. Análisis de las proteínas identificadas mediante DDA de las VEs liberadas del tejido adiposo subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) de pacientes con obesidad. Análisis funcional mediante la base de datos Panther y Reactome para la obtención de las funciones moleculares (A) y rutas biológicas (B) de las proteínas identificadas con un FDR <1 % (99 % de confianza). FDR: Tasa de falsos descubrimientos.

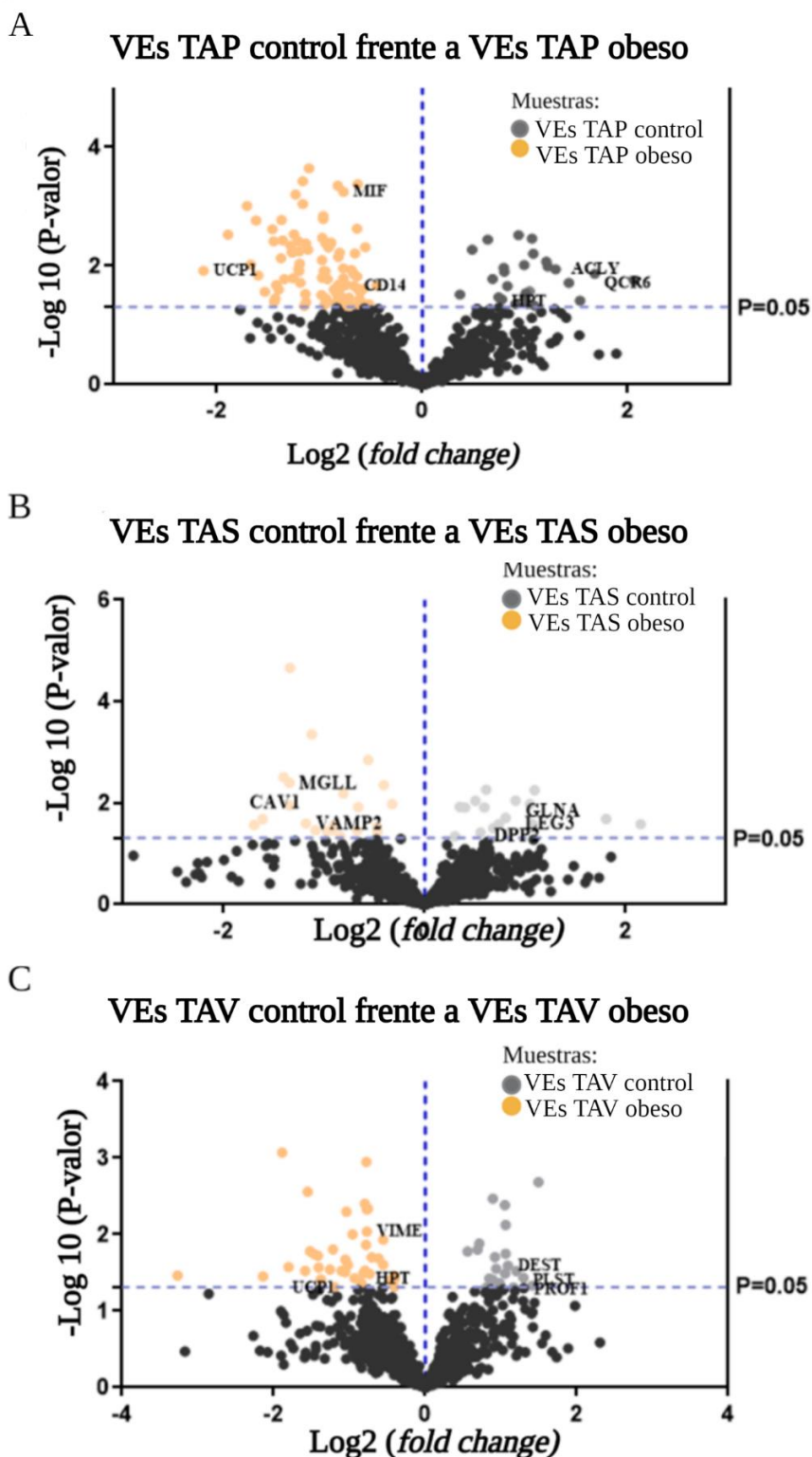


Figura S3. Análisis de las proteínas identificadas mediante DIA-SWATH/MS de las VEs de tejido adiposo pardo (TAP), subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) de animales con obesidad y normopeso/control. El análisis cuantitativo (SWATH) de las proteínas identificado en las vesículas del TA pardo (A), subcutáneo (B) y visceral (C) obeso (amarillo) en comparación con las de magro (gris) se representa como un gráfico de Vulcano, eje x = \log_2 (fold change), eje y = $-\log_{10}$ (p-valor). La línea punteada azul horizontal muestra el p-valor elegido para seleccionar proteínas reguladas al alza.

A

ELEVADAS EN VEs DE TAS OBESO		
NOMBRE	p-value	Fold Change
Rano antígeno de histocompatibilidad de clase II, cadena B-1 beta	0,000	6,04
Aminopeptidasa N	0,020	5,44
Albumina	0,003	5,08
Inhibidor de la serina proteasa A3L	0,034	4,88
Serotransferrina	0,006	4,41
Ig cadena gamma-2B región C	0,003	4,07
Ig gamma-1 cadena C región	0,018	3,82
Receptor 3 del péptido natriurético auricular	0,001	3,78
Proteína de control de la división celular 42 homóloga	0,004	3,60
Proteína de unión a nucleótidos de guanina subunidad G(I)/G(S)/G(T) beta-1	0,004	3,57
Región C de la cadena gamma-2A de la Ig	0,004	3,47
Proteína de membrana asociada a vesículas 2	0,001	3,43
Proteína 14-3-3 beta/alfa	0,008	3,36
Proteína transformante RhoA	0,003	3,34
Proteína de unión a la vitamina D	0,001	3,31
Isoforma LMW de Kininogen-1	0,046	3,20
Anexina A4	0,006	3,07
Fosfomán	0,033	3,03
Sustrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionada con Ras	0,001	3,02
E3 ubiquitina-proteína ligasa NEDD4	0,045	2,97
Proteína similar al receptor del componente del complemento 1	0,003	2,91
Proteína relacionada con Ras Rap-1b	0,034	2,88
Glicoproteína de membrana Thy-1	0,006	2,84
Anexina A5	0,015	2,83
Fosfolípido fosfatasa 3	0,006	2,77
Proteína relacionada con Ras Rap-1A	0,003	2,74
Proteína de unión a GTP SAR1b	0,004	2,71
Galectina-3	0,003	2,69
Dextrin	0,001	2,68
Anexina A6	0,004	2,65
Proteína de unión a nucleótidos de guanina Subunidad G(I)/G(S)/G(T) beta-2	0,001	2,56
Copina-7	0,022	2,51
Beta-2-glicoproteína 1	0,005	2,47
Transtiretina	0,047	2,45
UDP-glucuronosiltransferasa 1A1	0,037	2,44
Subunidad alfa-1 de la proteína de unión a nucleótidos de guanina G(i)	0,004	2,42
Sortilina	0,049	2,40
Caveolina-1	0,017	2,35
Fosfoproteína nuclear ácida rica en leucina 32, miembro de la familia A	0,042	2,31
Fetuin-B	0,022	2,29
Subunidad beta-3 de la ATPasa transportadora de sodio/potasio	0,027	2,28
Cistatina-C	0,011	2,15
Familia 10 de dominios de lectinas de tipo C, miembro A	0,006	2,12
Inhibidor alfa-1 3	0,006	2,11
Proteína 14-3-3 gamma	0,049	2,11
Caveolina-2	0,007	2,07

B

ELEVADAS EN VEs DE TAV OBESO		
NOMBRE	p-value	Fold Change
Histona H2A tipo 2-A	0,038	19,45
Histona H3.1	0,020	16,08
Histona H2B tipo 1	0,024	13,17
Cofactor regulador del intercambio Na(+)/H(+) NHE-RF2	0,033	9,84
Proteína Gla de la matriz	0,017	4,28
Núcleo de la histona macro-H2A.1	0,014	3,83
Vimentina	0,001	3,54
Citocromo c, somático	0,001	3,29
Proteína transportadora de aniones de la banda 3	0,018	3,22
Isocitrato deshidrogenasa [NAD] subunidad alfa, mitocondrial	0,000	3,04
Proteína activadora transcripcional Pur-alfa (fragmentos)	0,003	2,89
Queratina, tipo II del citoesqueleto 8	0,000	2,87
Proteína relacionada con la actina 3	0,036	2,77
Gamma-simucleína	0,054	2,67
Proteína transportadora de esteroides 2	0,012	2,59
Prostaglandina sintasa	0,019	2,43
Anhidrasa carbónica 1	0,009	2,41
Subunidad beta de la proteína del complejo T 1	0,034	2,24
Subunidad de la flavoproteína succinato deshidrogenasa [ubiquinona], mitocondrial	0,012	2,24
Proteína 1 asociada a la caveola	0,045	2,08
3-hidroxisobutiril-CoA hidrolasa, mitocondrial	0,042	2,06
6-fosfofructoquinasa dependiente de ATP, tipo muscular	0,032	2,05
Alfa-actinina-4	0,006	2,02

Figura S4. Análisis cuantitativo DIA-SWATH/MS de las proteínas reguladas en las VEs de tejido adiposo subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) de ratas con obesidad. Se muestran las proteínas reguladas al alza en las VEs de TAS en comparación con las del TAV (A) y las elevadas en las VEs del TAV en comparación con las de las VEs de TAS (B) con un p-valor <0,05 y un fold change >2.

MCF10A- CÉLULAS EPITELIALES DE MAMA NO TUMORAL

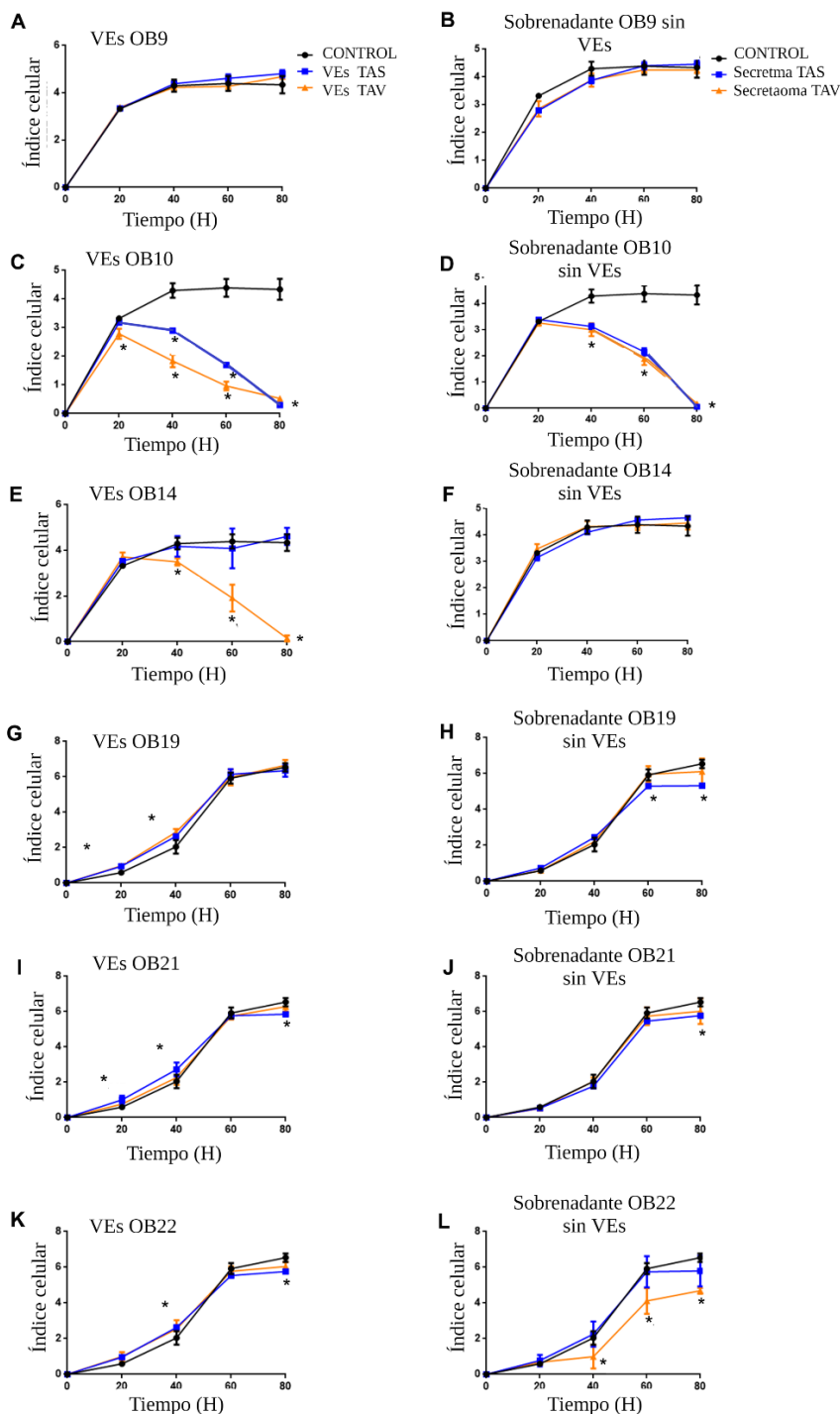


Figura S5. Efecto de las VEs aisladas del TAS y TAV de pacientes individuales con obesidad en la proliferación de las células epiteliales de mama no tumorales (MCF10A). Monitorización a tiempo real de la proliferación de las MCF10 (7.500 células/pocillo) en presencia de vesículas aisladas de 1 gramo de TAV (tejido adiposo visceral) y TAS (tejido adiposo subcutáneo) liberadas de individuos obesos independientes (n = 6) (A, C, E, G, I, K). El efecto del sobrenadante libre de las VEs tras la ultracentrifugación (diluido 1:100) para cada uno de los pacientes se muestran en (B, D, F, H, J, L). Las diferencias se analizaron mediante la prueba de *One-Way Anova-Kruskall Wallis*, seguida de la prueba de comparación múltiple de *Dunn* $P \leq 0,05$. Se consideró estadísticamente significativo (* $p < 0,05$). H: horas.



MCF7- CÉLULAS EPITELIALES DE MAMA TUMORAL

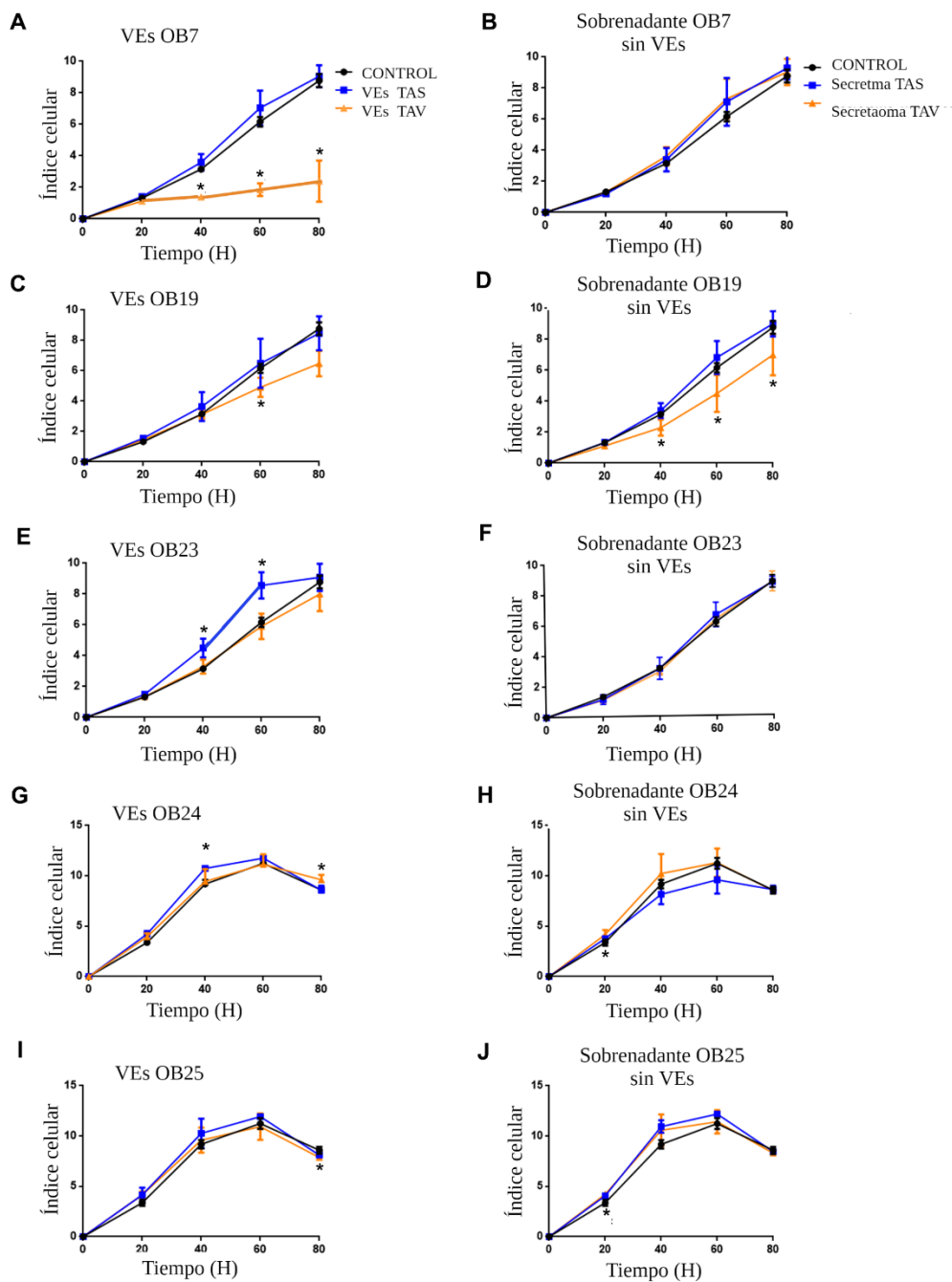


Figura S6.1. Efecto de las VEs aisladas del TAS y TAV de pacientes individuales con obesidad en la proliferación de las células epiteliales de mama tumorales (MCF7). Monitorización a tiempo real de la proliferación de las MCF7 (7.500 células/pocillo) en presencia de vesículas aisladas de 1 gramo de TAV (tejido adiposo visceral) y TAS (tejido adiposo subcutáneo) liberadas de individuos obesos independientes (n = 9) (A, C, E, G, I). El efecto del sobrenadante libre de las VEs tras la ultracentrifugación (diluido 1:100) para cada uno de los pacientes se muestran en (B, D, F, H, J). Las diferencias se analizaron mediante la prueba de *One-Way* Anova-Kruskall Wallis, seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn; $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo (* $p < 0,05$). H: horas.

MCF7- CÉLULAS EPITELIALES DE MAMA TUMORAL

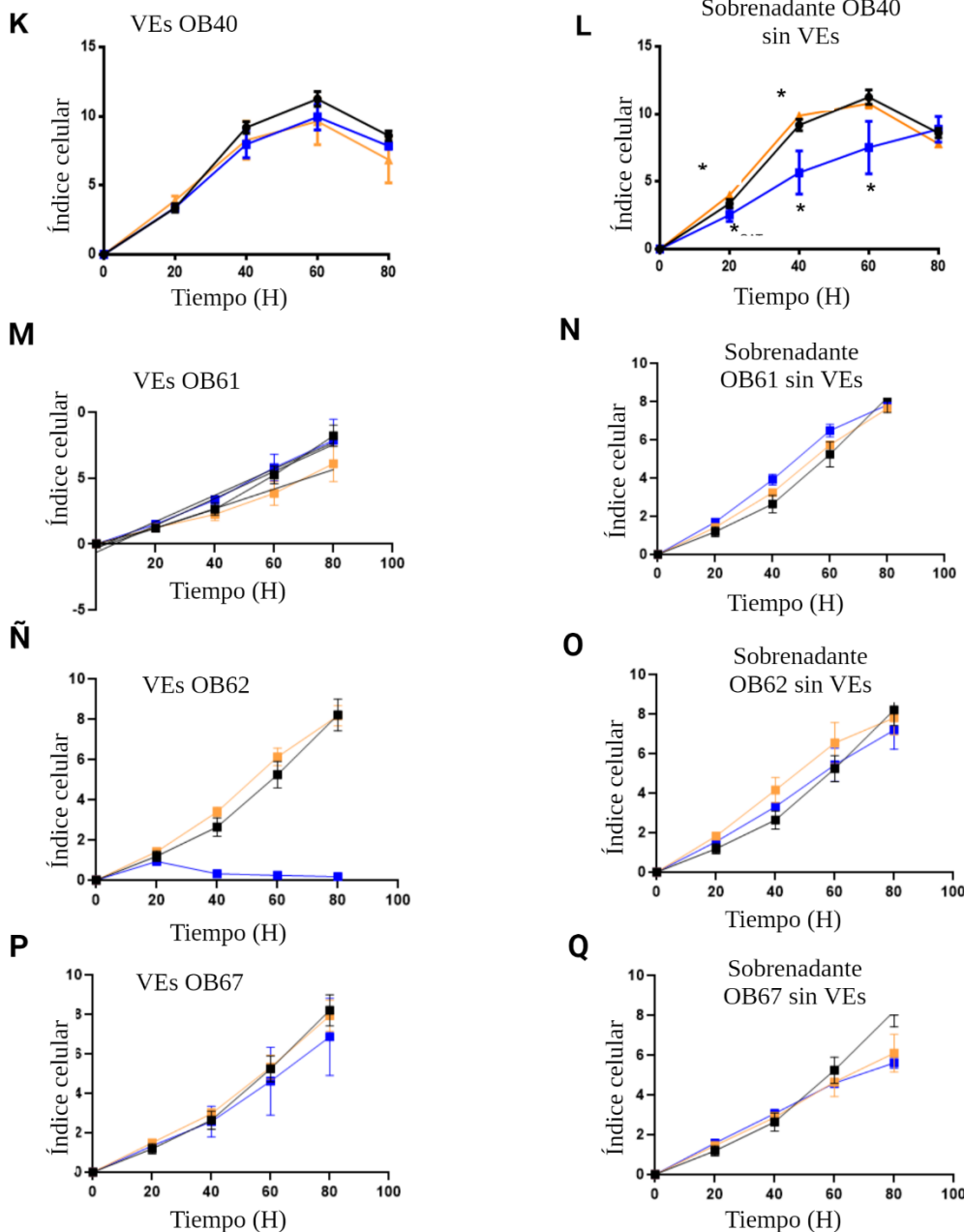


Figura S6.2. Efecto de las VEs aisladas del TAS y TAV de pacientes individuales con obesidad en la proliferación de las células epiteliales de mama tumorales (MCF7). Monitorización a tiempo real de la proliferación de las MCF7 (7.500 células/pocillo) en presencia de vesículas aisladas de 1 gramo de TAV (tejido adiposo Visceral) y TAS (tejido adiposo subcutáneo) liberadas de individuos obesos independientes (n = 9) (K, M, N̄, P). El efecto del sobrenadante libre de las VEs tras la ultracentrifugación (diluido 1:100) para cada uno de los pacientes se muestran en (L, N, O, Q). Las diferencias se analizaron mediante la prueba de *One-Way* Anova-Kruskall Wallis, seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn; $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo (* $p < 0,05$). H: horas.



BI16F1- CÉLULAS MELANOMA

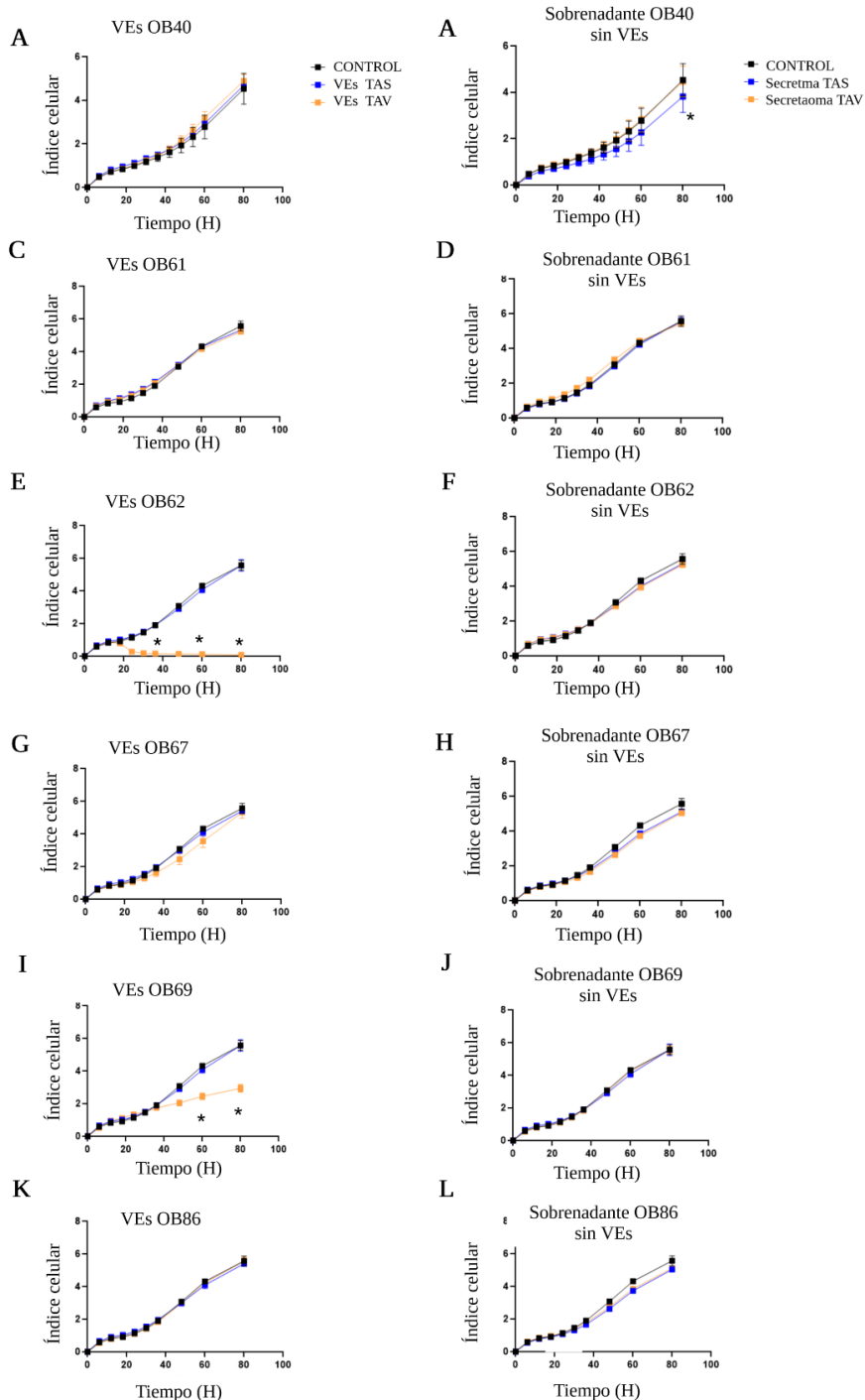


Figura S7. Efecto de las VEs aisladas del TAS y TAV de pacientes individuales con obesidad en la proliferación de las células de melanoma (B16F1). Monitorización a tiempo real de la proliferación de las B16F1 (7.500 células/pocillo) en presencia de vesículas aisladas de 1 gramo de TAV (tejido adiposo visceral) y TAS (tejido adiposo subcutáneo) liberadas de individuos obesos independientes (n = 6) (A, C, E, G, I, K). El efecto del sobrenadante libre de las VEs tras la ultracentrifugación (diluido 1:100) para cada uno de los pacientes se muestran en (B, D, F, H, J, L). Las diferencias se analizaron mediante la prueba de *One-Way Anova-Kruskall Wallis*, seguida de la prueba de comparación múltiple de *Dunn* $P \leq 0,05$. Se consideró estadísticamente significativo (* $p < 0,05$). H: horas.

ANEXO V: DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS Y FINANCIACIÓN

La doctoranda declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.

Este trabajo ha sido realizado en el Grupo Obesidómica del IDIS y ha sido financiado por el proyecto de investigación nacional del ISCIII-PI19/00305, cuyo investigador principal es el Dra. María Pardo Pérez. La doctoranda ha sido contratada por el programa FPU/2017 (Ministerio de Educación, Cultura y Deporte).



La obesidad es una enfermedad metabólica que desencadena diferentes patologías. En este contexto, de manera independiente a la vía clásica de secreción de hormonas y metabolitos, surge el redescubrimiento de las vesículas extracelulares (VEs) como una nueva vía de comunicación celular a nivel fisiológico y patológico capaz de participar en la regulación del metabolismo del organismo. En la presente tesis doctoral, se ha optimizado el aislamiento y la caracterización de las VEs liberadas por el tejido adiposo obeso, además de estudiar su rol funcional tanto en condiciones fisiológicas, como tras las alteraciones metabólicas asociadas a esta patología.