

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Expresión de PPAR- γ y miR-27 en el tejido adiposo de
pacientes obesos**

JORGE LUIS TORRES TRIANA

2015

D. MIGUEL MARCOS MARTÍN, PROFESOR ASOCIADO DEL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

DÑA. LOURDES HERNÁNDEZ COSIDO, PROFESORA ASOCIADA DEL
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA. UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

CERTIFICAN

Que el trabajo presentado por D. Jorge Luis Torres Triana, titulado “**Expresión de PPAR- γ y miR-27 en el tejido adiposo de pacientes obesos**”, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Medicina, y reúne, a su juicio, originalidad y contenido suficiente para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Salamanca, a 15 de diciembre de 2014.

Fdo. Prof. Dr. Miguel Marcos Martin. Profa. Dra. Lourdes Hernández Cosido

A mi familia

Quiero expresar mi agradecimiento:

A los profesores Miguel Marcos Martín y Lourdes Hernández Cosido, directores de este trabajo. Por brindarme la oportunidad de iniciar este proyecto y recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad. Por el apoyo, la orientación, la discusión crítica y el tiempo dedicado, que han permitido que esta tesis se convirtiera en realidad.

Al equipo de Cirugía Bariátrica encabezado por el Prof. Luis Ortega, por su colaboración incondicional durante estos años, la asistencia técnica y la selección de los pacientes y controles incluidos en este estudio.

A los profesores Francisco Javier Laso Guzmán y Rogelio González Sarmiento, por su confianza depositada para la realización de este proyecto y sobre todo por incentivar la investigación en nuestro servicio de Medicina Interna y en nuestro entorno.

A la Dra. Guadalupe Sabio, por su colaboración en este proyecto y el apoyo prestado durante estos años.

A Ana, Lucía y Ronald por la ayuda prestada en la recogida de datos clínicos.

A Marian y a Nieves por su incalculable colaboración técnica.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina, por su amabilidad y su predisposición para ayudarme en los variados problemas técnicos del aprendizaje, estandarización y realización de la PCR.

A mis amigos, compañeros residentes y adjuntos del Hospital Clínico de Salamanca, que a lo largo de este recorrido me han permitido compartir experiencias, sentimientos y aprender de cada uno de ellos para intentar ser mejor cada día.

A Laura por todos los momentos juntos, por su apoyo, confianza y comprensión.

A mis padres y a mi hermano por brindarme un hogar cálido, apoyarme en todas mis aventuras y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos.

I. INTRODUCCIÓN	1
1. La obesidad como problema de salud	3
2. Morbimortalidad asociada a la obesidad	5
2.1. Enfermedad cardiovascular	6
2.2. Hipertensión arterial	6
2.3. Dislipemia	7
2.4. Diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina	7
2.5. Esteatohepatitis no alcohólica	8
2.6. Cáncer	9
2.7. Efectos respiratorios	10
3. Impacto económico de la obesidad	10
4. Etiopatogenia de la obesidad	11
5. Tratamiento de la obesidad	14
5.1. Modificaciones del estilo de vida	15
5.2. Tratamiento farmacológico	16
5.3. Tratamiento quirúrgico	17
6. Papel de los receptores activadores de proliferación de peroxisomas (PPAR)-γ en la obesidad	19
6.1. Estructura y mecanismo de acción del PPAR- γ	20
6.2. Funciones fisiológicas del PPAR- γ	24
6.3. Papel fisiopatológico del PPAR- γ en la obesidad	28
7. Influencia del micro-ARN en la regulación del PPAR-γ	32

7.1.	Función reguladora de los micro-ARN en la obesidad y el metabolismo	33
7.2.	Regulación del PPAR- γ por micro-ARN	35
II.	OBJETIVOS	37
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	41
1.	Muestra objeto de estudio	43
2.	Procesamiento de muestras y extracción de ARN total	44
3.	Cuantificación de la expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa relativa	44
3.1.	RT-PCR a partir de ARNm	47
3.2.	Curvas de fusión (<i>melt curves</i>)	48
3.3.	Selección de genes de referencia para la normalización	49
3.4.	Análisis de la expresión génica	51
4.	Transcripción reversa y cuantificación de ARNm por PCR a tiempo real	53
4.1.	Síntesis de ADNc a partir de ARNm	53
4.2.	Cebadores o primers	54
4.3.	Temperatura de anillamiento	55
4.4.	Análisis de las curvas de fusión (<i>melt curves</i>)	55
4.5.	Cálculo de la eficiencia de la PCR	56
4.6.	Condiciones finales de la reacción de PCR a tiempo real	57
4.7.	Análisis de la estabilidad de expresión de los genes de referencia	58
4.8.	Cálculo de la expresión génica	59
5.	Transcripción Reversa y cuantificación por PCR a tiempo real de micro-ARN	59
5.1.	Síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN	59

5.2.	Cebadores o primers	60
5.3.	Análisis de las curvas de fusión (<i>melt curves</i>)	60
5.4.	Condiciones finales de la reacción de PCR a tiempo real	61
5.5.	Análisis de la estabilidad de expresión de los genes de referencia	62
5.6.	Cálculo de la expresión génica	63
6.	Métodos estadísticos	63
7.	Financiación del estudio	64
IV.	RESULTADOS	65
1.	Características clínicas de casos y controles	67
2.	Expresión de genes de referencia en las muestras (actina y miR-103a)	68
3.	Expresión del PPAR-γ1 y PPAR-γ2 en grasa visceral	68
3.1.	Comparación de la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en grasa visceral entre casos y controles	68
3.2.	Influencia del sexo en la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en grasa visceral	69
3.3.	Correlación de la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en grasa visceral con las variables clínicas y analíticas	70
4.	Expresión del PPAR-γ1 y PPAR-γ2 en grasa subcutánea	74
4.1.	Comparación de la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en grasa subcutánea entre casos y controles	74
4.2.	Influencia del sexo en la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en grasa subcutánea	74
4.3.	Correlación de la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en grasa subcutánea con las variables clínicas y analíticas	75
5.	Expresión de miR-27a y miR-27b en grasa visceral	76

5.1. Comparación de la expresión de miR-27a y miR-27b en grasa visceral entre casos y controles	76
5.2. Influencia del sexo en la expresión de miR-27a y miR-27b en grasa visceral	76
5.3. Correlación de la expresión de miR-27a y miR-27b en grasa visceral con las variables clínicas y analíticas	77
6. Expresión de miR-27a y miR-27b en grasa subcutánea	78
6.1. Comparación de la expresión de miR-27a y miR-27b en grasa subcutánea entre casos y controles	78
6.2. Influencia del sexo en la expresión de miR-27a y miR-27b en grasa subcutánea	78
6.3. Correlación de la expresión de miR-27a y miR-27b en grasa subcutánea con las variables clínicas y analíticas	79
6.4. Correlación entre los niveles de expresión del PPAR- γ 1, PPAR- γ 2, miR-27a y miR-27b	82
7. Relación entre los niveles de expresión del PPAR-γ1 y PPAR-γ2 y la pérdida de peso postquirúrgica	83
8. Relación entre los niveles de expresión de miR-27a y miR-27b y la pérdida de peso postquirúrgica	89
V. DISCUSIÓN	91
1. Consideraciones metodológicas de los estudios de expresión de ARN en tejido adiposo de pacientes obesos	94
1.1. Selección de casos y controles	95
1.2. Obtención y procesamiento de las muestras	96
1.3. Optimización de la PCR	97

1.4. Selección del gen de referencia	98
2. Diferencias en la expresión del PPAR-γ en tejido adiposo de sujetos obesos frente a controles y relación con el IMC	99
2.1. Resultados previos respecto a la expresión del PPAR- γ en tejido adiposo de sujetos con obesidad	100
2.2. Papel fisiopatológico del PPAR- γ en la obesidad	105
3. Relación entre los niveles del PPAR-γ1 en tejido adiposo y la pérdida de peso postquirúrgica.	109
4. Expresión de miR-27a y miR-27b en tejido adiposo y correlación con PPAR-γ	112
5. Implicaciones de nuestros resultados y líneas futuras de investigación	113
VI. CONCLUSIONES	115
VII. BIBLIOGRAFÍA	119
VIII. ANEXOS	143

I. INTRODUCCIÓN

1. La obesidad como problema de salud

La obesidad constituye uno de los principales problemas de salud pública mundial y tiene un enorme impacto socio-sanitario, debido a que favorece el desarrollo de diversas enfermedades crónicas como la hipertensión arterial, la diabetes mellitus, la cardiopatía isquémica, la artrosis, el síndrome de hipoventilación, la obesidad, el síndrome de apneas e hipopneas del sueño y algunos tipos de cánceres^{1,2}.

El sobrepeso y la obesidad pueden definirse como una acumulación anormal o excesiva de grasa debido a la interacción entre factores genéticos, ambientales y psicosociales³. El mejor indicador para definir estas condiciones es el índice de masa corporal (IMC), que es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla y se calcula al dividir el peso (medido en kilogramos) por la talla al cuadrado (expresada en metros). El IMC proporciona así la medida más útil del sobrepeso y la obesidad en la población, puesto que es válida para ambos sexos y para los adultos de todas las edades. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido los puntos de corte en adultos de 25 kg/m² para el sobrepeso y de 30 kg/m² para la obesidad y recomienda la clasificación por categorías de acuerdo al IMC que puede verse en la Tabla 1⁴.

Tabla 1. Clasificación del sobrepeso y la obesidad según el IMC.

Clasificación	Índice de masa corporal (kg/m ²)
Bajo peso	< 18,5
Peso normal	18,5 - 24,9
Sobrepeso	25 - 29,9
Obesidad	≥30
Obesidad grado I	30 - 34,9
Obesidad grado II	35 - 39,9
Obesidad grado III	≥40

Los efectos perjudiciales de la obesidad actualmente están bien reconocidos, pero la obesidad no siempre ha tenido connotaciones negativas en relación con la

salud a lo largo de la historia. En algunas culturas, de hecho, la obesidad se ha apreciado y reconocido como un síntoma de bienestar y de riqueza. En entornos en los que solo los más ricos podían ganar peso, el ser obeso era un indicador más claro de riqueza que las ropas lujosas o las joyas; la delgadez, en cambio, se identificaba con el hambre, la enfermedad y la pobreza⁵.

En el año 2008 la OMS estimó que 1400 millones de personas en el mundo tenía sobrepeso y más de 500 millones eran obesos⁶. Estas cifras se han elevado en los últimos años, como lo demuestra el último análisis del *Global Burden of Disease Study 2013*⁷, donde se indica que 2100 millones de personas tienen en la actualidad sobrepeso, lo que equivale a un incremento de la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad desde 1980 a 2013 de un 27,5% para adultos y un 47,1% para niños. Este aumento en la proporción de sobrepeso y obesidad fue similar en mujeres que en hombres, con un prevalencia ligeramente aumentada en mujeres. Así, la proporción de sobrepeso aumentó en hombres del 28,8% en 1980 al 36,9% en 2013 y, para las mujeres, la proporción se elevó del 29,8% al 38% durante el mismo periodo⁷. De mantenerse esta tendencia, se prevé que en el 2030 la prevalencia de obesidad estará entorno al 50% en Estados Unidos y al 40% en el Reino Unido⁸.

En España, la Encuesta Nacional de Salud de 2011-2012 revela un incremento de la prevalencia de obesidad cercano al 10% durante los últimos 25 años, pasando del 7,4% en 1987 al 17% actual. De igual forma el sobrepeso se ha incrementado y afecta al 53,7% de la población española⁹. En 2012, en el grupo de edad de 8 a 17 años, la prevalencia de sobrepeso es del 26% y la de obesidad, del 12,6%, con lo que podemos afirmar que 4 de cada 10 jóvenes sufren exceso de peso¹⁰.

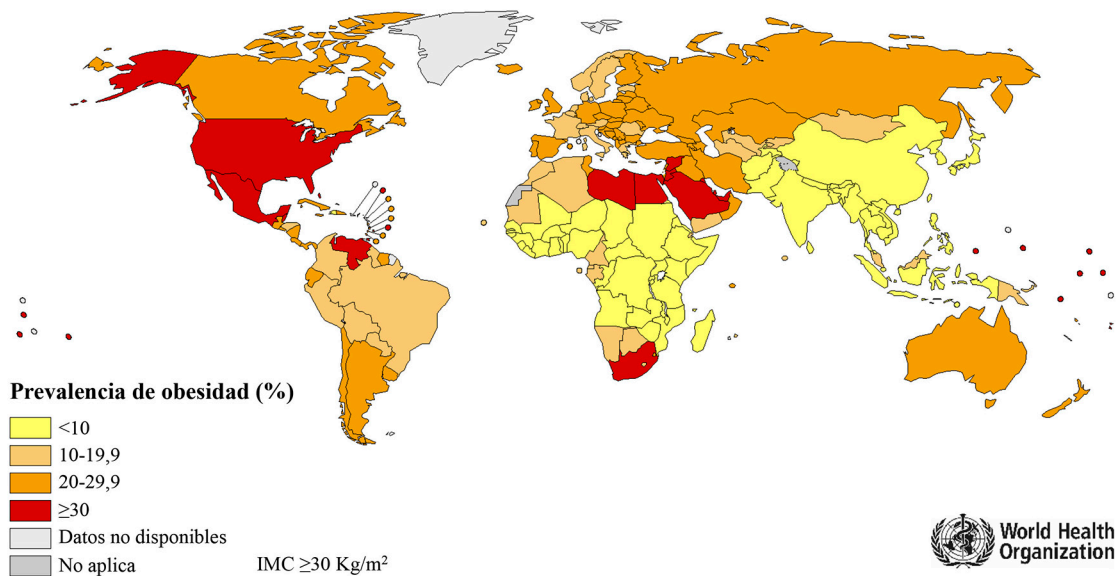


Figura 1. Mapa Mundial de la obesidad en la población mayor de 20 años en 2008.

Fuente Observatorio Mundial de la Salud. Organización Mundial de la Salud. <http://gamapserv.who.int>

2. Morbimortalidad asociada a la obesidad

Según los informes de la OMS, el sobrepeso y la obesidad ocupan el quinto lugar en la lista de factores de riesgo de mortalidad en el mundo y son responsables de 2,8 millones de muertes cada año (el 5% del total mundial). Esta cifra solo es superada por la hipertensión arterial (13%), el consumo de tabaco (9%), la glucemia alterada en ayunas (6%) y la inactividad física (6%)¹¹. Estudios recientes han demostrado la relación entre un IMC elevado con un incremento en la mortalidad por todas las causas¹²⁻¹⁶, además de efectos negativos sobre la longevidad y la calidad de vida y la reducción de los años de vida sin discapacidad. Todos estos efectos negativos se deben a que la obesidad incrementa el riesgo de desarrollar diversas enfermedades, como la hipertensión, la dislipemia, la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus, la esteatohepatitis no alcohólica y diferentes tipos de cáncer, entre otras¹⁷.

2.1. Enfermedad cardiovascular

La enfermedad cardiovascular, entendida como la presencia de cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular o arteriopatía periférica, tiene como uno de sus factores de riesgo la obesidad y especialmente la obesidad abdominal^{18,19}. En un estudio de seguimiento a 15 años realizado en Finlandia, se evidenció un incremento del riesgo de enfermedad cardiovascular a partir de valores de IMC de 23 kg/m² para los hombres y de 22 kg/m² para las mujeres²⁰. Este mayor riesgo se debe tanto al incremento de la hipertensión, la diabetes mellitus o la dislipemia en estos pacientes²¹, como también a un efecto independiente de la obesidad sobre la enfermedad cardiovascular. Este efecto directo de la obesidad ha sido demostrado por otros estudios clásicos como la cohorte de Framingham²² y comunicado también en un metanálisis reciente en el que se confirma que las personas obesas tienen un mayor riesgo de muerte y problemas cardiovasculares a largo plazo, independientemente de otras condiciones metabólicas²³.

2.2. Hipertensión arterial

La obesidad es reconocida como uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de hipertensión arterial tanto en hombres como en mujeres y en todos los grupos de edad^{21,24}. Así, los pacientes obesos adultos presentan un incremento del riesgo de hipertensión de aproximadamente 2,5 veces en comparación con sujetos no obesos²⁵, mientras que los niños con obesidad presentan un riesgo tres veces mayor^{26,27}. Los mecanismos implicados en el desarrollo de hipertensión asociada a la obesidad son complejos e incluyen la activación del sistema renina angiotensina aldosterona, la disfunción endotelial, la sobre-estimulación del sistema

nervioso simpático, la resistencia a la insulina, un aumento de la reabsorción renal de sodio, la expansión de volumen, la alteración en la regulación de la natriuresis y el desarrollo de alteraciones estructurales en el riñón que finalmente conducirán a la aparición de insuficiencia renal crónica y el consecuente aumento de la presión arterial²⁸⁻³³.

2.3. Dislipemia

La dislipemia también es más frecuente en personas obesas que aquellas con peso normal. En personas con IMC elevado, y especialmente en aquellos con obesidad visceral, es frecuente la elevación de triglicéridos, de lipoproteínas de baja densidad (LDL, del inglés *low density lipoprotein*) y el descenso de lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés *high density lipoprotein*). En concreto, el riesgo de dislipemia aumenta a partir de un IMC de 30 kg/m² en los hombres y de 25 kg/m² en las mujeres^{19,21}.

2.4. Diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina

La diabetes tipo 2 se asocia fuertemente con la obesidad en todos los grupos étnicos y cerca del 90% de las personas que desarrollan diabetes tipo 2 tienen un IMC superior a 23 kg/m². Es importante considerar también que el riesgo de diabetes tipo 2 aumenta progresiva y significativamente cuanto menor sea la edad a la que se eleve el IMC y también con la duración del exceso de peso y la obesidad³⁴⁻³⁶. Además de estas variables, la distribución de la grasa corporal es otro factor importante en el desarrollo de diabetes tipo 2, siendo el acúmulo de grasa visceral uno de los factores de riesgo independiente más importantes para su desarrollo³⁷.

La resistencia a la insulina, que consiste en una alteración de la capacidad de captar glucosa por los tejidos en respuesta a niveles normales de insulina³⁸, influye directamente en el desarrollo de diabetes asociada a la obesidad. La resistencia a la insulina se correlaciona directamente con el aumento de peso, como han demostrado la encuesta de salud de EEUU NHANES III (del inglés *National Health and Nutrition Examination Survey*) y la cohorte del estudio Framingham^{39,40}.

Finalmente, cabe mencionar que la obesidad es uno de los componentes principales del síndrome metabólico, que puede definirse como la presencia en un mismo individuo de una serie de factores de riesgo para diabetes y enfermedades cardiovasculares. Aunque la definición es variable y la existencia del propio síndrome ha estado en discusión, entre estos factores se incluyen la obesidad abdominal, la hiperglucemia o resistencia a la insulina, la dislipemia y la hipertensión arterial³⁸.

2.5. Esteatohepatitis no alcohólica

La esteatosis hepática no alcohólica, causada entre otros factores por el acúmulo de lípidos en el hígado, es reconocida a nivel mundial como la causa más frecuente de enfermedad hepática y su prevalencia ha aumentando rápidamente en los países más desarrollados a consecuencia de la epidemia de la obesidad. La prevalencia de esteatosis hepática (NAFLD, del inglés *non alcoholic fatty liver disease*) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH, del inglés *non alcoholic steatohepatitis*) en los pacientes con obesidad mórbida es del 90% y del 25%, respectivamente^{41,42}. Al igual que en otras comorbilidades de la obesidad, la NAFLD está relacionada también con la resistencia a la insulina, el acúmulo de grasa visceral y el síndrome metabólico^{43,44}.

2.6. Cáncer

La obesidad es una de las principales causas prevenibles de cáncer, siendo un factor de riesgo independiente para el desarrollo de cáncer de mama, endometrio, riñón, colon, páncreas, vesícula biliar y esófago^{13,45-47}. Cerca de un 10% de todas las muertes por cáncer entre las personas no fumadores, están relacionadas con la obesidad¹³ y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de la OMS estima que el sobrepeso y la inactividad física son responsables de un 25-30% de los cánceres de mama, colon, endometrio, riñón y esófago⁴⁸. El mecanismo biológico que explica la relación de la obesidad con cáncer no se conoce con exactitud y probablemente sea diferente para cada tipo de cáncer. Por ejemplo, los estudios apuntan a que un incremento del reflujo gastroesofágico, secundario al mayor volumen abdominal, contribuye al cáncer de esófago^{49,50} mientras que el hiperinsulinismo y la obesidad abdominal desempeñan un papel relevante en el desarrollo del cáncer de colon⁴⁷. El cáncer de mama parece estar asociado con los niveles elevados de estrógeno libre en las mujeres obesas posmenopáusicas, causados por la conversión periférica de las hormonas sexuales mediado por la aromatasa en el tejido adiposo, junto con una caída en las concentraciones de esteroides sexuales unidos a globulinas plasmáticas^{51,52}. Estos cambios probablemente también explican la propensión a cáncer de endometrio^{53,54} y podrían ser relevantes en la posible relación entre el sobrepeso y el cáncer de próstata⁵⁵⁻⁵⁷. Varios estudios epidemiológicos y clínicos han confirmado también la importancia de la obesidad como un factor de riesgo independiente para el carcinoma hepatocelular^{13,58,59}. Así, la inflamación hepática asociada a la esteatosis no alcohólica resulta en una elevada producción de diversas citocinas y adipocinas implicadas en la carcinogénesis

hepática, como el factor de necrosis tumoral (TNF- α , del inglés *tumor necrosis factor*), la interleucina (IL)-6, IL-8, IL-17, IL-18, la leptina y la adiponectina⁶⁰.

2.7. Efectos respiratorios

El síndrome de apnea e hipopnea obstructiva del sueño es el principal problema respiratorio asociado a la obesidad y esta condición es a su vez el primer factor de riesgo para su desarrollo⁶¹. Dentro de la variedad de problemas respiratorios asociados a la obesidad se incluyen además la disnea de esfuerzo, el síndrome de hipoventilación-obesidad, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), el asma, la embolia pulmonar y la neumonía por aspiración⁶²⁻⁶⁴. La ganancia de peso y el aumento del IMC, especialmente en la obesidad de origen central, conlleva una disminución de la función respiratoria, reflejada en la espirometría con un descenso en la capacidad vital forzada (FVC), el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV1), la capacidad residual funcional y el volumen de reserva espiratoria^{65,66}. De igual forma se ha visto un aumento en la demanda muscular de oxígeno durante la ventilación que puede explicar la disnea de esfuerzo que presentan las personas obesas⁶⁴.

3. Impacto económico de la obesidad

El aumento en la prevalencia del sobrepeso y la obesidad conlleva un incremento en los costes sanitarios, de importe similar o incluso superior a los costes sanitarios asociados al tabaquismo^{8,67}. Un metanálisis reciente demostró que la obesidad representa entre un 0,7 a un 2,8% de los costes sanitarios de un país, y que

los gastos médicos de las personas obesas eran un 30% más altos que los de las personas con peso normal⁶⁸.

Aunque resulta muy difícil obtener estimaciones precisas, el coste sanitario extra que supuso la obesidad en Estados Unidos en el 2013 fue de 75000 millones de dólares, lo que representó el 4-7% del gasto sanitario total^{69,70}. En nuestro entorno, la estimación de los costes sanitarios directos e indirectos atribuibles a la obesidad en los países miembros de la Unión Europea para el año 2002 fue de 33000 millones de euros, de los cuales casi 2000 millones de euros correspondían al gasto sanitario en España⁷¹.

Los resultados de un modelo de simulación⁸ que proyecta las consecuencias económicas y sanitarias de la obesidad en las dos próximas décadas en Estados Unidos y Reino Unido, muestran que en el año 2030 habrá 65 millones más de adultos obesos en Estados Unidos y 11 millones más en el Reino Unido, con un aumento consecuente, entre ambos países, de entre 6 a 8,5 millones de casos adicionales de diabetes, de 5,7 a 7,3 millones de casos de enfermedades cardiovasculares y alrededor de medio millón de casos de cáncer. Ello implicaría un total de 26 a 55 millones de años de vida perdidos. Según este estudio, los costes médicos asociados con el tratamiento de estas enfermedades prevenibles supondrían entre 48000 y 66000 millones de dólares al año en los Estados Unidos y 1900-2000 millones de libras al año en el Reino Unido⁸.

4. Etiopatogenia de la obesidad

Tradicionalmente se ha considerado que la obesidad estaba causada por una falta de control de la ingesta por parte de los pacientes, y se creía que eran ellos los únicos responsables de su exceso de peso. Esta visión simplista y tradicional se ha

superado y actualmente se acepta que la obesidad resulta de la interacción de un conjunto de factores ambientales y genéticos, capaces de actuar a través de mediadores de la ingesta y del gasto energético³. Estos factores los podemos agrupar en los siguientes bloques:

a) Inactividad física: es indudable que el sedentarismo reduce el gasto de energía y promueve el aumento de peso. Los avances tecnológicos han favorecido un cambio en la actividad física de las personas tanto a nivel laboral como recreativo, lo que determina una marcada disminución en la actividad física y convierte a la sociedad occidental en una sociedad sedentaria. El análisis de los datos de la encuesta NHANES entre 1960 a 2006, estimó que el gasto energético ocupacional diario se había reducido unas 100 calorías en los últimos 50 años, con el consecuente aumento en la media de peso corporal de hombres y mujeres⁷². De hecho, estudios similares en Europa demuestran que la epidemia de obesidad actual parece estar más asociada con la disminución de la actividad física, que con el aumento de la ingesta^{73,74}.

b) Aumento de la ingesta: el incremento de la ingesta de alimentos, así como el aumento en la proporción de hidratos de carbono refinados y de grasas en la dieta y el consumo de bebidas azucaradas, determinan un gran incremento de la ingesta de calorías contribuyendo a la elevada prevalencia de obesidad a nivel mundial^{75,76}. De igual forma, determinados cambios en los hábitos alimentarios como el consumo frecuente de comidas rápidas, el síndrome de alimentación nocturna y la concentración de la ingesta calórica en pocas comidas al día, se han relacionado también con la ganancia de peso y la obesidad^{77,78}.

c) Factores genéticos: la contribución genética en el peso corporal se ha establecido a través de estudios de asociación familiar, en gemelos y en niños

adoptados. Estos estudios encontraron estimaciones de heredabilidad, o proporción de la variación fenotípica atribuible al genotipo, de un 40 a un 70% para la obesidad⁷⁹.

Dentro de los factores genéticos específicos que influyen en la obesidad, hay descritos trastornos monogénicos que se asocian con esta enfermedad, pero las formas más frecuentes de obesidad se atribuyen a interacciones de múltiples genes con factores ambientales y de conducta. De hecho, la obesidad es un arquetipo de modelo poligénico de enfermedad en el que la susceptibilidad a la misma se debe a diversos factores genéticos que interaccionan entre sí y con factores ambientales que determinan la expresión fenotípica³. Los estudios recientes de asociación genética han encontrado más de 50 loci que se asocian de forma significativa, pero con una susceptibilidad débil a la obesidad. De esta forma, la importancia en la identificación de estos loci, radica también en su contribución al esclarecimiento de nuevas vías fisiopatológicas relacionadas a la obesidad, que a su vez podría conducir a identificar dianas terapéuticas y mejorar el tratamiento de esta enfermedad (Figura 2)⁸⁰. Entre los múltiples genes que se han asociado con la obesidad, los más relevantes son aquellos que codifican la leptina⁸¹, el receptor de leptina⁸², el receptor cannabinoide de tipo 1 (*CNR1*, del inglés *cannabinoid receptor 1*)⁸³, el receptor D2 de dopamina (*DRD2*, del inglés *dopamine receptor D2*), el gen *FTO* (del inglés *fat mass and obesity associated*)^{84,85}, el receptor 4 de la melanocortina (*MC4R*, del inglés *melanocortin 4 receptor*)⁸⁶ o el gen del receptor activador de proliferación de peroxisomas (*PPAR*, del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor*) gamma⁸⁷.

d) Otros factores: un gran número de medicamentos puede producir ganancia de peso, dentro de los cuales destacan los antipsicóticos, los antidepresivos, algunos anticonvulsivantes, hipoglicemiantes, algunos tratamientos hormonales, los betabloqueantes y los glucocorticoides^{88,89}. Asimismo, diferentes trastornos

sentido, las opciones terapéuticas disponibles para lograr el objetivo de reducción de peso son múltiples y van desde los cambios en estilo de vida hasta el tratamiento quirúrgico.

5.1. Modificaciones del estilo de vida

El manejo inicial del paciente con sobrepeso requiere de una intervención en los hábitos del paciente con una combinación de dieta, ejercicio y modificaciones de la conducta. Esta combinación debe generar un balance negativo entre la ingesta y el gasto energético, a partir de una valoración individualizada que permita ajustar la dieta y la actividad física en función de las necesidades y posibilidades de cada paciente.

Las opciones dietéticas son múltiples e incluyen dietas cuya ingesta calórica es muy baja (< 800 kcal/ día), baja (800 a 1500 kcal/día) o moderada (alrededor de 500 kcal/día menos de la ingesta diaria típica). La restricción energética de 500 a 1000 kcal/día respecto a la dieta habitual se traduce en una pérdida ponderal de 0,5-1 kg/semana, lo que representa habitualmente un promedio de pérdida de peso de un 8-10% sobre el valor inicial en 6 meses. El tratamiento dietético deberá mantenerse de por vida para lograr y mantener una reducción ponderal a largo plazo⁹⁵.

El aumento de la actividad física por sí solo y sin disminuir la ingesta calórica, produce una modesta reducción de peso, pero asociado a una restricción calórica no solo favorece una mayor reducción de peso, sino que también induce un cambio en la composición corporal con un aumento de la masa magra respecto a la masa grasa⁹⁶.

5.2. Tratamiento farmacológico

El tratamiento farmacológico puede ser considerado en aquellos pacientes con un IMC $> 30 \text{ kg/m}^2$ o en aquellos pacientes con IMC entre 27 a 29,9 kg/m^2 y comorbilidades asociadas. No debe utilizarse como un tratamiento aislado, sino de forma complementaria al tratamiento básico de plan de alimentación, actividad física y cambios en el estilo de vida. Dentro de los fármacos que han demostrado beneficio en el tratamiento de la obesidad se encuentran:

- Orlistat: Es un inhibidor de las lipasas gástrica y pancreática e impide la hidrólisis de los triglicéridos que provienen de la dieta, reduciendo en un 30% su absorción, lo que contribuye a desarrollar un balance calórico negativo. Su eficacia ha sido demostrada en diferentes ensayos clínicos y metanálisis, en los que también se ha observado que orlistat induce mejorías en la presión arterial y en el perfil lipídico en pacientes obesos⁹⁷⁻⁹⁹.
- Lorcaserin: Es un agonista selectivo de los receptores 2C de la serotonina, que reduce el apetito y con ello disminuye el peso en torno al 5%¹⁰⁰. Además de la pérdida de peso, lorcaserin tiene efectos beneficios sobre factores de riesgo vascular y de diabetes, reduciendo la presión arterial, la frecuencia cardíaca, el colesterol total y LDL, la glucosa en ayunas, los niveles de insulina y marcadores inflamatorios como la proteína C reactiva y el fibrinógeno^{101,102}.
- Drogas simpaticomiméticas: estimulan la liberación de la noradrenalina e inhiben su recaptación en las terminales nerviosas. Producen una disminución en la ingesta de alimentos al causar una sensación de saciedad temprana. Dentro de este grupo de fármacos se encuentran disponibles en el mercado cuatro fármacos que son la fentermina, dietilpropión, benzfetamina y fendimetrazina. Actualmente solo están aprobados como tratamiento a corto plazo (hasta 12 semanas)¹⁰³ y existe

también evidencia de una mayor reducción de peso cuando se combina un simpaticomimético con un anticonvulsivante, como es el caso de la combinación de fentermina con topiramato. Esta combinación ha demostrado reducciones de peso que oscilan entre el 5 al 10%, que se acompañan también de efectos beneficiosos en los factores de riesgo cardiovascular similar a los descritos con orlistat y lorcaserin¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

- Otros: además de los medicamentos mencionados, existe diferentes grupos de medicamentos que han demostrado reducciones significativas de peso en pacientes obesos, como los son la metformina¹⁰⁷, el liraglutide y la exenatide, que son análogos del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1, del inglés *Glucagon-like peptide-1*)¹⁰⁸ y el pramlintide, que es un análogo sintético de la amilina humana^{109,110}.

5.3. Tratamiento quirúrgico

La cirugía bariátrica, entendida como los procedimientos quirúrgicos destinados a reducir el peso corporal, es un tratamiento eficaz a largo plazo respecto a otras medidas convencionales en el tratamiento de la obesidad mórbida, tanto en la reducción de peso, como de las comorbilidades asociadas a la obesidad^{111,112}. La reducción de peso lograda varía en relación a la técnica quirúrgica empleada, con porcentajes de pérdida de peso, que oscilan entre un 50 y un 80% a los dos años¹¹³⁻¹¹⁶. Existe unanimidad en que las indicaciones deben quedar limitadas a sujetos con IMC > 40 kg/m² o IMC > 35 kg/m² en presencia de comorbilidades mayores (como la diabetes tipo 2, la apnea del sueño, la esteatohepatitis alcohólica o el reflujo gastroesofágico grave, entre otras), y también que es preciso asumir ciertos requisitos

de estabilidad psicológica y compromisos para el seguimiento por parte del paciente para garantizar un éxito a largo plazo (Tabla 2).

Tabla 2. Criterios de selección de pacientes con obesidad mórbida candidatos a cirugía bariátrica⁹⁵.

<ul style="list-style-type: none">• Edad 18 – 60 años.• IMC \geq 40 kg/m² o IMC \geq 35 kg/m² con comorbilidades mayores asociadas, susceptibles de mejora tras la pérdida de ponderal.• Tiempo de evolución de la obesidad mórbida mayor a 5 años.• Fracasos continuados tras tratamientos convencionales supervisados.• Ausencia de trastornos endocrinos como causa de la obesidad mórbida.• Estabilidad psicológica: a) ausencia de abuso de alcohol o drogas y b) ausencia de alteraciones psiquiátricas mayores (depresión mayor, esquizofrenia, psicosis), retraso mental, trastornos del comportamiento alimentario (bulimia nerviosa).• Capacidad para comprender los mecanismos por los que se pierde peso con la cirugía y entender que no siempre se alcanzan buenos resultados.• Comprender que el objetivo de la cirugía no es alcanzar el peso ideal.• Compromiso de adhesión a las normas de seguimiento tras la cirugía.• Consentimiento informado después de haber recibido toda la información necesaria (oral y escrita).• Las mujeres en edad fértil deberían evitar la gestación al menos durante el primer año post cirugía.

Los procedimientos quirúrgicos utilizados pueden dividirse en tres grupos¹¹⁷:

A. Restrictivos (limitan la capacidad gástrica)

- Gastroplastia vertical en banda
- Banda gástrica ajustable
- Gastrectomía tubular

B. Malabsortivos (derivan parte del intestino delgado, dificultando la digestión y absorción de los alimentos)

C. Mixtos (incluyen ambos componentes)

- Bypass gástrico en Y de Roux, preferentemente restrictivo
- Derivación biliopancreática y sus variantes, como el cruce duodenal, preferentemente malabsortivos

Actualmente, el abordaje de elección es la laparoscopia, al haber demostrado una menor estancia hospitalaria, una recuperación más rápida y una menor incidencia de complicaciones respecto a la cirugía abierta, con resultados semejantes en pérdida de peso, calidad de vida y resolución de las comorbilidades.

Las complicaciones quirúrgicas más frecuentes e inherentes a la propia cirugía bariátrica incluyen la dehiscencia de suturas, úlcera marginal, comunicación gastrogástrica, estenosis de la anastomosis gastroyeyunal o eventración (25-50%) en cirugías abiertas. Entre las complicaciones médicas se encuentran la aparición de vómitos o diarreas, el síndrome de vaciamiento gástrico acelerado (*dumping*) y aquellas relacionadas con la malabsorción de proteínas y vitaminas. Por ello, el seguimiento de las pautas alimentarias prescritas y la suplementación diaria de complejos de vitaminas y minerales (en especial hierro, calcio y vitaminas B12 y D) deben formar parte de la educación nutricional necesaria tras la cirugía y tenerse en cuenta en el seguimiento^{116,118}.

6. Papel de los receptores activadores de proliferación de peroxisomas (PPAR)- γ en la obesidad

Los PPAR- γ son factores de transcripción activados por ligando que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares hormonales¹¹⁹⁻¹²¹, de los que se han identificado tres isotipos principales: PPAR- α , PPAR- β/δ y PPAR- γ ¹²². El gen del PPAR- γ está localizado en la región 3p25¹²³ con dos isoformas principales específicas (PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2) como resultado de procesamiento alternativo del ARN mensajero (ARNm). Estos receptores están implicados en la regulación del metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, la diferenciación celular y el control de la inflamación¹²¹, a través de la trans-activación y trans-represión de múltiples

genes¹²⁴. Su expresión es variable en los diferentes tejidos celulares (Tabla 3). Así, el PPAR- α se expresa sobre todo en tejido adiposo, el hígado, el músculo, el riñón y el corazón; PPAR- β se expresa de forma más ubicua, con niveles comparativamente mayores en músculo esquelético, cardíaco y en tejido nervioso (particularmente en cerebelo); y el PPAR- γ se expresa de forma predominante en el intestino, el tejido adiposo y en menor medida en el hígado¹²⁴⁻¹²⁶.

6.1. Estructura y mecanismo de acción del PPAR- γ

Los tres isotipos de los receptores PPAR se componen de cinco dominios diferentes: a) un dominio N-terminal A/B o dominio de función activación 1 (AF1, del inglés *activation function 1*) implicado en la trans-activación independiente de ligando, y que en otros casos pueden regular la unión al ADN; b) un dominio de unión al ADN con dos dedos de zinc, responsable de la mitad del reconocimiento de especificidad de genes diana; c) una región bisagra; d) un dominio de unión al ligando carboxi-terminal, y e) un dominio de trans-activación o de función activación 2 (AF2, del inglés *activation function 2*)^{120,121,127}.

Tabla 3. Propiedades de las isoformas de PPAR.

	PPAR- α	PPAR- γ	PPAR- β/δ
Principales tejidos donde se expresa	Hígado y músculo esquelético	Tejido adiposo	Ubicuo
Ligandos naturales	Ácidos grasos Leucotrieno B4 Ácido hidroxieicosatetraenóico-8	Ácidos grasos Ácido araquidónico Ácido hidroxieicosatetraenóico 15 Prostaglandina J2	Ácidos grasos
Ligandos sintéticos	Fenofibrato Gemfibrozilo	Tiazolidinedionas	GW501516
Principales funciones	Metabolismo lipídico	Homeostasis de la glucosa Almacenamiento de lípidos	Metabolismo lipídico

		Diferenciación y maduración de adipocitos	Curación de heridas
--	--	---	---------------------

Modificado de Wilding *et al.*¹²⁸ y Grygiel-Gornia *et al.*¹²⁹.

La regulación transcripcional de los PPAR, incluyendo el PPAR- γ , requiere la heterodimerización con el receptor retinoide X (RXR, del inglés *retinoid X receptor*), que pertenece a la misma superfamilia de receptores nucleares¹²⁰. Este heterodímero PPAR/RXR se une a los elementos de respuesta de proliferación del peroxisoma (PPRE, del inglés *peroxisome proliferator response element*, Figura 3) de los genes diana del complejo PPAR/RXR. Estos PPRE suelen estar presentes en una o múltiples copias en la región promotora de un gran número de genes diana implicados en múltiples funciones celulares¹²⁷, con una amplia variedad de funciones¹³⁰⁻¹³³

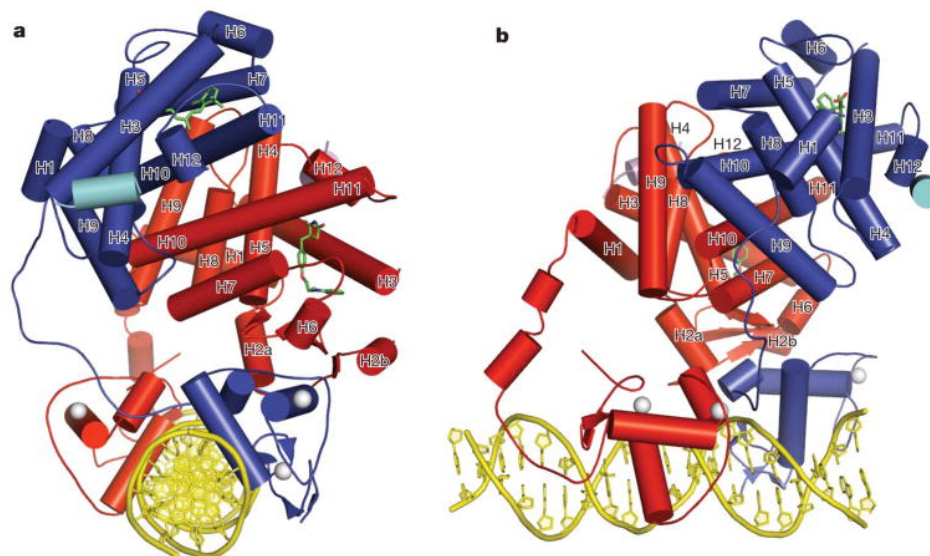


Figura 3. Estructura general del complejo de PPAR γ -RXR- α con PPRE.

Las figuras a y b son vistas ortogonales en las que se muestra el RXR- α de color azul, el PPAR- γ de color rojo y el ADN con la región PPRE de color amarillo. Se muestran además otros ligandos de PPAR- γ y péptidos coactivadores (p. ej., la rosiglitazona en verde). RXR: del inglés *retinoid X receptor*. PPAR: del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor*. PPRE: del inglés *peroxisome proliferator response element*. Modificado de Chandra *et al.*¹³⁴.

El control de la transcripción del heterodímero PPAR/RXR requiere de la interacción con moléculas correguladoras complejas, que pueden actuar incrementando (coactivadores) o inhibiendo (correpresores) la expresión del gen diana^{121,135,136}. En este contexto, diversos estudios han identificado una serie de ligandos endógenos para

PPAR tales como los ácidos grasos insaturados, las LDL oxidadas, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, del inglés *very low density lipoproteins*) y los metabolitos derivados del ácido linoleico y araquidónico^{137,138}. Además de los ligandos endógenos, se han sintetizado numerosos compuestos que actúan como agonistas PPAR- γ , entre las que destacan las tiazolidinedionas (TZD) o glitazonas. Estos fármacos son los primeros agonistas de los PPAR- γ desarrollados y se han usado para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2¹³⁹.

Adicionalmente a la regulación del complejo PPAR/RXR por ligandos específicos, la actividad como factor de transcripción del PPAR- γ también puede verse alterada por modificaciones post-traduccionales como la sumoilación, la ubiquitinación, la acetilación y la fosforilación¹⁴⁰⁻¹⁴² (resumidas en la Tabla 4) o por otros mecanismos como los asociados a micro-ARN¹⁴³⁻¹⁴⁵.

Tabla 4. Modificaciones post-traduccionales del PPAR- γ .

Modificación de PPAR-γ	Función
Fosforilación	Disminución de la actividad transcripcional del PPAR- γ .
Sumoilación	Disminución de la actividad transcripcional.
Ubiquitinación	Aumenta la degradación del PPAR- γ por lo que reduce la expresión de proteínas.
O-Gluco-acetilación	Inhibe la actividad transcripcional del PPAR- γ independiente de ligando

Modificado de Floyd *et al.*¹⁴⁶.

Fosforilación del PPAR- γ : se ha demostrado que PPAR- γ es fosforilado por varios miembros de la familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés *mitogen activated protein kinase*), incluyendo p38-MAPK, la quinasa Jun N-terminal (JNK, del inglés *jun N terminal kinase*), y la proteína quinasa extracelular regulada por señal (ERK, del inglés *extracelular signal regulated kinase*)^{147,148}. La fosforilación se hace en el dominio AF1 del PPAR- γ y reduce la afinidad de unión del

PPAR- γ al ligando, lo que determina una regulación negativa de la función del PPAR- γ y por lo tanto una inhibición de la adipogénesis¹⁴⁸⁻¹⁵².

Ubiquitinación of PPAR- γ : la ubiquitinación es la unión de una molécula cualquiera con ubiquitina, produciéndose una unión covalente entre la glicina del extremo carboxi-terminal de la proteína ubiquitina y el nitrógeno épsilon de una lisina de la proteína ubiquitinada. La importancia de esta vía es que, aunque el PPAR- γ tienen una vida media corta en el adipocito¹⁵³, su tasa de recambio está regulada por el sistema ubiquitina-proteosoma^{154,155} y la ubiquitinación del PPAR- γ regula así una parte importante de la actividad del PPAR- γ en el tejido adiposo¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

Sumoilación: la sumoilación es un tipo de modificación post-traducciona producida por pequeñas proteínas relacionadas con la ubiquitina conocidas como SUMO (del inglés *small ubiquitin related modifier*)¹⁵⁹. Las proteínas SUMO se unen de forma covalente a las proteínas diana por medio de receptores específicos de lisina y se ha descrito que PPAR- γ es modificado por sumoilación principalmente en dos sitios funcionales que son, la lisina 107 de la región AF1 (lisina 77 en PPAR- γ 1) y la lisina 365 de la región AF2 (lisina 365 en PPAR- γ 1)^{140,156,160}. Estas modificaciones inducen una regulación negativa de la actividad transcripcional del PPAR- γ , que puede verse reflejada en una inhibición de la adipogénesis^{156,160-162}.

O-Gluco-acetilación del PPAR- γ : La O-Gluco-acetilación es la adición postrasduccional de N-acetil glucosamina a residuos específicos de serina y treonina de proteínas nucleolares y citoplasmáticas, mediante una unión β -O-glucosídica. Esta modificación post-traducciona influye en la función proteica modificando la

interacciones entre proteínas, alterando su estabilidad, y generando un cambio de actividad¹⁶³. Un estudio reciente de análisis de espectrometría de masas y de mutaciones realizado *in vitro* en cultivos de adipocitos, reveló que la treonina 54 del dominio AF-1 N-terminal del PPAR- γ 1 y la treonina 84 PPAR- γ 2 son los principales sitios de O-Gluco-acetilación. Este estudio también evidenció que la O-Gluco-acetilación del PPAR- γ reduce su actividad transcripcional¹⁶⁴.

6.2. Funciones fisiológicas del PPAR- γ

El PPAR- γ es un actor fundamental en la diferenciación del tejido adiposo, el almacenamiento de los ácidos grasos y el metabolismo de la glucosa, y también participa en una gran variedad de funciones específicas en diferentes tejidos (Figura 4). Aunque no hay diferencias funcionales entre las dos isoformas principales del PPAR- γ , sí la hay en sus patrones de expresión. Así, el PPAR- γ 1 se expresa en múltiples tejidos y tipos celulares, incluidos el tejido adiposo, el músculo esquelético, el hígado, las células β del páncreas, los macrófagos, el colon, el hueso y la placenta^{165,166}. En cambio, el PPAR- γ 2 en condiciones fisiológicas solo se expresa en el tejido adiposo, aunque en condiciones de sobre-nutrición u obesidad se expresa en el hígado y el músculo esquelético¹⁶⁵. Los aspectos funcionales del PPAR- γ más relevantes para este trabajo de investigación son los siguientes.

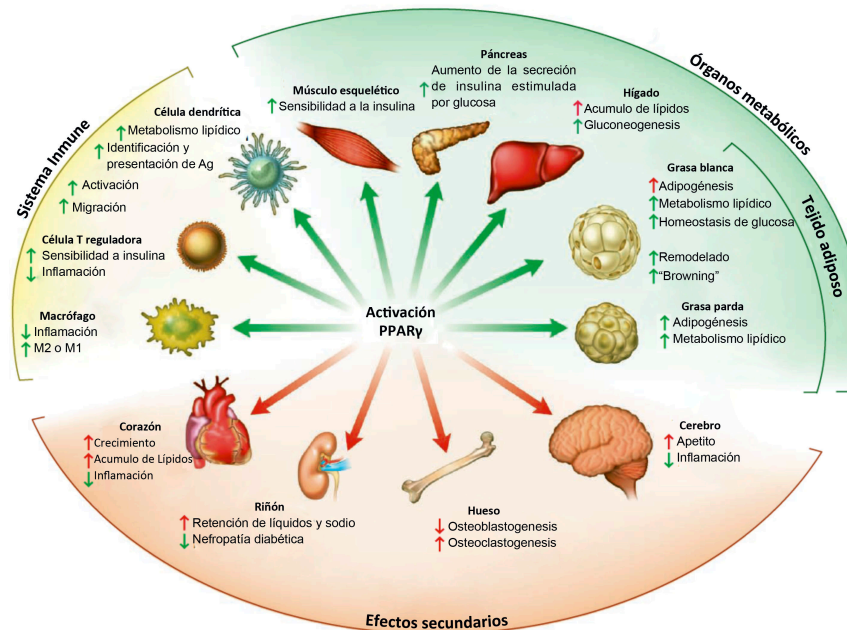


Figura 4. Efectos conocidos de la activación del PPAR-γ.

Los efectos fisiológicos de la activación del PPAR-γ probablemente beneficiosos se muestran con flechas verdes y los potencialmente adversos en rojo. Modificado de Ahmadian *et al.*¹⁶⁷

- **Diferenciación de adipocitos y metabolismo lipídico:** en el tejido adiposo, el PPAR-γ desempeña un papel central en el proceso de diferenciación de los adipocitos y estudios en ratones han demostrado que la deficiencia del PPAR-γ se relaciona con una disminución en la masa de tejido adiposo^{168,169}. Este efecto sobre la adipogénesis se produce a través de la regulación de la expresión de genes específicos de los adipocitos, tales como el gen de la lipasa lipoproteica, el CD36, la proteína de unión a los adipocitos aP2 (del inglés *fatty acid binding protein 2*), la proteína de transporte de ácidos grasos FATP-1 (del inglés *fatty acid transport protein*), la acetil-CoA sintetasa o la fosfoenol-piruvato-carboxi-quinasa PEPCK (del inglés, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*); también modifica la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico como los de la adiponectina, la leptina, la resistina, y el receptor de LDL oxidadas 1, favoreciendo la captación de ácidos grasos circulantes (Figura 5)^{133,167,170-177}. Además de su importancia en la adipogénesis, el PPAR-γ actúa en la regulación del metabolismo lipídico al controlar la función de los

adipocitos maduros, como se demostró en estudios en ratones en los que la ablación selectiva del PPAR- γ en adipocitos maduros reducía la viabilidad de estos y provocaba lipodistrofia^{178,179}.

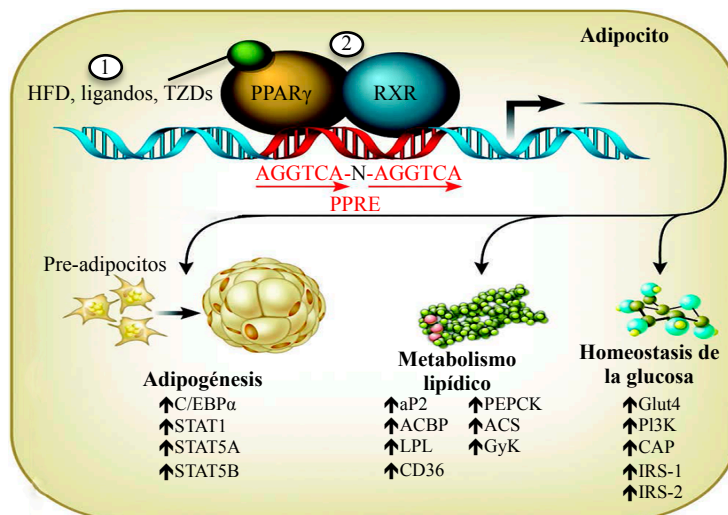


Figura 5. Roles del PPAR- γ en el tejido adiposo.

Las dietas ricas en grasa, los ligandos del PPAR- γ o las TZD (1) activan el heterodímero funcional PPAR-RXR (2) para mantener la homeostasis metabólica a través de la regulación directa de los genes que albergan los PPRE implicados en la diferenciación de los adipocitos, el metabolismo de los lípidos y la homeostasis de la glucosa. *PPAR*: del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor*. TZD: tiazolidinedionas; RXR: del inglés *retinoid X receptor*; PPRE, del inglés *peroxisome proliferator response element*; C/EBP α : del inglés *CCAAT/enhancer-binding protein α* ; STAT: del inglés *signal transducer and activator of transcription*; aP2: del inglés *fatty acid binding protein 2*; ACBP: del inglés *acyl-CoA-binding protein*; LPL: del inglés *lipoprotein lipase*; CD36: del inglés *cluster of differentiation 36*; PEPCK: del inglés *phosphoenolpyruvate carboxykinase*; ACS: del inglés *acyl-CoA synthetase*; GyK: del inglés *glycerol kinase*; Glut4: del inglés *glucose transporter 4*; PI3K: del inglés *phosphoinositide 3 kinase*; CAP: del inglés, *c-Cbl-associated protein*; IRS: del inglés *insulin receptor substrate*. Modificada de Ahmadian *et al.*¹⁶⁷.

- **Sensibilidad a la insulina:** PPAR- γ está involucrado también en el metabolismo de la glucosa, favoreciendo la sensibilidad a la insulina en diversos tejidos (tejido adiposo, hepático o muscular) por lo que representa un punto de unión entre el metabolismo de los lípidos y de los hidratos de carbono. Este efecto sobre la sensibilidad a la insulina ha sido utilizado para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, mediante el uso de agonistas del PPAR- γ como las glitazonas. Los principales mecanismos por los que se produce este efecto son: 1) la retención de ácidos grasos en el tejido adiposo a través de la activación de las proteínas FATP-1, PEPCK o

glicerol quinasa; 2) la regulación en los adipocitos de la expresión de hormonas y citocinas reguladoras, al aumentar la expresión de adiponectina y reducir la producción de leptina, cortisol, resistina, TNF- α , IL-6 y del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1, del inglés *plasminogen activator inhibitor*); y, 3) un incremento del metabolismo de la glucosa en los adipocitos por inducción de la proteína CAP (del inglés, *c-Cbl-associated protein*) y el transportador de glucosa GLUT4 (del inglés *glucose transporter 4*)^{167,180,181}.

- **Inflamación:** adicionalmente PPAR- γ juega un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria, mediante la activación de genes anti-inflamatorios y la inhibición de factores de transcripción pro-inflamatorios tales como el factor nuclear kappa B (NF-kB, del inglés nuclear factor kappa B), mediante la trans-represión dependiente de ligando. Otros genes pro-inflamatorios inhibidos por la trans-represión mediada por PPAR- γ son la proteína activadora-1 (AP-1), los transductores de señal y activadores de la transcripción-1 (STAT-1, del inglés *signal transducer and activator of transcription 1*), y el factor nuclear de células T activadas (NFAT, del inglés *nuclear factor of activated T-cells*)¹⁸². En este sentido, el PPAR- γ es capaz de ejercer, por ejemplo, un efecto inhibitor de las respuestas pro-inflamatorias mediadas por macrófagos reduciendo la producción de citocinas como el TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-12^{182,183}. El PPAR- γ también reprime la producción de óxido nítrico (NO) a través de la inhibición de la expresión de la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS, del inglés *inducible nitric oxide synthase*) e inhibe el reclutamiento de macrófagos en los sitios de inflamación a través de la represión de la transcripción de la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1, del inglés

monocytechemotactic protein-1) y de su receptor, así como del receptor de quimiocinas 2 (CCR2, del inglés *chemokine receptor 2*)^{124,184}.

- **Otros:** además de estas principales acciones del PPAR- γ , destacan otros efectos en el cerebro, el riñón o el corazón (Figura 4). En el sistema nervioso central, el PPAR- γ tiene un papel neuroprotector, anti-inflamatorio y favorece un incremento en la ingesta de alimentos^{185,186}. En el riñón, induce un aumento en la reabsorción de sodio y agua, favoreciendo la retención de líquidos y el edema^{187,188}. En el corazón, el PPAR- γ contribuye a la hipertrofia cardíaca, el acumulo de lípidos y glucógeno y la disfunción mitocondrial^{189,190}. En el páncreas, se expresa en las células β , donde activa la expresión de genes clave implicados en la secreción de insulina estimulada por glucosa^{167,191}.

6.3. Papel fisiopatológico del PPAR- γ en la obesidad

La importancia del PPAR- γ en el metabolismo, tanto de los hidratos de carbono como de los lípidos, ha motivado un gran interés en las acciones que desempeña este receptor en el desarrollo de la obesidad. El papel del PPAR- γ en la fisiopatología de esta enfermedad parece evidente dadas las funciones fisiológicas descritas en diferentes órganos^{165,192} y se refuerza por múltiples hallazgos en estudios experimentales.

En primer lugar, el efecto global del PPAR- γ sobre la obesidad está apoyado tanto por el efecto de las glitazonas en humanos sobre el peso, el metabolismo lipídico e hidrocarbonado¹⁶⁷ como por el rol descrito para el polimorfismo Pro12Ala (rs1801282) del gen del PPAR- γ (*PPARG*) en la obesidad. Este polimorfismo tiene una frecuencia del alelo menor en población caucásica de 0,12¹⁹³ y corresponde a una

mutación con cambio de sentido en el exón B del codón 12 del PPAR- γ 2. Esta mutación sustituye una citosina por guanina, que resulta en la conversión de alanina por prolina en la cadena de aminoácidos, provocando una menor afinidad en la unión de este receptor al ADN y, por tanto, una alteración en la transcripción de los genes diana^{194,195}. Un gran número de estudios genéticos de asociación han sugerido que la posesión del alelo Ala12 se asocia con un incremento del tejido adiposo y con un mayor riesgo de obesidad¹⁹⁵ y un reciente metanálisis realizado en población caucásica y asiática, en el que se incluyeron 49092 sujetos, concluyó que los sujetos que poseían este alelo Ala12 (genotipo Pro/Ala o Ala/Ala) presentaban un IMC mayor que los sujetos con genotipo Pro/Pro¹⁹⁶.

Sin embargo, y pese al gran número de estudios realizados, no están claramente establecidos ni el efecto específico de la activación del PPAR- γ en los diferentes órganos y tejidos ni su relación con la sensibilidad a la insulina y la obesidad. Así, el uso de agonistas del PPAR- γ provoca mejoría de la sensibilidad a la insulina, que es el mismo fenotipo que muestran, paradójicamente, ratones heterocigotos para PPAR- γ ¹⁶⁹. Estos datos aparentemente contradictorios han tratado de explicarse analizando los diferentes mecanismos fisiopatológicos implicados¹⁹⁷ o por un efecto diferencial de la edad o del tipo de dieta¹⁹⁸, y se ha intentado profundizar en el análisis del efecto específico del PPAR- γ o de sus isoformas en los diferentes órganos usando modelos de ratón modificados genéticamente en un único tejido. De esta forma, se ha descrito que la ablación específica del PPAR- γ en el hígado induce esteatosis hepática y mejoría de la sensibilidad a la insulina¹⁹⁹, características similares a las provocadas por la eliminación selectiva del PPAR- γ en neuronas productoras de proopiomelanocortina²⁰⁰. Por otro lado, la ablación del PPAR- γ en el tejido adiposo ha mostrado, sorprendentemente, dos fenotipos diferentes: el estudio de Jones *et al.*²⁰¹

mostró que los ratones sin este receptor en el tejido graso estaban protegidos frente a la obesidad y la resistencia a la insulina pero el trabajo de He *et al.*¹⁷⁸ encontró que ratones *knockout* para este gen en tejido adiposo desarrollados mediante otra técnica experimental tenían mayor resistencia a la insulina en dicho tejido graso pero no en hígado ni en el músculo. Finalmente, la ablación sistémica del PPAR- γ 2 en ratones obesos induce mayor resistencia a la insulina, lo que también resulta contradictorio con otros resultados pero que sugiere un efecto específico para esta isoforma²⁰².

Además de los resultados procedentes de modelos animales modificados genéticamente, se han llevado a cabo diferentes investigaciones para estudiar si la obesidad induce cambios en la expresión del PPAR- γ en varios tejidos, fundamentalmente en tejido adiposo. Uno de los primeros estudios realizados en este campo encontró que no había diferencias en los niveles de ARNm del PPAR- γ en tejido adiposo pardo de ratones obesos comparado con controles, pero sí mostró un incremento del 50% en los niveles de ARNm del PPAR- γ después de alimentar ratones normales con dietas ricas en grasa²⁰³. Posteriormente otros autores han encontrado una sobre-expresión del PPAR- γ en tejido adiposo blanco de ratas con obesidad en comparación con controles²⁰⁴, pero otros estudios han mostrado una disminución en la expresión del PPAR- γ en tejido adiposo de ratones obesos con resistencia a la insulina respecto a controles²⁰⁵.

En sujetos con obesidad también se ha comunicado la disminución de la expresión del PPAR- γ tras una dieta hipocalórica²⁰⁶ pero no es posible afirmar con claridad si existen diferencias en la expresión del ARNm del PPAR- γ en tejido adiposo entre obesos y controles, dado que los estudios existentes muestran, una vez más, resultados contradictorios. Así, mientras que algunos autores demuestran un incremento en la expresión del PPAR- γ en tejido adiposo de pacientes obesos frente a

controles²⁰⁷⁻²¹², otros trabajos muestran una disminución²¹³⁻²¹⁵ y en otros no se observa ninguna diferencia significativa²¹⁶⁻²¹⁹. Para explicar estos resultados contradictorios se ha sugerido que las diferencias en la expresión del PPAR- γ entre casos y controles pueden ser diferentes en el tejido adiposo visceral frente al subcutáneo²⁰⁹ o que solo habría alteraciones en la expresión de la isoforma PPAR- γ 2²⁰⁸. Asimismo, debemos considerar que existen diferencias metodológicas entre los estudios, tanto en relación con las técnicas empleadas para la biopsia o los análisis de la muestra como con los criterios de selección de los grupos. En concreto, algunos trabajos han observado diferencias entre los niveles de expresión del PPAR- γ y el sexo, encontrando un incremento significativo en la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en mujeres respecto a hombres, tanto en grasa visceral como en grasa periférica²⁰⁸. Este resultado puede encajar con las diferencias de género en la eficacia y eventos adversos asociados a los tratamientos con agonistas del PPAR- γ ²²⁰, pero aunque hay estudios que reportan un efecto regulador de las hormonas sexuales 17-beta-estradiol, testosterona y dehidroepiandrosterona sobre la expresión del PPAR- γ , faltan datos para explicar esta posible regulación de las hormonas sexuales en la expresión del PPAR- γ y, por tanto, para apoyar claramente esta diferencia de género²²¹.

En resumen, aunque el papel fisiopatológico del PPAR- γ en la obesidad es evidente, no está completamente establecido cuál es el efecto de este receptor en los diferentes tejidos, cómo influye la obesidad en la expresión del PPAR- γ o cuáles son los factores que afectan a su expresión en tejido adiposo.

7. Influencia del micro-ARN en la regulación del PPAR- γ

Los micro-ARN son pequeñas moléculas de ARN no codificante que regulan la expresión postranscripcional de genes diana mediante la unión a la región no traducida (UTR, del inglés *untranslated region*) 3' o 5' del ARNm diana, con el fin de regular la producción de proteínas, ya sea mediante una represión traduccional o por la degradación del ARNm²²². Estas moléculas de ARN fueron descritas inicialmente en *Caenorhabditis elegans* en 2001²²³, y desde entonces han sido implicadas en el control de múltiples funciones biológicas como el metabolismo, la diferenciación, el crecimiento, la proliferación y la apoptosis celular^{224,225}.

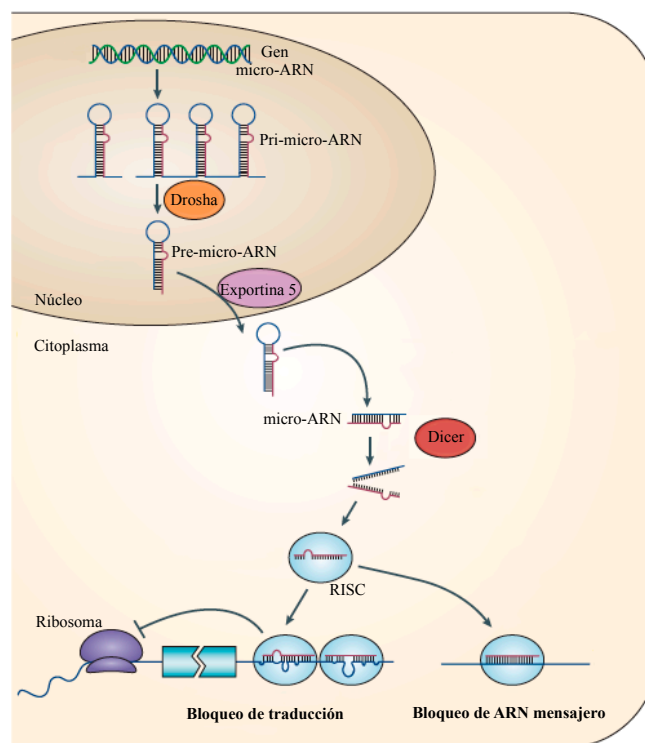


Figura 6. Mecanismo de acción de los micro-ARN.

A partir de los genes que codifican micro-ARN se transcriben precursores que, tras la acción de enzimas como Drosha, forman micro-ARN maduro que es exportado al citoplasma. Una vez allí, la enzima Dicer procede a la separación de las dos hebras, tras la cual la hebra antisentido se integra en el complejo proteico RISC (del inglés *RNA-induced silencing complex*). Dicho complejo, una vez activado, puede ejercer su acción reguladora mediante la degradación directa del ARNm o a través del bloqueo de la traducción en los ribosomas. Modificado de Hu *et al.*²²⁶.

Los micro-ARN se transcriben a partir de regiones de ADN, pero no se traducen a proteínas. Durante su transcripción se forman dos cadenas complementarias que forman una estructura en horquilla de ARN bicatenario, precursora del micro-ARN, que posteriormente es modificado por varias enzimas hasta dar lugar al micro-ARN maduro (Figura 6)²²⁷, que es el que regula la expresión génica. En general, parece necesaria la unión de varios micro-ARN a diferentes puntos diana para llevar a cabo su acción. Asimismo, un mismo micro-ARN puede modificar la expresión de varios genes, que son, a su vez, diana de diversos micro-ARN²²⁷.

Se ha descrito la implicación de determinados micro-ARN en el desarrollo de múltiples enfermedades, habitualmente a través de un aumento o disminución de su expresión, con el consiguiente aumento o disminución de la inhibición de la expresión de sus genes diana²²⁸. Los micro-ARN están implicados en la fisiopatología de la enfermedad y pueden servir, además, como biomarcadores o como factores pronósticos. Así, miR-21, miR-361 y miR-519e se han relacionado con la cardiopatía isquémica²²⁹ y se ha planteado el uso de los niveles circulantes de miR-29a en sangre para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar²³⁰, de miR-135 como marcador de cáncer colorrectal²³¹ y de miR-122, miR-124, let-7, miR-10a como marcadores de hepatocarcinoma²³²⁻²³⁴. Asimismo, los micro-ARN pueden tener utilidad como dianas terapéuticas, y se han desarrollado fármacos capaces de ejercer su acción en diversas enfermedades a través de la regulación de la expresión de micro-ARN^{235,236}.

7.1. Función reguladora de los micro-ARN en la obesidad y el metabolismo

Los micro-ARN juegan un papel importante en la regulación de todos los procesos biológicos, incluyendo aquellas vías metabólicas potencialmente asociadas con la ganancia de peso y la obesidad^{225,237,238}. La primera evidencia del rol de los

micro-ARN en el metabolismo graso y en la obesidad, observada en *Drosophila*, fue que la supresión de miR-14 produjo un aumento en la apoptosis y en el tamaño de los adipocitos, así como niveles elevados de triglicéridos y diacilglicerol²³⁹. En mamíferos, el primer micro-ARN descrito en este campo fue miR-122²⁴⁰⁻²⁴², capaz de regular el metabolismo lipídico y la síntesis de colesterol hepática y posteriormente diversos estudios han mostrado la implicación de los micro-ARN en múltiples aspectos del metabolismo lipídico e hidrocarbonado como la adipogénesis^{243,244}, la resistencia a la insulina^{245,246} o la síntesis de colesterol y ácidos grasos (Tabla 5)²⁴⁷⁻²⁴⁹.

Tabla 5. Micro-ARN potencialmente implicados en la fisiopatología del tejido adiposo y en la adipogénesis.

Micro-ARN	Funciones fisiológicas
miR-103/107	Metabolismo de la glucosa. Adipogénesis
miR-122	Metabolismo lipídico hepático
miR-130	Adipogénesis
miR-143	Resistencia a la insulina. Adipogénesis
miR-168a	Metabolismo del colesterol
miR-223	Sensibilidad a la insulina
miR-27a/b	Adipogénesis. Síntesis de ácidos grasos
miR-33a/b	Metabolismo lipídico y balance energético
miR-302a	Síntesis de ácidos grasos
miR-335	Producción de insulina. Síntesis de lípidos
miR-34a	Metabolismo lipídico
miR-370	Síntesis de lípidos
miR-375	Secreción de insulina
miR-378/378*	Adipogénesis. Síntesis de lípidos
miR-613	Síntesis de ácidos grasos
miR-9	Secreción de insulina
let-7	Sensibilidad a la insulina

Modificada de Sacco *et al.*²⁵⁰, Rottiers *et al.*²³⁸ y Hilton *et al.*²⁵¹.

Asimismo, se han descrito diversos micro-ARN cuya expresión está incrementada o disminuida en tejido adiposo humano, aunque no se ha realizado una validación funcional en todos ellos. Entre ellos, se ha encontrado un incremento en los niveles de let-7c, miR-132, miR-21 o miR-519d, mientras que se ha observado una disminución en la expresión de miR-125b o miR-143^{238,250-254}.

7.2. Regulación del PPAR- γ por micro-ARN

Estudios recientes han mostrado que PPAR- γ puede regularse por miR-27a y miR-27b, apuntando así a una posible relación de estos micro-ARN con el desarrollo de la obesidad^{144,145}. La familia miR-27 se compone de las isoformas miR-27a y miR-27b, que son homólogas y comparten 20 de los 21 nucleótidos que las conforman. Estas dos isoformas están altamente conservadas durante la evolución y se encuentran presentes en mamíferos, aves, peces y reptiles²⁵⁵. Una gran variedad estudios indican que miR-27 participa activamente en diferentes procesos como lo son la angiogénesis, la adipogénesis, el estrés oxidativo, la inflamación, la diferenciación y maduración celular, la resistencia a la insulina y el metabolismo lipídico^{143,255-258}. De igual forma se ha descrito su papel como oncogén en diferentes tipos de cáncer como el de colon, el gástrico, el pulmonar, el de endometrio y el de próstata²⁵⁹⁻²⁶⁴.

Los miR-27 están implicados por tanto en los procesos metabólicos, especialmente en el metabolismo de ácidos grasos, al actuar sobre dos receptores principales de la adipogénesis, el PPAR- γ y el C/EBP α ¹⁴³. Un estudio en un modelo murino demostró que miR-27a y miR-27b reducen la expresión del PPAR- γ dando como resultado una inhibición de la conversión a adipocitos de células progenitoras mesenquimales obtenidas de diferentes tejidos, como las células OP9 derivadas de médula ósea y las células 3T3-L1 derivadas de fibroblastos embrionarios¹⁴³. La unión directa de miR-27a a la región 3' UTR del PPAR- γ y su capacidad de inhibir la adipogénesis fue comprobada posteriormente en otro tipo celular (3T3-L1)¹⁴⁴. Finalmente, utilizando células adiposas derivadas de células madres humanas (hMADS, del inglés *human multipotent adipose-derived stem*), Karbiener *et al.*¹⁴⁵ encontraron que la expresión de miR-27b estaba reducida un 40% durante la

adipogénesis respecto a células hMADS en fase proliferativa, lo que refuerza la implicación de este micro-ARN en dicho proceso.

Además de los resultados descritos *in vitro*, en pacientes diabéticos se ha observado una disminución en la expresión de miR-27a en la grasa visceral respecto a no diabéticos²⁶⁵. Por el contrario, Viesti *et al.*²⁶⁶ encontraron un aumento en la expresión de miR-27a en la grasa visceral de los pacientes obesos respecto a no obesos, sin observar diferencias en la expresión de miR-27b²⁶⁶.

Otro micro-ARN que inhibe la adipogénesis al actuar sobre PPAR- γ es el miR-130. Tanto el miR-130a como el miR-130b actúan sobre la región codificante y la región 3' UTR del PPAR- γ disminuyendo su producción y por lo tanto inhiben la expresión de los genes regulados por PPAR- γ ²¹¹. Este efecto sobre la regulación de la adipogénesis a través del PPAR- γ fue observado en preadipocitos humanos y confirmado en ratones 3T3-L1, observándose que al aumentar la expresión de miR-130 se inhibía la adipogénesis y al disminuir su expresión se favorecía. Adicionalmente, este mismo trabajo analizó el tejido adiposo de mujeres con obesidad, y encontró una disminución en la expresión de miR-130a y miR-130b y un aumento de los niveles del PPAR- γ en mujeres obesas respecto a no obesas, con una correlación inversa entre los niveles de miR-130 y el IMC²¹¹.

II. OBJETIVOS

El objetivo general de nuestro trabajo, fue determinar la expresión del PPAR- γ 1, del PPAR- γ 2, y de los micro-ARN miR-27a y miR-27b en el tejido de adiposo de pacientes obesos, para poder explorar así la correlación *in vivo* entre estos micro-ARN y el PPAR- γ . Asimismo, nos planteamos analizar la asociación de estas moléculas con variables clínicas y analíticas. Con este fin establecimos los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en grasa visceral y grasa subcutánea de pacientes con obesidad y controles no obesos.
2. Analizar la expresión de los micro-ARN miR-27a y miR-27b en grasa visceral y grasa subcutánea de pacientes con obesidad y controles no obesos.
3. Correlacionar los niveles de expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 con la expresión de los micro-ARN miR-27a y miR-27b.
4. Correlacionar variables clínicas y analíticas con la expresión del PPAR- γ 1, PPAR- γ 2, miR-27a y miR-27b.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestra objeto de estudio

La muestra objeto de estudio se compuso de 62 sujetos de origen caucásico, de los que 43 eran pacientes obesos y 19 eran controles no obesos. Los 43 pacientes tenían un IMC ≥ 35 kg/m², presentando edades comprendidas entre los 19 y los 75 años (con una media de 44,9 años y una desviación estándar [DE] de 12,3). Todos los pacientes fueron reclutados en la Unidad de Cirugía Bariátrica del servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo del Hospital Universitario de Salamanca y se les realizó gastrectomía tubular laparoscópica como terapia para la obesidad.

El grupo control estaba compuesto por 19 pacientes sin obesidad, y sin enfermedad hepática conocida excepto litiasis biliar, a los que se les realizó una colecistectomía laparoscópica en el servicio de Cirugía del Hospital Universitario de Salamanca por el mismo equipo quirúrgico.

Los criterios de exclusión establecidos para los casos fueron los siguientes:

- Cirugía bariátrica previa
- Nutrición parenteral total en los 6 meses previos
- Enfermedad crónica debilitante (p. ej., procesos tumorales) o procesos agudos intercurrentes (p. ej., infecciones)
- Toma de fármacos inmunosupresores.

Los criterios de exclusión para los controles fueron:

- Los indicados previamente para los casos
- Obesidad (IMC ≥ 30 kg/m²)
- Malnutrición o IMC < 17 kg/m²

A todos los sujetos de la muestra, se les realizó un registro del peso, la talla y los antecedentes médicos. Además, previo a la cirugía se les recogieron muestras de

sangre periférica en ayunas para determinaciones analíticas, lo que incluyó la glucemia basal y el perfil lipídico. De igual forma, se tomaron biopsias intraoperatorias de grasa visceral y grasa periférica, como se detalla posteriormente. Adicionalmente, a los pacientes se les realizó un seguimiento postoperatorio a los 3, 6 y 12 meses, en el que se registró el peso en cada visita y se recogieron muestras de sangre periférica en ayunas para determinaciones analíticas. Todas las muestras fueron obtenidas previa información y firma del consentimiento para participar en el estudio, siguiendo las regulaciones legales para estudios clínicos en España y las del Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca.

2. Procesamiento de muestras y extracción de ARN total

Las muestras de tejido adiposo fueron obtenidas durante el acto quirúrgico. Aproximadamente 5 cm³ grasa visceral se obtuvieron del epiplón, y otros 5 cm³ de grasa subcutánea se tomaron del pliegue umbilical. Las muestras de tejido fueron troceadas, depositadas en tubos con RNAlater^{267,268} y mantenidas en un recipiente con hielo hasta su congelación a -80 °C. Posteriormente el ARN total de tejido adiposo fue extraído utilizando el método Trizol (Invitrogen) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Este ARN obtenido se conservó a -80 °C tras haber determinado su cuantía y pureza mediante un espectrofotómetro, calculando la absorbancia a 260 nm y el ratio de absorbancias a 260/280 nm, respectivamente.

3. Cuantificación de la expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa relativa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) a tiempo real o PCR cuantitativa es una variación de la PCR estándar

utilizada para la cuantificación de ADN o de ARNm de una muestra. La tecnología de la PCR en tiempo real permite detectar y evaluar la progresión de la reacción de amplificación en cada uno de sus ciclos. Se fundamenta en la adaptación de un termociclador y un fluorímetro, que permite detectar la fluorescencia emitida por sondas o componentes intercalantes unidos al ADN. Se divide en 4 fases principales:

a) La fase inicial, en la cual la fluorescencia de los primeros ciclos es mínima y no rebasa la fluorescencia de fondo (*background*) del medio circundante, lo que permite calcular la línea base.

b) La fase exponencial temprana, en la cual la fluorescencia producida por el producto de PCR rebasa el umbral definido. El ciclo en el cual la fluorescencia ha alcanzado el umbral definido se conoce como ciclo umbral o Ct (del inglés *cycle threshold*). Este valor es representativo de la cantidad inicial de copias de ADN de la muestra que hay en la reacción y es usado en los cálculos posteriores. Por tanto, cuanto más bajo sea el valor de Ct, mayor es el número de copias de ADN de la muestra en la reacción.

c) La fase lineal, en la cual se alcanza un estado de amplificación óptima donde la cantidad de producto de PCR se dobla en cada ciclo.

d) Finalmente, la fase de meseta o estacionaria, en la cual los reactivos y el equipo han alcanzado el límite de detección y la reacción ha terminado²⁶⁹. Un ejemplo de la curva de la reacción de PCR en tiempo real se muestra en la Figura 7.

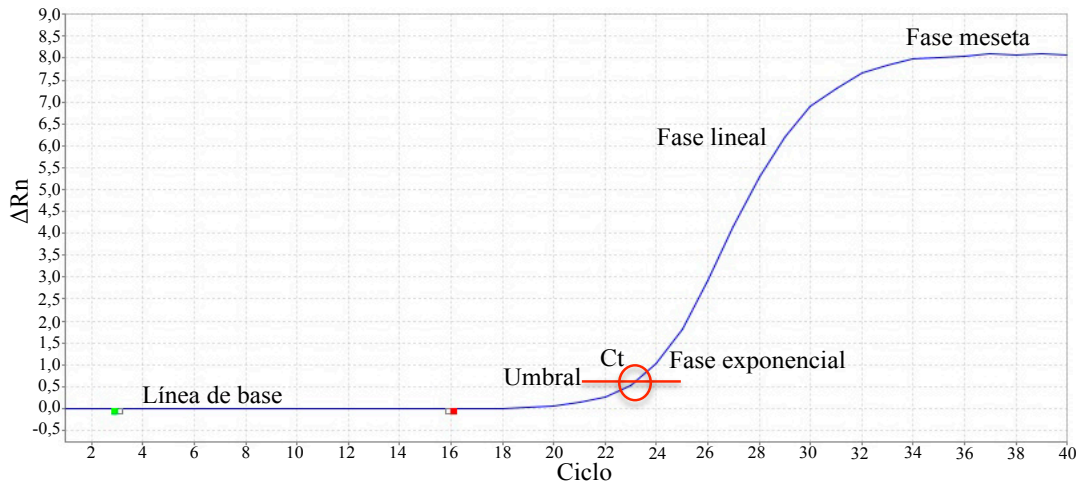


Figura 7. Modelo de curva de amplificación de PCR a tiempo real. Se puede observar el aumento exponencial de fluorescencia a medida que aumenta el número de ciclos.

Cuando la PCR a tiempo real se realiza después de una reacción de transcripción inversa (RT-PCR, del inglés *reverse transcription PCR*) en la que se sintetiza ADN complementario (ADNc) a partir de ARN, esta técnica permite determinar la cantidad de ARN de una muestra mediante una cuantificación relativa. Esto se aplica tanto al ARNm como a ARN de pequeño tamaño (p. ej., micro-ARN). Dicha cuantificación se denomina relativa ya que se realiza comparando la expresión del gen analizado respecto a la expresión de un gen de referencia cuya expresión es uniforme en diferentes condiciones experimentales (gen control endógeno). Este gen control endógeno sirve para normalizar posibles variaciones de la cantidad de ADNc que se añade a cada reacción, mediante el ajuste de la expresión de este gen respecto a las diferentes concentraciones de ARN total de las muestras empleado en la síntesis de ADNc²⁷⁰. Es decir, la RT-PCR a tiempo real nos permite determinar la cantidad de ARN de un gen determinado presente en una muestra, realizando la síntesis de ARN en ADNc y posterior comparación del número de copias presentes de ADNc del gen analizado con las presentes de un gen control.

3.1. RT-PCR a partir de ARNm

El termociclador utilizado en este trabajo ha sido el equipo de PCR a tiempo real Step-One-Plus de Applied Biosystems, que emplea un sistema de detección de fluorescencia basado en SYBR Green. Este fluorocromo interacciona con el surco menor del ADN, emitiendo 1000 veces más fluorescencia que cuando está libre en solución, por lo que el incremento en la cantidad de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Resumiendo el procedimiento, cuando se añade el fluorocromo SYBR Green I a la muestra, este se une inmediatamente a todo el ADN de doble cadena. Durante la PCR, la ADN polimerasa amplifica el gen diana, lo que crea el producto de PCR, o amplicón. A continuación, el fluorocromo SYBR Green I se une a cada copia nueva del ADN de doble cadena. A medida que avanza la PCR, se produce más amplicón y dado que el fluorocromo SYBR Green I se une a todo el ADN de doble cadena, el resultado es un aumento de la intensidad de la fluorescencia que es proporcional a la cantidad de producto de PCR de doble cadena producido²⁷¹ (Figura 8).

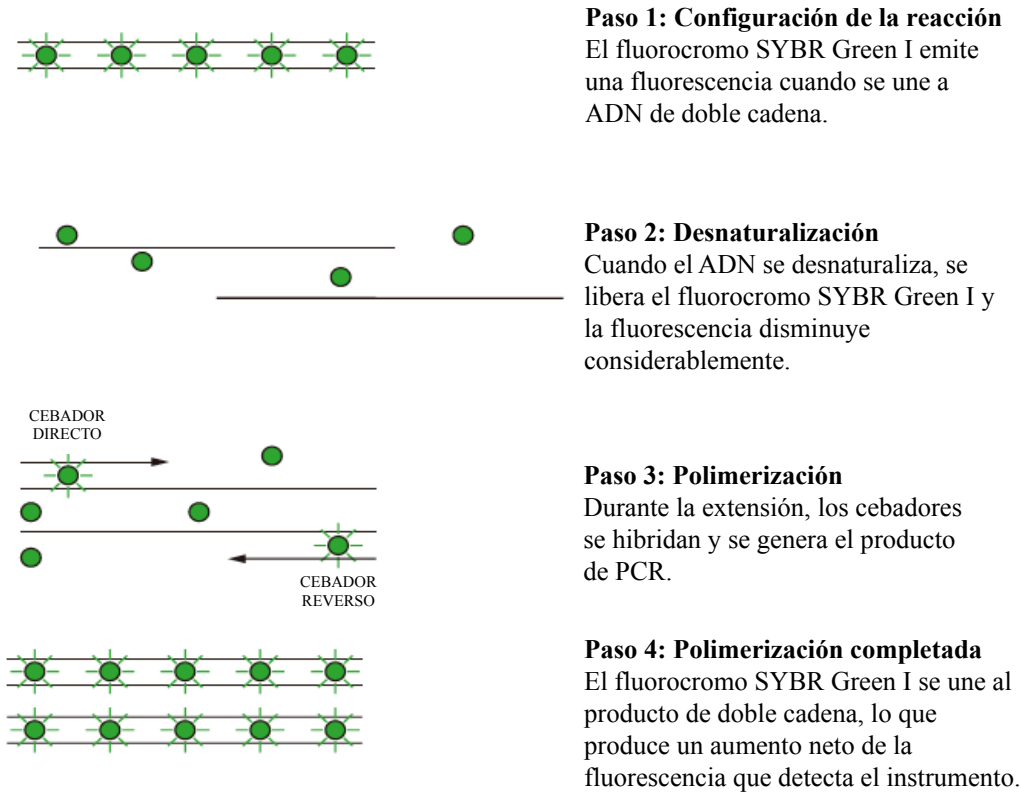


Figura 8. Funcionamiento de los reactivos SYBR Green. Modificado de la guía de reactivos de Applied Biosystems²⁷¹.

3.2. Curvas de fusión (*melt curves*)

La principal limitación cuando se usa el fluorocromo SYBR Green es que este se une al total de ácidos nucleicos presentes en la reacción de la PCR y emite una señal luminosa tanto para productos específicos como para aquellos que no lo son, como los dímeros de primer. Para valorar correctamente esta situación se debe realizar un análisis de los resultados en la curva de fusión (*melt curve*; Figura 9). La morfología de esta curva nos permite identificar los productos amplificados y distinguirlos de los dímeros de primer y otros pequeños artefactos de amplificación. El concepto se deriva de la temperatura de fusión (T_m , del inglés *melt temperature*), que se define como la temperatura a la que la mitad de una molécula concreta de ADN de doble cadena se

desnaturaliza en dos cadenas simples de ADN. La temperatura de fusión de una molécula de ADN depende de su tamaño y de su composición de nucleótidos. De esta forma, los productos de la PCR o amplicones ricos en pares de bases de guanina y citosina tienen una T_m diferente que los que tienen una gran cantidad de pares de bases adenina y timina. El análisis de la curva de fusión puede llevarse a cabo en la mayoría de plataformas disponibles para la PCR en tiempo real, por lo general al final de la reacción de amplificación. La medida de la fluorescencia dependiente de la temperatura se realiza mientras la temperatura en el termociclador aumenta de alrededor de 50°C a 95°C, siendo la fluorescencia detectada dependiente de la presencia de secuencias de doble cadena de ADN o ADNc.

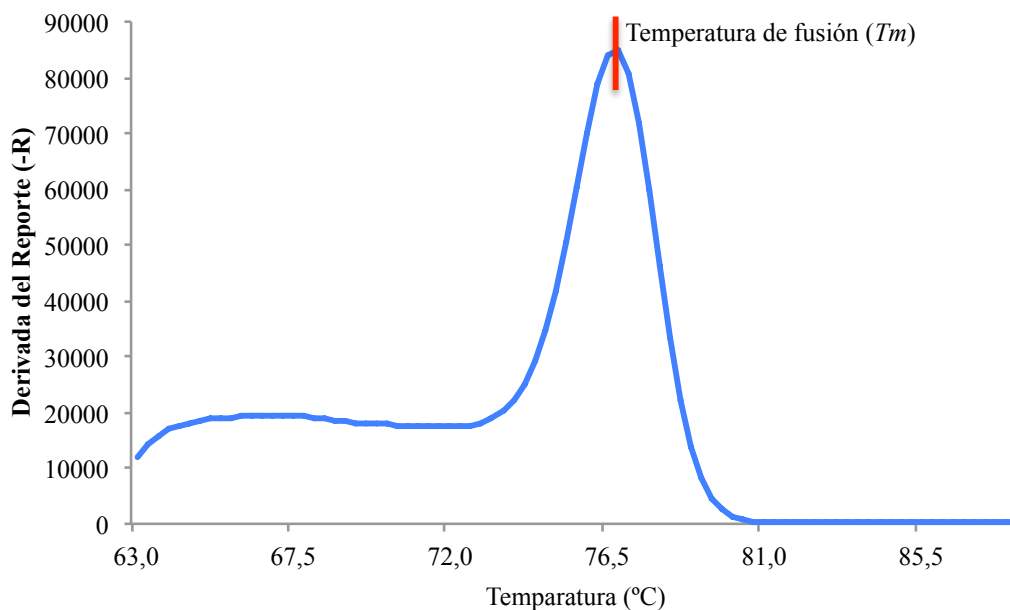


Figura 9. Modelo de curva de fusión (*melt curve*) de PCR a tiempo real. T_m : del inglés *melt temperature*.

3.3. Selección de genes de referencia para la normalización

Como se ha comentado, para realizar la determinación de los niveles de ARNm es preciso contar con un gen de referencia. El gen de referencia ideal es aquel que se

expresa de forma consistente en todas las muestras analizadas independientemente de las condiciones experimentales (presencia o ausencia de enfermedad, uso de medicamentos o condiciones de cultivo, etc.) y que presenta unos niveles de expresión comparables a los del gen diana. Los genes que se han usado tradicionalmente como controles endógenos son, entre otros, los que codifican las proteínas ARN ribosomal 18s, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), actina, hipoxantina fosforribosil transferasa, beta-2-microglobulina, entre otros. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que la expresión de estos genes de referencia comunes varían con el tipo de tejido, así como con el estado fisiológico, por lo que la idoneidad de un gen de referencia concreto puede variar con el diseño y las condiciones experimentales inherentes al estudio^{272,273}. Por este motivo, se han desarrollado diferentes algoritmos matemáticos que permiten analizar la idoneidad de los genes de referencia para cada experimento. En 2002, se desarrolló el software GeNorm que valida y clasifica los genes de referencia candidatos en función de la estabilidad de su expresión. Para ello calcula un valor de estabilidad denominado M utilizando los niveles de expresión; este valor M es inversamente proporcional a la estabilidad del gen en cuestión y se calcula como el promedio de la variación por parejas de un gen particular, comparado con los demás genes de referencia²⁷⁴. Otro software, denominado NormFinder, aprovecha los valores Ct para ajustar un algoritmo matemático basado en modelos de estimación de la variación de la expresión génica, con lo que es capaz de evaluar las variaciones presentes dentro de los grupos experimentales (tipo de órganos, tratamientos químicos, etc.) definidos por el investigador, así como compararlos entre sí. De este modo, los genes con una variación inter e intragrupo menor son los considerados más estables, teniendo un valor de estabilidad mínimo²⁷⁵. Además, se ha desarrollado un programa similar

denominado BestKeeper, el cual tiene en cuenta los valores de Ct de los genes de referencia candidatos y utiliza un algoritmo estadístico en el que se calcula la desviación estándar de cada gen, y el coeficiente de correlación de Pearson para cada par de genes de referencia candidatos²⁷⁶. El gen con la desviación estándar mas baja y el coeficiente de correlación más alto es considerado el más estable de acuerdo a este programa. En resumen, el gen mejor clasificado de acuerdo a estos algoritmos es el que puede recomendarse como control endógeno para su uso posterior en experimentos similares²⁷⁷.

En nuestro trabajo, la estabilidad de la expresión de los genes de referencia candidatos se evaluó usando los algoritmos estadísticos GeNorm y NormFinder incorporados en el programa Genex versión 5.44 y la plantilla de Excel del algoritmo BestKeeper. Para este análisis de genes de referencia se utilizaron muestras de grasa visceral y periférica de 10 individuos obesos y 10 controles.

3.4. Análisis de la expresión génica

La cuantificación relativa de la expresión de los ARNm y de los micro-ARN fue calculada usando el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que es un modelo matemático que calcula los cambios en la expresión génica como una diferencia entre una muestra experimental (en nuestro caso pacientes) y una muestra de referencia que permite la calibración (en nuestro caso sujetos controles). Este método incluye una corrección de la eficiencia de amplificación, en la que se asume como hipótesis que la eficiencia de la amplificación del gen diana y el gen de referencia es similar. El modelo se deriva inicialmente de la característica exponencial de la reacción de PCR, de acuerdo a la siguiente ecuación (Ecuación 1):

$$X_n = X_0 * (1+E_x)^n$$

Donde X_n es el número de copias del gen X en el ciclo n; X_0 es el número inicial de moléculas del gen X; E_x es la eficiencia de amplificación del gen X y n es el número de ciclos de la PCR. El C_t es el ciclo fraccionario en el cual la fluorescencia del gen alcanza en umbral fijado, entonces la ecuación queda de esta manera (Ecuación 2):

$$X_T = X_0 * (1+E_x)^{C_{T,X}} = K_X$$

Donde X_T es el número de copias del gen X en el ciclo C_t ; $C_{T,X}$ es el ciclo C_t del gen X y K_X es una constante. Esto se repite para el gen de referencia R (Ecuación 3):

$$R_T = R_0 * (1+E_R)^{C_{T,R}} = K_R$$

Donde R_T es el número de copias del gen de referencia; R_0 es el número inicial de moléculas del gen de referencia; E_R es la eficiencia de amplificación del gen de referencia; $C_{T,R}$ es el ciclo C_t del gen de referencia y K_R es una constante del gen de referencia.

Dividiendo la ecuación 1 entre la ecuación 2, tenemos la siguiente expresión (Ecuación 4):

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 * (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{R_0 * (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R}$$

Y asumiendo que la eficiencia del gen de referencia es igual a la eficiencia del gen

X, tenemos (Ecuación 5):

$$E_X = E_R = E,$$

$$\frac{X_T}{R_0} * (1 + E_X)^{C_{T,X}-C_{T,R}} = K,$$

o (Ecuación 6):

$$X_N * (1 + E)^{\Delta C_T} = K,$$

Donde X_N es la cantidad normalizada del gen X (X_0/R_0) y el ΔC_T es la diferencia

de los C_t del gen diana y del gen de referencia ($C_{T,X} - C_{T,R}$). Ordenando la ecuación queda de la siguiente manera (Ecuación 7).

$$X_N = K * (1 + E)^{-\Delta C_T}$$

El paso final es dividir el X_N de cualquier muestra q , que se define como el tratamiento a ser evaluado, para el X_N de la muestra calibrador (cb) (Ecuación 8).

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K * (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K * (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T}$$

Donde
$$-\Delta \Delta C_T = -(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb})$$

Para amplicones diseñados de un tamaño menor de 150 bp, en el cual las concentraciones de cebadores o primers y Mg^{2+} han sido adecuadamente optimizadas, la eficiencia de amplificación es cercana a 1. En este caso, la cantidad del gen diana, normalizada a un control endógeno, y relativa a una muestra calibrador queda de la siguiente manera (Ecuación 9):

$$\text{Cantidad relativa del gen diana} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

Esta fórmula final permite el cálculo de la expresión génica, asumiendo que las eficiencias de los genes de referencia y el gen de estudio son aproximadamente iguales²⁷⁸.

4. Transcripción reversa y cuantificación de ARNm por PCR a tiempo real

4.1. Síntesis de ADNc a partir de ARNm

La síntesis de ADNc a partir de ARNm se ha realizado en nuestro estudio mediante una reacción de transcripción reversa utilizando el *High-Capacity cDNA*

Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Siguiendo las recomendaciones del fabricante, se mezclaron 10 μL de ARN a una concentración de 10ng/ μL , con 10 μL de la mezcla de reacción al 2X cuya composición se describe en la Tabla 6.

Tabla 6. Componentes de la reacción de síntesis de ADNc a partir de ARNm.

Componente	Volumen de la reacción (μL)
10X RT Buffer	2,0
25X dNTP Mix (100mM)	0,8
10X RT Random Primers	2,0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0
Inhibidor de ARNasa	1,0
Agua libre de nucleasas	3,2
Volumen Final	10

El ADNc obtenido se diluyó a 1:8 y se conservó en alícuotas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior utilización como molde para la PCR.

4.2. Cebadores o primers

En nuestro estudio se utilizaron secuencias del gen PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 como genes de estudio y como potenciales genes de referencia se seleccionaron los genes de actina, GAPDH, ARN polimerasa II (RPII, también conocido como POLR2A) y la fosfoproteína ribosomal ácida P0, también conocida como 36B4, todos ellos utilizados previamente con este fin en tejido adiposo^{277,279}. Las secuencias utilizadas aparecen especificadas en la Tabla 7.

Tabla 7. Primers utilizados en el análisis de expresión de ARNm.

Primers	Forward	Reverse
PPAR-γ1	AAAGAAGCCGACACTAAACC	CTTCATTACGGAGAGATCC
PPAR-γ2	TCCATGCTGTTATGGGTGAA	TCAAAGGAGTGGGAGTTGTC
Actina	CCAACCGCGAGAAGATGA	CCAGAGGCGTACAGGGATAG
GAPDH	CCATGAGAAGTATGACAACAGCC	GGGTGCTAAGCAGTTGGTG
POLR2A	CTTCACGGTGCTGGGCATT	GTGCGGCTGCTCCATAA
36B4	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA

4.3. Temperatura de anillamiento

Para cada uno de los primers se calculó la temperatura de anillamiento y se realizó una PCR a tiempo real con cuatro temperaturas de anillamiento a 55 °C, 58 °C, 60 °C y 62 °C. Se encontró que la temperatura de 60 °C, fue la temperatura de anillamiento óptima para la reacción en los diferentes primers, por lo que se utilizó posteriormente para todas las reacciones.

4.4. Análisis de las curvas de fusión (*melt curves*)

El análisis de la curva de fusión se realizó para verificar la presencia de un solo fragmento de amplificación en la reacción de PCR en tiempo real para cada uno de los genes evaluados mediante PCR cuantitativa basada en SYBR Green en este estudio (Figura 10).

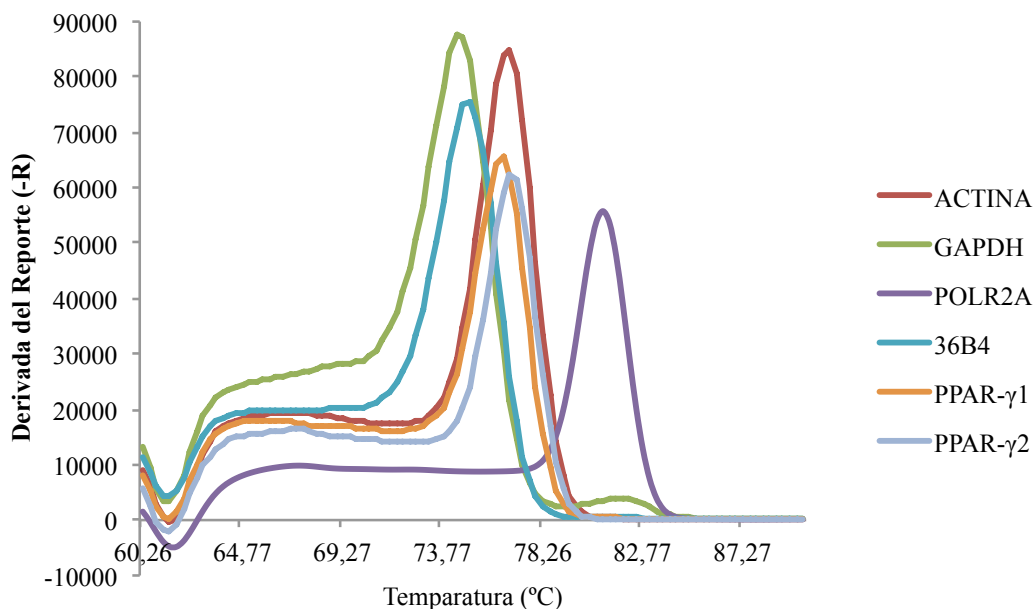


Figura 10. Curva de fusión de actina, GAPDH, POLR2A, 36B4, PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2.

4.5. Cálculo de la eficiencia de la PCR

Para calcular la eficiencia de la PCR de cada uno de los primers mencionados se realizó un experimento de cuantificación tipo curva estándar (Figura 11), analizando por triplicado 5 diluciones (con una dilución seriada 1:5) de una muestra de ADNc de grasa visceral retro-transcrito a una concentración inicial de ARN de 5 ng/μL. A partir de los datos obtenidos de fluorescencia frente a número de ciclos (Ct), se elaboró una curva de calibración (Ct frente a logaritmo de la concentración del ARN) y se calculó la eficiencia utilizando la fórmula:

$$Eficiencia = 1^{(-1/Pendiente)} - 1$$

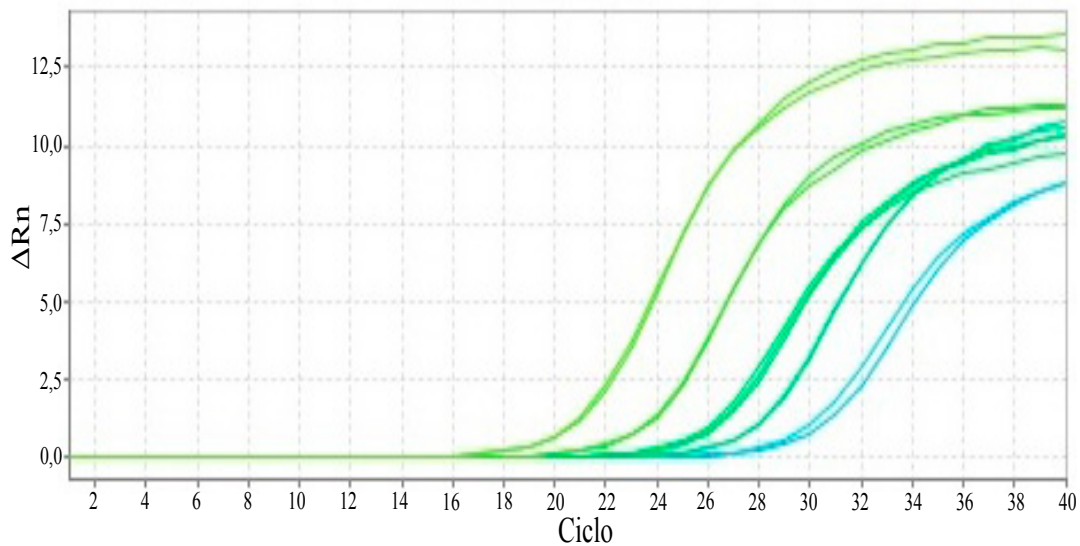


Figura 11. Curva de calibración de PCR con cinco diluciones de ADNc.

En la Figura 12 se muestran las curvas de calibración y los valores de eficiencia para cada uno de los genes analizados mediante SYBR Green en este estudio.

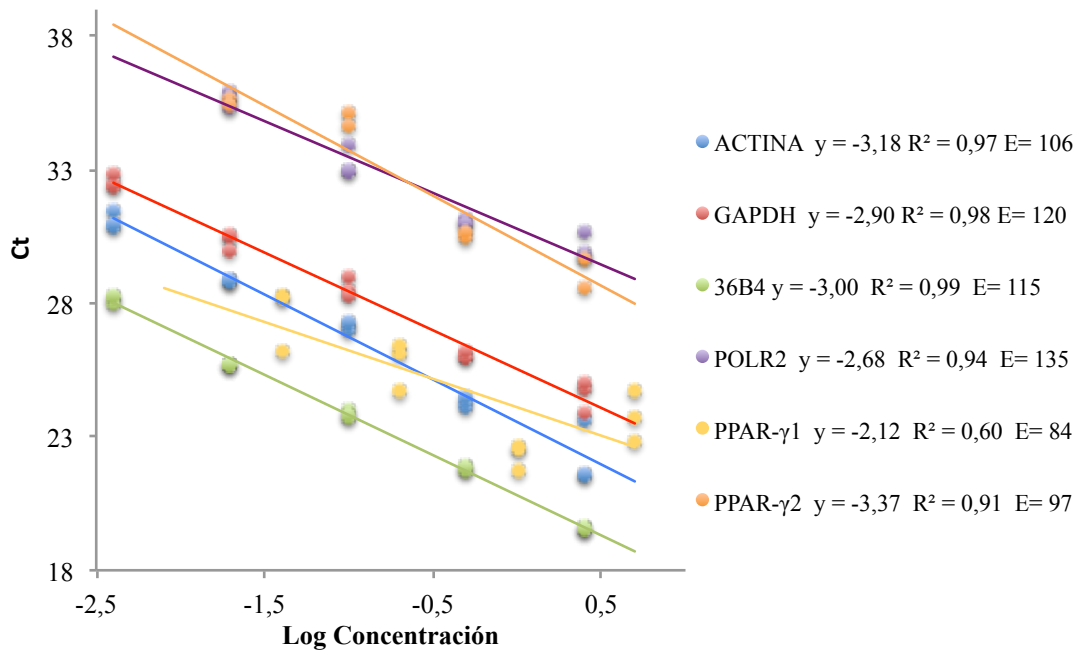


Figura 12. Curva estándar para el cálculo de la eficiencia de los primers estudiados.

4.6. Condiciones finales de la reacción de PCR a tiempo real

Como se ha mencionado, la PCR a tiempo real se llevó a cabo en el equipo Step-One-Plus de Applied Biosystems. Cada amplificación se realizó por duplicado para reducir la variabilidad de concentración en las muestras y el volumen final de la amplificación fue de 10 μ L con los siguientes componentes:

- 6 μ L de Fast Start SyBR Green Master Rox de Roche.
- 0,6 μ L de cada primer, diluido a la concentración 10 μ M.
- 1,4 y 2,4 μ L de agua libre de nucleasas en los genes de estudio y en los genes de referencia respectivamente.
- 2 μ L de ADNc a una concentración de 0,625 ng/ μ L en los genes de estudio y 1 μ L en los genes de referencia.

Como control de la reacción se mezclaron todos los componentes en un tubo sin ADNc y las condiciones de PCR utilizadas para amplificar cada uno de los oligonucleótidos fueron las siguientes (Figura 13).

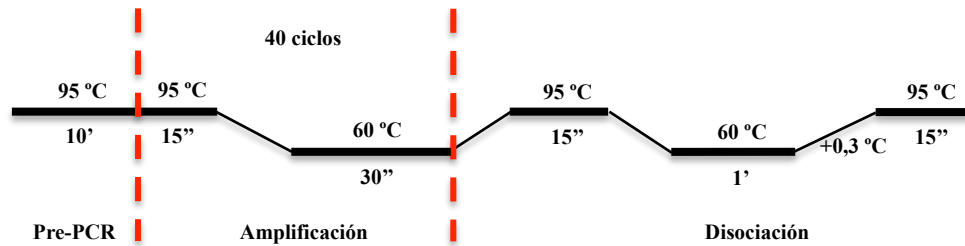


Figura 13. Condiciones de la PCR a tiempo real de ARNm.

4.7. Análisis de la estabilidad de expresión de los genes de referencia

El análisis de la estabilidad de expresión de los genes de referencia candidatos evidenció que actina y GAPDH fueron los genes de referencia más estables en las muestras de grasa periférica, de la misma manera actina fue el gen más estable en las muestras de grasa visceral, seguido del 36B4 (Figura 14). De acuerdo a estos resultados, se seleccionó el gen que codifica la actina como el gen de referencia de nuestras muestras.

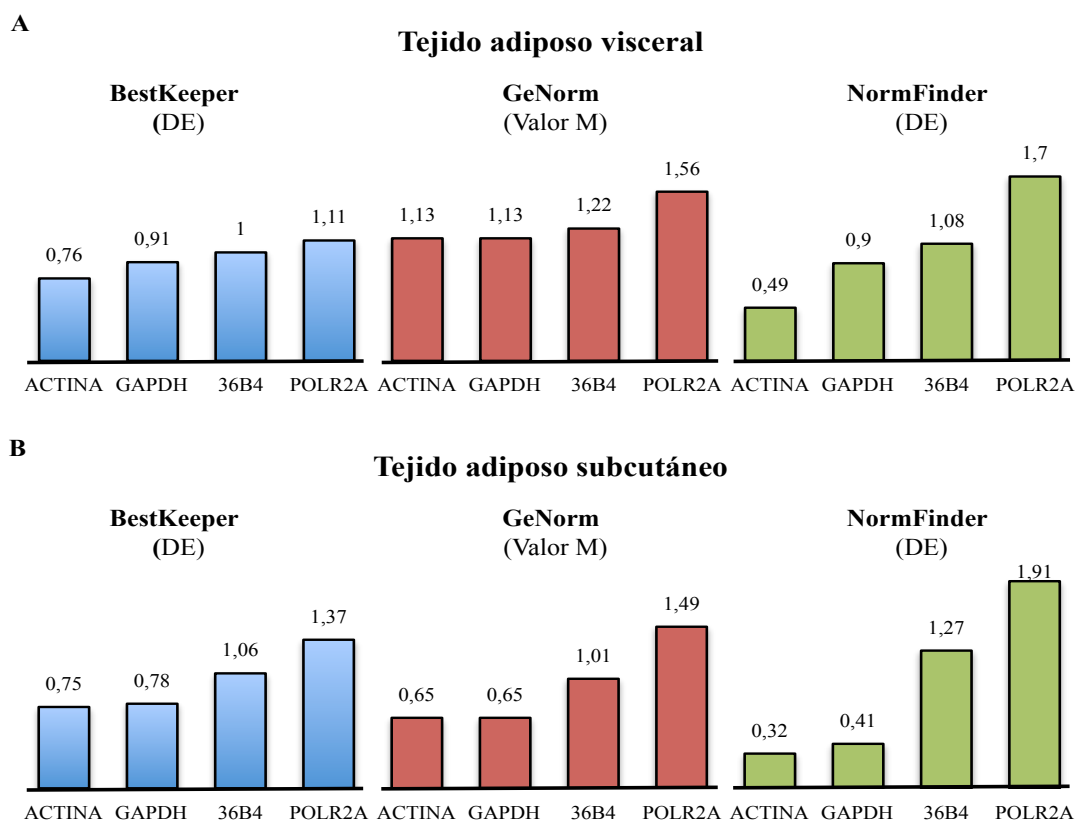


Figura 14. Resultados del análisis de la estabilidad de los genes de referencia candidatos en tejido adiposo visceral y subcutáneo.

4.8. Cálculo de la expresión génica

Como se ha indicado, la cuantificación relativa de la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 fue calculada usando el método del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y la expresión se normalizó con la actina, como gen de referencia más estable en nuestras muestras

5. Transcripción Reversa y cuantificación por PCR a tiempo real de micro-ARN

5.1. Síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN

La síntesis de ADNc a partir de ARN total para la determinación posterior de micro-ARN se realizó mediante una reacción de transcripción reversa usando primers específicos del kit de *miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR* (Exiqon). Este sistema permite amplificar micro-ARN mediante una transcripción reversa universal de ADNc, seguida de una amplificación por PCR a tiempo real con primers específicos de micro-ARN y mejorados con LNA (del inglés, *locked nucleic acid*).

Para la transcripción reversa se mezclaron 2 μ L de ARN total ajustado a una concentración de 10 ng/ μ L, con 8 μ L de la mezcla cuya composición se describe en la Tabla 8.

Tabla 8. Componentes de la reacción de síntesis de ADNc para la determinación de micro-ARN.

Componente	Volumen de la reacción (μ L)
Buffer de la reacción (5x)	2
Agua libre de nucleasas	5
Mezcla de enzimas (<i>enzyme mix</i>)	1
ARN total	2
Volumen Final	10

Las mezclas fueron incubadas en el termociclador Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 a 42 °C durante 60 minutos y a 95 °C por 5 minutos. El ADNc obtenido se diluyó a 1:80 y se conservó en alícuotas a -80 °C hasta su posterior utilización como molde para las PCR.

5.2. Cebadores o primers

Se utilizaron las secuencias de los micro-ARN miR-27a-3p y miR-27b-3p proporcionadas por Exiqon para el estudio de los micro-ARN. Como potenciales genes de referencia se seleccionaron el U6, el miR-103a-3p y el miR-24-3p, por haber sido utilizados previamente con este fin²⁸⁰. Las secuencias facilitadas por la casa comercial se especifican en la Tabla 9, donde figura el nombre completo del micro-ARN. Este nombre incluye el prefijo hsa-, que denota que es un micro-ARN humano, y el sufijo -3p, que indica la cercanía al extremo 3' del pre-micro-ARN.

Tabla 9. Primers de micro-ARN.

micro-ARN	Secuencia
hsa-miR-27a-3p	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC
hsa-miR-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC
hsa-miR-103a-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA
hsa-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG

5.3. Análisis de las curvas de fusión (*melt curves*)

El análisis de la curva de fusión se realizó para verificar la presencia de un solo fragmento de amplificación en la reacción de PCR en tiempo real, y descartar así la presencia de fragmentos inespecíficos. En la Figura 15 se muestra la curva de fusión

de cada uno de los micro-ARN evaluados mediante PCR cuantitativa basada en SYBR Green en este estudio.

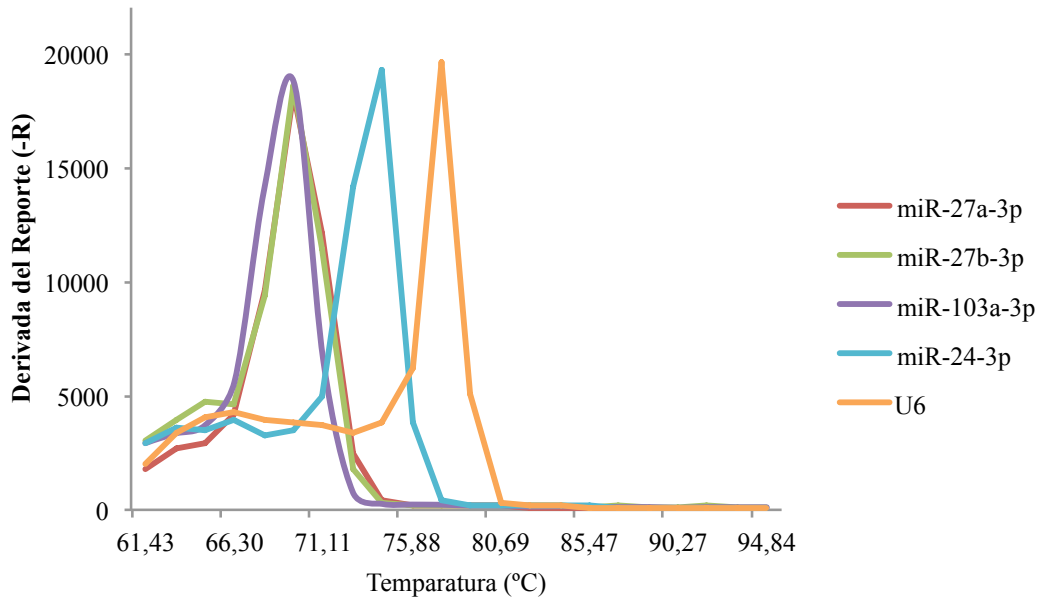


Figura 15. Curva de fusión de miR-27a-3p, miR-27b-3p, mir-103a-3p, miR-24-3p y U6.

5.4. Condiciones finales de la reacción de PCR a tiempo real

Al igual que con la determinación de ARNm, la PCR a tiempo real para la determinación de micro-ARN se llevó a cabo en el equipo Step-One-Plus de Applied Biosystems, de acuerdo a las indicaciones del fabricante de los reactivos (Exiqon). La temperatura de anillamiento utilizada para cada uno de los primers fue de 60 °C, siguiendo la recomendación del fabricante. Cada amplificación se realizó por duplicado para minimizar la variabilidad de concentración en las muestras. El volumen final de la amplificación fue de 10 μ L cuyos componentes son:

- 5 μ L de ExiLENT SYBR Green master mix.
- 1 μ L de PCR Primer mix
- 4 μ L de ADNc.

Las condiciones de PCR utilizadas para amplificar cada uno de los oligonucleótidos se describen en la Figura 16.

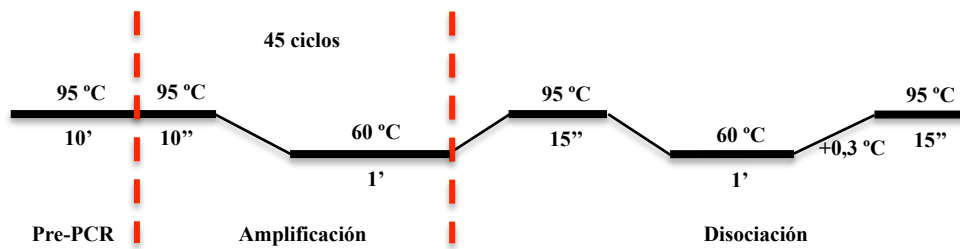


Figura 16. Condiciones de la PCR a tiempo real de micro-ARN.

5.5. Análisis de la estabilidad de expresión de los genes de referencia

El análisis de la estabilidad de expresión de los genes de referencia candidatos mostró que el miR-103a-3p fue el gen de referencia más estable en las muestras de grasa periférica y grasa visceral (Figura 17), por lo que se seleccionó como gen de referencia de nuestras muestras.

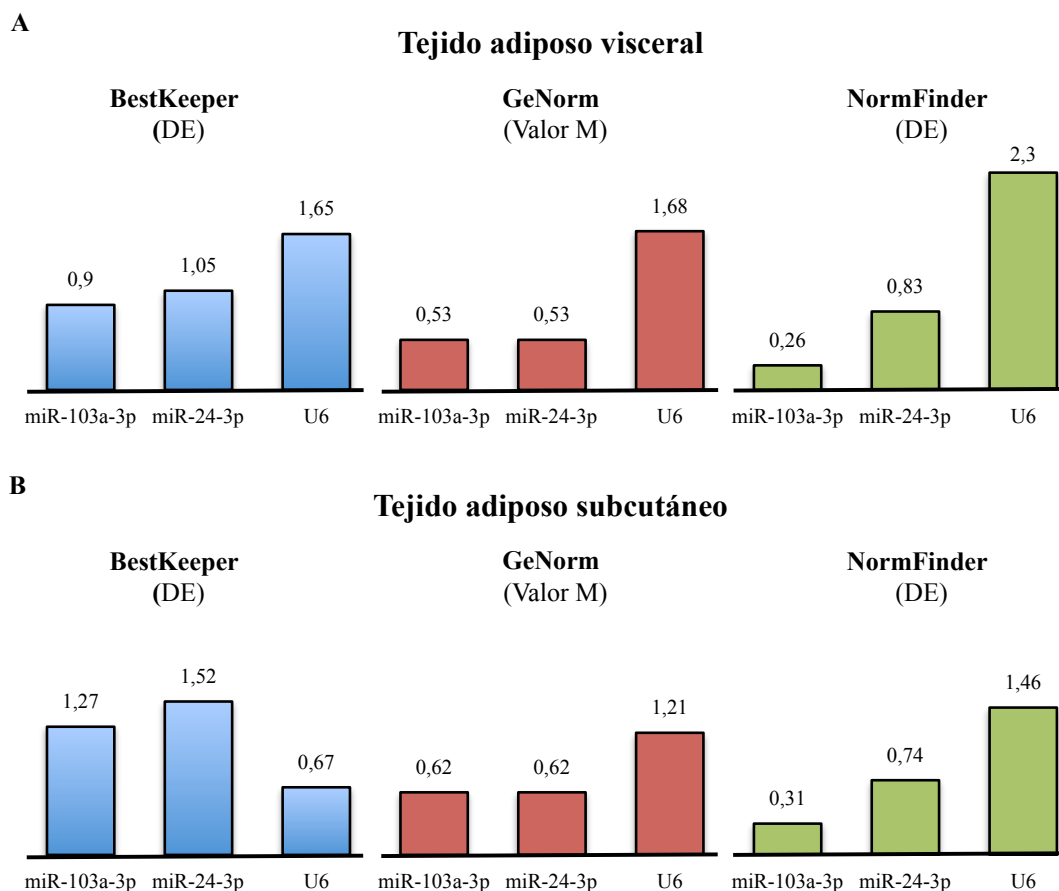


Figura 17. Resultados del análisis de la estabilidad de los genes de referencia candidatos en tejido adiposo visceral y subcutáneo.

5.6. Cálculo de la expresión génica

La cuantificación relativa de la expresión de miR-27a-3p y miR-27b-3p fue calculada usando el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. La expresión de estos micro-ARN se normalizó con la de miR-103a-3p, que fue el gen de referencia más estable en nuestras muestras.

6. Métodos estadísticos

El cálculo de la expresión cuantitativa relativa de los ARNm y micro-ARN estudiados se realizó mediante una plantilla de Excel con las ecuaciones de RT-PCR cuantitativa relativa descritas. Se comprobó la ausencia de valores extremos mediante una plantilla de Excel con el test de Grubbs. El análisis estadístico de la comparación de variables entre el grupo de pacientes y el grupo control, y las diferencias en la expresión cuantitativa de los ARNm y micro-ARN, así como los análisis de correlación, se realizaron con el programa SPSS versión 20 para MAC OS. (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Las variables cuantitativas se presentan como la media y su desviación estándar (DE) y fueron comparadas mediante la U de Mann-Whitney debido al carácter no paramétrico de la mayoría de las mismas. Las variables cualitativas se presentan como frecuencias absolutas y relativas y fueron analizadas mediante el test de la χ^2 o el test exacto de Fisher, si las frecuencias esperadas fueron menores de cinco. El análisis de las correlaciones entre variables cuantitativas se realizó mediante la correlación de la ρ (rho) de Spearman. El nivel de significación α se estableció en el 5%.

Como se ha mencionado, se utilizaron los algoritmos estadísticos GeNorm y NormFinder incorporados en el programa Genex versión 5.44 y la plantilla de Excel del algoritmo BestKeeper, para el análisis de estabilidad de los genes de referencia.

7. Financiación del estudio

Este trabajo de investigación ha sido financiado principalmente gracias a la subvención concedida por la Gerencia Regional de Salud de la Junta de Castilla y León al proyecto “Importancia del micro-ARN en la inflamación y esteatohepatitis asociada a la obesidad” (referencia GRS 681/A/11), cuya investigadora principal es la Dra. Lourdes Hernández Cosido.

IV. RESULTADOS

1. Características clínicas de casos y controles

Nuestra muestra de estudio se compuso de 43 pacientes obesos con una media de IMC de 49,3 (DE = 7,5) Kg/m² y 19 controles con IMC medio de 24,4 (2,1) Kg/m². La edad media de los pacientes fue de 44,9 (12,3) años y la de los controles fue de 55,3 (17,4) años. Las principales características clínicas de los pacientes se resumen en la Tabla 10, mientras que las características detalladas de nuestra muestra, así como los resultados obtenidos en los análisis de expresión relativa de cada uno de los genes y micro-ARN, se muestran en los anexos de este trabajo.

Tabla 10. Características clínicas de la muestra.

Variable	Pacientes obesos n = 43	Controles n = 19	P
Edad (años)	44,9 (12,3)	55,3 (17,4)	0,054
Relación hombre/mujer	9/34	8/11	0,085
IMC (kg/m ²)	49,3 (7,5)	24,4 (2,1)	<0,001
Hipertensión arterial	18 (41,9)	6 (31,6)	0,444
Diabetes mellitus	8 (18,6)	2 (10,5)	0,425
Enfermedad cardiovascular	2 (4,7)	0	0,339
Dislipemia	12 (27,9)	3 (15,8)	0,304
Hipotiroidismo	8 (18,6)	2 (10,5)	0,425
Glucemia basal (mg/dL)	102,9 (32,1)	91,1 (12,4)	0,061
Colesterol total (mg/dL)	197,4 (37,2)	197,9 (50,1)	0,880
Triglicéridos (mg/dL)	134,9 (59,3)	120,6 (54,5)	0,551
Colesterol LDL (mg/dL)	117,5 (37,6)	123,8 (41,9)	0,733
Colesterol HDL (mg/dL)	48,1 (11,1)	50 (16,6)	0,985

Las variables cualitativas son presentadas como valor absoluto (%) y se compararon mediante una χ^2 o el test exacto de Fisher, mientras que las variables cuantitativas son presentadas como media (DE) y se compararon mediante una U de Mann-Whitney.

2. Expresión de genes de referencia en las muestras (actina y miR-103a)

De acuerdo a los estudios de estabilidad de genes de referencia anteriormente presentados, la actina y el miR-103a fueron los controles endógenos más estables en las muestras de nuestro estudio para realizar el análisis de expresión de ARNm y micro-ARN, respectivamente. En la Tabla 11 se muestran las medias de los valores de Ct de Actina y de miR-103a en tejido adiposo visceral y periférico de los pacientes obesos y los controles.

Tabla 11. Expresión relativa (Ct) de actina y mir-103a en los diferentes tejidos.

Tejido	Paciente	Control	<i>P</i>
Actina grasa visceral	24,65 (1,7)	24,35 (2,1)	0,325
Actina grasa periférica	23,87 (2,2)	23,75 (1)	0,849
miR-103a grasa visceral	26,67 (1,5)	26,53 (1,3)	0,994
miR-103a grasa visceral	27,32 (1,72)	27,43 (1,3)	0,789

3. Expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en grasa visceral

3.1. Comparación de la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en grasa visceral entre casos y controles

La resultados obtenidos al analizar la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en tejido adiposo visceral se observan en la Figura 18. No encontramos diferencias significativas en la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en tejido adiposo visceral entre los pacientes obesos y los controles.

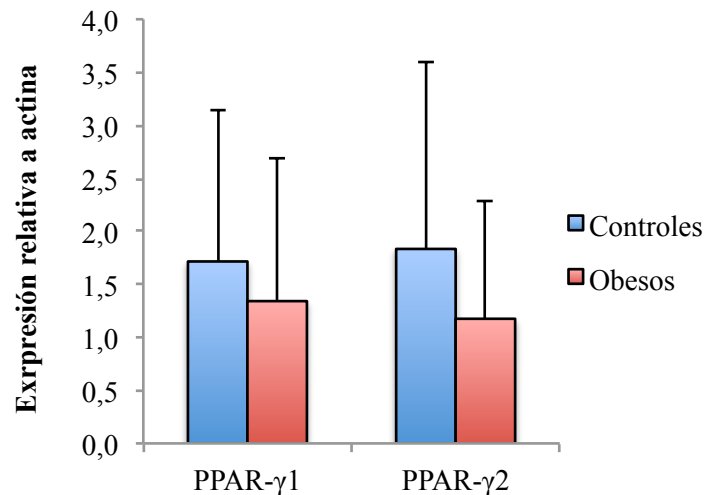


Figura 18. Expresión relativa del PPAR-γ1 y 2 en grasa visceral.

La expresión relativa de ARNm para cada grupo se expresa con la media del valor y la desviación estándar. Las expresiones relativas se normalizaron con actina y se calibraron con la media $2^{\Delta\Delta Ct}$ de los controles.

3.2. Influencia del sexo en la expresión del PPAR-γ1 y PPAR-γ2 en grasa visceral

Estratificando por sexos, se observó una disminución significativa de la expresión del PPAR-γ1 en mujeres obesas respecto a las pacientes controles ($P = 0,045$). También se observó una disminución en la expresión del PPAR-γ2 en mujeres obesas, respecto a no obesas, en grasa visceral, pero esta diferencia no fue significativa ($P = 0,113$). No se encontraron diferencias entre la expresión al comparar el grupo de pacientes y controles de sexo masculino (Figura 19).

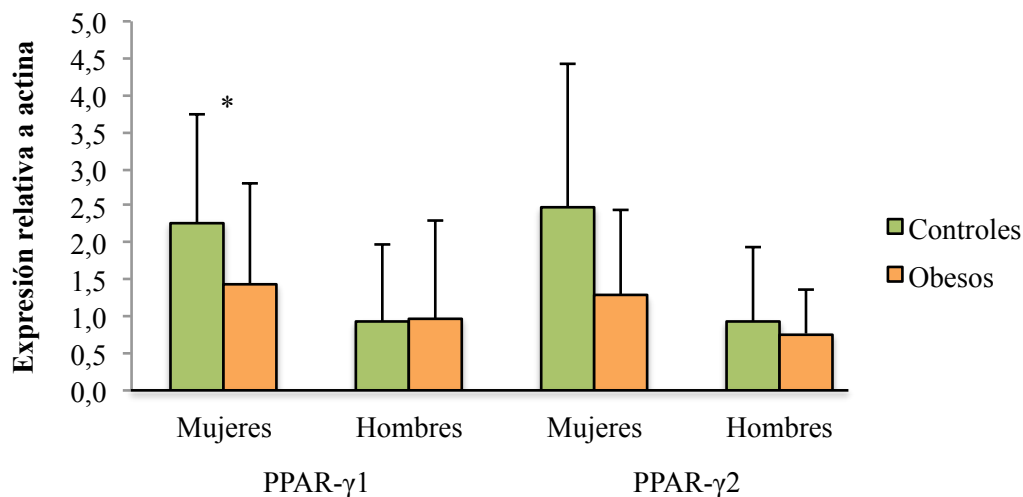


Figura 19. Expresión relativa del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en grasa visceral según el sexo. La expresión relativa de ARNm para cada grupo se expresa con la media del valor y la desviación estándar. Las expresiones relativas se normalizaron con actina y se calibraron con la media $2^{\Delta\Delta Ct}$ de los controles. * $P=0,045$.

3.3. Correlación de la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en grasa visceral con las variables clínicas y analíticas

El análisis de correlación entre los niveles de expresión del PPAR- γ en grasa visceral con la edad y otras variables clínicas y analíticas recogidas se muestran en la Tabla 12. Analizando el conjunto de pacientes y controles, se observa una correlación negativa débil entre el PPAR- γ 1 con el peso ($\rho = -0,305$; $P = 0,016$) y también con el IMC ($\rho = -0,325$; $P = 0,001$) (Figuras 20 y 21). Esta correlación fue más fuerte en mujeres tanto para el peso ($\rho = -0,419$ y $P = 0,004$) como para la correlación con el IMC ($\rho = -0,495$ y $P = 0,001$; Figuras 20 y 21); en este subgrupo también se encontró una relación inversa entre el PPAR- γ 2 y el IMC ($\rho = -0,358$; $P = 0,016$).

La correlación negativa entre los niveles de expresión del PPAR- γ 1 en grasa visceral con el peso y el IMC, se encontró también analizando por separado el grupo de los pacientes ($\rho = -0,312$ y $P = 0,042$ para el peso; $\rho = -0,373$ y $P = 0,014$ para el

IMC), pero no alcanzó la significación estadística en los controles ($\rho = -0,370$ y $P = 0,119$ para el peso; $\rho = -0,302$ y $P = 0,209$ para el IMC).

Tabla 12. Correlación entre la expresión del PPAR- γ en grasa visceral y las variables clínicas y analíticas.

		Edad	Peso	IMC	Glucosa	CT	TG	HDL	LDL
PPAR-γ1	ρ	-0,018	-0,305	-0,325	-0,122	0,159	0,117	-0,006	0,172
	P	0,887	0,016	0,01	0,35	0,243	0,391	0,967	0,213
PPAR-γ2	ρ	-0,11	-0,179	-0,199	-0,203	0,086	-0,016	0,045	0,184
	P	0,395	0,164	0,122	0,117	0,527	0,909	0,742	0,182

El análisis se hizo sobre el total de la muestra. IMC: índice de masa corporal. CT: colesterol total (mg/dL); TG: triglicéridos (mg/dL); HDL: colesterol HDL (mg/dL); LDL: colesterol LDL (mg/dL). Para cada correlación, en la fila superior se muestra el valor de la ρ de Spearman y en la inferior el valor de la P asociada a dicho contraste.

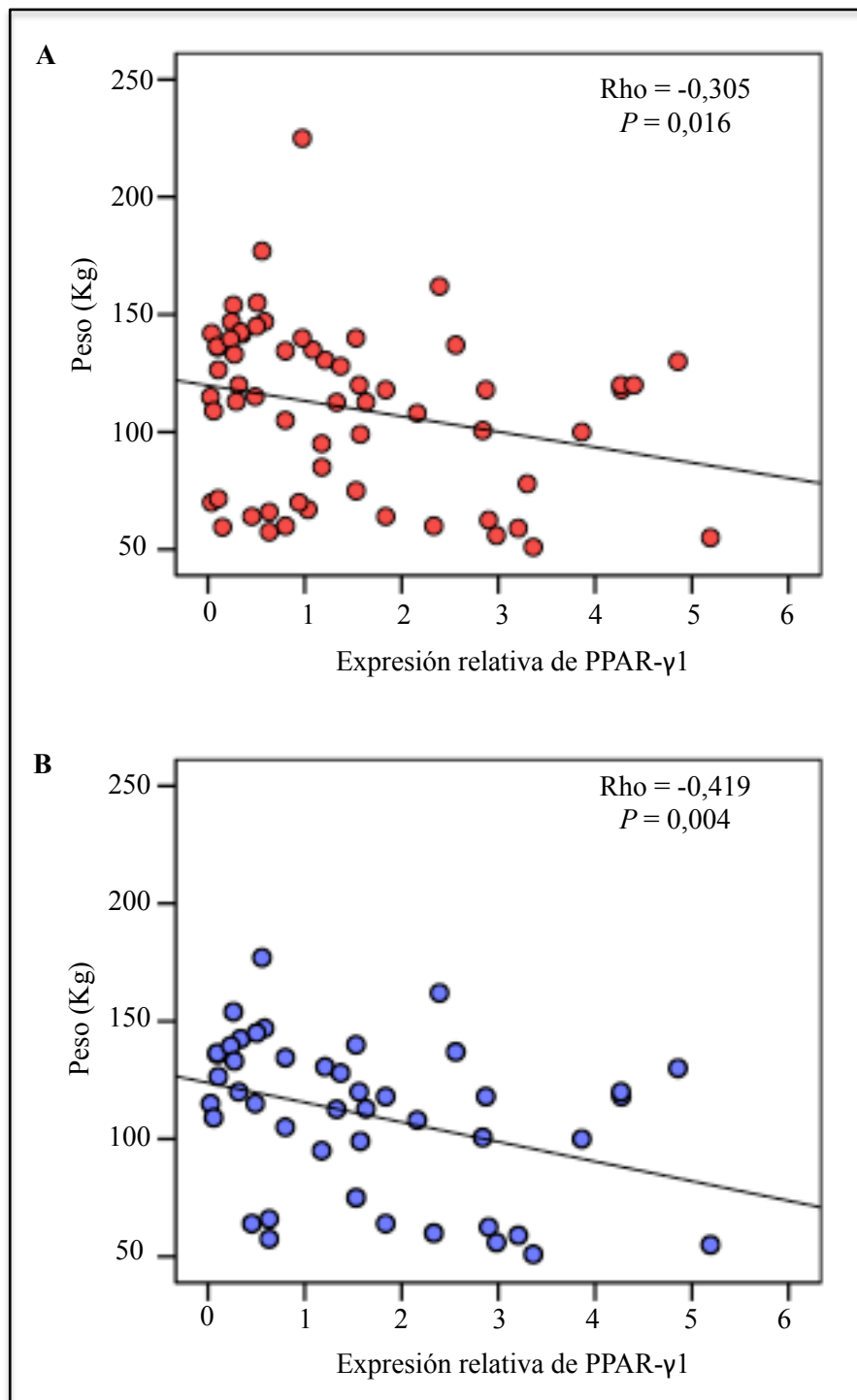


Figura 20. Correlación entre la expresión relativa del PPAR- γ 1 en grasa visceral con el peso.

A: Total de la muestra. B: Sexo femenino.

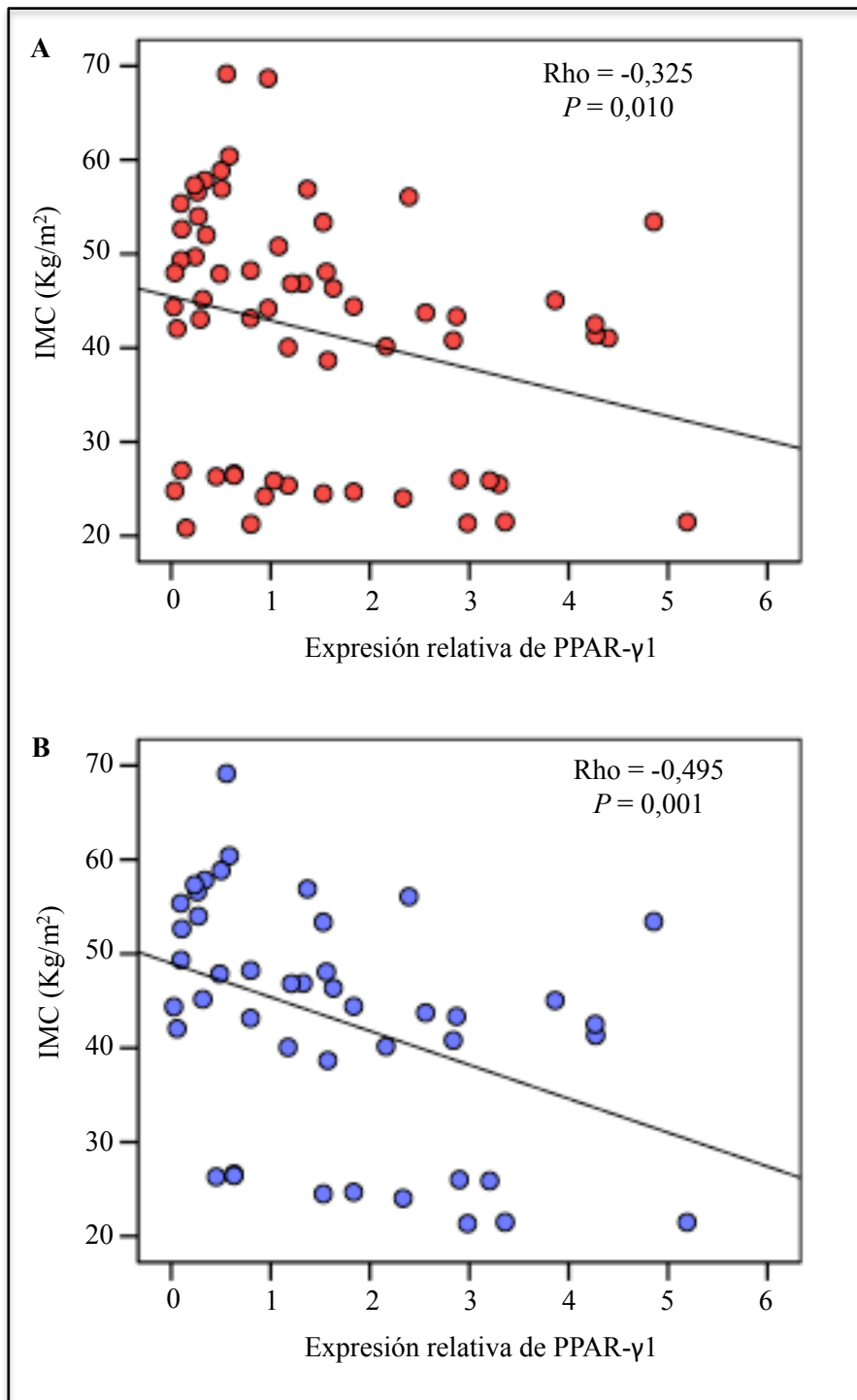


Figura 21. Correlación entre la expresión relativa del PPAR- γ 1 en grasa visceral con el IMC.

A: Total de la muestra. B: Sexo femenino.

4. Expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en grasa subcutánea

4.1. Comparación de la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en grasa subcutánea entre casos y controles

La resultados obtenidos al analizar la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en tejido adiposo subcutáneo se observan en la Figura 22. No se encontraron diferencias significativas en la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en tejido adiposo subcutáneo entre los pacientes obesos y los controles.

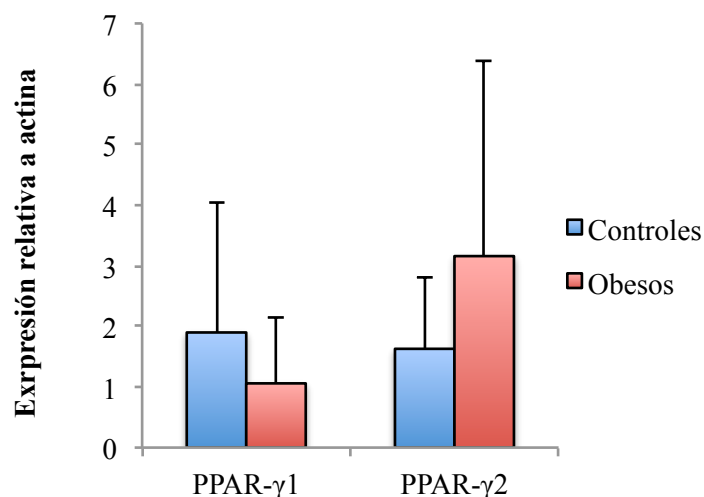


Figura 22. Expresión relativa del PPAR- γ 1 y 2 en grasa subcutánea.

La expresión relativa de ARNm para cada grupo se expresa con la media del valor y la desviación estándar. Las expresiones relativas se normalizaron con actina y se calibraron con la media $2^{\Delta\Delta C_t}$ de los controles.

4.2. Influencia del sexo en la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en grasa subcutánea

Al comparar la expresión del PPAR- γ 1 y 2 en grasa subcutánea de mujeres obesas y no obesas, se observó también una disminución no significativa del PPAR- γ 1 en las mujeres obesas. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la

expresión del PPAR- γ 2 en grasa subcutánea entre mujeres obesas y controles, ni del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en hombres obesos respecto a controles no obesos (Figura 23).

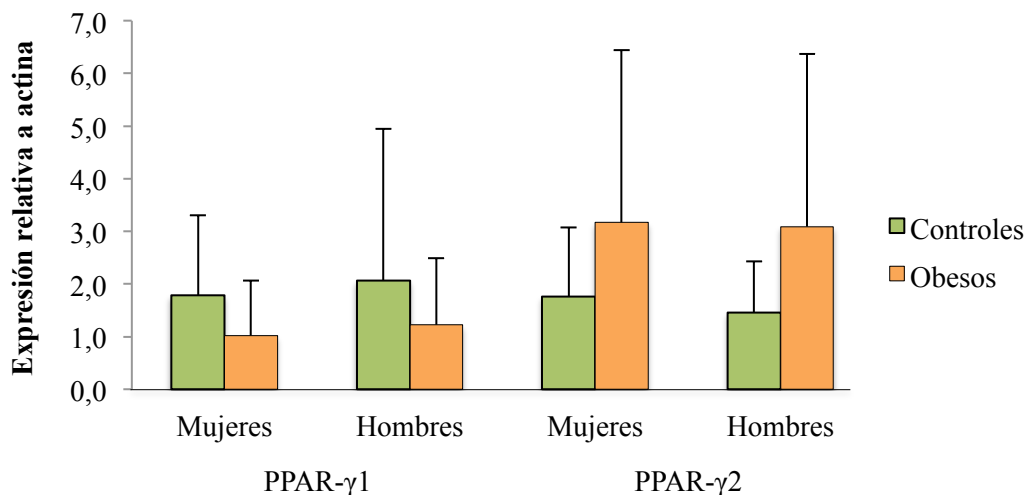


Figura 23. Expresión relativa del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en grasa subcutánea según el sexo.

La expresión relativa de ARNm para cada grupo se expresa con la media del valor y la desviación estándar. Las expresiones relativas se normalizaron con actina y se calibraron con la media $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de los controles.

4.3. Correlación de la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en grasa subcutánea con las variables clínicas y analíticas

No se observó ninguna correlación significativa entre los niveles de expresión del PPAR- γ 1 y 2 en grasa subcutánea, la edad o los parámetros antropométricos y bioquímicos de los obesos y controles (Tabla 13).

Tabla 13. Correlación entre la expresión del PPAR- γ en grasa subcutánea y las variables clínicas y analíticas.

		Edad	Peso	IMC	Glucosa	CT	TG	HDL	LDL
PPAR- γ 1	ρ	-0,06	0,005	-0,051	-0,019	-0,133	0,005	-0,202	-0,082
	<i>P</i>	0,64	0,972	0,696	0,886	0,327	0,968	0,14	0,557
PPAR- γ 2	ρ	0,01	0,172	0,103	0,061	-0,034	0,111	-0,069	-0,112
	<i>P</i>	0,938	0,18	0,424	0,64	0,801	0,417	0,618	0,419

El análisis se hizo sobre el total de la muestra. IMC: índice de masa corporal. CT: colesterol total (mg/dL); TG: triglicéridos (mg/dL); HDL: colesterol HDL (mg/dL); LDL: colesterol LDL (mg/dL). Para cada correlación, en la fila superior se muestra el valor de la ρ de Spearman y en la inferior el valor de la *P* asociada a dicho contraste.

5. Expresión de miR-27a y miR-27b en grasa visceral

5.1. Comparación de la expresión de miR-27a y miR-27b en grasa visceral entre casos y controles

Los resultados obtenidos al analizar la expresión de miR-27a y miR-27b en tejido adiposo visceral de obesos respecto a controles, se observan en la Figura 24. No encontramos diferencias significativas en la expresión de miR-27a y miR-27b en tejido adiposo visceral entre los pacientes obesos y los controles.

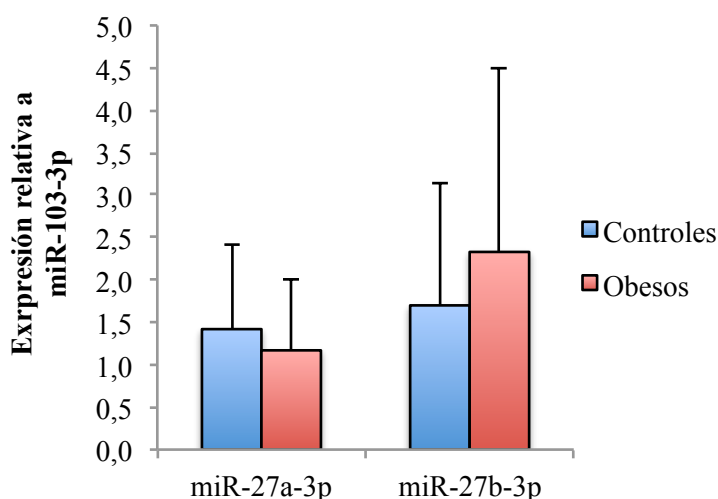


Figura 24. Expresión relativa de miR-27a y miR-27b en grasa visceral.

La expresión relativa de micro-ARN para cada grupo se expresa con la media del valor y la desviación estándar. Las expresiones relativas se normalizaron con mir-103a y se calibraron con la media $2^{\Delta\Delta Ct}$ de los controles.

5.2. Influencia del sexo en la expresión de miR-27a y miR-27b en grasa visceral

Estratificando por sexos, no encontramos diferencias de expresión de miR-27a y miR-27b al comparar las mujeres obesas respecto a las no obesas, ni entre hombres obesos y controles (Figura 25).

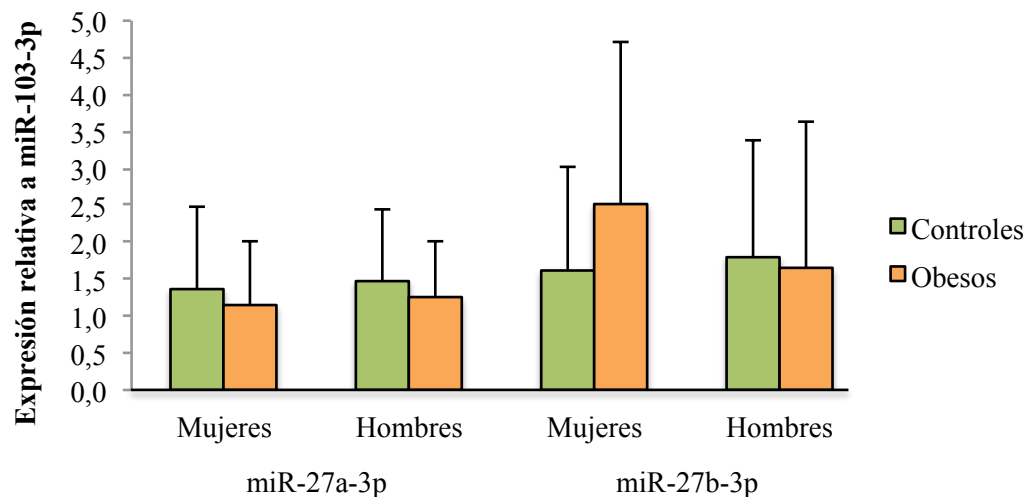


Figura 25. Expresión relativa de miR-27a y miR-27b en grasa visceral en hombres y mujeres.

La expresión relativa de micro-ARN para cada grupo se expresa con la media del valor y la desviación estándar. Las expresiones relativas se normalizaron con mir-103a y se calibraron con la media $2^{\Delta\Delta Ct}$ de los controles.

5.3. Correlación de la expresión de miR-27a y miR-27b en grasa visceral con las variables clínicas y analíticas

El análisis de correlación entre los niveles de expresión de miR-27a y miR-27b en grasa visceral, con la edad o los parámetros antropométricos y bioquímicos de los pacientes y controles (Tabla 14) no demostró ninguna correlación estadísticamente significativa. Tampoco se evidenció ninguna correlación al analizarlos en los pacientes y en los controles.

Tabla 14. Correlación entre la expresión de miR-27a y miR-27b en grasa visceral y las variables clínicas y analíticas.

		Edad	Peso	IMC	Glucosa	CT	TG	HDL	LDL
miR-27a	ρ	0,098	0,034	-0,052	-0,22	0,162	0,137	0,07	0,071
	<i>P</i>	0,447	0,793	0,686	0,089	0,234	0,315	0,611	0,612
miR-27b	ρ	-0,049	0,108	0,117	-0,082	0,126	0,068	0,047	0,055
	<i>P</i>	0,707	0,402	0,364	0,530	0,356	0,616	0,732	0,694

El análisis se hizo sobre el total de la muestra. IMC: índice de masa corporal. CT: colesterol total (mg/dL); TG: triglicéridos (mg/dL); HDL: colesterol HDL (mg/dL); LDL: colesterol LDL (mg/dL). Para cada correlación, en la fila superior se muestra el valor de la ρ de Spearman y en la inferior el valor de la *P* asociada a dicho contraste.

6. Expresión de miR-27a y miR-27b en grasa subcutánea

6.1. Comparación de la expresión de miR-27a y miR-27b en grasa subcutánea entre casos y controles

El análisis de la expresión de miR-27a y miR-27b en tejido adiposo subcutáneo de obesos respecto a controles se observa en la Figura 26. No encontramos diferencias significativas en la expresión de estos dos micro-ARN entre los grupos de estudio.

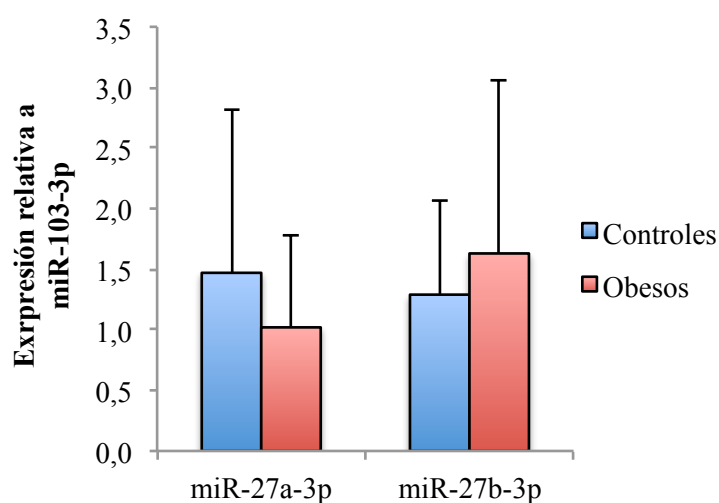


Figura 26. Expresión relativa de miR-27a y miR-27b en grasa subcutánea.

La expresión relativa de micro-ARN para cada grupo se expresa con la media del valor y la desviación estándar. Las expresiones relativas se normalizaron con mir-103a y se calibraron con la media $2^{\Delta\Delta Ct}$ de los controles.

6.2. Influencia del sexo en la expresión de miR-27a y miR-27b en grasa subcutánea

Al estratificar por sexos por sexos, se observó una disminución no significativa de la expresión miR-27a en mujeres obesas respecto a los controles ($P = 0,061$). Por el contrario, la expresión diferencial de miR-27b en grasa subcutánea mostró un

incremento no significativo en la expresión de miR-27b tanto en mujeres obesas ($P = 0,907$) como en hombres obesos ($P = 0,083$) respecto a los controles (Figura 27).

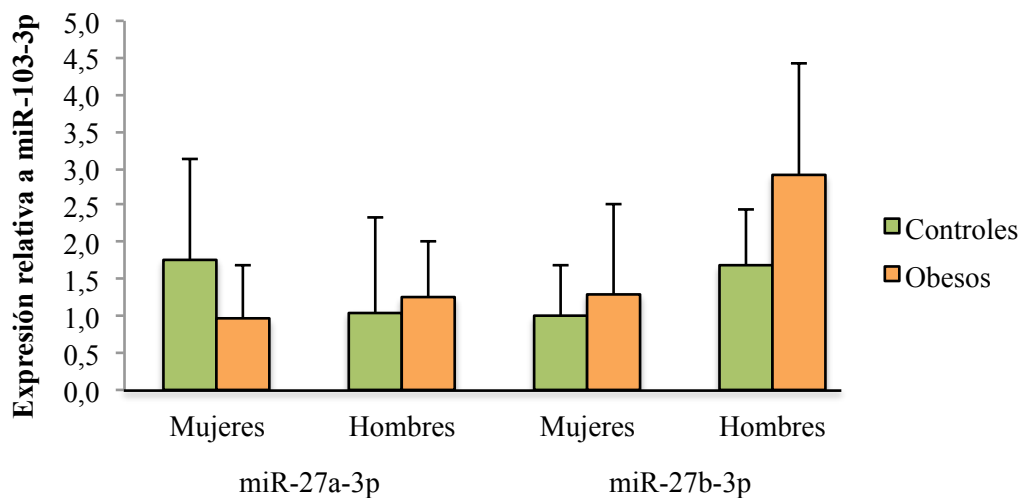


Figura 27. Expresión relativa de miR-27a y miR-27b en grasa subcutánea en hombres y mujeres.

La expresión relativa de micro-ARN para cada grupo se expresa con la media del valor y la desviación estándar. Las expresiones relativas se normalizaron con mir-103a y se calibraron con la media $2^{\Delta\Delta Ct}$ de los controles.

6.3. Correlación de la expresión de miR-27a y miR-27b en grasa subcutánea con las variables clínicas y analíticas

El análisis de correlación entre los niveles de expresión de miR-27a y miR-27b en grasa subcutánea, con la edad y los parámetros antropométricos y bioquímicos del conjunto de la muestra se presenta en la Tabla 15. Este análisis puso de manifiesto una correlación positiva débil entre la expresión de miR-27a y los niveles de colesterol total ($\rho = 0,281$; $P = 0,036$). Este resultado se mantuvo en el subgrupo de las mujeres ($\rho = 0,335$; $P = 0,032$; Figura 28), en las que adicionalmente se observó una correlación positiva entre dicho micro-ARN y el nivel de colesterol LDL ($\rho = 0,377$; $P = 0,018$).

Tabla 15. Correlación de miR-27a y miR-27b en grasa subcutánea con las variables clínicas y analíticas.

		Edad	Peso	IMC	Glucosa	CT	TG	HDL	LDL
miR-27a	ρ	-0,165	-0,136	-0,145	-0,079	0,281	0,044	0,245	0,223
	P	0,199	0,291	0,26	0,543	0,036	0,749	0,072	0,106
miR-27b	ρ	-0,039	0,072	0,024	0,053	-0,065	0,17	-0,249	-0,126
	P	0,766	0,58	0,855	0,686	0,633	0,211	0,067	0,364

El análisis se hizo sobre el total de la muestra. IMC: índice de masa corporal. CT: colesterol total (mg/dL); TG: triglicéridos (mg/dL); HDL: colesterol HDL (mg/dL); LDL: colesterol LDL (mg/dL). Para cada correlación, en la fila superior se muestra el valor de la ρ de Spearman y en la inferior el valor de la P asociada a dicho contraste.

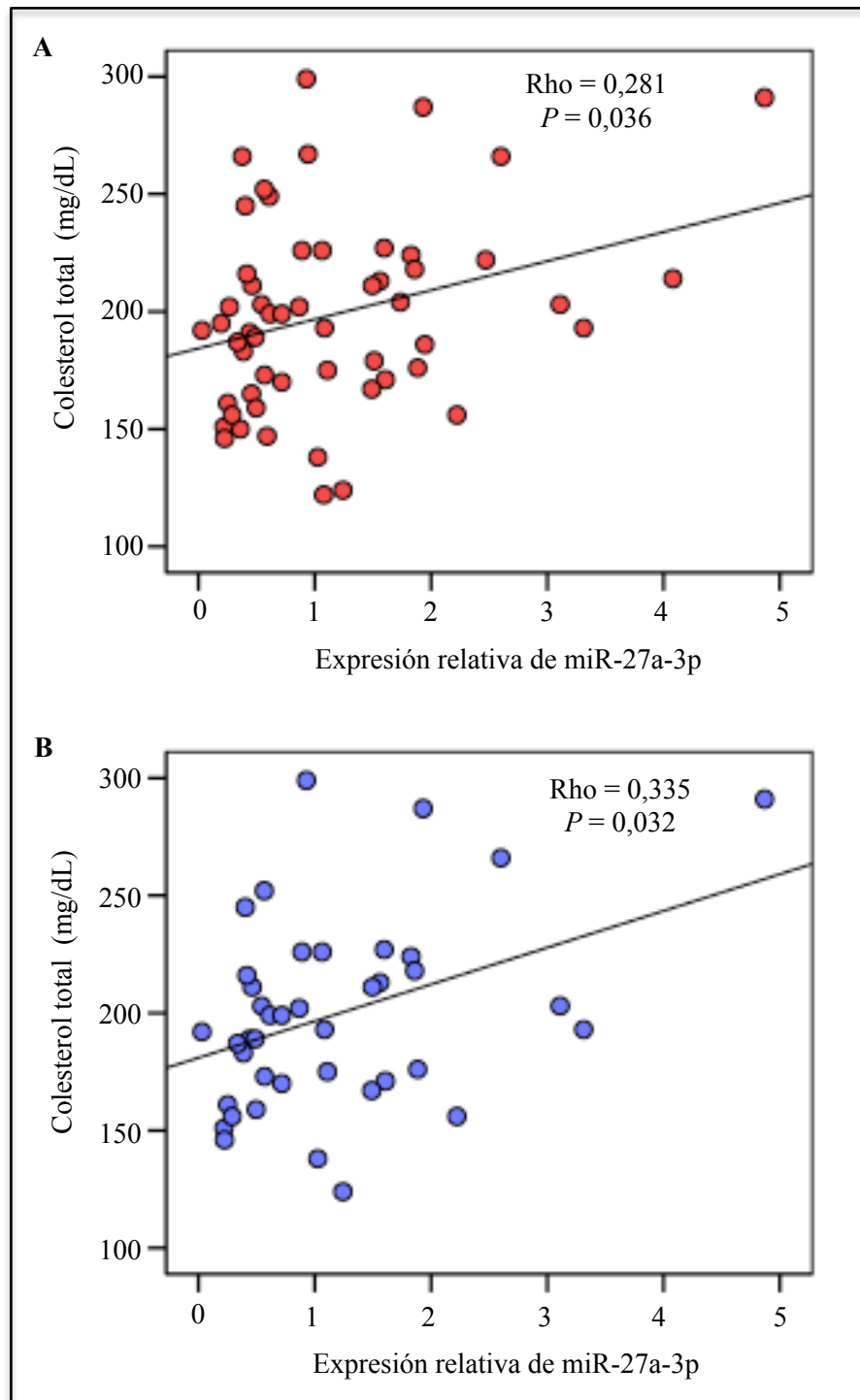


Figura 28. Correlación entre la expresión relativa de miR-27a en grasa subcutánea con el colesterol total.

A: Total de la muestra. B: Sexo femenino.

6.4. Correlación entre los niveles de expresión del PPAR- γ 1, PPAR- γ 2, miR-27a y miR-27b

Se realizó un análisis de correlación entre los niveles de expresión de ARNm del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 y los niveles de expresión de los micro-ARN miR-27a y miR-27b en grasa visceral (Tabla 16) y en grasa subcutánea (Tabla 17). En este análisis encontramos una correlación positiva entre los niveles del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en ambos tejidos, al igual que se encontró una correlación entre el miR-27a y el miR-27b en grasa visceral, pero no en grasa periférica. Además, se evidenció una correlación positiva débil entre el miR-27b y el PPAR- γ 2 en grasa visceral ($\rho = 0,276$; $P = 0,030$). Al contrastar este último análisis en el grupo de casos y en el grupo de controles, la correlación entre miR-27b y PPAR- γ 2, solo se observó en el grupo de controles ($\rho = 0,589$; $P = 0,008$).

Tabla 16. Correlación entre la expresión del PPAR- γ y miR-27a y miR-27b en grasa visceral.

		PPAR- γ 1	PPAR- γ 2	miR-27a	miR-27b
PPAR- γ 1	ρ	.	0,398	0,169	0,155
	P	.	0,001	0,189	0,23
PPAR- γ 2	ρ	0,398	.	0,247	0,276
	P	0,001	.	0,053	0,03

El análisis se hizo sobre el total de la muestra. Para cada correlación, en la fila superior se muestra el valor de la ρ de Spearman y en la inferior el valor de la P asociada a dicho contraste.

Tabla 17. Correlación entre la expresión del PPAR- γ y miR-27a y miR-27b en grasa subcutánea.

		PPAR- γ 1	PPAR- γ 2	miR-27a	miR-27b
PPAR- γ 1	ρ	.	0,286	-0,175	-0,057
	P	.	0,024	0,174	0,662
PPAR- γ 2	ρ	0,286	.	-0,148	-0,055
	P	0,024	.	0,251	0,669

El análisis se hizo sobre el total de la muestra. Para cada correlación, en la fila superior se muestra el valor de la ρ de Spearman y en la inferior el valor de la P asociada a dicho contraste.

7. Relación entre los niveles de expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 y la pérdida de peso postquirúrgica

Adicionalmente se realizó un seguimiento clínico postoperatorio de al menos 12 meses en 31 de los 43 pacientes obesos y se registraron los cambios en el peso y el IMC tras la cirugía bariátrica. El porcentaje medio de disminución de peso al año de la cirugía bariátrica fue de 33,65 (7,7) % y, en consecuencia y dada la relación lineal directa entre ambas variables, el promedio de la disminución del IMC al año de la cirugía fue también de un 33,64 (7,7) %.

El análisis de correlación mediante la ρ de Spearman mostró una correlación negativa entre los niveles del PPAR- γ 1 en la muestra de tejido adiposo obtenida durante la cirugía bariátrica, y el porcentaje de pérdida de peso y de reducción del IMC a los 12 meses (Tabla 18), tanto en tejido adiposo visceral ($\rho = -0,460$ y $P = 0,009$ para el peso; $\rho = -0,462$ y $P = 0,009$ para el IMC; Figura 29) como subcutáneo ($\rho = -0,404$ y $P = 0,024$ para el peso; $\rho = -0,398$ y $P = 0,026$ para el IMC; Figura 30). De esta forma, los pacientes con niveles de expresión más bajos del PPAR- γ 1, perdieron más peso y tuvieron un mayor descenso en el IMC. Esta relación fue más fuerte en mujeres (Tabla 19), aunque no se realizó el análisis en el grupo de varones dado el bajo tamaño muestral ($N = 5$).

Esta correlación significativa entre la pérdida de peso y los niveles del PPAR- γ 1 en ambos tejidos se pone de manifiesto a partir de los 6 meses y es más evidente en la grasa visceral, como se observa en la Tabla 20. Por el contrario, no se encontró correlación entre los niveles del PPAR- γ 2 y la pérdida de peso o la reducción de IMC post-quirúrgica. No se encontró tampoco ninguna relación significativa entre la pérdida de peso post-cirugía y las variables recogidas, como la edad, el peso o el IMC previo a la cirugía bariátrica.

Tabla 18. Correlación entre la expresión del PPAR- γ y la pérdida de peso al año de la cirugía.

		Pérdida de peso al año (%)	Reducción del IMC al año (%)
PPAR- γ 1	ρ	-0,460	-0,462
Grasa visceral	P	0,009	0,009
PPAR- γ 2	ρ	-0,083	-0,085
Grasa visceral	P	0,658	0,649
PPAR- γ 1	ρ	-0,404	-0,398
Grasa subcutánea	P	0,024	0,026
PPAR- γ 2	ρ	-0,225	-0,224
Grasa subcutánea	P	0,224	0,225

El análisis se hizo sobre 31 pacientes seguidos durante 1 año. Para cada correlación, en la fila superior se muestra el valor de la ρ de Spearman y en la inferior el valor de la P asociada a dicho contraste.

Tabla 19. Correlación entre PPAR- γ y la pérdida de peso al año de la cirugía en mujeres.

		Pérdida de peso al año (%)	Reducción del IMC al año (%)
PPAR- γ 1	ρ	-0,490	-0,497
Grasa visceral	P	0,011	0,01
PPAR- γ 2	ρ	0,019	0,02
Grasa visceral	P	0,925	0,922
PPAR- γ 1	ρ	-0,423	-0,415
Grasa subcutánea	P	0,031	0,035
PPAR- γ 2	ρ	-0,152	-0,148
Grasa subcutánea	P	0,458	0,47

El análisis se hizo en 26 pacientes de sexo femenino seguidas durante 1 año. Para cada correlación, en la fila superior se muestra el valor de la ρ de Spearman y en la inferior el valor de la P asociada a dicho contraste.

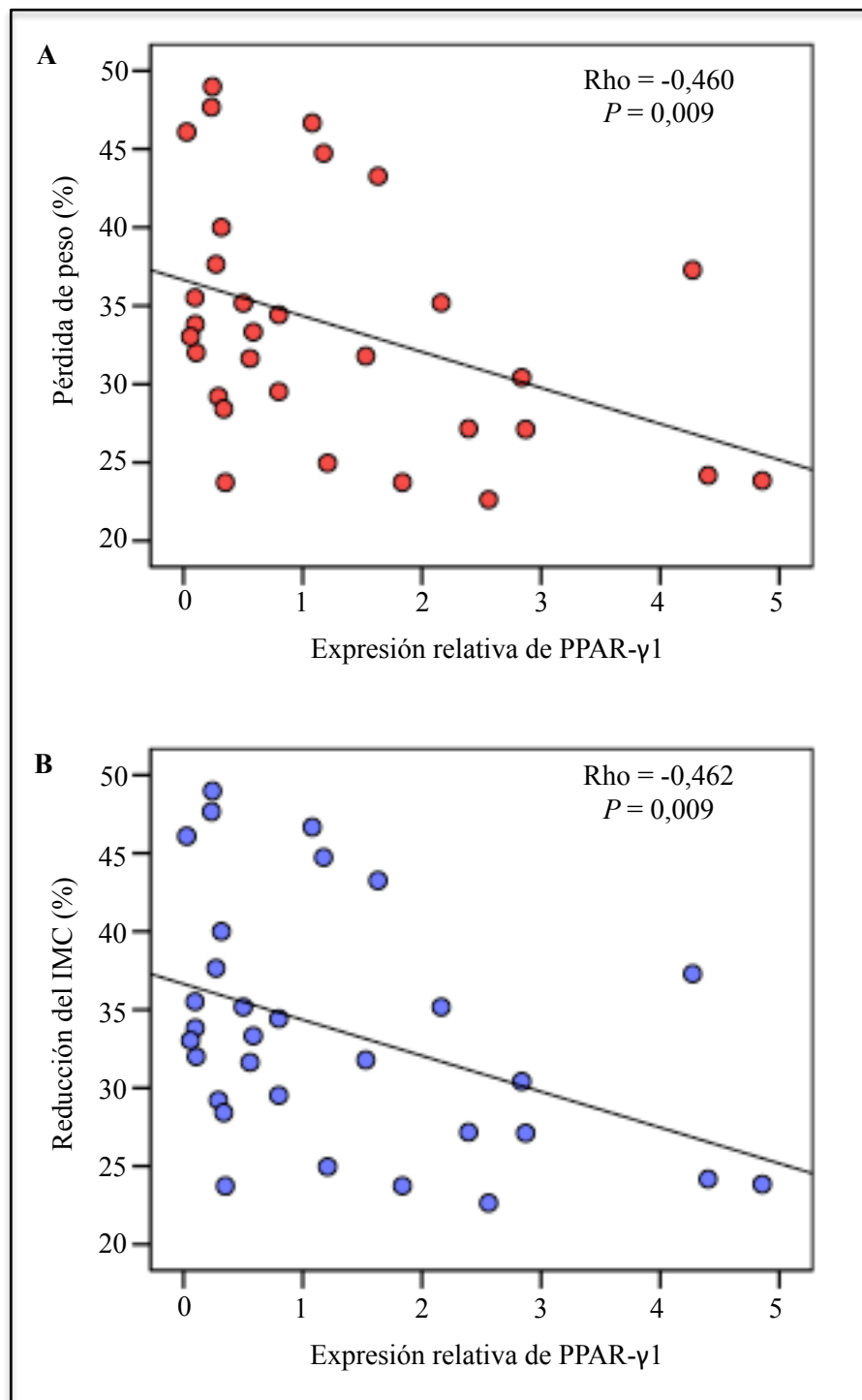


Figura 29. Correlación entre los niveles del PPAR- γ 1 en grasa visceral y la pérdida de peso y reducción del IMC durante el primer año post-cirugía bariátrica.

A: Pérdida de peso. B: Reducción del IMC.

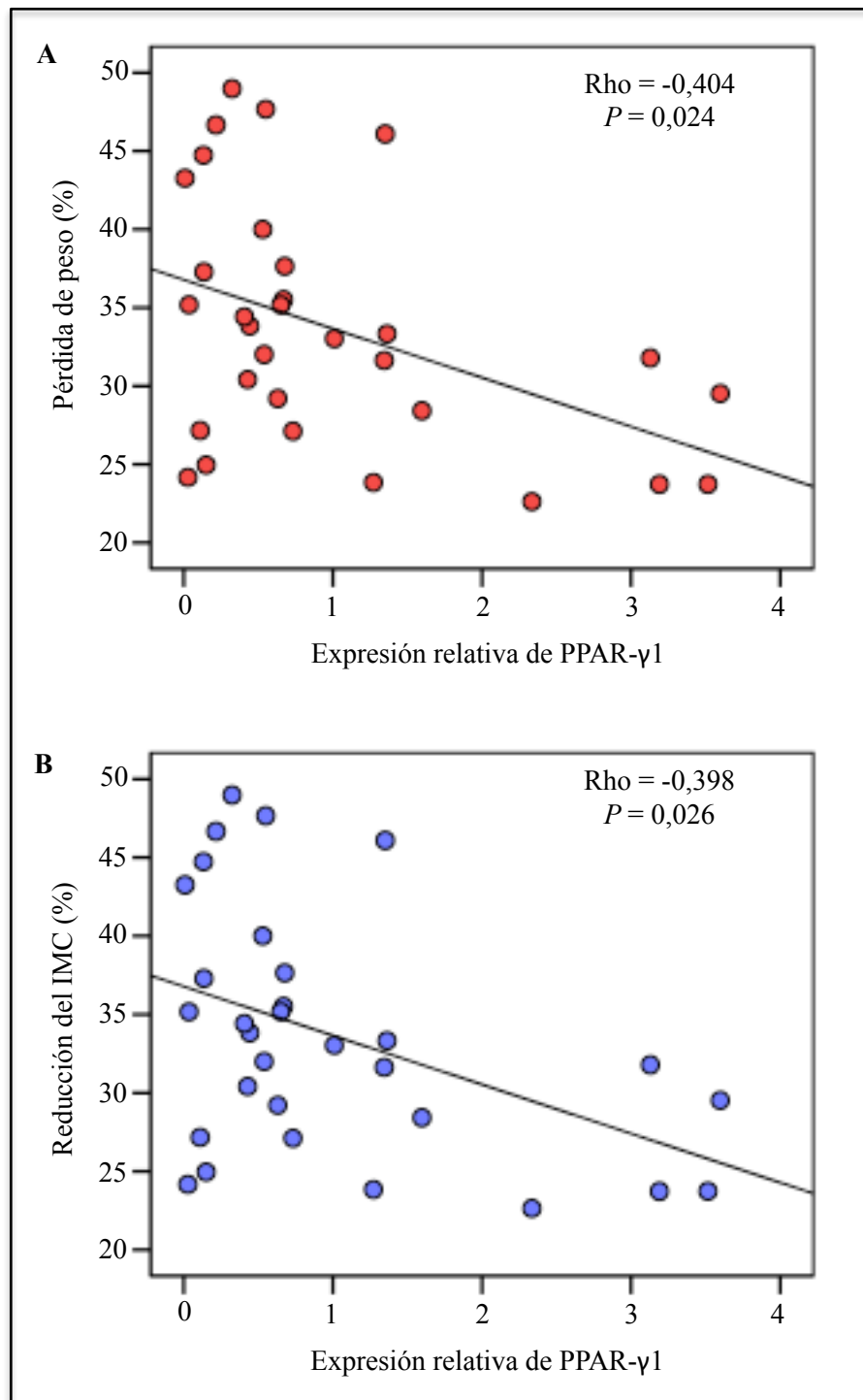


Figura 30. Correlación entre los niveles del PPAR-γ1 en grasa subcutánea y la pérdida de peso y reducción del IMC durante el primer año post-cirugía bariátrica.

A: Pérdida de peso. B: Reducción del IMC.

Tabla 20. Correlación entre los niveles del PPAR- γ 1 y la pérdida de peso y reducción del IMC durante el primer año post-cirugía bariátrica.

		Pérdida de peso (%)	Reducción del IMC (%)	Pérdida de peso (%)	Reducción del IMC (%)	Pérdida de peso (%)	Reducción del IMC (%)
		3 meses (N = 39)		6 meses (N = 33)		12 meses (N = 31)	
PPAR-γ1	ρ	-0,186	-0,186	-0,454	-0,454	-0,460	-0,462
Grasa visceral	P	0,258	0,258	0,008	0,008	0,009	0,009
PPAR-γ1	ρ	-0,26	-0,26	-0,336	-0,336	-0,404	-0,398
Grasa subcutánea	P	0,109	0,109	0,056	0,056	0,024	0,026

El análisis se hizo en los pacientes seguidos a los 3, 6 y 12 meses. Para cada correlación, en la fila superior se muestra el valor de la ρ de Spearman y en la inferior el valor de la P asociada a dicho contraste.

Para analizar más detalladamente esta relación entre los niveles del PPAR- γ 1 y la reducción de peso post-quirúrgica, se dividió a los pacientes en dos subgrupos de acuerdo a la media de reducción de peso (33,65%) e IMC (33,64%). Así, los pacientes que habían perdido más de un 33% del peso inicial al año de la cirugía tenían niveles de expresión del PPAR- γ 1 significativamente más bajos que aquellos pacientes que habían perdido menos del 33% de peso. Este resultado fue estadísticamente significativo en grasa visceral ($P = 0,021$) y en grasa subcutánea ($P = 0,048$; Figura 31). De igual forma, los pacientes que habían perdido más de un 33% en el valor de IMC al año de la cirugía tenían niveles de expresión del PPAR- γ 1 significativamente más bajos que aquellos pacientes que habían perdido menos del 33% de peso, tanto en grasa visceral ($P = 0,022$) como subcutánea ($P = 0,048$; Figura 32).

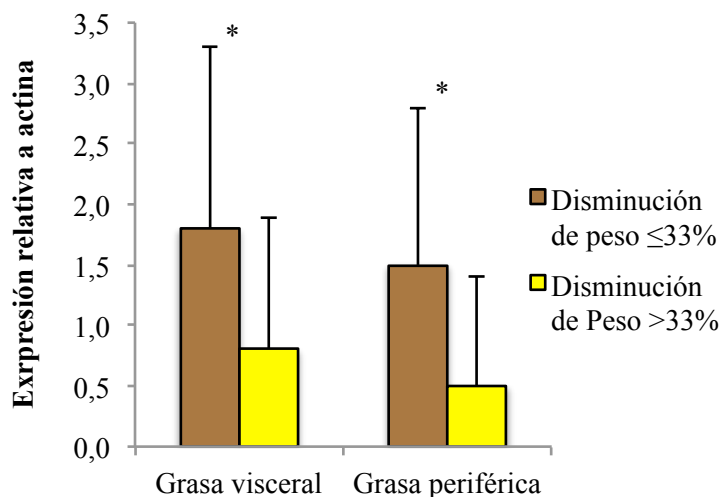


Figura 31. Diferencia en la expresión relativa del PPAR- γ 1 de acuerdo al porcentaje de reducción de pérdida de peso.

La expresión relativa de micro-ARN para cada grupo se expresa con la media del valor y la desviación estándar. En color marrón se encuentra el grupo de pacientes con disminución del peso al año de la cirugía menor o igual al 33% (n = 16). En color amarillo se representa el grupo de pacientes con disminución de peso al año >33% (n = 15). * $P < 0,05$.

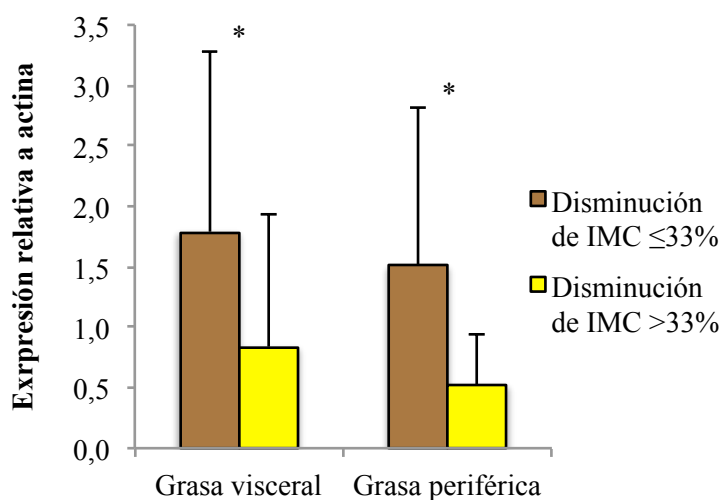


Figura 32. Diferencia entre la expresión relativa del PPAR- γ 1 de acuerdo al porcentaje de reducción de IMC.

La expresión relativa de micro-ARN para cada grupo se expresa con la media del valor y la desviación estándar. En color marrón se encuentra el grupo de pacientes con disminución del IMC al año de la cirugía menor o igual al 33% (n = 16). En color amarillo se representa el grupo de pacientes con disminución de IMC al año >33% (n = 15). IMC: Índice de masa corporal. * $P < 0,05$.

8. Relación entre los niveles de expresión de miR-27a y miR-27b y la pérdida de peso postquirúrgica

No se observó ninguna relación entre la expresión de miR-27a y miR-27b y la reducción de peso o del IMC en el primer año del postoperatorio (Tabla 21).

Tabla 21. Correlación entre miR-27a y miR-27b y la pérdida de peso al año.

		Pérdida de peso al año (%)	Reducción del IMC al año (%)
miR-27a	ρ	-0,218	-0,217
Grasa visceral	P	0,238	0,242
miR-27b	ρ	0,11	0,109
Grasa visceral	P	0,557	0,56
miR-27a	ρ	0,286	0,287
Grasa subcutánea	P	0,119	0,118
miR-27b	ρ	0,152	0,149
Grasa subcutánea	P	0,415	0,424

El análisis se hizo en 26 pacientes de sexo femenino seguidas durante 1 año. Para cada correlación, en la fila superior se muestra el valor de la ρ de Spearman y en la inferior el valor de la P asociada a dicho contraste.

V. DISCUSIÓN

En nuestro trabajo hemos analizado la expresión en tejido adiposo del factor de transcripción PPAR- γ y de dos micro-ARN potencialmente implicados en su regulación. En concreto, hemos realizado un análisis mediante RT-qPCR de la expresión de las isoformas 1 y 2 del PPAR- γ y de los micro-ARN miR-27a y miR-27b, en muestras de tejido adiposo visceral y subcutáneo de pacientes obesos y controles no obesos; además, hemos correlacionado los niveles de expresión encontrados con variables clínicas y analíticas.

Como resultados principales de nuestro estudio, no hemos observado diferencias en la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en el tejido adiposo visceral o subcutáneo de pacientes obesos comparados con controles; sin embargo, al estratificar por sexo, sí hemos encontrado una disminución significativa en los niveles de ARNm del PPAR- γ 1 en el tejido adiposo visceral de mujeres con obesidad ($P = 0,045$). Asimismo, hemos observado una correlación negativa entre los niveles de ARNm del PPAR- γ 1 en tejido adiposo visceral con el peso ($\rho = -0,305$; $P = 0,016$) y el IMC ($\rho = -0,325$; $P = 0,001$); esta correlación inversa entre la expresión del PPAR- γ 1 y el peso fue más fuerte en mujeres, grupo en el que también se observó una correlación inversa del PPAR- γ 2 con el peso ($\rho = -0,419$; $P = 0,004$) y el IMC ($\rho = -0,495$; $P = 0,001$). Esta relación inversa entre el PPAR- γ 1 y el peso no se apreció en el tejido adiposo subcutáneo.

En el análisis de expresión del miR-27a y el miR-27b en el tejido adiposo subcutáneo y visceral, no se encontraron cambios en la expresión de estos micro-ARN entre el grupo de casos y controles. La expresión de ambos micro-ARN estaba correlacionada positivamente pero no se observó una asociación *in vivo* entre sus niveles de expresión y los del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2.

Por primera vez en la literatura, nuestro estudio ha mostrado una correlación negativa entre los niveles del PPAR- γ 1 previos a la cirugía bariátrica con la pérdida de peso y la reducción del IMC en los primeros 12 meses tras la cirugía, tanto en tejido adiposo visceral, como subcutáneo. Esta relación entre una mayor pérdida de peso y una menor expresión del PPAR- γ 1 también fue significativa al dividir en dos grupos a los pacientes de acuerdo al valor medio de reducción de peso e IMC al año de la cirugía, lo que refuerza la consistencia del hallazgo encontrado.

Para valorar de forma adecuada los resultados encontrados es preciso en primer lugar considerar algunos aspectos relevantes del diseño y metodología del estudio, lo que realizaremos antes de discutir cada uno de los resultados encontrados.

1. Consideraciones metodológicas de los estudios de expresión de ARN en tejido adiposo de pacientes obesos

El análisis de la expresión de ARN de diferentes moléculas en tejido adiposo de sujetos obesos y su comparación con la expresión en controles es un tipo de diseño ampliamente utilizado para estudiar el papel de distintos mediadores en la fisiopatología de la obesidad. Una vez seleccionado el grupo de casos y el de controles, se procede a la obtención de material mediante biopsia y posteriormente se extrae el ARN para su análisis, habitualmente mediante RT-qPCR.

Este modelo experimental, pese a su aparente sencillez, entraña diversas dificultades metodológicas, dentro de las que destacan la variabilidad inherente de la expresión de ARN en diversas condiciones fisiológicas y patológicas, diferencias en los protocolos de obtención de la muestra o de extracción de ARN, variabilidad en las técnicas de transcripción reversa y empleo de distintos genes de referencia. Todo ello puede determinar diferencias metodológicas, incluso sesgos, en los cálculos de los

niveles de expresión de ARN. A continuación, se detallan algunos de los aspectos más relevantes que pueden influir en los resultados encontrados con este diseño experimental o que están asociados con potenciales sesgos en el análisis de los datos.

1.1. Selección de casos y controles

En el tipo de estudio que nos ocupa, la selección adecuada de casos y controles se realiza de forma habitual de acuerdo a los criterios de sobrepeso y obesidad definidos por la OMS⁴, que permiten una clasificación sencilla y sin necesidad de pruebas complementarias. Aunque existen otras medidas antropométricas asociadas con la obesidad, no cabe duda que el IMC es el parámetro más sencillo y universal y por tanto, el utilizado por la mayoría de estudios para identificar y clasificar la presencia de esta enfermedad^{206-211,213,214,216-219}.

Sin embargo, dentro de la misma definición de obesidad ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$), pueden existir diferencias en la expresión genética en el tejido adiposo debido a distintas variables, como la edad, la presencia de comorbilidades, la raza o el sexo^{281,282}. Asimismo, también es evidente que la situación metabólica no es la misma en un paciente con obesidad mórbida y síndrome metabólico asociado que en aquellos conocidos como “obesos metabólicamente sanos”^{23,283}. Por tanto, diferencias en cualquiera de estas variables pueden provocar variaciones en los resultados de los estudios, particularmente porque no suele resultar factible incluir un tamaño muestral muy elevado. También puede implicar un sesgo, lógicamente, la selección de los controles. Particularmente porque en muchos casos, (p. ej., si se toman biopsias quirúrgicas del tejido adiposo visceral) no es posible incluir controles sanos sin enfermedad sino que es preciso incluir sujetos controles no obesos que van a ser sometidos a cirugía por otro motivo.

En nuestro trabajo, se estratificó a los sujetos del estudio en dos grupos, obesos y no obesos, de acuerdo a su IMC, siguiendo la clasificación mencionada. Como pacientes obesos, se incluyeron aquellos con $IMC > 35 \text{ kg/m}^2$ que fueron sometidos a cirugía bariátrica, lo que representa un grupo de pacientes relativamente homogéneo en cuanto a su peso pero que pueden tener diferencias en otros parámetros como la presencia o no de diabetes mellitus o dislipemia, así como el tratamiento de las mismas. Como controles, se incluyeron pacientes sometidos a cirugía laparoscópica, sin enfermedades agudas intercurrentes y con $IMC < 30 \text{ kg/m}^2$. Aunque lo ideal hubiera sido incluir pacientes con $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$, es bien conocido que el exceso de peso es un factor de riesgo de litiasis biliar²⁸⁴, por lo que la selección de pacientes únicamente con $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ hubiera limitado mucho el tamaño muestral de los controles. Un diseño similar ha sido utilizado en otros trabajos^{208,214} y dada la enorme diferencia entre el IMC medio de casos y controles en nuestro estudio, no creemos que este aspecto suponga un sesgo importante en nuestros resultados. Las diferencias en la selección de nuestra muestra con respecto a otros estudios, sin embargo, sí deben ser tenidas en cuenta al comparar los resultados obtenidos.

1.2. Obtención y procesamiento de las muestras

La obtención de la muestra y la purificación de su ARN, marcan el paso inicial de cada ensayo de RT-qPCR. La adecuada realización de este proceso es posiblemente uno de los factores más determinantes de la reproducibilidad y la consistencia de los resultados posteriores de la RT-qPCR. Por ello, es esencial cuantificar con precisión y evaluar la calidad del ARN antes de realizar la transcripción reversa²⁸⁵. En nuestro estudio se aplicó un estricto protocolo de obtención y procesamiento de las muestras de grasa visceral y periférica hasta obtener

el ARN, tal y como se ha detallado en el apartado de metodología de este trabajo, poniendo un especial hincapié en las medidas para evitar la contaminación y/o degradación del ARN. La cuantía y pureza del ARN obtenido, se determinó mediante un espectrofotómetro, calculando la absorbancia a 260 nm y el ratio de absorbancias a 260/280 nm, respectivamente²⁸⁶.

Resulta de interés comentar en este apartado que se han descrito diferencias entre las biopsias obtenidas por punción aspiración con aguja fina y las biopsias obtenidas por técnica quirúrgica, pudiendo las primeras no ser representativas del total del tejido adiposo²⁸⁷; este aspecto puede por tanto explicar también diferencias entre distintos estudios.

1.3. Optimización de la PCR

Para realizar el análisis de expresión de ARN, la RT-qPCR es la técnica más usada para examinar los cambios de expresión de uno o más genes de interés, debido a su especificidad, sensibilidad, sencillez, bajo coste y alto rendimiento. Por todo ello, ofrece una amplia gama de ventajas sobre otros métodos como el Northern blot o la PCR semi-cuantitativa y se ha convertido en la herramienta más usada para la cuantificación absoluta y relativa de los niveles de ARNm²⁸⁸. En cualquiera de los casos, la optimización de la PCR es un paso clave para mejorar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de la misma²⁸⁹. En este sentido, el protocolo de PCR realizado en nuestro estudio, se llevó a cabo con un control de calidad metodológico siguiendo las recomendaciones de las guías MIQE (del inglés *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*)²⁹⁰. Entre otras medidas, se incluyó un control negativo en cada fila de la placa que contenía todos los componentes de la reacción excepto el ADNc retrotranscrito y todas las muestras

fueron realizadas por duplicado, repitiéndose aquellas cuya desviación estándar entre duplicados fue mayor a 1. Se realizó una curva de fusión para cada uno de los genes utilizados, las cuales verificaron la ausencia de dímeros de primers. Adicionalmente, se realizó un test de Grubbs previo al análisis de los resultados, que comprobó la ausencia de valores extremos o *outliers*.

1.4. Selección del gen de referencia

La normalización con genes de referencia permite disminuir, al menos en parte, los errores derivados de las variaciones entre muestras, de la extracción y calidad del ARN, y de la síntesis de ADNc. Una buena normalización es especialmente importante cuando el objetivo es comparar perfiles de expresión de genes utilizando biopsias *in vivo* de diferentes individuos, dada la variabilidad biológica entre individuos. Por tal motivo, la selección de un gen de referencia adecuado para cada tejido y condición experimental, resulta crucial para garantizar la corrección de los resultados de un experimento²⁹¹. En este sentido, estudios realizados sobre la normalización de la RT-PCR han mostrado que el uso de genes de referencia inadecuados puede llevar a encontrar resultados falsamente positivos o negativos^{292,293}.

Con el objetivo de seleccionar el gen de referencia óptimo, en nuestro estudio hemos utilizado los algoritmos GeNorm, NormFinder y BestKeeper para realizar el análisis de estabilidad de los genes de referencia candidatos, en las muestras de tejido adiposo visceral y periférico, tanto para ARNm como para micro-ARN, tal y como se recomienda en la literatura²⁷⁴⁻²⁷⁶. El análisis realizado en nuestras propias muestras mostró unos valores de estabilidad de los genes de referencia seleccionados que

fueron consistentes con los descritos previamente para muestras de tejido adiposo humano, tanto para ARNm como para micro-ARN^{277,279,280}.

Este aspecto, sin duda, es de gran relevancia a la hora de comparar estudios similares que estudien el perfil de expresión de ARN en tejido adiposo. En nuestro conocimiento, nuestro trabajo es el primer estudio que analiza la expresión de ARNm del PPAR- γ y de los micro-ARN miR-27 empleando genes de referencia validados en las mismas muestras de tejido adiposo visceral y subcutáneo utilizadas.

2. Diferencias en la expresión del PPAR- γ en tejido adiposo de sujetos obesos frente a controles y relación con el IMC

En nuestro estudio no hemos observado diferencias significativas en la expresión del PPAR- γ entre pacientes obesos respecto a controles no obesos. La tendencia observada en los datos fue, sin embargo, hacia una disminución de la expresión del PPAR- γ y cuando se realizó un análisis estratificado por sexos, sí encontramos una disminución significativa en la expresión del PPAR- γ 1 en mujeres obesas en grasa visceral. Este resultado es consistente con la correlación negativa encontrada entre los niveles del PPAR- γ 1 en grasa visceral con el peso ($\rho = -0,305$; $P = 0,016$) y el IMC ($\rho = -0,325$; $P = 0,001$), tanto para el total de sujetos como estratificado por sexos, de forma que niveles reducidos del PPAR- γ 1 se asociaron con un mayor peso e IMC.

Resulta difícil, sin embargo, plantear una explicación fisiopatológica de nuestros hallazgos dado que existen datos experimentales contradictorios en los estudios previamente publicados, tanto en modelos animales de experimentación como en estudios en humanos.

2.1. Resultados previos respecto a la expresión del PPAR- γ en tejido adiposo de sujetos con obesidad

Los estudios previos realizados para analizar la expresión del PPAR- γ en tejido adiposo de pacientes obesos han encontrado resultados sumamente dispares. Así, los trabajos de Auboeuf *et al.*²¹⁶, Krempler *et al.*²¹⁷, y Hammes *et al.*²¹⁸ no mostraron diferencias en la expresión de este receptor, mientras que los estudios de Lefebvre *et al.*²⁰⁷, Bortolotto *et al.*²⁰⁹, Vidal-Puig *et al.*²⁰⁸, Redonnet *et al.*²¹², Ruschke *et al.*²¹⁰ y Lee *et al.*²¹¹, encontraron un incremento en la expresión del PPAR- γ en obesos. Resultados más parecidos al nuestro se han comunicado en los trabajos publicados por Leyvraz *et al.*²¹⁴, Poulain-Godefroy *et al.*²¹³, Sewter *et al.*²⁹⁴ y Rodríguez-Acebes *et al.*²¹⁵, que mostraron una disminución en los niveles de expresión del PPAR- γ en tejido adiposo de obesos.

Los resultados resumidos de los estudios citados se muestran en la Tabla 22 junto con algunas de las características de los mismos. En relación con los datos de nuestro estudio, el trabajo de Leyvraz *et al.*²¹⁴ encontró también una disminución significativa en la expresión del PPAR- γ 1, pero no PPAR- γ 2, en mujeres obesas tanto en grasa visceral como en grasa subcutánea, lo que coincide parcialmente con los datos de nuestro estudio. Este mismo trabajo, además, demostró que los pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica presentaron un incremento progresivo de los niveles PPAR- γ 1 al año de la cirugía, lo que apoya que la obesidad induce un descenso de la expresión de este receptor. Sin embargo, Poulain-Godefroy *et al.*²¹³ mostraron una disminución del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 sólo en la grasa subcutánea, pero no en la grasa visceral de mujeres obesas respecto a no obesas. Por otro lado, el trabajo de Rodríguez-Acebes *et al.*²¹⁵, que solo analizó muestras de tejido adiposo

subcutáneo, encontró una disminución del PPAR- γ 1, pero no del PPAR- γ 2, en mujeres y en hombres obesos respecto a no obesos.

Tabla 22. Resultados previos respecto a la expresión del PPAR- γ en tejido adiposo de sujetos con obesidad

Autor/año	Técnica	Gen de referencia	Gen diana	Obesos (N)	Controles (N)	Hallazgos
Lefebvre <i>et al.</i> 1997 ²⁰⁷	RT-PCR competitiva	-	PPAR- γ 1 PPAR- γ 2	6	6	Incremento del PPAR- γ en obesos en grasa visceral y subcutánea
Auboef <i>et al.</i> 1997 ²¹⁶	RT-PCR competitiva	-	PPAR- γ 1 PPAR- γ 2	10	10	No hay diferencias en la expresión del PPAR- γ 1 y 2 en grasa visceral
Vidal-Puig <i>et al.</i> 1997 ²⁰⁸	Solución de hibridación con protección de nucleasa.	18S	PPAR- γ 1 PPAR- γ 2	24	14	Incremento del PPAR- γ 2 en grasa subcutánea de obesos, principalmente en mujeres Disminución no significativa del PPAR- γ 1 en obesos
Krempler <i>et al.</i> 2000 ²¹⁷	Northern Blot	GAPDH y actina	PPAR- γ común	- 50 grasa subcutánea - 76 grasa visceral.	-19 grasa subcutánea -20 grasa visceral.	No hay diferencias en la expresión
Redonnet <i>et al.</i> 2002 ²¹²	RT-qPCR SYBR Green	Actina	PPAR- γ común	15 (mujeres)	10 (mujeres)	Incremento del PPAR- γ en obesos en grasa subcutánea
Sewter <i>et al.</i> 2002 ²⁹⁴	RT-qPCR TaqMan	GAPDH	PPAR- γ 1 PPAR- γ 2	11	11	Disminución del PPAR- γ 1 e incremento del PPAR- γ 2 en grasa subcutánea de obesos
Bortolotto <i>et al.</i> 2007 ²⁰⁹	RT-qPCR SYBR Green	Actina	PPAR- γ común	10	10	Incremento del PPAR- γ en obesos en grasa subcutánea, pero no en grasa visceral
Poulain-Godefroy <i>et al.</i> 2008 ²¹³	RT-qPCR TaqMan	GAPDH	PPAR- γ 1 PPAR- γ 2	18 (mujeres)	6 (mujeres)	Disminución del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en obesos en grasa subcutánea, pero no en grasa visceral
Rodríguez-Acebes <i>et al.</i> 2010 ²¹⁵	RT-qPCR SYBR Green	36b4	PPAR- γ 1 PPAR- γ 2	40	18	Disminución del PPAR- γ 1 en grasa subcutánea No hay diferencias para PPAR- γ 2
Ruschke <i>et al.</i> 2010 ²¹⁰	RT-qPCR TaqMan	18S	PPAR- γ 2	- 37 con obesidad visceral - 58 con obesidad subcutánea	58	Incremento del PPAR- γ 2 en grasa visceral y subcutánea de obesos
Lee <i>et al.</i> 2010 ²¹¹	RT-qPCR SYBR Green	GAPDH	PPAR- γ común	12 (mujeres)	5 (mujeres)	Incremento del PPAR- γ en grasa subcutánea de obesos
Hammes <i>et al.</i> 2012 ²¹⁸	RT-qPCR SYBR Green	B2M	PPAR- γ común	13	10	No hay diferencias en la expresión del PPAR- γ en grasa visceral y subcutánea
Leyvraz <i>et al.</i> 2012 ²¹⁴	RT-qPCR SYBR Green	B2M	PPAR- γ 1 PPAR- γ 2	30 (mujeres)	5 (mujeres)	Disminución del PPAR- γ 1 en grasa visceral y subcutánea de obesos No hay diferencias en la expresión del PPAR- γ 2

No cabe duda que resulta muy difícil intentar conciliar los resultados de estos trabajos. En primer lugar, es obligado mencionar que se han utilizado diferentes

metodologías para determinar la expresión del PPAR- γ y que el tamaño muestral de la mayoría de los estudios es muy pequeño, especialmente en lo referente al número de controles, lo que incrementa la posibilidad de un error aleatorio. En concreto, solo los estudios de Vidal-Puig *et al.*²⁰⁸, Krempler *et al.*²¹⁷, Sewter *et al.*²⁹⁴, Rodríguez-Acebes *et al.*²¹⁵ y de Ruschke *et al.*²¹⁰, tienen más de 10 controles, y varios estudios tienen menos de 20 individuos en cada grupo. Asimismo, la selección de casos y controles es diferente entre los estudios, con diferencias que pueden resultar relevantes en algunas variables. Por ejemplo, el rango de edad oscila desde los 33 hasta los 64 años para los casos, y desde los 23 hasta los 55 años para los controles en los diferentes trabajos. Este detalle resulta de relevancia porque estudios en ratones han encontrado una disminución de la expresión de ARNm del PPAR- γ asociada al envejecimiento^{295,296}. Otra de las diferencias observadas entre los diferentes estudios, fue la variación en las cifras del IMC tanto en casos como en controles. Para los casos la variación osciló en un rango comprendido entre 33 y 50 Kg/m², y en los controles desde 22 a 29 Kg/m².

En la revisión realizada, también se observaron diferencias entre la técnica de obtención de tejido entre los casos y controles, no solo entre diferentes trabajos sino incluso dentro del mismo estudio: el trabajo de Vidal-Puig *et al.*²⁰⁸ recogió la muestra de los pacientes mediante biopsia quirúrgica y de los controles por punción por aguja fina. Además, los estudios han empleado diferentes genes de referencia, utilizando dos de ellos la proteína ribosomal 18S, que se ha demostrado como uno de los genes de referencia menos estables en el tejido adiposo de pacientes obesos^{277,279,280}.

Por otro lado, las restricciones dietéticas así como una pérdida o ganancia de peso reciente pueden alterar la expresión del PPAR- γ , tanto en modelos humanos como animales^{205,212,297}, por lo que hemos revisado este aspecto en los estudios incluidos en la Tabla 22. Concretamente, en el estudio de Redonnet *et al.*²¹² los

pacientes obesos fueron clasificados en dos grupos según la ganancia o pérdida de peso los 6 meses previos a la cirugía, encontrándose que los pacientes que habían perdido peso tuvieron un incremento menor del PPAR- γ que los obesos con incremento de peso previo a la cirugía. Similares hallazgos fueron descritos por Viguerie *et al.*²⁰⁶, quienes encontraron una disminución en la expresión del PPAR- γ 2 en mujeres obesas tras 10 semanas de restricción dietética. Entre los estudios descritos que analizan la expresión en tejido adiposo entre pacientes y controles, solo los trabajos de Vidal-Puig *et al.*²⁰⁸, Lefebvre *et al.*²⁰⁷ y Hammes *et al.*²¹⁸, especifican que fueron realizados con obesos cuyo peso se mantuvo estable al menos los 3 meses previos a la cirugía bariátrica. Sin embargo, es importante mencionar que en el protocolo habitual para esta cirugía, como ocurre en nuestro centro, los pacientes suelen recibir una dieta hipocalórica inmediatamente antes de la intervención quirúrgica, lo cual puede favorecer cambios en la expresión de los niveles del PPAR- γ respecto a obesos que no hayan variado sus hábitos dietéticos antes del estudio.

Otro de los factores que puede influir en los resultados son las diferencias funcionales entre isoformas. Por ejemplo, algunos estudios muestran resultados significativos para una de las isoformas pero no para la otra y los trabajos que analizan el PPAR- γ 1 utilizando RT-qPCR en tejido adiposo subcutáneo^{213-215,294} han demostrado una disminución en su expresión en los pacientes obesos respecto a los controles. Esta variación en los resultados entre las dos isoformas puede explicarse por las diferencias en los patrones de expresión o en su papel fisiológico en la adipogénesis^{166,167}. Igualmente, el tejido adiposo visceral puede tener más relación que el subcutáneo con el perfil metabólico, motivando así diferencias en la expresión genética²⁹⁸.

Finalmente, un factor que puede guardar relación con las diferencias de expresión del PPAR- γ es el grado de resistencia a la insulina o la presencia de diabetes, dado que algunos estudios han seleccionado obesos “metabólicamente sanos”²⁰⁸, mientras que otros trabajos han incluido pacientes con obesidad mórbida y presencia de diabetes o resistencia a la insulina^{213,215,217}. Sin embargo, no existen datos consistentes que relacionen la expresión del PPAR- γ con estas variables. Así, en el estudio de Krempler *et al.*²¹⁷, el nivel del PPAR- γ en grasa visceral en pacientes obesos no diabéticos se correlacionaba negativamente con indicadores de resistencia a la insulina, por lo que los pacientes con mayor expresión del PPAR- γ presentaban menor resistencia a la insulina. En cambio, el estudio de Ruschke *et al.*²¹⁰ encontró una correlación positiva entre el PPAR- γ y el grado de resistencia a la insulina o los niveles de HbA1c. Por otro lado, Dubois *et al.*²⁹⁹ mostraron una disminución del PPAR- γ 2 en pacientes diabéticos con obesidad, respecto a obesos no diabéticos, mientras que Yang *et al.*³⁰⁰ encontraron el resultado contrario con la variante común, es decir, un incremento del PPAR- γ en pacientes diabéticos obesos, respecto a obesos no diabéticos.

En resumen, existen grandes diferencias, incluso resultados claramente contradictorios, entre los estudios que han analizado previamente la expresión del PPAR- γ en tejido adiposo. Estas diferencias podrían ser explicadas en parte por diferencias metodológicas entre estudios, particularmente por los criterios para la selección de casos y controles y no puede descartarse tampoco un efecto específico las diferentes isoformas del PPAR- γ . En cualquier caso, en la revisión que hemos realizado no hemos encontrado ningún factor que nos permita interpretar de forma consistente estos resultados, fundamentalmente por el bajo número de estudios y la heterogeneidad de los mismos.

2.2. Papel fisiopatológico del PPAR- γ en la obesidad

La presencia de datos contradictorios en los estudios en humanos que valoran la expresión del PPAR- γ en tejido adiposo coincide con los resultados dispares que arrojan otros trabajos experimentales sobre el PPAR- γ . Por un lado, es cierto que numerosos estudios apuntan a que la estimulación del receptor PPAR- γ tiene efectos positivos sobre la resistencia a la insulina y el metabolismo en general, sosteniendo así la hipótesis de que este receptor desarrolla un papel protector en la lipotoxicidad. Esta forma de daño celular inducida por la exposición crónica a niveles elevados de lípidos puede lesionar diferentes órganos y tejidos (p. ej., tejido adiposo o muscular, hígado y páncreas), dado que favorece la producción de metabolitos tóxicos como las ceramidas, el diacil-glicerol y especies reactivas de oxígeno^{202,301,302}. El efecto protector del PPAR- γ sobre la lipotoxicidad estaría mediado por tres mecanismos principales que son el incremento del número de adipocitos, la mejora de la capacidad de metabolizar los lípidos en los tejidos periféricos y la proliferación de las células β del páncreas^{165,202,302}.

Estos datos coinciden con el hecho de que la administración de agonistas PPAR- γ , como las tiazolidinedionas, inducen una mejora de la resistencia a la insulina³⁰³⁻³⁰⁵, o que el uso de doxorubicina, un inhibidor del PPAR- γ , se asocia con un aumento de la resistencia a la insulina³⁰⁶. En consonancia con ello, y como ya se ha mencionado en el epígrafe anterior, algunos trabajos han encontrado una correlación inversa entre la expresión del PPAR- γ y la resistencia a la insulina²¹⁷ o con la presencia de marcadores de riesgo vascular²⁰⁵, con una mejoría de la sensibilidad a la insulina y un menor riesgo vascular en los pacientes con mayor expresión del PPAR- γ . Asimismo, está bien establecido que los pacientes obesos presentan un incremento de los niveles de la leptina y una resistencia a la misma, que

se correlaciona con la resistencia a la insulina³⁰⁷. Y se ha descrito también un mecanismo de regulación negativa entre PPAR- γ y leptina³⁰⁸, en el cual PPAR- γ inhibe la expresión de leptina y, de igual forma, el incremento de la leptina inhibe la expresión del PPAR- γ ³⁰⁹, todo lo cual apoya la relación inversa entre PPAR- γ y resistencia a la insulina.

Pero además de estos datos que apuntan hacia un efecto protector del PPAR- γ sobre la resistencia a la insulina y la lipotoxicidad, no podemos olvidar que las glitazonas presentan efectos pleiotrópicos y son capaces de provocar también aumento de peso así como acúmulo de lípidos en el hígado a largo plazo^{167,199,310}. Así mismo, el estudio de Ruschke *et al.*²¹⁰ evidenció una correlación positiva entre el PPAR- γ y la resistencia a la insulina, lo que no coincide con los datos anteriores.

Lamentablemente, estos resultados contradictorios en relación con el efecto del PPAR- γ también aparecen en modelos de ratones *knockout* que, en teoría, deberían permitir establecer con claridad su papel en la fisiopatología de la obesidad. Así, mientras que el estudio de Jones *et al.*²⁰¹ describió que la ablación del PPAR- γ en tejido adiposo protege del desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina tras una dieta rica en grasas, otro modelo *knockout* selectivo para PPAR- γ en tejido adiposo desarrollado con otra técnica ha mostrado, sorprendentemente, un incremento en la resistencia a la insulina en tejido adiposo y hepático, aunque no en tejido muscular¹⁷⁸. Estas diferencias se han atribuido al momento del desarrollo en que se produjo la recombinación genética que dio origen al *knockout* o a la eficiencia de la misma, pero son difíciles de interpretar en cualquier caso.

Finalmente, los ratones heterocigotos para PPAR- γ (el *knockout* homocigoto no resulta viable) muestran una mejora de la sensibilidad a la insulina, el mismo efecto que se obtiene, de forma paradójica, tras la administración de agonistas del PPAR- γ

como las glitazonas; y todo ello pese a que los agonistas del PPAR- γ inducen ganancia de peso y de tejido adiposo, mientras que los ratones heterocigotos para este receptor presentan una disminución del tejido graso¹⁶⁹. Para explicar que la activación farmacológica del PPAR- γ y la ablación génica de este receptor determinen ambos una mejora de la sensibilidad a la insulina, se ha descrito que los ratones heterocigotos para PPAR- γ presentan un aumento de la sensibilidad a la insulina respecto a los controles asociada a la edad, pero no tras una dieta rica en grasas, mientras que el uso de agonistas del PPAR- γ sí prevendría el desarrollo de resistencia a la insulina mediada por la dieta rica en grasas¹⁹⁸. Una probable explicación de este hecho es que la activación provocada por los agonistas del PPAR- γ estimula la adipogénesis, desencadenando un flujo de ácidos grasos libres hacia el tejido adiposo desde el hígado y el músculo, lo que mejora la sensibilidad a la insulina en estos órganos¹⁹⁷. Por otra parte, la reducción de la actividad del PPAR- γ en ratones heterocigotos provoca una disminución de los triglicéridos en el tejido adiposo, el hígado y el músculo, debido entre otros factores a un aumento en la expresión de la leptina; ello determinaría una reducción de la expresión de enzimas lipogénicas y una activación de la vía del PPAR- α que favorece la β -oxidación de ácidos grasos¹⁹⁷. En buena medida, no podemos olvidar que la expresión del PPAR- γ también es relevante en otros órganos como el hígado y el músculo y variables como la presencia o no de esteatosis hepática³¹¹ o el metabolismo muscular (que depende a su vez de factores como la adaptación al ejercicio) pueden influir en el metabolismo lipídico³¹². De hecho, los modelos en ratones que han suprimido el PPAR- γ en tejido adiposo han encontrado un aumento de su expresión en hígado²⁰¹ y la ablación selectiva del PPAR- γ en hígado determina una mejora de la sensibilidad a la insulina de forma sistémica¹⁹⁹. A la luz de los datos publicados, por tanto, resulta muy difícil aclarar

completamente el papel del PPAR- γ en el metabolismo, particularmente en el tejido adiposo.

En resumen, nuestros resultados apoyan los trabajos que muestran que en pacientes con obesidad mórbida que van a ser sometidos a cirugía bariátrica, los pacientes con mayor IMC presentan una menor expresión del PPAR- γ 1 en tejido adiposo, particularmente en el sexo femenino y en tejido adiposo visceral. Estos datos encajarían también con los estudios que muestran que a menor expresión del PPAR- γ hay mayor resistencia a la insulina y mayor presencia de otros factores asociados con el síndrome metabólico y con el riesgo vascular. Sin embargo, resulta también evidente que estamos lejos de conocer el papel exacto que desempeña este receptor en el metabolismo lipídico, así como su rol en la lipotoxicidad que acompaña a la obesidad y que tampoco se pueden establecer relaciones de causalidad. Considerando todo ello, para integrar nuestros datos con el conjunto de la literatura podemos plantear de manera tentativa la hipótesis de que la expresión del PPAR- γ podría estar en relación con la situación metabólica y el grado de obesidad. Así, pacientes obesos “metabólicamente sanos” o con grados de la enfermedad, presentarían un incremento del PPAR- γ en tejido adiposo, como un mecanismo fisiológico para reducir la lipotoxicidad y mejorar la sensibilidad a la insulina; por el contrario, aquellos con mayor grado de obesidad y peor situación metabólica, presentarían un nivel reducido del PPAR- γ en el tejido adiposo, asociado con una mayor resistencia a la insulina. En cualquier caso, sí parece evidente que las variaciones en los niveles del PPAR- γ en tejido adiposo se asocian con múltiples variables, no sólo en dicho tejido sino en otros órganos (hígado y músculo), difícilmente analizables dado el tamaño muestral y el diseño de los estudios realizados, todo lo cual dificulta la explicación fisiopatológica de nuestros hallazgos.

3. Relación entre los niveles del PPAR- γ 1 en tejido adiposo y la pérdida de peso postquirúrgica.

Nuestro estudio es el primero que evidencia una relación entre los niveles del PPAR- γ 1 previos a la cirugía y la disminución de peso y del IMC posterior a la cirugía bariátrica, encontrando que los pacientes con niveles reducidos del PPAR- γ 1 tienen mejores resultados postquirúrgicos con una mayor pérdida de peso y disminución del IMC, que aquellos pacientes con niveles basales del PPAR- γ 1 elevados.

Previamente, en el estudio de Leyvraz *et al.*²¹⁴, se determinó el efecto de la pérdida de peso asociada a la cirugía bariátrica sobre la expresión del PPAR- γ 1, encontrando un incremento significativo del PPAR- γ 1 y una disminución no significativa del PPAR- γ 2 al año de la cirugía bariátrica. Similares hallazgos fueron encontrados por Verreth *et al.*²⁰⁵ quienes mostraron que ratones sometidos a una restricción dietética y pérdida de peso incrementaron los niveles del PPAR- γ en tejido adiposo, que se asoció a un incremento en los transportadores de glucosa, mayor sensibilidad a la insulina, reducción de la inflamación y del estrés oxidativo, mejoría de las funciones cardiovasculares y menores niveles de triglicéridos. Sin embargo, estos resultados están en contraposición con los estudios de Bastard *et al.*²⁹⁷, Garaulet *et al.*³¹³ y Vidal-Puig *et al.*²⁰³, que encontraron una disminución del PPAR- γ tras un programa de restricción dietética hipocalórica.

En cualquier caso, para explicar la relación entre los niveles del PPAR- γ y la pérdida de peso, puede ser útil considerar el efecto hormonal y metabólico de la cirugía bariátrica, en concreto de la gastrectomía tubular. Así, un estudio en ratones comparó los cambios metabólicos inducidos por la banda gástrica y la gastrectomía tubular, encontrando un incremento en los niveles de adiponectina y GLP-1, una

menor resistencia a la insulina y un mejor perfil lipídico, en los ratones sometidos a la gastrectomía tubular respecto a los intervenidos de banda gástrica o los controles. Además, y al igual que en el estudio de Leyvraz *et al.*²¹⁴, los ratones sometidos a la gastrectomía tubular presentaron un incremento en los niveles de expresión del PPAR- γ tanto a nivel de ARNm como de proteína³¹⁴. Adicionalmente, otros estudios en ratones han demostrado diferencias significativas en la mejoría de parámetros metabólicos tras una gastrectomía tubular, respecto a otras técnicas de cirugía bariátrica, con un mayor incremento en la secreción de insulina y GLP-1³¹⁵. Resultados similares a los comunicados en modelos animales se han observado también en pacientes obesos sometidos a gastrectomía tubular laparoscópica, quienes después de la intervención muestran una mejoría en el metabolismo de la glucosa y cambios significativos en la grelina, el polipéptido pancreático, el péptido YY, el GLP-1, la amilina y la leptina³¹⁶. Por tanto, la gastrectomía tubular, no solo induce pérdida de peso en relación con la restricción gástrica, sino que también provoca cambios neurohormonales relacionados con la resección y la alteración del vaciamiento gástrico, que favorecen una mayor reducción de peso y una mejoría en el perfil metabólico.

Dentro de las hormonas candidatas que condicionan los beneficios cardiovasculares y del perfil metabólico asociados a la reducción de peso posterior a la gastrectomía tubular, debemos considerar en primer lugar a la leptina. Esta adipocina se sintetiza y secreta casi exclusivamente en el tejido adiposo y la cantidad liberada es directamente proporcional a la masa de este tejido. Su efecto lo ejerce a través del sistema nervioso central, donde regula la conducta alimentaria y el balance energético³¹⁷, y es capaz en condiciones fisiológicas de suprimir el apetito en respuesta a la ingesta calórica. Sin embargo, se ha observado en modelos animales

que las dietas ricas en grasa inducen una hiperleptinemia y generan un bloqueo funcional de esta vía, que recibe el nombre de bloqueo leptinérgico. Este bloqueo conlleva a una resistencia a la leptina, con el consecuente aumento del consumo de alimentos y desarrollo de obesidad³¹⁸. Este mismo efecto, como ya se ha indicado previamente, también se ha observado en los pacientes obesos, en los que se produce un estado patológico de resistencia a la leptina y se pierde sensibilidad a las funciones ejercidas por la misma³⁰⁷. Diferentes estudios han demostrado un incremento consistente en los niveles de leptina en pacientes obesos comparados con controles^{214,217,266,319}, y también se ha encontrado un descenso en los niveles de expresión de leptina tras la pérdida de peso por dieta y por cirugía bariátrica^{214,297,319,320}. Además, es de gran interés el mecanismo descrito de regulación entre PPAR- γ y leptina³⁰⁸, en el cual el incremento de la expresión del PPAR- γ produce una inhibición de la expresión de leptina y el aumento en los niveles de leptina, a su vez, inhibe la expresión del PPAR- γ ³⁰⁹.

Basándonos en estos resultados, y en consonancia con la hipótesis anteriormente formulada para explicar la relación inversa entre el IMC y el PPAR- γ , podemos plantear que la correlación encontrada en nuestro estudio entre una mayor reducción de peso y niveles más bajos del PPAR- γ puede ser debida a que los pacientes con menor expresión del PPAR- γ presentan una mayor lipotoxicidad, así como una mayor resistencia a la insulina y a la leptina. Estos pacientes podrían, por tanto, ser más sensibles a los efectos de la gastrectomía y perder más peso en relación con la mejora de la homeostasis metabólica asociada a la cirugía. Apoyan también esta hipótesis los datos de que cuanto mayor sea el grado de obesidad más difícil es la pérdida de peso mediante dieta³²¹, mientras que la reducción de peso que se consigue con la cirugía bariátrica es directamente proporcional al peso previo a la cirugía³²².

4. Expresión de miR-27a y miR-27b en tejido adiposo y correlación con PPAR- γ

En nuestro estudio no hemos observado diferencias en la expresión de miR-27a y miR-27b entre pacientes obesos respecto a controles no obesos en tejido adiposo visceral y subcutáneo. Estos resultados no coinciden completamente con los de Viesti *et al.*²⁶⁶, que mostraron un aumento en la expresión de miR-27a en grasa visceral de 15 pacientes con obesidad comparado con 15 controles, pero sin encontrar diferencias para el miR-27a en grasa subcutánea o para el miR-27b en ambos tejidos. Este resultado discordante puede ser debido, una vez más, a las diferencias metodológicas entre los dos estudios así como al bajo tamaño muestral empleado. Adicionalmente, los genes de referencia utilizados por Viesti *et al.*²⁶⁶ fueron el RNU24, que no ha sido validado en muestras de tejido adiposo, y el RNU48, que se ha descrito como un gen menos estable que el mir-103a o que otros como U6²⁸⁰.

Esta variabilidad de la expresión de los miR-27 en humanos, también se han comunicado en ratones, en los que se ha encontrado un aumento de la expresión de miR-27 en el tejido adiposo de ratones obesos respecto a no obesos¹⁴³, pero también una disminución expresión en adipocitos maduros de ratones obesos respecto a controles¹⁴⁴. Pese a esta diferencia, estos dos últimos estudios son concluyentes en demostrar el efecto regulador negativo de los miR-27 *in vitro* durante la adipogénesis, donde se ha comprobado que pre-adipocitos 3T3-L1 tienen disminución de la expresión de este micro-ARN durante la diferenciación a adipocitos, y que el incremento de miR-27 produce un bloqueo de esta diferenciación^{143,144}; similares hallazgos fueron encontrados en células madre derivadas de adipocitos¹⁴⁵. Este efecto de regulación negativa del miR-27 sobre el PPAR- γ está mediado de forma directa por la unión de este micro-ARN a la región 3'UTR del PPAR- γ , inhibiendo su

expresión¹⁴³⁻¹⁴⁵. Este efecto del miR-27 se ha encontrado además en otros modelos *in vitro* de enfermedad, como en células endoteliales de la arteria pulmonar³²³.

Considerando estos datos, sería plausible que existiera una correlación negativa *in vivo* entre la expresión en tejido adiposo de estos micro-ARN y del PPAR- γ , y nuestro trabajo ha sido el primer estudio en analizarlo. Sin embargo, no hemos descrito una asociación entre estas variables, dado que sólo se encontró una débil correlación entre miR-27b y PPAR- γ 2 en grasa visceral del grupo de controles ($\rho = 0,589$; $P = 0,008$). Es posible que el papel *in vivo* de estos micro-ARN no sea relevante en la obesidad en adultos o que otros factores, no analizados, desempeñen un papel de mayor importancia.

Por otra parte, la correlación de los miR-27 en grasa subcutánea con las variables clínicas, demostró una correlación positiva débil entre el miR-27a y los niveles de colesterol total previos a la cirugía ($\rho = 0,281$; $P = 0,036$). Este efecto del miR-27a sobre el colesterol podría estar en relación con la inhibición que ejerce el miR-27 sobre el receptor β de la hormona tiroidea³²⁴, cuyos agonistas han demostrado reducir el colesterol sérico³²⁵, sin embargo no existen demasiados datos para apoyar esta relación y la asociación encontrada en nuestro estudio es débil, por lo que no podemos descartar que este resultado sea únicamente un falso positivo.

5. Implicaciones de nuestros resultados y líneas futuras de investigación

En nuestro trabajo hemos encontrado, como resultado principal, que la expresión reducida del PPAR- γ 1 en tejido adiposo de sujetos obesos se asocia con un mayor IMC y con una mayor reducción de peso tras la cirugía bariátrica. Este hallazgo resulta muy difícil de interpretar dada la disparidad de los resultados previos sobre el PPAR- γ y la obesidad, pero podría ser útil como marcador para identificar

pacientes con una mayor probabilidad de éxito tras cirugía bariátrica. Encontrar marcadores pronósticos de respuesta a la cirugía bariátrica sería de gran relevancia tanto para la selección de los pacientes candidatos a este procedimiento como para el seguimiento de los mismos.

En todo caso, para confirmar este hallazgo es preciso ampliar el tamaño muestral y realizar el análisis de hormonas, como la leptina, que pudieran estar implicadas en este proceso, así como validarlo en otras cohortes de pacientes. Por otro lado, con el objetivo de esclarecer el papel del PPAR- γ en la obesidad, sería de gran interés estudiar la expresión de este receptor en muestras de varios tejidos además del adiposo y correlacionar dicha expresión con variables clínicas y analíticas que permitan apoyar la hipótesis enunciada en este trabajo.

El PPAR- γ presenta múltiples funciones en diferentes órganos y tejidos³²⁶, dado que su isoforma 1 es prácticamente ubicua, por lo que se le ha considerado en ocasiones como el principal regulador del metabolismo³²⁷ o el mayor “ahorrador”³²⁸ energético del organismo. Y es evidente que por esta misma participación en numerosos procesos fisiológicos resulta más complicado todavía esclarecer su papel en aspectos concretos del metabolismo, particularmente tras el fracaso clínico de sus agonistas, las glitazonas³²⁹. En todo caso, la importancia de este receptor en el metabolismo lipídico e hidrocarbonado es evidente y avanzar en el conocimiento de sus efectos permitirá profundizar en la fisiopatología de la obesidad.

VI. CONCLUSIONES

1. No se han observado diferencias en la expresión del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 en el tejido adiposo visceral o subcutáneo del conjunto de pacientes obesos comparados con los controles.
2. En mujeres los niveles del ARNm del PPAR- γ 1 están disminuidos de forma significativa en el tejido adiposo visceral de obesas respecto a controles no obesas.
3. La expresión reducida de PPAR- γ 1 en tejido adiposo visceral de sujetos obesos se correlaciona con un mayor IMC.
4. No se han encontrado diferencias en la expresión de miR-27a y miR-27b en el tejido adiposo visceral o subcutáneo de pacientes obesos comparados con los controles.
5. No se ha observado asociación *in vivo* entre los niveles de expresión de miR-27a y el miR-27b y los del PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2.
6. Los pacientes con menor expresión de PPAR- γ 1 en tejido adiposo visceral y subcutáneo presentan una mayor reducción de su índice de masa corporal a los 12 meses de la cirugía bariátrica.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Vander Hoorn S, Murray CJ. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet* 2002;360:1347-60.
2. James WPT J-LR, Ni Mhurchu C, et al. Overweight and obesity (high body mass index). In: Ezzati M LA, Rodgers A, Murray CJL, ed. *Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors*. Geneva: WHO; 2004: 497–596.
3. Santi Cano MJ, Barba Chacon A, Mangas Rojas A. Bases moleculares de la obesidad: regulación del apetito y control del metabolismo energético. *Med Clin (Barc)* 2001;117:463-76.
4. OMS | Obesidad y sobrepeso. 2013, at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>.)
5. Haslam D. Obesity: a medical history. *Obes Rev* 2007;8 Suppl 1:31-6.
6. Preventing chronic diseases: a vital investment: WHO global report. Geneva: World Health Organization; 2005.
7. Ng M, Fleming T, Robinson M, *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2014.
8. Wang YC, McPherson K, Marsh T, Gortmaker SL, Brown M. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet* 2011;378:815-25.
9. Encuesta Nacional de Salud: ENSE 2011-2012. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad 2013.
10. Sanchez-Cruz JJ, Jimenez-Moleon JJ, Fernandez-Quesada F, Sanchez MJ. Prevalence of child and youth obesity in Spain in 2012. *Rev Esp Cardiol* 2013;66:371-6.
11. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva: World Health Organization; 2009.
12. Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, *et al.* Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med* 2006;355:763-78.
13. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003;348:1625-38.
14. Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI. Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2013;309:71-82.
15. Orpana HM, Berthelot JM, Kaplan MS, Feeny DH, McFarland B, Ross NA. BMI and mortality: results from a national longitudinal study of Canadian adults. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18:214-8.

16. Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, *et al.* Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet* 2009;373:1083-96.
17. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet* 2005;366:1197-209.
18. Reeder BA, Angel A, Ledoux M, Rabkin SW, Young TK, Sweet LE. Obesity and its relation to cardiovascular disease risk factors in Canadian adults. Canadian Heart Health Surveys Research Group. *CMAJ* 1992;146:2009-19.
19. Dudina A, Cooney MT, Bacquer DD, *et al.* Relationships between body mass index, cardiovascular mortality, and risk factors: a report from the SCORE investigators. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2011;18:731-42.
20. Jousilahti P, Tuomilehto J, Vartiainen E, Pekkanen J, Puska P. Body weight, cardiovascular risk factors, and coronary mortality. 15-year follow-up of middle-aged men and women in eastern Finland. *Circulation* 1996;93:1372-9.
21. Brown CD, Higgins M, Donato KA, *et al.* Body mass index and the prevalence of hypertension and dyslipidemia. *Obes Res* 2000;8:605-19.
22. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1983;67:968-77.
23. Kramer CK, Zinman B, Retnakaran R. Are metabolically healthy overweight and obesity benign conditions?: A systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2013;159:758-69.
24. Narkiewicz K. Diagnosis and management of hypertension in obesity. *Obes Rev* 2006;7:155-62.
25. Wilson PW, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch Intern Med* 2002;162:1867-72.
26. Sorof J, Daniels S. Obesity hypertension in children: a problem of epidemic proportions. *Hypertension* 2002;40:441-7.
27. Friedemann C, Heneghan C, Mahtani K, Thompson M, Perera R, Ward AM. Cardiovascular disease risk in healthy children and its association with body mass index: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2012;345:e4759.
28. Cooper R, McFarlane-Anderson N, Bennett FI, *et al.* ACE, angiotensinogen and obesity: a potential pathway leading to hypertension. *J Hum Hypertens* 1997;11:107-11.
29. Meyers MR, Gokce N. Endothelial dysfunction in obesity: etiological role in atherosclerosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2007;14:365-9.
30. Alvarez GE, Beske SD, Ballard TP, Davy KP. Sympathetic neural activation in visceral obesity. *Circulation* 2002;106:2533-6.
31. Kurukulasuriya LR, Stas S, Lastra G, Manrique C, Sowers JR. Hypertension in obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008;37:647-62, ix.

32. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991;14:173-94.
33. Hall JE, Brands MW, Henegar JR, Shek EW. Abnormal kidney function as a cause and a consequence of obesity hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998;25:58-64.
34. Wannamethee SG, Shaper AG. Weight change and duration of overweight and obesity in the incidence of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999;22:1266-72.
35. Li C, Ford ES, Zhao G, Mokdad AH. Prevalence of pre-diabetes and its association with clustering of cardiometabolic risk factors and hyperinsulinemia among U.S. adolescents: National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *Diabetes Care* 2009;32:342-7.
36. Stevens J, Couper D, Pankow J, *et al.* Sensitivity and specificity of anthropometrics for the prediction of diabetes in a biracial cohort. *Obes Res* 2001;9:696-705.
37. Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R. Body mass index, waist circumference, and health risk: evidence in support of current National Institutes of Health guidelines. *Arch Intern Med* 2002;162:2074-9.
38. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365:1415-28.
39. Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB. The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med* 2003;163:427-36.
40. Palaniappan L, Carnethon MR, Wang Y, *et al.* Predictors of the incident metabolic syndrome in adults: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care* 2004;27:788-93.
41. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 2001;121:91-100.
42. Ong JP, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin Liver Dis* 2007;11:1-16, vii.
43. Marceau P, Biron S, Hould FS, *et al.* Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1513-7.
44. Gholam PM, Flancbaum L, Machan JT, Charney DA, Kotler DP. Nonalcoholic fatty liver disease in severely obese subjects. *Am J Gastroenterol* 2007;102:399-408.
45. Jee SH, Yun JE, Park EJ, *et al.* Body mass index and cancer risk in Korean men and women. *Int J Cancer* 2008;123:1892-6.
46. Rapp K, Schroeder J, Klenk J, *et al.* Obesity and incidence of cancer: a large cohort study of over 145,000 adults in Austria. *Br J Cancer* 2005;93:1062-7.
47. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008;371:569-78.

48. Vainio H BF. International Agency for Cancer handbook of cancer prevention, vol 6. Weight control and physical activity. Lyon: IARC; 2002.
49. Corley DA, Kubo A, Levin TR, *et al.* Abdominal obesity and body mass index as risk factors for Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2007;133:34-41; quiz 311.
50. Edelstein ZR, Farrow DC, Bronner MP, Rosen SN, Vaughan TL. Central adiposity and risk of Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2007;133:403-11.
51. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, *et al.* Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1218-26.
52. Gunter MJ, Hoover DR, Yu H, *et al.* Insulin, insulin-like growth factor-I, and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:48-60.
53. Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. Endometrial cancer. *Lancet* 2005;366:491-505.
54. Gredmark T, Kvint S, Havel G, Mattsson LA. Adipose tissue distribution in postmenopausal women with adenomatous hyperplasia of the endometrium. *Gynecol Oncol* 1999;72:138-42.
55. MacInnis RJ, English DR. Body size and composition and prostate cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Cancer Causes Control* 2006;17:989-1003.
56. Stewart SB, Freedland SJ. Influence of obesity on the incidence and treatment of genitourinary malignancies. *Urol Oncol* 2011;29:476-86.
57. Allott EH, Masko EM, Freedland SJ. Obesity and prostate cancer: weighing the evidence. *Eur Urol* 2013;63:800-9.
58. Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, *et al.* Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9:428-33; quiz e50.
59. Saunders D, Seidel D, Allison M, Lyratzopoulos G. Systematic review: the association between obesity and hepatocellular carcinoma - epidemiological evidence. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31:1051-63.
60. Sun B, Karin M. Obesity, inflammation, and liver cancer. *J Hepatol* 2012;56:704-13.
61. Foster GD, Sanders MH, Millman R, *et al.* Obstructive sleep apnea among obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009;32:1017-9.
62. Beuther DA, Sutherland ER. Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:661-6.
63. Koenig SM. Pulmonary complications of obesity. *Am J Med Sci* 2001;321:249-79.
64. Kress JP, Pohlman AS, Alverdy J, Hall JB. The impact of morbid obesity on oxygen cost of breathing (VO(2)RESP) at rest. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:883-6.
65. Jones RL, Nzekwu MM. The effects of body mass index on lung volumes. *Chest* 2006;130:827-33.

66. Leone N, Courbon D, Thomas F, *et al.* Lung function impairment and metabolic syndrome: the critical role of abdominal obesity. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:509-16.
67. Sturm R. The effects of obesity, smoking, and drinking on medical problems and costs. *Health Aff (Millwood)* 2002;21:245-53.
68. Withrow D, Alter DA. The economic burden of obesity worldwide: a systematic review of the direct costs of obesity. *Obes Rev* 2011;12:131-41.
69. Finkelstein EA, Fiebelkorn IC, Wang G. National medical spending attributable to overweight and obesity: how much, and who's paying? *Health Aff (Millwood)* 2003;Suppl Web Exclusives:W3-219-26.
70. Finkelstein EA, Fiebelkorn IC, Wang G. State-level estimates of annual medical expenditures attributable to obesity. *Obes Res* 2004;12:18-24.
71. Fry J, Finley W. The prevalence and costs of obesity in the EU. *Proc Nutr Soc* 2005;64:359-62.
72. Church TS, Thomas DM, Tudor-Locke C, *et al.* Trends over 5 decades in U.S. occupation-related physical activity and their associations with obesity. *PLoS One* 2011;6:e19657.
73. Prentice AM, Jebb SA. Obesity in Britain: gluttony or sloth? *BMJ* 1995;311:437-9.
74. Kromhout D. Changes in energy and macronutrients in 871 middle-aged men during 10 years of follow-up (the Zutphen study). *Am J Clin Nutr* 1983;37:287-94.
75. Mozaffarian D, Hao T, Rimm EB, Willett WC, Hu FB. Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. *N Engl J Med* 2011;364:2392-404.
76. Te Morenga L, Mallard S, Mann J. Dietary sugars and body weight: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials and cohort studies. *BMJ* 2013;346:e7492.
77. Pereira MA, Kartashov AI, Ebbeling CB, *et al.* Fast-food habits, weight gain, and insulin resistance (the CARDIA study): 15-year prospective analysis. *Lancet* 2005;365:36-42.
78. Toschke AM, Thorsteinsdottir KH, von Kries R. Meal frequency, breakfast consumption and childhood obesity. *Int J Pediatr Obes* 2009;4:242-8.
79. Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet* 1997;27:325-51.
80. Loos RJ. Genetic determinants of common obesity and their value in prediction. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012;26:211-26.
81. Jiang Y, Wilk JB, Borecki I, *et al.* Common variants in the 5' region of the leptin gene are associated with body mass index in men from the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am J Hum Genet* 2004;75:220-30.
82. Chagnon YC, Wilmore JH, Borecki IB, *et al.* Associations between the leptin receptor gene and adiposity in middle-aged Caucasian males from the HERITAGE family study. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:29-34.

83. Benzinou M, Chevre JC, Ward KJ, *et al.* Endocannabinoid receptor 1 gene variations increase risk for obesity and modulate body mass index in European populations. *Hum Mol Genet* 2008;17:1916-21.
84. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, *et al.* A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007;316:889-94.
85. Dina C, Meyre D, Gallina S, *et al.* Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 2007;39:724-6.
86. Loos RJ, Lindgren CM, Li S, *et al.* Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet* 2008;40:768-75.
87. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, *et al.* A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 1998;20:284-7.
88. Leslie WS, Hankey CR, Lean ME. Weight gain as an adverse effect of some commonly prescribed drugs: a systematic review. *QJM* 2007;100:395-404.
89. Malone M. Medications associated with weight gain. *Ann Pharmacother* 2005;39:2046-55.
90. Wajchenberg BL, Bosco A, Marone MM, *et al.* Estimation of body fat and lean tissue distribution by dual energy X-ray absorptiometry and abdominal body fat evaluation by computed tomography in Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2791-4.
91. Knudsen N, Laurberg P, Rasmussen LB, *et al.* Small differences in thyroid function may be important for body mass index and the occurrence of obesity in the population. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4019-24.
92. Lim SS, Norman RJ, Davies MJ, Moran LJ. The effect of obesity on polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 2013;14:95-109.
93. Poirier P, Giles TD, Bray GA, *et al.* Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 2006;113:898-918.
94. Mathus-Vliegen L, Toouli J, Fried M, *et al.* World Gastroenterology Organisation global guidelines on obesity. *Journal of clinical gastroenterology* 2012;46:555-61.
95. Salas-Salvado J, Rubio MA, Barbany M, Moreno B, Grupo Colaborativo de la S. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med Clin (Barc)* 2007;128:184-96; quiz 1 p following 200.
96. Schwingshackl L, Dias S, Hoffmann G. Impact of long-term lifestyle programmes on weight loss and cardiovascular risk factors in overweight/obese participants: a systematic review and network meta-analysis. *Systematic reviews* 2014;3:130.

97. Siebenhofer A, Jeitler K, Horvath K, Berghold A, Siering U, Semlitsch T. Long-term effects of weight-reducing drugs in hypertensive patients. The Cochrane database of systematic reviews 2013;3:CD007654.
98. Davidson MH, Hauptman J, DiGirolamo M, *et al.* Weight control and risk factor reduction in obese subjects treated for 2 years with orlistat: a randomized controlled trial. JAMA 1999;281:235-42.
99. Osei-Assibey G, Adi Y, Kyrou I, Kumar S, Matyka K. Pharmacotherapy for overweight/obesity in ethnic minorities and White Caucasians: a systematic review and meta-analysis. Diabetes, obesity & metabolism 2011;13:385-93.
100. Smith SR, Weissman NJ, Anderson CM, *et al.* Multicenter, placebo-controlled trial of lorcaserin for weight management. N Engl J Med 2010;363:245-56.
101. Fidler MC, Sanchez M, Raether B, *et al.* A one-year randomized trial of lorcaserin for weight loss in obese and overweight adults: the BLOSSOM trial. J Clin Endocrinol Metab 2011;96:3067-77.
102. O'Neil PM, Smith SR, Weissman NJ, *et al.* Randomized placebo-controlled clinical trial of lorcaserin for weight loss in type 2 diabetes mellitus: the BLOOM-DM study. Obesity (Silver Spring) 2012;20:1426-36.
103. Kang JG, Park CY, Kang JH, Park YW, Park SW. Randomized controlled trial to investigate the effects of a newly developed formulation of phentermine diffuse-controlled release for obesity. Diabetes, obesity & metabolism 2010;12:876-82.
104. Allison DB, Gadde KM, Garvey WT, *et al.* Controlled-release phentermine/topiramate in severely obese adults: a randomized controlled trial (EQUIP). Obesity (Silver Spring) 2012;20:330-42.
105. Gadde KM, Allison DB, Ryan DH, *et al.* Effects of low-dose, controlled-release, phentermine plus topiramate combination on weight and associated comorbidities in overweight and obese adults (CONQUER): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet 2011;377:1341-52.
106. Garvey WT, Ryan DH, Look M, *et al.* Two-year sustained weight loss and metabolic benefits with controlled-release phentermine/topiramate in obese and overweight adults (SEQUEL): a randomized, placebo-controlled, phase 3 extension study. Am J Clin Nutr 2012;95:297-308.
107. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, *et al.* Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. N Engl J Med 2002;346:393-403.
108. Pratley RE. Overview of glucagon-like peptide-1 analogs and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for type 2 diabetes. Medscape journal of medicine 2008;10:171.
109. Maggs D, Shen L, Strobel S, Brown D, Kolterman O, Weyer C. Effect of pramlintide on A1C and body weight in insulin-treated African Americans and Hispanics with type 2 diabetes: a pooled post hoc analysis. Metabolism: clinical and experimental 2003;52:1638-42.
110. Kim GW, Lin JE, Blomain ES, Waldman SA. Antiobesity pharmacotherapy: new drugs and emerging targets. Clinical pharmacology and therapeutics 2014;95:53-66.

111. Vest AR, Heneghan HM, Agarwal S, Schauer PR, Young JB. Bariatric surgery and cardiovascular outcomes: a systematic review. *Heart* 2012;98:1763-77.
112. Kwok CS, Pradhan A, Khan MA, *et al.* Bariatric surgery and its impact on cardiovascular disease and mortality: a systematic review and meta-analysis. *International journal of cardiology* 2014;173:20-8.
113. Nelson DW, Blair KS, Martin MJ. Analysis of obesity-related outcomes and bariatric failure rates with the duodenal switch vs gastric bypass for morbid obesity. *Archives of surgery* 2012;147:847-54.
114. O'Brien PE, MacDonald L, Anderson M, Brennan L, Brown WA. Long-term outcomes after bariatric surgery: fifteen-year follow-up of adjustable gastric banding and a systematic review of the bariatric surgical literature. *Annals of surgery* 2013;257:87-94.
115. van Rutte PW, Smulders JF, de Zoete JP, Nienhuijs SW. Outcome of sleeve gastrectomy as a primary bariatric procedure. *The British journal of surgery* 2014;101:661-8.
116. Colquitt JL, Pickett K, Loveman E, Frampton GK. Surgery for weight loss in adults. *The Cochrane database of systematic reviews* 2014;8:CD003641.
117. Sauerland S, Angrisani L, Belachew M, *et al.* Obesity surgery: evidence-based guidelines of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES). *Surgical endoscopy* 2005;19:200-21.
118. Tack J, Deloose E. Complications of bariatric surgery: dumping syndrome, reflux and vitamin deficiencies. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 2014;28:741-9.
119. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990;347:645-50.
120. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 1992;68:879-87.
121. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999;20:649-88.
122. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 1999;97:161-3.
123. Greene ME, Blumberg B, McBride OW, *et al.* Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr* 1995;4:281-99.
124. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* 2000;49:497-505.
125. Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing. *Swiss Med Wkly* 2002;132:83-91.
126. Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 1996;137:354-66.

127. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, *et al.* International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2006;58:726-41.
128. Wilding JP. PPAR agonists for the treatment of cardiovascular disease in patients with diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism* 2012;14:973-82.
129. Grygiel-Gorniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutrition journal* 2014;13:17.
130. Bardot O, Aldridge TC, Latruffe N, Green S. PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response element upstream of the bifunctional enzyme gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:37-45.
131. Varanasi U, Chu R, Huang Q, Castellon R, Yeldandi AV, Reddy JK. Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the human peroxisomal fatty acyl coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem* 1996;271:2147-55.
132. Tontonoz P, Graves RA, Budavari AI, *et al.* Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha. *Nucleic Acids Res* 1994;22:5628-34.
133. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 1994;8:1224-34.
134. Chandra V, Huang P, Hamuro Y, *et al.* Structure of the intact PPAR-gamma-RXR-nuclear receptor complex on DNA. *Nature* 2008;456:350-6.
135. Dowell P, Ishmael JE, Avram D, Peterson VJ, Nevriy DJ, Leid M. Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein. *J Biol Chem* 1999;274:15901-7.
136. Guan HP, Ishizuka T, Chui PC, Lehrke M, Lazar MA. Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes Dev* 2005;19:453-61.
137. Bensinger SJ, Tontonoz P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature* 2008;454:470-7.
138. Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 2000;405:421-4.
139. Hauner H. The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes Metab Res Rev* 2002;18 Suppl 2:S10-5.
140. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, *et al.* A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 2005;437:759-63.
141. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002;53:409-35.
142. Burns KA, Vanden Heuvel JP. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771:952-60.
143. Lin Q, Gao Z, Alarcon RM, Ye J, Yun Z. A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. *FEBS J* 2009;276:2348-58.

144. Kim SY, Kim AY, Lee HW, *et al.* miR-27a is a negative regulator of adipocyte differentiation via suppressing PPARgamma expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;392:323-8.
145. Karbiener M, Fischer C, Nowitsch S, *et al.* microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;390:247-51.
146. Floyd ZE, Stephens JM. Controlling a master switch of adipocyte development and insulin sensitivity: covalent modifications of PPARgamma. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:1090-5.
147. Camp HS, Tafuri SR, Leff T. c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and negatively regulates its transcriptional activity. *Endocrinology* 1999;140:392-7.
148. Camp HS, Tafuri SR. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997;272:10811-6.
149. Adams M, Reginato MJ, Shao D, Lazar MA, Chatterjee VK. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem* 1997;272:5128-32.
150. Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science* 1996;274:2100-3.
151. Reginato MJ, Krakow SL, Bailey ST, Lazar MA. Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 1998;273:1855-8.
152. Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ, Lazar MA. Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature* 1998;396:377-80.
153. Waite KJ, Floyd ZE, Arbour-Reily P, Stephens JM. Interferon-gamma-induced regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and STATs in adipocytes. *J Biol Chem* 2001;276:7062-8.
154. Hauser S, Adelmant G, Sarraf P, Wright HM, Mueller E, Spiegelman BM. Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem* 2000;275:18527-33.
155. Floyd ZE, Stephens JM. Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPARgamma in adipocytes. *J Biol Chem* 2002;277:4062-8.
156. Floyd ZE, Stephens JM. Control of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 stability and activity by SUMOylation. *Obes Res* 2004;12:921-8.
157. Kilroy GE, Zhang X, Floyd ZE. PPAR-gamma AF-2 domain functions as a component of a ubiquitin-dependent degradation signal. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:665-73.
158. Kilroy G, Kirk-Ballard H, Carter LE, Floyd ZE. The ubiquitin ligase Siah2 regulates PPARgamma activity in adipocytes. *Endocrinology* 2012;153:1206-18.

159. Geiss-Friedlander R, Melchior F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:947-56.
160. Ohshima T, Koga H, Shimotohno K. Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 2004;279:29551-7.
161. Yamashita D, Yamaguchi T, Shimizu M, Nakata N, Hirose F, Osumi T. The transactivating function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is negatively regulated by SUMO conjugation in the amino-terminal domain. *Genes Cells* 2004;9:1017-29.
162. Shimizu M, Yamashita D, Yamaguchi T, Hirose F, Osumi T. Aspects of the regulatory mechanisms of PPAR functions: analysis of a bidirectional response element and regulation by sumoylation. *Mol Cell Biochem* 2006;286:33-42.
163. Yang YR, Suh PG. O-GlcNAcylation in cellular functions and human diseases. *Adv Biol Regul* 2013.
164. Ji S, Park SY, Roth J, Kim HS, Cho JW. O-GlcNAc modification of PPARgamma reduces its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;417:1158-63.
165. Medina-Gomez G, Gray S, Vidal-Puig A. Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and PPARgamma coactivator-1 (PGC1). *Public health nutrition* 2007;10:1132-7.
166. Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPARgamma. *Cell* 2005;123:993-9.
167. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, *et al.* PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* 2013;19:557-66.
168. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, *et al.* PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 1999;4:597-609.
169. Miles PD, Barak Y, He W, Evans RM, Olefsky JM. Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. *J Clin Invest* 2000;105:287-92.
170. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. Transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:165-73.
171. Dubuquoy L, Dharancy S, Nutten S, Pettersson S, Auwerx J, Desreumaux P. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases. *Lancet* 2002;360:1410-8.
172. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, *et al.* PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 1996;15:5336-48.
173. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998;93:241-52.
174. Frohnert BI, Hui TY, Bernlohr DA. Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. *J Biol Chem* 1999;274:3970-7.

175. Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, *et al.* Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem* 1995;270:19269-76.
176. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 1995;15:351-7.
177. Chui PC, Guan HP, Lehrke M, Lazar MA. PPARgamma regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. *J Clin Invest* 2005;115:2244-56.
178. He W, Barak Y, Hevener A, *et al.* Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15712-7.
179. Imai T, Takakuwa R, Marchand S, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4543-7.
180. Rangwala SM, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:331-6.
181. Long Q, Lei T, Feng B, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma increases adiponectin secretion via transcriptional repression of endoplasmic reticulum chaperone protein ERp44. *Endocrinology* 2010;151:3195-203.
182. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998;391:79-82.
183. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998;391:82-6.
184. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 2001;7:48-52.
185. Ryan KK, Li B, Grayson BE, Matter EK, Woods SC, Seeley RJ. A role for central nervous system PPAR-gamma in the regulation of energy balance. *Nat Med* 2011;17:623-6.
186. Lu M, Sarruf DA, Talukdar S, *et al.* Brain PPAR-gamma promotes obesity and is required for the insulin-sensitizing effect of thiazolidinediones. *Nat Med* 2011;17:618-22.
187. Zhang H, Zhang A, Kohan DE, Nelson RD, Gonzalez FJ, Yang T. Collecting duct-specific deletion of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks thiazolidinedione-induced fluid retention. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:9406-11.
188. Borsting E, Cheng VP, Glass CK, Vallon V, Cunard R. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists repress epithelial sodium channel expression in the kidney. *American journal of physiology Renal physiology* 2012;302:F540-51.
189. Wang P, Liu J, Li Y, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor {delta} is an essential transcriptional regulator for mitochondrial protection and biogenesis in adult heart. *Circulation research* 2010;106:911-9.

190. Duan SZ, Ivashchenko CY, Russell MW, Milstone DS, Mortensen RM. Cardiomyocyte-specific knockout and agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma both induce cardiac hypertrophy in mice. *Circulation research* 2005;97:372-9.
191. Kim HI, Cha JY, Kim SY, *et al.* Peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma upregulates glucokinase gene expression in beta-cells. *Diabetes* 2002;51:676-85.
192. Mansour M. The roles of peroxisome proliferator-activated receptors in the metabolic syndrome. *Progress in molecular biology and translational science* 2014;121:217-66.
193. Yen CJ, Beamer BA, Negri C, *et al.* Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:270-4.
194. Morini E, Tassi V, Capponi D, *et al.* Interaction between PPARgamma2 variants and gender on the modulation of body weight. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:1467-70.
195. Razquin C, Marti A, Martinez JA. Evidences on three relevant obesogenes: MC4R, FTO and PPARgamma. *Approaches for personalized nutrition. Molecular nutrition & food research* 2011;55:136-49.
196. Galbete C, Toledo E, Martinez-Gonzalez MA, Martinez JA, Guillen-Grima F, Marti A. Pro12Ala variant of the PPARG2 gene increases body mass index: An updated meta-analysis encompassing 49,092 subjects. *Obesity (Silver Spring)* 2013;21:1486-95.
197. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, *et al.* The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem* 2001;276:41245-54.
198. Miles PD, Barak Y, Evans RM, Olefsky JM. Effect of heterozygous PPARgamma deficiency and TZD treatment on insulin resistance associated with age and high-fat feeding. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2003;284:E618-26.
199. Moran-Salvador E, Lopez-Parra M, Garcia-Alonso V, *et al.* Role for PPARgamma in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2011;25:2538-50.
200. Long L, Toda C, Jeong JK, Horvath TL, Diano S. PPARgamma ablation sensitizes proopiomelanocortin neurons to leptin during high-fat feeding. *J Clin Invest* 2014;124:4017-27.
201. Jones JR, Barrick C, Kim KA, *et al.* Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:6207-12.
202. Medina-Gomez G, Gray SL, Yetukuri L, *et al.* PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS genetics* 2007;3:e64.
203. Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB, *et al.* Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* 1996;97:2553-61.

204. Gorla-Bajszczak A, Siegrist-Kaiser C, Boss O, Burger AG, Meier CA. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in lean and obese Zucker rats. *Eur J Endocrinol* 2000;142:71-8.
205. Verreth W, De Keyzer D, Pelat M, *et al.* Weight-loss-associated induction of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma correlate with reduced atherosclerosis and improved cardiovascular function in obese insulin-resistant mice. *Circulation* 2004;110:3259-69.
206. Viguerie N, Vidal H, Arner P, *et al.* Adipose tissue gene expression in obese subjects during low-fat and high-fat hypocaloric diets. *Diabetologia* 2005;48:123-31.
207. Lefebvre AM, Laville M, Vega N, *et al.* Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes* 1998;47:98-103.
208. Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 1997;99:2416-22.
209. Bortolotto JW, Margis R, Ferreira AC, Padoin AV, Mottin CC, Guaragna RM. Adipose tissue distribution and quantification of PPARbeta/delta and PPARgamma1-3 mRNAs: discordant gene expression in subcutaneous, retroperitoneal and visceral adipose tissue of morbidly obese patients. *Obes Surg* 2007;17:934-40.
210. Ruschke K, Fishbein L, Dietrich A, *et al.* Gene expression of PPARgamma and PGC-1alpha in human omental and subcutaneous adipose tissues is related to insulin resistance markers and mediates beneficial effects of physical training. *Eur J Endocrinol* 2010;162:515-23.
211. Lee EK, Lee MJ, Abdelmohsen K, *et al.* miR-130 suppresses adipogenesis by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Mol Cell Biol* 2011;31:626-38.
212. Redonnet A, Bonilla S, Noel-Suberville C, *et al.* Relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor alpha gene expression in obese human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:920-7.
213. Poulain-Godefroy O, Lecoecur C, Pattou F, Fruhbeck G, Froguel P. Inflammation is associated with a decrease of lipogenic factors in omental fat in women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:R1-7.
214. Leyvraz C, Verdumo C, Suter M, *et al.* Changes in gene expression profile in human subcutaneous adipose tissue during significant weight loss. *Obesity facts* 2012;5:440-51.
215. Rodriguez-Acebes S, Palacios N, Botella-Carretero JJ, *et al.* Gene expression profiling of subcutaneous adipose tissue in morbid obesity using a focused microarray: distinct expression of cell-cycle- and differentiation-related genes. *BMC medical genomics* 2010;3:61.
216. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, *et al.* Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 1997;46:1319-27.

217. Krempler F, Breban D, Oberkofler H, *et al.* Leptin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and CCAAT/enhancer binding protein-alpha mRNA expression in adipose tissue of humans and their relation to cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:443-9.
218. Hammes TO, Costa Cdos S, Rohden F, *et al.* Parallel down-regulation of FOXO1, PPARgamma and adiponectin mRNA expression in visceral adipose tissue of class III obese individuals. *Obesity facts* 2012;5:452-9.
219. Montague CT, Prins JB, Sanders L, *et al.* Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes* 1998;47:1384-91.
220. Tajiri Y, Takei R, Mimura K, Umeda F. Indicators for the efficacy of pioglitazone before and during treatment in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes technology & therapeutics* 2007;9:429-37.
221. Sato H, Sugai H, Kurosaki H, *et al.* The effect of sex hormones on peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activity in mature adipocytes. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2013;36:564-73.
222. Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 2008;455:64-71.
223. Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 2001;294:797-9.
224. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431:350-5.
225. Sun K, Lai EC. Adult-specific functions of animal microRNAs. *Nature reviews Genetics* 2013;14:535-48.
226. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews Genetics* 2004;5:522-31.
227. Sasidharan R, Gerstein M. Genomics: protein fossils live on as RNA. *Nature* 2008;453:729-31.
228. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature reviews Genetics* 2011;12:861-74.
229. Wang F, Long G, Zhao C, *et al.* Atherosclerosis-related circulating miRNAs as novel and sensitive predictors for acute myocardial infarction. *PLoS One* 2014;9:e105734.
230. Fu Y, Yi Z, Wu X, Li J, Xu F. Circulating microRNAs in patients with active pulmonary tuberculosis. *Journal of clinical microbiology* 2011;49:4246-51.
231. Valeri N, Braconi C, Gasparini P, *et al.* MicroRNA-135b promotes cancer progression by acting as a downstream effector of oncogenic pathways in colon cancer. *Cancer cell* 2014;25:469-83.
232. Zhu Z, Zhang X, Wang G, Zheng H. Role of MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatitis monthly* 2014;14:e18672.
233. Callegari E, Elamin BK, Sabbioni S, Gramantieri L, Negrini M. Role of microRNAs in hepatocellular carcinoma: a clinical perspective. *OncoTargets and therapy* 2013;6:1167-78.

234. Giordano S, Columbano A. MicroRNAs: new tools for diagnosis, prognosis, and therapy in hepatocellular carcinoma? *Hepatology* 2013;57:840-7.
235. Ghelani HS, Rachchh MA, Gokani RH. MicroRNAs as newer therapeutic targets: A big hope from a tiny player. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics* 2012;3:217-27.
236. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, *et al.* Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 2013;368:1685-94.
237. Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. Role of microRNAs in obesity and the metabolic syndrome. *Obes Rev* 2010;11:354-61.
238. Rottiers V, Naar AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:239-50.
239. Xu P, Vernooij SY, Guo M, Hay BA. The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Current biology : CB* 2003;13:790-5.
240. Lewis AP, Jopling CL. Regulation and biological function of the liver-specific miR-122. *Biochemical Society transactions* 2010;38:1553-7.
241. Esau C, Davis S, Murray SF, *et al.* miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell metabolism* 2006;3:87-98.
242. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, *et al.* Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005;438:685-9.
243. Oskowitz AZ, Lu J, Penforis P, *et al.* Human multipotent stromal cells from bone marrow and microRNA: regulation of differentiation and leukemia inhibitory factor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:18372-7.
244. Wang Q, Li YC, Wang J, *et al.* miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2889-94.
245. Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, *et al.* MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature* 2011;474:649-53.
246. Frost RJ, Olson EN. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:21075-80.
247. Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, *et al.* MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science* 2010;328:1566-9.
248. Rayner KJ, Suarez Y, Davalos A, *et al.* MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science* 2010;328:1570-3.
249. Ramirez CM, Rotllan N, Vlassov AV, *et al.* Control of cholesterol metabolism and plasma high-density lipoprotein levels by microRNA-144. *Circulation research* 2013;112:1592-601.
250. Sacco J, Adeli K. MicroRNAs: emerging roles in lipid and lipoprotein metabolism. *Current opinion in lipidology* 2012;23:220-5.

251. Hilton C, Neville MJ, Karpe F. MicroRNAs in adipose tissue: their role in adipogenesis and obesity. *International journal of obesity* 2013;37:325-32.
252. McGregor RA, Choi MS. microRNAs in the regulation of adipogenesis and obesity. *Current molecular medicine* 2011;11:304-16.
253. Son YH, Ka S, Kim AY, Kim JB. Regulation of Adipocyte Differentiation via MicroRNAs. *Endocrinology and metabolism* 2014;29:122-35.
254. Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Pardo G, *et al.* MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PLoS One* 2010;5:e9022.
255. Chen WJ, Yin K, Zhao GJ, Fu YC, Tang CK. The magic and mystery of microRNA-27 in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2012;222:314-23.
256. Li T, Cao H, Zhuang J, *et al.* Identification of miR-130a, miR-27b and miR-210 as serum biomarkers for atherosclerosis obliterans. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2011;412:66-70.
257. Ji J, Zhang J, Huang G, Qian J, Wang X, Mei S. Over-expressed microRNA-27a and 27b influence fat accumulation and cell proliferation during rat hepatic stellate cell activation. *FEBS letters* 2009;583:759-66.
258. Chinchilla A, Lozano E, Daimi H, *et al.* MicroRNA profiling during mouse ventricular maturation: a role for miR-27 modulating Mef2c expression. *Cardiovascular research* 2011;89:98-108.
259. Li M, Li J, Ding X, He M, Cheng SY. microRNA and cancer. *The AAPS journal* 2010;12:309-17.
260. Zanetti KA, Haznadar M, Welsh JA, *et al.* 3'-UTR and functional secretor haplotypes in mannose-binding lectin 2 are associated with increased colon cancer risk in African Americans. *Cancer research* 2012;72:1467-77.
261. Myatt SS, Wang J, Monteiro LJ, *et al.* Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer. *Cancer research* 2010;70:367-77.
262. Qi J, Mu D. MicroRNAs and lung cancers: from pathogenesis to clinical implications. *Frontiers of medicine* 2012;6:134-55.
263. Zhang Z, Liu S, Shi R, Zhao G. miR-27 promotes human gastric cancer cell metastasis by inducing epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer genetics* 2011;204:486-91.
264. Walter BA, Valera VA, Pinto PA, Merino MJ. Comprehensive microRNA Profiling of Prostate Cancer. *Journal of Cancer* 2013;4:350-7.
265. Kloting N, Berthold S, Kovacs P, *et al.* MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. *PLoS One* 2009;4:e4699.
266. Viesti ACR, Salgado W, Jr., Pretti da Cunha Tirapelli D, dos Santos JS. The expression of LEP, LEPR, IGF1 and IL10 in obesity and the relationship with microRNAs. *PLoS One* 2014;9:e93512.

267. Florell SR, Coffin CM, Holden JA, *et al.* Preservation of RNA for functional genomic studies: a multidisciplinary tumor bank protocol. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2001;14:116-28.
268. Hemmrich KaD, Bernd and Paul, Nora Emilie and Hoffmeister, Diego and Pallua, Norbert. RNA Isolation from Adipose Tissue: An Optimized Procedure for High RNA Yield and Integrity. *Lab Medicine* 2010;41:104-6.
269. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 2005;39:75-85.
270. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology* 2002;29:23-39.
271. Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Reagent Guide. Applied Biosystems, 2010. at http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_046739.pdf.)
272. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *BioTechniques* 2000;29:332-7.
273. Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of biochemical and biophysical methods* 2000;46:69-81.
274. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 2002;3:RESEARCH0034.
275. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research* 2004;64:5245-50.
276. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters* 2004;26:509-15.
277. Mehta R, Birerdinc A, Hossain N, *et al.* Validation of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis of human visceral adipose samples. *BMC molecular biology* 2010;11:39.
278. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
279. Hurtado del Pozo C, Calvo RM, Vesperinas-Garcia G, *et al.* IPO8 and FBXL10: new reference genes for gene expression studies in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18:897-903.
280. Neville MJ, Collins JM, Gloyn AL, McCarthy MI, Karpe F. Comprehensive human adipose tissue mRNA and microRNA endogenous control selection for quantitative real-time-PCR normalization. *Obesity (Silver Spring)* 2011;19:888-92.
281. Mittendorfer B. Sexual dimorphism in human lipid metabolism. *The Journal of nutrition* 2005;135:681-6.

282. Deboer MD. Ethnicity, obesity and the metabolic syndrome: implications on assessing risk and targeting intervention. *Expert review of endocrinology & metabolism* 2011;6:279-89.
283. Hanks LJ, Tanner RM, Muntner P, *et al.* Metabolic subtypes and risk of mortality in normal weight, overweight, and obese individuals with CKD. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2013;8:2064-71.
284. Bonfrate L, Wang DQ, Garruti G, Portincasa P. Obesity and the risk and prognosis of gallstone disease and pancreatitis. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 2014;28:623-35.
285. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of biomolecular techniques : JBT* 2004;15:155-66.
286. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols* 2006;1:1559-82.
287. Mutch DM, Tordjman J, Pelloux V, *et al.* Needle and surgical biopsy techniques differentially affect adipose tissue gene expression profiles. *Am J Clin Nutr* 2009;89:51-7.
288. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental hematology* 2002;30:503-12.
289. Hilscher C, Vahrson W, Dittmer DP. Faster quantitative real-time PCR protocols may lose sensitivity and show increased variability. *Nucleic Acids Res* 2005;33:e182.
290. Bustin SA, Benes V, Garson JA, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 2009;55:611-22.
291. Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, *et al.* Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical biochemistry* 2002;309:293-300.
292. Bas A, Forsberg G, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology* 2004;59:566-73.
293. Lamba V, Ghodke-Puranik Y, Guan W, Lamba JK. Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation. *BMC research notes* 2014;7:129.
294. Sewter C, Blows F, Considine R, Vidal-Puig A, O'Rahilly S. Differential effects of adiposity on peroxisomal proliferator-activated receptor gamma1 and gamma2 messenger ribonucleic acid expression in human adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4203-7.
295. Sung B, Park S, Yu BP, Chung HY. Modulation of PPAR in aging, inflammation, and calorie restriction. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 2004;59:997-1006.
296. Ulrich-Lai YM, Ryan KK. PPARgamma and stress: implications for aging. *Experimental gerontology* 2013;48:671-6.

297. Bastard JP, Hainque B, Dusserre E, *et al.* Peroxisome proliferator activated receptor-gamma, leptin and tumor necrosis factor-alpha mRNA expression during very low calorie diet in subcutaneous adipose tissue in obese women. *Diabetes Metab Res Rev* 1999;15:92-8.
298. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, *et al.* Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2007;116:39-48.
299. Dubois SG, Heilbronn LK, Smith SR, *et al.* Decreased expression of adipogenic genes in obese subjects with type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14:1543-52.
300. Yang YK, Chen M, Clements RH, Abrams GA, Aprahamian CJ, Harmon CM. Human mesenteric adipose tissue plays unique role versus subcutaneous and omental fat in obesity related diabetes. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2008;22:531-8.
301. Lelliott C, Vidal-Puig AJ. Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 2004;28 Suppl 4:S22-8.
302. Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:338-49.
303. Hallsten K, Virtanen KA, Lonnqvist F, *et al.* Enhancement of insulin-stimulated myocardial glucose uptake in patients with Type 2 diabetes treated with rosiglitazone. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 2004;21:1280-7.
304. Harrington WW, C SB, J GW, *et al.* The Effect of PPARalpha, PPARdelta, PPARgamma, and PPARpan Agonists on Body Weight, Body Mass, and Serum Lipid Profiles in Diet-Induced Obese AKR/J Mice. *PPAR Res* 2007;2007:97125.
305. Larsen TM, Toubro S, Astrup A. PPARgamma agonists in the treatment of type II diabetes: is increased fatness commensurate with long-term efficacy? *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 2003;27:147-61.
306. Arunachalam S, Tirupathi Pichiah PB, Achiraman S. Doxorubicin treatment inhibits PPARgamma and may induce lipotoxicity by mimicking a type 2 diabetes-like condition in rodent models. *FEBS letters* 2013;587:105-10.
307. Singh P, Peterson TE, Sert-Kuniyoshi FH, *et al.* Leptin signaling in adipose tissue: role in lipid accumulation and weight gain. *Circulation research* 2012;111:599-603.
308. Hollenberg AN, Susulic VS, Madura JP, *et al.* Functional antagonism between CCAAT/Enhancer binding protein-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on the leptin promoter. *J Biol Chem* 1997;272:5283-90.
309. Kim WK, Lee CY, Kang MS, *et al.* Effects of leptin on lipid metabolism and gene expression of differentiation-associated growth factors and transcription factors during differentiation and maturation of 3T3-L1 preadipocytes. *Endocrine journal* 2008;55:827-37.
310. Uno K, Katagiri H, Yamada T, *et al.* Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science* 2006;312:1656-9.

311. Kursawe R, Narayan D, Cali AM, *et al.* Downregulation of ADIPOQ and PPAR γ 2 gene expression in subcutaneous adipose tissue of obese adolescents with hepatic steatosis. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18:1911-7.
312. Kintscher U, Law RE. PPAR γ -mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2005;288:E287-91.
313. Garaulet M, Viguerie N, Porubsky S, *et al.* Adiponectin gene expression and plasma values in obese women during very-low-calorie diet. Relationship with cardiovascular risk factors and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:756-60.
314. Kawano Y, Ohta M, Hirashita T, Masuda T, Inomata M, Kitano S. Effects of sleeve gastrectomy on lipid metabolism in an obese diabetic rat model. *Obes Surg* 2013;23:1947-56.
315. Patel RT, Shukla AP, Ahn SM, Moreira M, Rubino F. Surgical control of obesity and diabetes: the role of intestinal vs. gastric mechanisms in the regulation of body weight and glucose homeostasis. *Obesity (Silver Spring)* 2014;22:159-69.
316. Dimitriadis E, Daskalakis M, Kampa M, Peppe A, Papadakis JA, Melissas J. Alterations in gut hormones after laparoscopic sleeve gastrectomy: a prospective clinical and laboratory investigational study. *Annals of surgery* 2013;257:647-54.
317. Havel PJ. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* 2004;53 Suppl 1:S143-51.
318. Wang MY, Orci L, Ravazzola M, Unger RH. Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: implications for treatment of human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:18011-6.
319. Pardina E, Ferrer R, Baena-Fustegueras JA, *et al.* The relationships between IGF-1 and CRP, NO, leptin, and adiponectin during weight loss in the morbidly obese. *Obes Surg* 2010;20:623-32.
320. Knerr I, Herzog D, Rauh M, Rascher W, Horbach T. Leptin and ghrelin expression in adipose tissues and serum levels in gastric banding patients. *European journal of clinical investigation* 2006;36:389-94.
321. Seaman DR. Weight gain as a consequence of living a modern lifestyle: a discussion of barriers to effective weight control and how to overcome them. *Journal of chiropractic humanities* 2013;20:27-35.
322. Still CD, Wood GC, Chu X, *et al.* Clinical factors associated with weight loss outcomes after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Obesity (Silver Spring)* 2014;22:888-94.
323. Kang B-Y, Park KK, Tan F, *et al.* Hemin-Induced miR-27a Reduces PPAR {gamma} Expression in Sickle Cell Disease with Pulmonary Hypertension. *The FASEB Journal* 2013;27:724.2.
324. Nishi H, Ono K, Horie T, *et al.* MicroRNA-27a regulates beta cardiac myosin heavy chain gene expression by targeting thyroid hormone receptor beta1 in neonatal rat ventricular myocytes. *Mol Cell Biol* 2011;31:744-55.

325. Erion MD, Cable EE, Ito BR, *et al.* Targeting thyroid hormone receptor-beta agonists to the liver reduces cholesterol and triglycerides and improves the therapeutic index. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:15490-5.
326. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* 2008;77:289-312.
327. van Beekum O, Fleskens V, Kalkhoven E. Posttranslational modifications of PPAR-gamma: fine-tuning the metabolic master regulator. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:213-9.
328. Auwerx J. PPARgamma, the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 1999;42:1033-49.
329. Nissen SE, Wolski K. Rosiglitazone revisited: an updated meta-analysis of risk for myocardial infarction and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 2010;170:1191-201.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Datos de los pacientes obesos incluidos en nuestro estudio. N°: número de identificación del paciente en el estudio. ID muestra: número de identificación de las muestras en la colección de muestras biológicas. Edad: edad del paciente en el momento de recoger las muestras. Sexo: (H: hombre; M: mujer). Peso: peso del paciente en el momento de recoger las muestras. IMC: índice de masa corporal del paciente en el momento de recoger las muestras. Peso 1a: peso del paciente al año de la cirugía bariátrica. IMC 1a: índice de masa corporal del paciente al año de la cirugía bariátrica. Diabetes: presencia de diabetes mellitus. El incremento relativo del ARNm se normalizó con actina. El incremento relativo del micro-ARN se normalizó con miR-103a.

N°	ID	Edad	Sexo	Peso	IMC	Peso 1a	IMC 1a	Diabetes	Incremento relativo de ARNm y micro-ARN							
									Grasa visceral				Grasa subcutánea			
									PPAR - γ 1	PPAR - γ 2	miR-27a	miR-27b	PPAR - γ 1	PPAR - γ 2	miR-27a	miR-27b
1	22531	44	M	147	60,4	98	40,3	Sí	0,58	0,02	1,50	6,71	1,36	0,88	0,50	1,37
2	22538	32	M	120	45,2	72	27,1	No	0,32	0,87	0,85	2,04	0,53	0,10	1,56	0,00
3	22565	61	M	108	40,2	70	26,0	No	2,16	1,24	1,14	3,67	0,03	0,07	0,93	2,17
4	22571	21	M	118	41,3	74	25,9	No	4,27	3,61	0,83	8,28	0,13	0,05	1,88	1,44
5	22669	60	M	126,5	52,7	86	35,8	No	0,11	1,57	0,93	8,35	0,54	0,04	0,54	0,25
6	22837	31	M	136	49,4	90	32,7	No	0,10	0,37	0,51	1,00	0,44	0,01	0,22	0,32
7	22841	35	M	130,6	46,8	98	35,1	No	1,21	3,18	1,95	1,25	0,15	0,07	0,34	1,12
8	22907	44	H	135	50,8	72	27,1	No	1,08	0,53	0,91	0,69	0,22	0,02	2,47	3,32
9	22981	53	M	130	53,4	99	40,7	No	4,86	0,36	0,83	0,54	1,27	2,03	0,25	0,44
10	23203	48	M	140	53,4	95,5	36,4	No	1,53	4,45	0,52	0,99	3,13	0,83	3,31	4,27
11	23245	43	H	120	41,0	91	31,1	No	4,40	1,75	1,46	1,56	0,03	0,06	1,51	4,68
12	23244	49	H	140	44,2	-	-	Sí	0,97	0,27	2,25	1,86	0,82	3,24	0,94	2,84
13	23425	52	M	137	43,7	106	33,8	No	2,56	0,81	2,22	1,46	2,33	7,60	0,89	0,11
14	23569	52	H	141,6	52,0	108	39,7	No	0,35	1,04	1,02	1,21	3,19	10,59	0,61	1,84
15	23740	50	H	147	49,7	75	25,4	Sí	0,24	0,27	0,79	0,89	0,32	2,08	1,95	0,24
16	23741	26	M	118	44,4	90	33,9	No	1,84	0,18	0,66	0,63	3,51	2,35	0,57	0,17
17	23992	33	M	100,6	40,8	70	28,4	No	2,84	1,52	1,04	4,99	0,43	8,16	1,60	0,36
18	24536	19	H	155	56,9	-	-	No	0,51	1,21	1,37	0,22	1,83	0,71	1,74	4,18
19	24611	47	M	105	43,2	74	30,4	Sí	0,80	1,04	1,05	0,47	3,60	6,16	1,61	1,73
20	24656	56	M	136,5	55,4	88	35,7	No	0,10	0,04	0,72	0,65	0,67	10,94	1,06	0,65
21	25414	51	M	177	69,1	121	47,3	No	0,56	2,72	0,68	0,63	1,34	3,49	0,26	0,38
22	25052	55	M	142,5	57,8	102	41,4	No	0,34	0,39	0,36	1,31	1,60	1,78	2,22	0,61
23	24875	55	M	115	44,4	62	23,9	No	0,03	2,28	0,91	0,43	1,35	2,04	2,06	0,84
24	25525	53	M	115	47,9	-	-	No	0,49	1,70	0,80	0,70	0,12	0,70	0,87	3,26

25	26196	34	M	109	42,1	73	28,2	No	0,06	0,18	0,41	1,02	1,01	7,07	1,50	0,69
26	26337	33	M	139,5	57,3	73	30,0	No	0,23	0,69	0,53	1,11	0,55	0,04	0,29	0,50
27	26381	47	M	145	58,8	94	38,1	No	0,50	1,26	3,00	5,35	0,65	1,69	1,49	5,16
28	26634	43	M	134,5	48,2	88,2	31,6	Sí	0,80	0,75	2,74	2,98	0,41	7,64	0,72	1,74
29	26660	39	M	133,1	54,0	83	33,7	Sí	0,27	0,29	0,07	5,65	0,68	8,33	0,57	2,12
30	27083	42	M	112,6	46,9	-	-	No	1,33	0,68	1,41	2,73	0,07	3,05	0,40	0,64
31	27193	58	M	112,8	46,4	64	26,3	No	1,63	0,11	0,06	1,34	0,01	0,29	0,49	0,68
32	27354	29	M	128	56,9	-	-	No	1,37	0,64	0,54	2,26	0,24	3,26	1,08	1,75
33	27715	65	M	162	56,1	118	40,8	Sí	2,39	1,06	2,75	2,89	0,11	7,90	1,03	0,19
34	27797	44	M	95	40,1	52,5	22,1	No	1,18	1,57	1,99	3,43	0,13	2,24	1,93	1,15
35	22834	29	H	225	68,7	-	-	No	0,97	1,38	2,57	6,75	0,57	2,18	1,41	4,21
36	28166	53	M	118	43,3	86	31,6	No	2,87	0,52	1,95	2,94	0,73	0,01	0,61	0,37
37	28304	43	M	99	38,7	-	-	No	1,57	3,25	1,05	0,73	0,42	6,42	1,11	1,79
38	28403	38	H	113	43,1	80	30,5	No	0,29	0,29	0,18	0,28	0,63	4,46	0,44	1,19
39	28504	75	M	120	48,1	-	-	Sí	1,56	1,55	0,36	2,28	3,04	1,02	0,39	2,08
40	28549	39	M	120	42,5	-	-	No	4,27	3,66	0,39	1,15	0,87	4,22	0,03	0,55
41	29052	64	M	100	45,0	-	-	No	3,86	0,28	0,81	1,04	0,52	0,11	0,06	1,96
42	29220	60	H	142	48,0	-	-	No	0,04	0,16	0,68	1,26	3,36	4,48	0,19	3,62
43	29330	41	M	154	56,6	-	-	No	0,26	0,79	3,55	4,25	2,58	7,27	0,22	2,94

- No se disponía del valor del peso ni del IMC al año de la cirugía bariátrica.

Anexo 2. Datos de los controles no obesos incluidos en nuestro estudio. N°: número de identificación del control en el estudio. ID muestra: número de identificación de las muestras en la colección de muestras biológicas. Edad: edad del control en el momento de recoger las muestras. Sexo: (H: hombre; M: mujer). Peso: peso del control en el momento de recoger las muestras. IMC: índice de masa corporal del control en el momento de recoger las muestras. Diabetes: presencia de diabetes mellitus. El incremento relativo del ARNm se normalizó con actina. El incremento relativo del micro-ARN se normalizó con miR-103a.

N°	ID	Edad	Sexo	Peso	IMC	Diabetes	Incremento relativo de ARNm y micro-ARN							
							Grasa visceral				Grasa subcutánea			
							PPAR- γ 1	PPAR- γ 2	miR-27a	miR-27b	PPAR- γ 1	PPAR- γ 2	miR-27a	miR-27b
	23003	80	H	67	25,9	No	1,03	0,12	2,53	1,66	0,13	0,11	1,23	1,43
2	23074	71	M	60	24,0	Sí	2,33	4,53	2,16	1,38	1,23	3,81	0,72	0,90
3	23092	26	H	70	24,8	No	0,04	1,45	2,63	3,47	6,85	1,69	0,59	1,21
4	24440	41	M	51	21,5	No	3,36	4,96	2,58	1,77	0,72	0,13	1,83	1,03
5	25948	76	M	57,5	26,6	No	0,63	2,90	0,54	4,68	0,20	0,03	2,60	0,69
6	26540	35	M	66	26,4	No	0,63	0,16	0,16	0,03	2,41	0,68	1,89	0,46
7	26668	49	M	62,5	26,0	No	2,90	0,29	2,07	0,22	1,24	2,41	1,86	1,21
8	27522	54	M	64	24,7	No	1,84	3,39	3,20	3,25	0,16	1,52	4,87	1,67
9	27547	76	H	60	21,3	No	0,80	0,34	2,30	0,30	0,49	3,12	0,36	2,43
10	27697	46	M	75	24,5	No	1,53	0,78	0,32	0,31	4,07	2,93	0,46	0,22
11	27840	63	M	59	25,9	No	3,21	4,59	2,25	2,20	0,84	2,06	0,42	0,83
12	28114	50	H	59,5	20,8	No	0,15	0,36	0,53	0,23	0,72	1,78	0,46	2,07
13	28138	76	H	71,6	27,0	No	0,11	0,49	0,69	0,52	0,75	1,53	0,27	0,13
14	28331	80	M	64	26,3	Sí	0,45	0,25	1,00	1,29	2,78	3,30	0,44	0,39
15	28337	39	M	55	21,5	No	5,19	3,97	0,58	1,78	1,25	0,46	3,11	2,68
16	28338	53	H	70	24,2	No	0,94	0,57	1,02	3,46	6,58	0,60	0,38	1,80
17	28704	60	H	85	25,4	No	1,18	1,01	0,31	0,76	0,74	2,14	1,08	2,21
18	28705	28	M	56	21,3	No	2,98	1,48	0,24	1,05	4,73	2,02	1,24	0,95
19	28746	43	H	78	25,5	No	3,30	3,22	1,79	3,98	0,19	0,69	4,08	2,15