



VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA

PROGRAMA DE  
DOCTORADO EN MEDICINA

**ESTUDIO DE NUEVOS MECANISMOS ANGIOGÉNICOS  
E INFLAMATORIOS ASOCIADOS A LA OBESIDAD**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

**Luisa María Hueso Soler**

Dirigida por:

**Laura Piqueras Ruiz**

**María Jesús Sanz Ferrando**

**José Tomás Real Collado**

Valencia, febrero 2023



**INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS**

**Director (es) / Codirector (es):**

- 1.- Apellidos y nombre: **Piqueras Ruiz Laura** N.I.F. 73559637W  
Departamento/Instituto: Farmacología Centro: Universidad de Valencia
- 2.- Apellidos y nombre: **Sanz Ferrando María Jesús** N.I.F. 24326571T  
Departamento/Instituto: Farmacología Centro: Universidad de Valencia
- 3.- Apellidos y nombre: **Real Collado José Tomás** N.I.F. 24329722T  
Departamento/Instituto: Medicina Centro: Universidad de Valencia

**Tutor o tutora (si procede)**

- Apellidos y nombre: **Sanz Ferrando María Jesús** N.I.F. 24326571T  
Departamento/Instituto: Farmacología Centro: Universidad de Valencia

Directores/as y tutor/a, respectivamente, de la tesis doctoral: “**Estudio de nuevos mecanismos angiogénicos e inflamatorios asociados a la obesidad**” de D/Dña. **Luisa María Hueso Soler** estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina (RD99/2011)** en Medicina de la Universitat de València, emiten informe **FAVORABLE** para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 19/01/2023

Fdo.: Laura Piqueras

LAURA|  
PIQUER|  
AS|  
RUIZ|  
Firmado digitalmente por LAURA| PIQUERAS|RUIZ  
Fecha: 2023.01.19 14:11:30 +01'00'

Directora

Fdo.: María Jesús Sanz

MARIA|  
JESUS|  
SANZ|  
FERRANDO|  
Firmado digitalmente por MARIA JESUS| SANZ|FERRANDO  
Fecha: 2023.01.19 14:06:36 +01'00'

Directora y tutora

Fdo.: José Tomás Real

JOSE|  
TOMAS|  
REAL|  
COLLADO|  
Firmado digitalmente por JOSE TOMAS| REAL|COLLADO  
Fecha: 2023.02.01 13:39:06 +01'00'

Director

**ESCUELA DOCTORAL**

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**



**La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por las siguientes ayudas económicas:**

**Proyectos:**

- **Título del proyecto:** Estudio de nuevos ejes de quimiocinas como potenciales dianas de intervención en la obesidad y la resistencia a la insulina.  
**Entidad financiadora:** Instituto de Salud Carlos III/ cofinanciado Fondos FEDER (PI21/00220).  
**Duración:** De enero 2022 hasta diciembre 2024.  
**Investigadores responsables:** Laura Piqueras Ruiz y José Tomas Real.
- **Título del proyecto:** Identificación de nuevos mecanismos implicados en la angiogénesis e inflamación en pacientes obesos. Modulación por ligandos de receptores nucleares constitutivos de androstano.  
**Entidad financiadora:** Instituto de Salud Carlos III (PI18/00209).  
**Duración:** De enero 2019 hasta diciembre 2021.  
**Investigadores responsables:** Laura Piqueras Ruiz y José Tomas Real.
- **Título del proyecto:** Estudio de nuevos mecanismos inflamatorios y angiogénicos asociados a la obesidad grave mórbida; Papel del eje CXCR3 y los receptores nucleares ROR.  
**Entidad financiadora:** Instituto de Salud Carlos III (PI15/00082).  
**Duración:** De enero 2016 hasta diciembre 2018.  
**Investigadores responsables:** Laura Piqueras Ruiz y José Tomas Real
- **Título del proyecto:** Efecto de la cirugía bariátrica en la inflamación vascular en pacientes con obesidad mórbida y diabéticos.  
**Entidad financiadora:** Generalitat Valenciana (AICO/2019/250).  
**Duración:** De enero 2019 hasta diciembre 2020.  
**Investigadora responsable:** Laura Piqueras Ruiz

- **Título del proyecto:** Estudio de nuevos mecanismos inflamatorios asociados a la obesidad mórbida. Modulación por la cirugía bariátrica.  
**Entidad financiadora:** Generalitat Valenciana (CDEI-04/20A).  
**Duración:** De enero 2020 hasta diciembre 2024.  
**Investigadora responsable:** Laura Piqueras Ruiz
- **Título del proyecto:** Modulación Inmunofarmacológica de la Inflamación Sistémica asociada a Desórdenes Metabólicos. Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y síntesis de fármacos novedosos.  
**Entidad financiadora:** Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2014- 57845-R).  
**Duración:** De enero 2015 hasta junio 2018.  
**Investigadores responsables:** María Jesús Sanz Ferrando y Juan Francisco Ascaso Gimilio.
- **Título del proyecto:** Modulación farmacológica del sistema inmune como diana clave en la prevención de la enfermedad cardiovascular asociada a desórdenes metabólicos. Síntesis de fármacos novedosos.  
**Entidad financiadora:** Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2017- 89714-R).  
**Duración:** De julio 2018 hasta diciembre 2020.  
**Investigadores responsables:** María Jesús Sanz Ferrando y Juan Francisco Ascaso Gimilio.

#### **Becas:**

- Título de la beca: Beca predoctoral de formación en investigación en salud (PFIS). Expediente FI19/00033.  
Convocatoria: (2019, ISCIII), Acción Estratégica en Salud 2017 - 2020  
**Entidad financiadora:** Instituto de Salud Carlos III  
**Duración:** De enero 2020 hasta diciembre 2023.

**A lo largo de la presente Tesis Doctoral se han obtenido las siguientes publicaciones:**

- **Hueso L.†**, Marques P.†, Morant B.†, González-Navarro H., Ortega J., Real J.T., Sanz M.J., Piqueras L. (2023). CCL17 and CCL22 chemokines are upregulated in human obesity and play a role in vascular dysfunction. [Manuscrito presentado para su publicación.](#)
- Moreno B. †, **Hueso L. †**, Ortega R., Benito E., Martínez-Hervas S., Peiro M., Civera M., Sanz M. J., Piqueras L., & Real J. T. (2022). Association of chemokines IP-10/CXCL10 and I-TAC/CXCL11 with insulin resistance and enhance leukocyte endothelial arrest in obesity. *Microvascular research*, 139, 104254. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2021.104254>
- López-Riera M., Ortega R., **Hueso L.**, Montesinos M. C., Gomez-Cabrera M. C., Sanz M. J., Real J. T., & Piqueras L. (2021). Activation of the Constitutive Androstane Receptor Inhibits Leukocyte Adhesiveness to Dysfunctional Endothelium. *International journal of molecular sciences*, 22(17), 9267. <https://doi.org/10.3390/ijms22179267>
- Ortega R. †, **Hueso L. †**, Benito E., Ortega J., Civera M., Sanz M. J., Real J. T., & Piqueras L. (2021). The nuclear retinoid-related orphan receptor ROR $\alpha$  controls adipose tissue inflammation in patients with morbid obesity and diabetes. *International journal of obesity* 45(7), 1369–1381. <https://doi.org/10.1038/s41366-021-00787-5>
- Ríos-Navarro C. †, **Hueso L. †**, Díaz A., Marcos-Garcés V., Bonanad C., Ruiz-Sauri A., Vila J. M., Sanz M. J., Chorro F. J., Piqueras L., & Bodi V. (2021). Role of antiangiogenic VEGF-A<sub>165</sub>b in angiogenesis and systolic function after reperfused myocardial infarction. *Revista española de cardiología (English ed.)*, 74(2),131–139. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2020.03.013>
- **Hueso L. †**, Ortega R. †, Selles F., Wu-Xiong N. Y., Ortega J., Civera M., Ascaso J. F., Sanz M. J., Real J. T., & Piqueras L. (2018). Upregulation of angiostatic chemokines IP-10/CXCL10 and I-TAC/CXCL11 in human obesity and their implication for adipose tissue angiogenesis. *International journal of obesity*, 42(8),1406–1417. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0102-5>

† Estos autores han contribuido igualmente a este trabajo como primeros autores.





*Para Jordi, mis padres Gonzalo y Luisa,  
y mi hermana Elena ♡*



# Agradecimientos

*Una vez acabada la escritura de la Tesis Doctoral, lo primero que me ha venido a la mente ha sido el apoyo incondicional de muchas personas sin las cuales esta Tesis no hubiese sido posible y por lo tanto me gustaría dedicarles unas breves palabras de gratitud.*

*En primer lugar, me gustaría agradecer a los directores de mi Tesis Doctoral, las Dras. Laura Piqueras, María Jesús Sanz y al Dr. José T. Real por haberme dado la gran oportunidad de realizar este trabajo dejándome formar parte de su equipo de investigación en el Dpto. de Farmacología, depositando su confianza en mí y permitiéndome crecer tanto como persona, como profesionalmente. En especial, quería agradecer a la Dra. Laura Piqueras por su dedicación, disciplina, perfección en el trabajo y el rigor científico, y también por compartir conmigo todo su conocimiento, gracias a su enseñanza esta Tesis y la larga lista de publicaciones y congresos han sido posibles.*

*Mi gran agradecimiento también a mis compañeros de laboratorio, Rebeca, Elena, Paqui, Mireia, Vera y Patrice, con los cuales he compartido bancada y hemos trabajado mano a mano todos los días durante años, gracias por vuestro compañerismo por hacerme la investigación tan llevadera, gracias por la música, los almuerzos y las quedadas. También agradecer mis compañeros de Burjassot: Nuria, Laura y Carlos. Gracias a todos por vuestro compañerismo, vuestra alegría y gran ayuda cuando lo he necesitado.*

*También quisiera agradecer a el Dr. Yihai Cao y a mis compañeros de laboratorio y de piso en Estocolmo, por su gran acogida. Gracias Kayoko, Taka, Mirko, Xin, Mei, Jade, Kristian, Maryam y Sandra.*

*A mis amigas de siempre, mis "Kuiiwii's", Bea, Elena y Sofía, muchas gracias por los buenos momentos y por estar siempre escuchándome y apoyándome. A mis "Alturanas", Paula, Vero y Marta, por hacerme la vida mucho más divertida. Y a mis grandes amigas Elisa y Elvira que desde que nos hemos cruzado en el camino hemos sido inseparables, a pesar de la distancia, gracias.*

*Para ir acabando, quisiera agradecer a mi familia. A mis padres Luisa y Gonzalo, por haberme apoyado siempre en todos los aspectos de mi vida y de mi carrera, por sus enseñanzas, consejos, confianza y cariño, pero sobre todo por creer en mí desde que era pequeña. A mi hermana Elena por su cariño, consejos y su inspirador ejemplo de constancia y perseverancia en cualquier tema que se proponga.*

*Y por último a mi compañero de vida, mi marido Jordi. Gracias por el amor incondicional y por hacerme la vida tan fácil a tu lado. Te quiero.*

*Muchas gracias a todos, de corazón.*

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>19</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>29</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>35</b>
<b>1.1. La Obesidad</b> .....	<b>37</b>
<b>1.1.1</b> Definición y epidemiología.....	37
<b>1.1.2</b> Diagnóstico y parámetros clínicos: índice de masa corporal (IMC), diámetro abdominal y resistencia a la insulina .....	40
<b>1.1.3</b> Tratamiento para la obesidad .....	41
<b>1.1.3.1</b> Modificaciones en el estilo de vida y tratamiento farmacológico.....	41
<b>1.1.3.2</b> Cirugía bariátrica .....	43
<b>1.2. La inflamación</b> .....	<b>44</b>
<b>1.2.1</b> El proceso inflamatorio: cascada de reclutamiento leucocitario	46
<b>1.2.1.1</b> Rodamiento de leucocitos .....	48
<b>1.2.1.2</b> Activación de leucocitos .....	49
<b>1.2.1.2.1</b> Las citocinas .....	49
<b>1.2.1.2.2</b> Las quimiocinas .....	49
<b>1.2.1.2.3</b> Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ .....	51
<b>1.2.1.3</b> Adhesión firme de leucocitos .....	52
<b>1.2.1.4</b> Transmigración de leucocitos .....	52
<b>1.3. La angiogénesis</b> .....	<b>53</b>
<b>1.3.1</b> Etapas de la angiogénesis .....	54
<b>1.3.2</b> Uniones endoteliales .....	55

<b>1.4. El tejido adiposo .....</b>	<b>57</b>
<b>1.4.1</b> Clasificación y funciones .....	57
<b>1.4.2</b> Expansión y remodelado del tejido adiposo en la obesidad .....	60
<b>1.4.3</b> Disfunción del tejido adiposo y obesidad .....	61
<b>1.4.3.1</b> Hipoxia y angiogénesis disfuncional en la obesidad .....	63
<b>1.4.3.2</b> El fenotipo del tejido adiposo blanco .....	64
<b>1.4.3.2.1</b> Fenotipo antiinflamatorio .....	67
<b>1.4.3.2.2</b> Fenotipo proinflamatorio en la obesidad.....	68
<b>1.4.3.3</b> Disfunción endotelial.....	69
<b>1.4.4</b> Diferencias entre SAT y VAT en el riesgo cardiometabólico asociado a la obesidad .....	71
<b>1.4.5</b> Vías de señalización implicadas en la disfunción del TA.....	71
<b>1.5. Ejes de quimiocinas estudiados en la presente Tesis Doctoral .....</b>	<b>74</b>
<b>1.5.1</b> El eje CXCL9/CXCL10/CXCL11 - CXCR3.....	74
<b>1.5.2</b> El eje CCL17/CCL22 - CCR4.....	77

**2. OBJETIVOS 81**

**3. MATERIALES Y MÉTODOS 85**

<b>3.1. Materiales y métodos del primer estudio:</b>	
<b>Implicación del eje CXCL10/CXCL11-CXCR3 en la angiogénesis y la inflamación del tejido adiposo en pacientes con obesidad mórbida.</b>	<b>87</b>
<b>3.1.1</b> Estudio poblacional.....	87
<b>3.1.2</b> Obtención de las muestras de TA durante la cirugía bariátrica...	89
<b>3.1.3</b> Cuantificación de los niveles plasmáticos de las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 .....	90
<b>3.1.4</b> Estudio de la expresión de ARNm de las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 y del receptor CXCR3 .....	90
<b>3.1.4.1</b> Extracción del ARNm de SAT y VAT .....	91
<b>3.1.4.2</b> Transcripción reversa (RT) del ARNm .....	91
<b>3.1.4.3</b> Análisis por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).....	92

<b>3.1.5</b>	Estudio de la expresión del receptor CXCR3 en el TA mediante Western Blot.....	94
<b>3.1.5.1</b>	Extracción y cuantificación proteica .....	94
<b>3.1.5.2</b>	Análisis por Western Blot .....	94
<b>3.1.6</b>	Análisis histológico de SAT y VAT.....	97
<b>3.1.6.1</b>	Preparación de los cortes histológicos del TA.....	97
<b>3.1.6.2</b>	Desparafinación de los cortes histológicos.....	97
<b>3.1.6.3</b>	Determinación de la infiltración linfocitaria (CD3) y la vascularización (CD31) del TA mediante inmunohistoquímica.....	97
<b>3.1.6.4</b>	Expresión de las quimiocinas CXCL10 y CXCL11 y de su receptor CXCR3 en el TA mediante estudios de inmunofluorescencia .....	99
<b>3.1.7</b>	Cultivos de explantes de TA.....	100
<b>3.1.7.1</b>	Cuantificación in vitro de la angiogénesis en los explantes de TA.....	100
<b>3.1.7.2</b>	Análisis de la expresión de CXCR3 y CXCR3B en los cultivos de explantes de VAT y SAT.....	101
<b>3.1.7.3</b>	Estudio del efecto de la neutralización del receptor CXCR3 sobre la angiogénesis en los explantes de TA.....	101
<b>3.1.7.4</b>	Estudio de la fosforilación y activación de la vía p38 MAPK en el TA .....	102
<b>3.1.7.5</b>	Estudio del efecto de la neutralización del receptor CXCR3 en la activación de la vía de señalización p38 MAPK en el TA .....	102
<b>3.2.</b>	<b>Materiales y métodos del segundo estudio:</b>	
	<b>Implicación del eje CCL17/CCL22-CCR4 en la disfunción endotelial en pacientes con obesidad mórbida.....</b>	<b>103</b>
<b>3.2.1</b>	Estudio poblacional.....	103
<b>3.2.2</b>	Cuantificación de los niveles plasmáticos de las quimiocinas CCL17 y CCL22 mediante ELISA.....	104
<b>3.2.3</b>	Estudio de la expresión de ARNm de las quimiocinas CCL17 y CCL22 y del receptor CCR4.....	104
<b>3.2.4</b>	Estudio de la expresión del receptor CCR4 en el TA .....	105

<b>3.2.5</b>	Análisis histológico del TA .....	106
<b>3.2.5.1</b>	Expresión del eje CCR4 por inmunofluorescencia en el TA .....	106
<b>3.2.6</b>	Cultivos de explantes de TA.....	108
<b>3.2.7</b>	Estudios con células aórticas endoteliales humanas (HAECs).....	108
<b>3.2.7.1</b>	Cultivos celulares.....	108
<b>3.2.7.2</b>	Expresión del receptor CCR4 por inmunofluorescencia en HAECs .....	108
<b>3.2.7.3</b>	Ensayo de proliferación endotelial .....	108
<b>3.2.7.4</b>	Análisis de la organización citoesquelética por inmunofluorescencia.....	110
<b>3.2.7.5</b>	Estudio de la expresión de CCR4 y de la fosforilación de p44/42 MAPK (ERK1/2) en HAECs mediante Western Blot..	111
<b>3.2.7.6</b>	Efecto de la neutralización de CCR4 en las interacciones leucocito-endotelio en condiciones dinámicas de flujo .....	112
<b>3.2.8</b>	Inmunofenotipado con citometría de flujo .....	114
<b>3.2.8.1</b>	Análisis de la activación de las plaquetas .....	116
<b>3.2.8.2</b>	Análisis de la expresión de CCR4 en las plaquetas .....	117
<b>3.2.8.3</b>	Análisis de las subpoblaciones leucocitarias circulantes: linfocitos T y monocitos.....	118
<b>3.3.</b>	<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>121</b>

## **4. RESULTADOS** **123**

<b>4.1. Resultados del primer estudio:</b>	
<b>Implicación del eje CXCL10/CXCL11-CXCR3 en la angiogénesis y la inflamación del TA en pacientes con obesidad mórbida .....</b>	<b>125</b>
<b>4.1.1</b> Los niveles circulantes de las quimiocinas CXCL10 y CXCL11 están elevados en pacientes con obesidad mórbida. ....	125
<b>4.1.2</b> La expresión de las quimiocinas CXCL10 y CXCL11 está aumentada en el VAT con respecto al SAT de los pacientes con obesidad mórbida. ....	129
<b>4.1.3</b> La expresión del receptor CXCR3 está aumentada en el VAT con respecto al SAT de los pacientes con obesidad mórbida. ....	132



4.1.4 El bloqueo del receptor CXCR3 mejora la angiogénesis en el tejido adiposo visceral de los pacientes con obesidad mórbida.....	134
4.1.5 CXCL10 y CXCL11 activan la vía de señalización p38 MAPK en el VAT de pacientes obesos.....	139
<b>4.2. Resultados del segundo estudio:</b>	
<b>Implicación del eje CCL17/CCL22-CCR4 en la disfunción endotelial en pacientes con obesidad mórbida.....</b>	<b>142</b>
4.2.1 Los niveles circulantes de quimiocinas CCL17 y CCL22 están aumentados en pacientes con obesidad mórbida .....	142
4.2.2 Los niveles circulantes de quimiocinas CCL17 y CCL22 se correlacionan positivamente con el IMC y el índice HOMA-IR.....	144
4.2.3 La expresión de las quimiocinas CCL17 y CCL22 está aumentada en el VAT de los pacientes con obesidad mórbida.....	146
4.2.4 La expresión del receptor CCR4 está aumentada en el VAT de los pacientes con obesidad mórbida.....	148
4.2.5 El bloqueo funcional del receptor CCR4 en las células endoteliales disminuye la adhesión leucocitaria inducida por TNF $\alpha$ en pacientes con obesidad mórbida.....	150
4.2.6 La neutralización del receptor CCR4 disminuye la proliferación inducida por el plasma de pacientes con obesidad mórbida.....	153
4.2.7 La activación de la vía de señalización ERK1/2 MAPK está aumentada el VAT de pacientes obesos en comparación con el SAT	156
4.2.8 Las quimiocinas CCL17 y CCL22 activan la vía de señalización ERK1/2 MAPK en las HAECs .....	157
4.2.9 El porcentaje de plaquetas circulantes, la activación plaquetaria y la expresión de CCR4 en plaquetas está aumentada en pacientes con obesidad mórbida .....	159
4.2.10 Los linfocitos T colaboradores presentan una mayor activación y expresan mayores niveles del receptor CCR4 en pacientes con obesidad mórbida.....	161
4.2.11 El porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos Th1, Th17 y Treg es mayor en pacientes con obesidad mórbida, mientras que la subpoblación Th2 se encuentra disminuida.....	163

4.2.12 Las subpoblaciones de linfocitos Th1, Th2 y Treg presentan una mayor activación y expresan mayores niveles del receptor CCR4 en pacientes con obesidad mórbida.....	165
4.2.13 Los monocitos presentan una mayor activación y expresan mayores niveles del receptor CCR4 en pacientes con obesidad mórbida .....	166
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>169</b>
5.1. Discusión del primer estudio: Implicación del eje CXCL10/CXCL11-CXCR3 en la angiogénesis y la inflamación del tejido adiposo en pacientes con obesidad mórbida.	171
5.2. Discusión del segundo estudio: Implicación del eje CCL17/CCL22-CCR4 en la disfunción endotelial en pacientes con obesidad mórbida.....	177
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>185</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>189</b>
<b>ANEXO</b>	<b>213</b>
A1. Listado e histórico de tratamientos para la obesidad .....	215
A2. Listado de fármacos anti-obesidad en ensayo clínico .....	217

# Abreviaturas

<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>APC</b>	Alofocianina
<b>APC-H7</b>	<i>Alofocianina conjugada en tándem con cianina</i>
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>BAT</b>	Tejido adiposo marrón
<b>BB</b>	Brilliant Blue™
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>BrdU</b>	5-bromo-2-desoxiuridina
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>BUV</b>	Brilliant Ultraviolet™
<b>BV</b>	Brilliant Violet™
<b>CAM</b>	Moléculas de adhesión celular
<b>CCL</b>	Ligando con motivo C-C
<b>CCL17/TARC</b>	Quimiocina regulada y activada del timo
<b>CCL22/MDC</b>	Quimiocina derivada de macrófagos
<b>CCR4</b>	Receptor 4 de quimiocinas con motivo C-C
<b>CD3</b>	Grupo de diferenciación 3
<b>CE</b>	Células endoteliales
<b>CKLF-1</b>	Factor similar a la quimiocina-1
<b>CXCL</b>	Ligando con motivo C-X-C
<b>CXCL10/IP-10</b>	Proteína 10 inducida por interferón gamma
<b>CXCL11/I-TAC</b>	Quimioatrayente de células T inducible por interferón gamma
<b>CXCL4/PF4</b>	Factor plaquetario 4
<b>CXCL9/MIG</b>	Monocina inducida por interferón gamma
<b>CXCR3</b>	Receptor 3 de quimiocinas con motivo C-X-C
<b>DAB</b>	3,3'- Diaminobencidina

<b>DMT2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>EBM-2</b>	Medio basal de células endoteliales-2
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento endotelial
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>ERK</b>	Quinasas reguladas por señales extracelulares
<b>ERK1/2</b>	Proteína quinasas activadas por mitógeno p44/42
<b>E-Sel</b>	E-selectina
<b>ESL-1</b>	Ligando-1 de E-selectina
<b>ESM</b>	Error estándar de la media
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FSC</b>	Dispersión frontal
<b>FT</b>	Factor de transcripción
<b>GLUT4</b>	Transportador de glucosa tipo 4
<b>GPCR</b>	Receptores acoplados a proteína G
<b>HAECs</b>	Células endoteliales humanas de aorta
<b>HBSS</b>	Solución salina equilibrada de Hanks
<b>HIF</b>	Factores inducibles por hipoxia
<b>HOMA-IR</b>	Modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina
<b>Hr</b>	Proteínas recombinantes humanas
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intercelular-1
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IL</b>	Interleucina
<b>ILC</b>	Células linfoides innatas
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>iNKT</b>	Células asesinas naturales invariantes
<b>IR</b>	Receptor de la insulina
<b>JAM</b>	Moléculas de adhesión de unión
<b>JNK</b>	Quinasas Jun amino terminales
<b>LFA-1</b>	Antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos
<b>MAC3</b>	Antígeno de macrófago-3

<b>MAPK</b>	Proteínas quinasas activadas mitógenos
<b>MCP-1</b>	Proteína quimioatrayente de monocitos
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MIF</b>	Media de intensidad de fluorescencia
<b>MMPs</b>	Metaloproteasas de matriz
<b>Mon 1</b>	Monocitos clásicos
<b>Mon 2</b>	Monocitos intermedios
<b>Mon 3</b>	Monocitos no clásicos
<b>N-cadherina</b>	Cadherina neural
<b>NIH</b>	Instituto Nacional de Salud
<b>NK</b>	Células asesinas naturales
<b>NKT</b>	Células T asesinas naturales
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PAI-1</b>	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PECAM-1</b>	Molécula de adhesión de células endoteliales y plaquetas 1 (o CD31).
<b>PE-Cy7</b>	Ficoeritrina conjugada en tándem con cianina
<b>PerCP</b>	Peridina-Clorofila
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>P-Sel</b>	P-selectina
<b>PSGL-1</b>	Ligando 1 de P-selectina
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
<b>RI</b>	Resistencia a la insulina
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT</b>	Transcripción reversa
<b>RYGB</b>	Bypass gástrico en Y de Roux
<b>SAT</b>	Tejido adiposo subcutáneo
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>SSC</b>	Dispersión lateral
<b>SVF</b>	Fracción estromal vascular

<b>TA</b>	Tejido adiposo
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>Th</b>	Linfocitos T colaboradores (T helper)
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral
<b>Treg</b>	Linfocitos T reguladores
<b>VAT</b>	Tejido adiposo visceral
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adhesión de células vasculares-1
<b>VE-cadherina</b>	Cadherina endotelial vascular
<b>VEGF</b>	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
<b>VLA-4</b>	Antígeno muy tardío-4
<b>WAT</b>	Tejido adiposo blanco
<b>WB</b>	Western Blot

# Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Mapa de porcentajes de población adulta con sobrepeso u obesidad .....	38
<b>Figura 2.</b> Principales comorbilidades asociadas a la obesidad .....	39
<b>Figura 3.</b> Diferentes procedimientos para la cirugía bariátrica. ....	43
<b>Figura 4.</b> Cascada de reclutamiento de leucocitos .....	47
<b>Figura 5.</b> Estructura de la familia de quimiocinas.....	50
<b>Figura 6.</b> Esquema del proceso de formación de nuevos vasos .....	56
<b>Figura 7.</b> Distribución y tipos de grasa corporal .....	58
<b>Figura 8.</b> Composición del tejido adiposo blanco (WAT) .....	59
<b>Figura 9.</b> Diferencias entre la expansión sana y patológica en el tejido adiposo blanco.....	62
<b>Figura 10.</b> Diferencias en el fenotipo de WAT con y sin obesidad .....	69
<b>Figura 11.</b> Disfunción endotelial en el tejido adiposo .....	70
<b>Figura 12.</b> Regulación del metabolismo celular por MAPK .....	73
<b>Figura 13.</b> Resumen esquemático del efecto de las quimiocinas CXCL9 – 11 sobre las isoformas CXCR3A y CXCR3B .....	76
<b>Figura 14.</b> Resumen esquemático sobre el efecto de las quimiocinas CCL17 y CCL22 mediante el receptor CCR4 .....	78
<b>Figura 15.</b> Resumen esquemático del estudio <sup>A</sup> .....	89
<b>Figura 16.</b> Resumen esquemático de los tratamientos utilizados en el ensayo de proliferación .....	110
<b>Figura 17.</b> Dibujo representativo de la cámara de flujo paralelo .....	114
<b>Figura 18.</b> Esquema ilustrativo del marcaje de células con fluorocromos y del citómetro de flujo. ....	115
<b>Figura 19.</b> Estrategia de selección de plaquetas humanas en sangre entera..	117
<b>Figura 20.</b> Estrategia de selección de linfocitos T (CD3+), CD4+ y CD8+ en sangre entera heparinizada .....	120
<b>Figura 21.</b> Cuantificación de los niveles de quimiocinas circulantes CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en pacientes obesos y controles.....	127
<b>Figura 22.</b> Gráficos correspondientes a las correlaciones obtenidas entre niveles plasmáticos de CXCL10 y CXCL11 con los parámetros antropométricos .....	128

<b>Figura 23.</b> Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de las quimiocinas.....	129
<b>Figura 24.</b> Análisis de la expresión de células endoteliales y linfocitos T. ....	130
<b>Figura 25.</b> Expresión de las quimiocinas CXCL10 y CXCL11 en de secciones de SAT y VAT de pacientes con obesidad. ....	131
<b>Figura 26.</b> Diferencias en la expresión del receptor CXCR3 en muestras pareadas de SAT y VAT de pacientes con obesidad mórbida .....	133
<b>Figura 27.</b> Expresión de los receptores CXCR3 y CXCR3B en secciones de SAT y VAT de pacientes con obesidad.....	134
<b>Figura 28.</b> El número total de brotes capilares fue menor en la grasa visceral de los pacientes obesos .....	135
<b>Figura 29.</b> Aumento de la expresión de las quimiocinas angiostáticas CCL10 y CCL11 en el secretoma de la grasa visceral de pacientes obesos .....	136
<b>Figura 30.</b> El tratamiento de VAT con los ligandos de CXCR3 disminuye la capacidad angiogénica de VAT de pacientes con obesidad mórbida.....	137
<b>Figura 31.</b> El bloqueo del receptor CXCR3 con un anticuerpo neutralizante aumenta la capacidad angiogénica del VAT de pacientes con obesidad mórbida .....	138
<b>Figura 32.</b> Inmunofluorescencia de los brotes capilares de VAT en Matrigel..	139
<b>Figura 33.</b> Activación de vía de señalización de p38 MAPK en el VAT de pacientes con obesidad mórbida.....	140
<b>Figura 34.</b> CXCL10 y CXCL11 a través del receptor CXCR3 activan la vía p38 MAPK en el tejido adiposo.....	141
<b>Figura 35.</b> Cuantificación de los niveles de quimiocinas circulantes CCL17 y CCL22 en pacientes obesos y controles sanos .....	144
<b>Figura 36.</b> Gráficos correspondientes a las correlaciones obtenidas entre niveles plasmáticos de CCL17 y CCL22 con los parámetros antropométricos .....	145
<b>Figura 37.</b> Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de las quimiocinas CCL17 y CCL22.....	146
<b>Figura 38.</b> Imágenes representativas de inmunofluorescencia que muestran la expresión de CCL17 y CCL22 en VAT.....	147
<b>Figura 39.</b> Aumento de la expresión de las quimiocinas CCL17 y CCL22 en el secretoma de los explantes de grasa visceral en pacientes obesos. ....	148
<b>Figura 40.</b> Diferencias en la expresión del receptor CCR4 en muestras pareadas del SAT y VAT de pacientes con obesidad mórbida. (a) .....	149



<b>Figura 41.</b> Imágenes representativas de inmunofluorescencia que muestran la expresión de CCR4 en VAT.....	150
<b>Figura 42.</b> El bloqueo ex vivo del receptor CCR4 disminuye la adhesión leucocito-endotelio inducida por TNF $\alpha$ en los pacientes obesos. ....	152
<b>Figura 43.</b> Efecto de las quimiocinas CCL17 y CCL22 sobre la proliferación de las células endoteliales .....	153
<b>Figura 44.</b> Efecto de las quimiocinas CCL17 y CCL22 sobre la organización de la cadherina endotelial vascular (VE-cadherina) y F-actina .....	154
<b>Figura 45.</b> La neutralización de CCR4 reduce la proliferación inducida por el suero de pacientes con obesidad mórbida .....	155
<b>Figura 46.</b> Imágenes representativas de inmunofluorescencia que muestran la remodelación celular de VE-cadherina y faloidina.....	156
<b>Figura 47.</b> Activación de fosfo-ERK1/2 MAPK en el VAT de pacientes con obesidad mórbida.....	157
<b>Figura 48.</b> CCL17 o CCL22 a través de la activación de CCR4 aumentan la fosforilación de ERK 1/2 en HAEC .....	158
<b>Figura 49.</b> El porcentaje de plaquetas, la activación plaquetaria y la expresión del receptor CCR4 es mayor en pacientes con obesidad. ....	160
<b>Figura 50.</b> El porcentaje de linfocitos CD4+, la activación linfocitaria y la expresión del receptor CCR4 es mayor en pacientes con obesidad .....	162
<b>Figura 51.</b> El porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos Th1, Th17 y Treg aumenta en pacientes con obesidad mórbida, mientras que la subpoblación Th2 disminuye .....	164
<b>Figura 52.</b> Las subpoblaciones de linfocitos Th1, Th2 y Treg están más activadas en pacientes con obesidad y expresan mayores niveles del receptor CCR4.....	165
<b>Figura 53.</b> Los monocitos están más activados en pacientes con obesidad y expresan en mayor porcentaje el receptor CCR4 .....	167

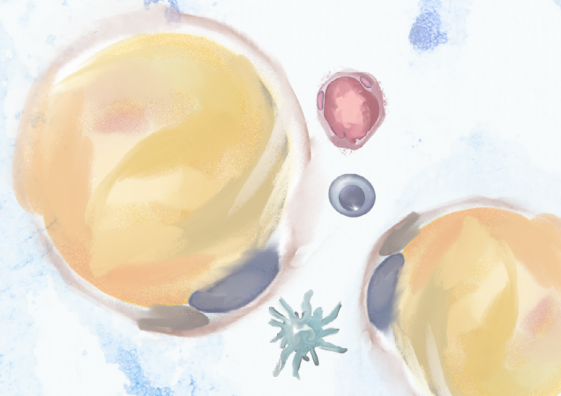


# LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de peso por IMC según la OMS y el riesgo de padecer patologías asociadas. ....	40
<b>Tabla 2.</b> Fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de la obesidad en 2022 .....	42
<b>Tabla 3.</b> Adipocinas secretadas por el TA, su función y expresión en la obesidad. ....	65
<b>Tabla 4.</b> Composición del Master Mix para la RT .....	91
<b>Tabla 5.</b> Programa de temperaturas para la RT. ....	92
<b>Tabla 6.</b> Reactivos de la PCR. ....	92
<b>Tabla 7.</b> Sondas empleadas en la qPCR .....	93
<b>Tabla 8.</b> Ciclos de temperaturas empleado para la qPCR. ....	93
<b>Tabla 9.</b> Composición de los tampones empleados en el Western Blot. ....	95
<b>Tabla 10.</b> Composición de los geles utilizados en el Western Blot. ....	95
<b>Tabla 11.</b> Anticuerpos empleados en el ensayo de Western Blot .....	96
<b>Tabla 12.</b> Anticuerpos utilizados en el análisis histológico .....	98
<b>Tabla 13.</b> Anticuerpos utilizados en el estudio de la vía p38 MAPK. ....	102
<b>Tabla 14.</b> Sondas Taqman® específicas para la qPCR.....	105
<b>Tabla 15.</b> Anticuerpos utilizados en el Western Blot de TA. ....	105
<b>Tabla 16.</b> Anticuerpos primarios utilizados en la inmunofluorescencia. ....	107
<b>Tabla 17.</b> Anticuerpos empleados en el estudio de la fosforilación de ERK 1/2. ....	112
<b>Tabla 18.</b> Anticuerpos empleados para detectar la activación plaquetaria.....	116
<b>Tabla 19.</b> Anticuerpos utilizados para detectar CCR4 en plaquetas. ....	117
<b>Tabla 20.</b> Anticuerpos utilizados para detectar CCR4 en las subpoblaciones de linfocitos. ....	118
<b>Tabla 21.</b> Anticuerpos utilizados para detectar CCR4 en monocitos. ....	119
<b>Tabla 22.</b> Características clínicas y bioquímicas de los pacientes con obesidad mórbida y los sujetos control. Los valores están expresados como la media $\pm$ ESM; * $p < 0,05$ vs controles.....	126
<b>Tabla 23.</b> Características clínicas y bioquímicas de los pacientes con obesidad mórbida y los sujetos controles no obesos. Los valores están expresados como la media $\pm$ ESM; * $p < 0,05$ vs controles. ....	143
<b>Tabla A1.</b> Histórico de tratamientos para la obesidad .....	215
<b>Tabla A2.</b> Listado de fármacos anti-obesidad en ensayo clínico .....	217



# RESUMEN





# Resumen

La obesidad es una enfermedad metabólica que se caracteriza por la acumulación excesiva de grasa acompañada de una inflamación crónica, leve y sistémica, debido a la elevada ingesta calórica, entre otros factores. Esta patología tiene varios grados y se diagnostica cuando los sujetos tienen un índice de masa corporal (IMC) mayor o igual a 30 kg/m<sup>2</sup>. Su prevalencia se ha triplicado a nivel mundial en los últimos 50 años y se ve afectada, aproximadamente, el 30% de la población mundial. Los mayores problemas de la obesidad son su alta mortalidad y el riesgo alto de desarrollar otras patologías asociadas como el síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2.

El tejido adiposo se ha reconocido como un órgano endocrino ya que las células que lo forman (los adipocitos y la fracción vascular estromal), contribuyen a la liberación de moléculas fisiológicamente activas, encargadas de regular funciones como la distribución de grasa, la secreción y sensibilidad a la insulina, el gasto energético, la función endotelial, la inflamación y la presión arterial. En la obesidad, el tejido adiposo, más concretamente, el tejido adiposo blanco, se expande de manera patológica (también conocido como remodelado del tejido adiposo), lo que conlleva a su disfunción, provocando inflamación, hipoxia, fibrosis, angiogénesis inadecuada, disfunción endotelial y aparición temprana de resistencia a la insulina.

Recientemente se ha estudiado que los ejes CXCL10/CXCL11-CXCR3 y CCL17/CCL22-CCR4, están implicados en enfermedades cardiometabólicas e inflamatorias. No obstante, no se conoce el papel que desempeñan en la obesidad. Por lo tanto, el objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido investigar la participación de los ejes CXCL10/CXCL11-CXCR3 y CCL17/CCL22-CCR4 en la

fisiopatología del tejido adiposo con la intención de comprender su papel en la obesidad humana.

Para ello, se determinaron los niveles circulantes de los ligandos de CXCR3 y CCR4 en el plasma de pacientes obesos y en sujetos control y su asociación con diferentes parámetros cardiometabólicos. Además, se realizó un inmunofenotipado de la sangre, para identificar las diferencias entre las poblaciones leucocitarias y la expresión del receptor CCR4, asimismo se estudió la adhesión leucocito-endotelio. Además, se extrajeron biopsias pareadas de tejido adiposo visceral y subcutáneo de pacientes con obesidad que fueron sometidos a una cirugía bariátrica y se evaluó la expresión y función de estos dos ejes en los explantes del tejido adiposo. Para completar estos estudios, se investigaron los efectos en la angiogénesis con el bloqueo funcional *ex vivo* del receptor CXCR3 en dichos explantes y en las células endoteliales.

Se observó que los niveles circulantes de los ligandos de CXCR3 y CCR4 estaban elevados en pacientes con obesidad mórbida y además se correlacionaban positivamente con el IMC, el índice HOMA de resistencia a la insulina y el diámetro de la cintura. También se detectó que la expresión de los dos ejes CXCR3 y CCR4 estaban aumentados en la grasa visceral en comparación con la subcutánea en pacientes con obesidad. Es más, la isoforma antiangiogénica CXCR3B también estaba sobreexpresada. Posteriormente se detectó una colocalización de los receptores CXCR3 y CCR4 en las células endoteliales, los linfocitos y los macrófagos.

En ensayos *ex vivo* con explantes de grasa, se observó que el bloqueo del receptor CXCR3/CXCR3B aumentaba la formación de brotes capilares en el tejido adiposo visceral de pacientes con obesidad y, en cambio, el tratamiento con proteína recombinante de CXCL10 y CXCL11 disminuía la formación de estos brotes angiogénicos. Posteriormente, se observó un aumento en la fosforilación basal de p38 MAPK en el tejido adiposo visceral de pacientes con obesidad mórbida, pero dicha fosforilación se redujo en presencia de un anticuerpo neutralizante frente a CXCR3.



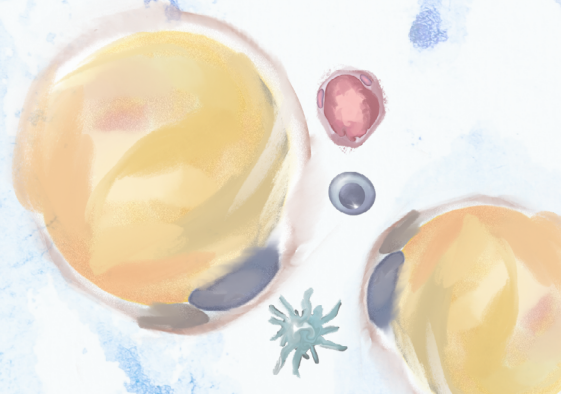
Por otro lado, mediante estudios con la cámara de flujo laminar se detectó que el bloqueo funcional *ex vivo* del receptor CCR4 en células endoteliales disminuía la adhesión leucocitaria inducida por TNF $\alpha$  en pacientes con obesidad mórbida. Asimismo, la neutralización del receptor CCR4 disminuyó la proliferación de las células endoteliales inducida por el plasma de pacientes con obesidad comparado con los controles.

Profundizando, se detectó un aumento de la fosforilación de la vía ERK1/2 en células endoteliales en presencia de las quimiocinas CCL17 y CCL22 que disminuyó cuando se bloqueó el receptor CCR4. Finalmente, los estudios de inmunofenotipado de la sangre de los pacientes con obesidad y de los controles mostró un aumento en el porcentaje de plaquetas, de linfocitos CD4+ y de las subpoblaciones Th1, Th17 y Treg en pacientes con obesidad mórbida en comparación con los controles. También se observó un incremento en la expresión del receptor CCR4 en las plaquetas, los monocitos y los linfocitos CD4+.

Por todo ello, la modulación farmacológica de la expresión y/o función de CXCR3, CCR4 y sus ligandos podría ser una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de las complicaciones cardiovasculares asociadas a la obesidad.



# 1. INTRODUCCIÓN





# 1. Introducción

## 1.1. La Obesidad

### 1.1.1 Definición y epidemiología

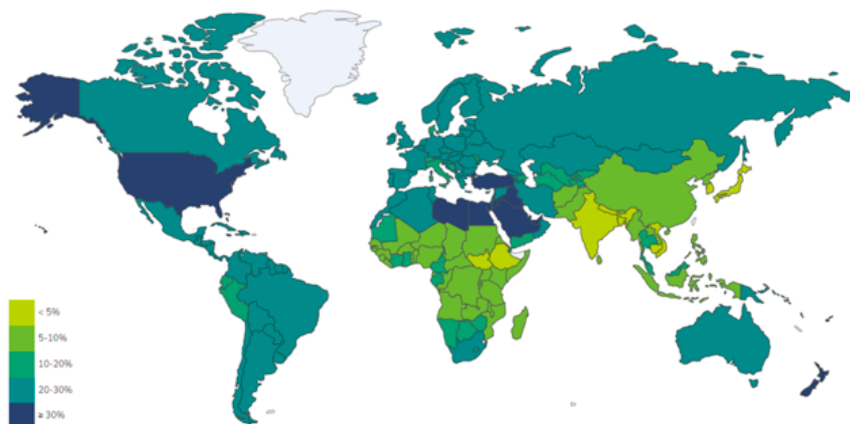
La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la obesidad como una acumulación excesiva de grasa que perjudica a la salud y que se diagnostica cuando los sujetos tienen un índice de masa corporal (IMC) mayor o igual a  $30 \text{ kg/m}^2$ . Esta patología está cada vez más estudiada y se conoce que es una enfermedad metabólica e inflamatoria que es multifactorial y muy compleja<sup>2</sup>.

La obesidad se debe principalmente al desequilibrio energético entre las calorías consumidas, es decir, la ingesta calórica y las calorías gastadas mediante actividad física y metabólica. El exceso de energía se convierte en triglicéridos que se almacenan posteriormente en el tejido adiposo (TA) y, en consecuencia, los adipocitos se expanden aumentando su número y también su tamaño<sup>3</sup>, esta expansión se conoce como remodelado del TA. Clínicamente podemos observar un aumento en el volumen de la grasa corporal y en el peso de los sujetos<sup>1</sup> pero estudios recientes demuestran que este aumento de peso se acompaña junto con el remodelado del TA de una inflamación crónica, leve y sistémica<sup>3-5</sup>.

Esta patología presenta unas tasas de morbilidad y mortalidad muy elevadas provocando aproximadamente 3 millones de muertes anuales en todo el mundo<sup>6</sup>. Las estadísticas más recientes indican que solamente en los últimos

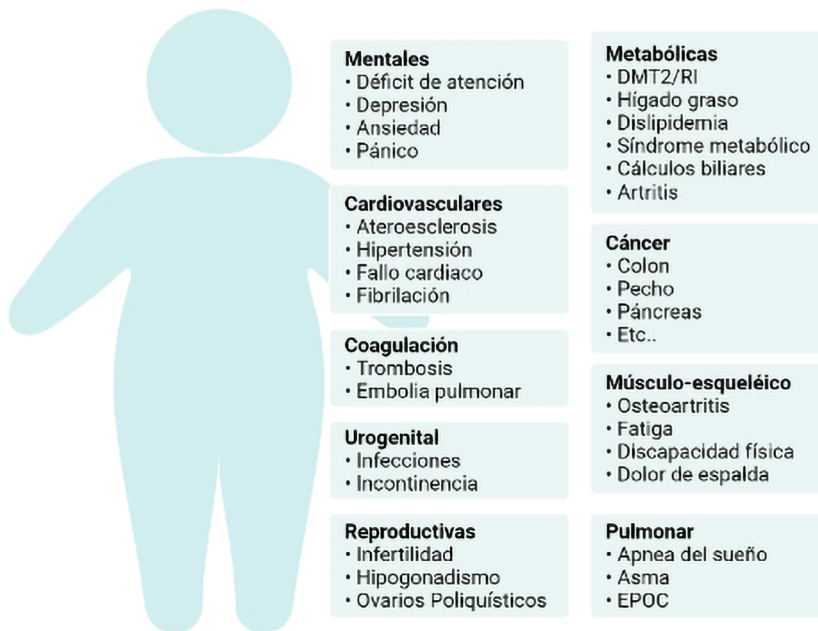
50 años la prevalencia de la obesidad y el sobrepeso se ha triplicado a nivel mundial y que alcanza a más de 2 mil millones de personas. Por lo tanto, está afectada aproximadamente el 30% de la población mundial y se considera pandémica. En España, la prevalencia del sobrepeso y la obesidad alcanza el 53% de la población adulta<sup>7</sup>. En la **Figura 1** se muestra un mapamundi donde se expone por países, el porcentaje de la población adulta con obesidad y sobrepeso<sup>8,9</sup>.

Existen factores muy diversos para el desarrollo de esta patología además de la ingesta dietética excesiva (consumo de energía) y de la disminución de la actividad física y metabólica (pérdida de energía), como los factores genéticos, fisiológicos, ambientales, psicológicos, económicos, sociales e incluso factores políticos que pueden promover su desarrollo<sup>10</sup>. En la mayoría de los casos, no hay un solo factor que sea el único responsable del desarrollo de la obesidad, sino que resulta de la combinación de estos factores y, además, pueden variar con el tiempo y entre individuos<sup>11</sup>.



**Figura 1.** Mapa de porcentajes de población adulta con sobrepeso u obesidad (actualizado 14/06/2021)<sup>9</sup>.

Uno de los mayores problemas de la obesidad son sus comorbilidades asociadas, ya que es un factor de riesgo muy alto para el desarrollo de otras patologías como las enfermedades cardiovasculares, por ejemplo, la hipertensión<sup>12</sup>, hiperlipidemia y el infarto de miocardio<sup>13</sup>, también de las enfermedades metabólicas, como por ejemplo la resistencia a la insulina (RI), la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y el síndrome metabólico<sup>14</sup>. Asimismo, es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer, por ejemplo, el de mama, ovario, próstata, hígado, riñón y colon<sup>15</sup>. En la **Figura 2** se exponen las principales comorbilidades asociadas a la obesidad<sup>16</sup>.



**Figura 2.** Principales comorbilidades asociadas a la obesidad <sup>15</sup>

## 1.1.2 Diagnóstico y parámetros clínicos: índice de masa corporal (IMC), diámetro abdominal y resistencia a la insulina

En la práctica clínica la obesidad se evalúa con el IMC, que se calcula dividiendo los kilogramos de peso por el cuadrado de la estatura en metros.  $IMC = peso (kg) / estatura (m^2)$ . La obesidad se diagnostica cuando los sujetos tienen un IMC mayor o igual a 30 kg/m<sup>2</sup> y, según el IMC calculado, la obesidad se divide en diferentes grados (Tabla 1). Se ha observado que existe una asociación positiva entre el aumento del IMC y el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y metabólicas, es decir, según el grado y la duración del aumento de peso, la obesidad puede causar y/o exacerbar algunas de las comorbilidades asociadas, no obstante, no todos los pacientes obesos pueden llegar a desarrollar estas complicaciones<sup>17</sup>.

**Tabla 1.** Clasificación de peso por IMC según la OMS y el riesgo de padecer patologías asociadas.

Clasificación	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Riesgo de comorbilidades
Peso bajo	<18,5	Aumentado
Normopeso	18,5–24,9	Bajo
Sobrepeso	25–29,9	Aumentado
<b>Obesidad</b>	<b>≥30</b>	
Grado I	30–34,9	Alto
Grado II	35–39,9	Muy alto
Grado III	40–49,9	Extremadamente Alto
Grado IV	50–59,9	Extremadamente Alto
Grado V	≥60	Extremadamente Alto

Los diferentes tipos de grasa y su distribución corporal son factores clave en el riesgo de desarrollar enfermedades cardiometabólicas como la RI. El tejido adiposo visceral es metabólicamente más activo y fundamentalmente es



el responsable del desarrollo dichas patologías por lo tanto, el IMC observado de manera aislada, es un biomarcador insuficiente para obtener el grado de adiposidad visceral abdominal, ya que se trata de un valor antropométrico que correlaciona la altura con el peso y no estima directamente la masa de tejido adiposo ni su distribución corporal<sup>17</sup>. La masa de tejido adiposo visceral es un determinante principal para el desarrollo síndrome metabólico y la diabetes<sup>18</sup>, esta relación no ocurre con otros tipos de grasa como la subcutánea.

Otro parámetro a tener en cuenta a la hora de determinar la obesidad, es el diámetro abdominal a la altura de la cintura, ya que es una medida indirecta del tejido adiposo visceral. Actualmente, la medida que da lugar a un aumento del riesgo vascular en Europa es de un diámetro abdominal de > 94 cm en hombres y > 80 cm en mujeres. Esta medida permite un mejor análisis del riesgo para la salud relacionado con la obesidad<sup>19</sup>. Por consiguiente, a la hora de evaluar el grado de obesidad, es de vital importancia tener en cuenta, a parte de los valores del IMC, la historia clínica y el examen físico del paciente para determinar el exceso de masa en el tejido adiposo visceral<sup>17</sup>.

## 1.1.3 Tratamiento para la obesidad

### 1.1.3.1 Modificaciones en el estilo de vida y tratamiento farmacológico

Los tratamientos para la obesidad incluyen modificaciones en el estilo de vida, farmacoterapia y procedimientos quirúrgicos bariátricos, cabe destacar que, aunque la pandemia mundial de la obesidad ha continuado sin cesar en las últimas dos décadas, se ha conseguido muy poco mediante el tratamiento farmacológico, especialmente en pacientes con obesidad severa.

Inicialmente se sugiere que los pacientes obesos pierdan al menos un 10% de su peso corporal a través de la combinación de cambio en la dieta, actividad física y terapia conductual (modificación del estilo de vida) ya que la pérdida de peso reduce significativamente los factores de riesgo cardiovascular, por ejemplo, presión arterial elevada, glucosa en sangre y lípidos<sup>20</sup>. La farmacoterapia se

recomienda posteriormente para aquellos pacientes obesos con un IMC  $\geq 30$  (o un IMC  $\geq 27$  con comorbilidades) y que no les ha sido posible perder peso modificando el estilo de vida.

Los medicamentos aprobados para el tratamiento de la obesidad que se están aplicando actualmente a nivel mundial se resumen en la **Tabla 2**<sup>21</sup>, son muy pocos ya que se han ido retirando fármacos a lo largo de los años al presentar efectos adversos graves. El histórico de tratamientos para la obesidad y en desarrollo clínico actual a nivel mundial se resumen las **Tablas A1 y A2**, en el **Anexo**<sup>16</sup>. No obstante, no todos están aprobados por la Agencia Europea del Medicamento para el tratamiento de la obesidad en España.

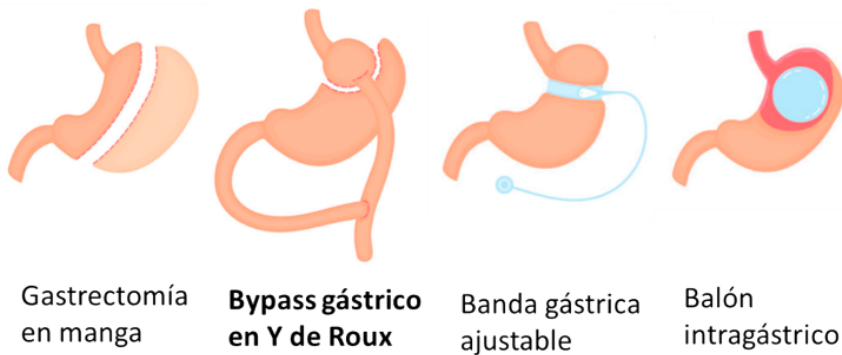
**Tabla 2.** Fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de la obesidad en 2022<sup>21</sup>

Fármaco	Mecanismo de acción	Descripción
Orlistat*	Inhibidor de la lipasa pancreática	Reducción de la cantidad de grasa absorbida en el intestino
Liraglutida*	Agonistas del receptor GLP1R	Disminución del apetito y aumento de la sensación de saciedad. Aumento de la liberación de insulina en el páncreas
Fentermina-topiramato	Simpaticomimético-Anticonvulsivo	Disminución del apetito y aumento de la sensación de saciedad
Naltrexona-Bupropión*	Antagonista de los receptores opioides-inhibidor de la recaptación de dopamina y noradrenalina	Reducción del apetito y control de antojos. Antidepresivo
Gelesis	Hidrogel superabsorbente	Aumento de la sensación de saciedad
Setmelanotida*	Agonista del receptor MC4R	Utilizado en personas con obesidad severa debido a la deficiencia de POMC, PCSK1 o LEPR

GLP1R: péptido similar al glucagón tipo 1; MC4R: receptor de melanocortina 4; POMC: proopiomelanocortina; PCSK1: proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 1; LEPR: receptor de leptina. \*Aprobados en la Agencia Europea del Medicamento para el tratamiento de la obesidad en España.

### 1.1.3.2 Cirugía bariátrica

Por último, se recomiendan los procedimientos quirúrgicos bariátricos, estos serían la última opción cuando el estilo de vida, los medicamentos y otros intentos de pérdida de peso no consiguen alcanzar los objetivos deseados, ya que no está exenta de riesgos operatorios y complicaciones postoperatorias, no obstante, su uso ha aumentado rápidamente durante los últimos años<sup>22</sup>. La cirugía es un procedimiento efectivo ya que da lugar a pérdida de peso a largo plazo, mejora y/o remite las comorbilidades asociadas (particularmente DMT2), en consecuencia, mejora la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes<sup>2</sup>. Se utilizan diferentes procedimientos quirúrgicos que modifican el tracto digestivo y ayudan a perder peso, estos procedimientos están esquematizados en la **Figura 3**.



**Figura 3.** Diferentes procedimientos para la cirugía bariátrica<sup>†</sup>.

El bypass gástrico en Y de Roux (RYGB) se considera el procedimiento bariátrico más frecuente a nivel mundial. Dicha operación consiste en dividir el estómago por su parte superior, lo que forma una pequeña bolsa gástrica proximal. El intestino delgado también se separa a nivel yeyunal, y se une la parte distal del intestino a la nueva y más pequeña bolsa estomacal. Como resultado, la comida ingerida pasa a través de la bolsa pequeña (limitando la cantidad) y fluye directamente hacia la parte distal del intestino delgado,

sin pasar por la parte proximal del intestino (limitando la absorción). El fragmento medio extirpado (el estómago distal e intestino delgado proximal) se vuelve a unir al intestino delgado más abajo. La exclusión del duodeno y el yeyuno proximal previene la secreción de sustancias anti-incretinas, y además la presencia temprana de alimentos ingeridos que viajan al intestino delgado distal puede estimular la secreción de incretinas lo que conduce a la mejora de la sensibilidad a la insulina<sup>23</sup>.

El RYGB se realiza fundamentalmente por vía laparoscópica y produce una pérdida de peso estimada del 73 % en 1 año, un buen mantenimiento de la pérdida de peso a largo plazo y la remisión de comorbilidades como la diabetes (95%), la dislipidemia (80%), la hipertensión (81%) y la apnea del sueño (95%). Las complicaciones graves incluyen fugas anastomóticas (3-5%) y la hernia intestinal interna (3,1 %) con el potencial de provocar obstrucción intestinal y perforación<sup>24</sup>.

## 1.2. La inflamación

El sistema inmunológico se define como un conjunto de células y procesos que funcionan para proteger el organismo ante el daño tisular, como células cancerígenas, o infecciones, como microbios (organismos como bacterias, hongos y parásitos), virus y toxinas. Existen dos tipos de inmunidad, la innata y adaptativa. La inmunidad innata es el primer mecanismo de defensa frente a un patógeno intruso, no es específica y no tiene memoria inmunológica de defensa, por lo tanto, es incapaz de reconocer o "memorizar" el mismo patógeno si el cuerpo se vuelve a exponer al patógeno en el futuro. En cambio, la inmunidad adaptativa, es específica de antígeno y, por lo tanto, existe un periodo de tiempo entre la exposición al antígeno y la respuesta máxima, además en este caso sí que posee memoria celular ante futuras exposiciones al mismo antígeno<sup>25</sup>.

Los leucocitos, son una pieza clave en la inmunidad innata, ya que inician la inflamación local, que es esencial para combatir la lesión y mantener la

homeostasis. Una función importante del proceso inflamatorio es el rápido reclutamiento de dichos leucocitos al tejido dañado y la producción y liberación de citocinas<sup>26</sup>, con el fin de eliminar cualquier agente infeccioso y/o los restos celulares del tejido dañado<sup>27</sup>. Diferentes células leucocitarias están implicadas en la inflamación, como los fagocitos (macrófagos y neutrófilos), las células dendríticas, los mastocitos, los basófilos, los eosinófilos, las células asesinas naturales (NK) y las células linfoides.

La inflamación puede ser aguda o crónica. La inflamación aguda generalmente dura solo unos pocos días y es un proceso beneficioso que sirve para inmovilizar el área lesionada mientras el resto del sistema inmunológico se moviliza para sanarla. Las características clínicas clásicas de la inflamación son calor, enrojecimiento, hinchazón y dolor. Las alteraciones vasculares también juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria. La histamina, las prostaglandinas y el óxido nítrico actúan sobre el músculo liso vascular provocando vasodilatación, lo que aumenta el flujo sanguíneo y la atracción de los leucocitos circulantes<sup>28</sup>. Los tejidos dañados liberan mediadores proinflamatorios que atraen a los leucocitos del torrente sanguíneo. Los macrófagos tisulares y las células dendríticas, también liberan citocinas y quimiocinas proinflamatorias, que producen la activación de los leucocitos que acaban de ingresar al tejido y éstos, en consecuencia, liberan más citocinas y mediadores de la inflamación amplificando así la respuesta inflamatoria<sup>29</sup>.

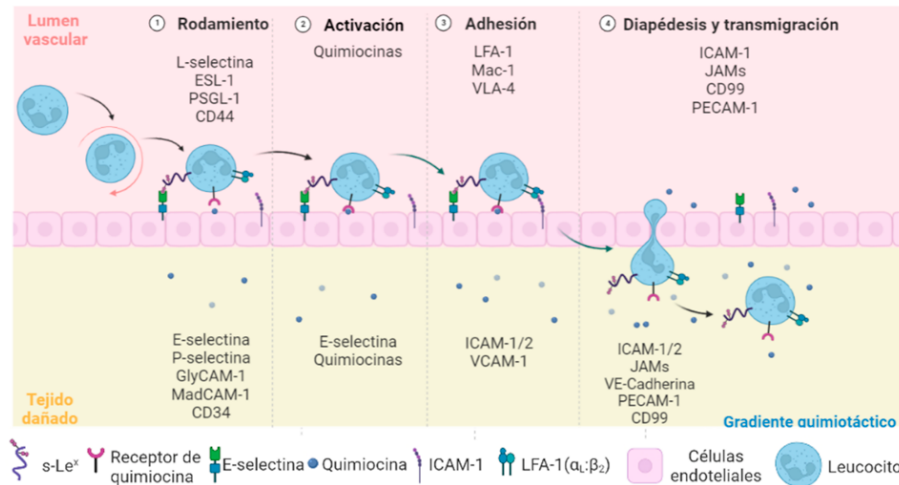
Esta respuesta inflamatoria generalmente promueve la curación, pero, si no se controla, puede volverse dañina y provocar una enfermedad inflamatoria crónica<sup>30</sup>. La inflamación crónica, es un proceso inflamatorio mantenido en el tiempo, que puede durar años y que puede estar causada por diferentes factores como el fracaso en la eliminación del agente que causa una inflamación aguda, la baja exposición a un irritante que no puede ser eliminado del cuerpo, un trastorno autoinmune donde se reconoce un componente corporal como un antígeno extraño, e inductores bioquímicos que pueden causar estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, aumento en la producción de moléculas que contienen radicales libres, etc<sup>29</sup>.

Por lo tanto, la inflamación crónica puede dañar el tejido sano en un intento equivocado de reparación y curación caracterizado por infiltración de células mononucleares y fibrosis<sup>31</sup>. La inflamación crónica se ha asociado con muchas patologías, como las enfermedades cardiovasculares<sup>32</sup>, la obesidad<sup>11</sup>, la diabetes<sup>33</sup>, la artritis<sup>34</sup> y el cáncer<sup>35</sup>, entre otras.

### 1.2.1 El proceso inflamatorio: cascada de reclutamiento leucocitario

Uno de los primeros pasos en el proceso inflamatorio es la infiltración leucocitaria hacia el tejido dañado, esto es clave en la inflamación crónica del tejido adiposo que se observa en pacientes con sobrepeso y obesidad<sup>4</sup>. Este reclutamiento también se asocia con la disfunción del tejido adiposo y complicaciones metabólicas como la resistencia a la insulina (RI)<sup>36</sup>. Las células endoteliales (CE) de los capilares sanguíneos y los leucocitos del torrente sanguíneo se activan con los estímulos pro-inflamatorios y expresan moléculas de adhesión celular (CAM, por sus siglas en inglés), las cuales promueven la adhesión de los leucocitos al endotelio y su posterior transmigración al espacio subendotelial<sup>37</sup>. Cabe destacar que, aunque se exprese en las CEs de las arterias, capilares y venas, las vénulas postcapilares son el sitio preferido para el reclutamiento de leucocitos debido a la mayor densidad de CAMs.

El proceso de reclutamiento leucocitario, mediado principalmente por las CAMs, se puede dividir en 4 fases (**Figura 4**): el rodamiento o “*rolling*” de los leucocitos que está regulado por selectinas (selectina P, selectina E); la posterior activación de los leucocitos mediada por quimiocinas y otros agentes quimiotácticos; la adhesión de firme de los leucocitos mediado por las integrinas (ICAM-1 y VCAM-1) y las inmunoglobulinas; y por último la extravasación de leucocitos, que está regulada por ICAM-1 y PECAM-1<sup>38</sup>, entre otras.



**Figura 4. Cascada de reclutamiento de leucocitos.** En condiciones proinflamatorias, las células endoteliales y los leucocitos expresan CAMs imprescindibles para el reclutamiento de leucocitos al tejido dañado y que actúan en todas las etapas del proceso. **1)** El primer paso es el rodamiento de leucocitos. **2)** El segundo paso es la activación de los leucocitos mediante quimiocinas proinflamatorias y factores quimiotácticos. **3)** Posteriormente se adhieren firmemente al endotelio. **4)** Finalmente los leucocitos migran al foco inflamatorio. En cada etapa se nombran las CAMs más importantes<sup>A</sup>.

*Abreviaturas: ESL-1: Ligando-1 de E-Selectina; PSGL-1: ligando 1 de glicoproteína de selectina P; CD, grupo de diferenciación; VLA-4, :antígeno 4 muy tardío; LFA-1:antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos; Mac-1: antígeno macrófago-1; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1; ICAM-2: molécula de adhesión intercelular-2; VCAM-1: molécula de adhesión de células vasculares-1; PECAM-1: molécula de adhesión de células endoteliales y plaquetas-1; JAM: moléculas de adhesión de unión; VE-Cadherina: cadherina endotelial vascular.*

Algunos de los estímulos pro-inflamatorios que inducen a la adhesión de leucocitos al endotelio también están estudiados como factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares como la interleucina (IL)-1 $\beta$ , el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) y las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL-ox). Estos agentes desencadenan las vías de señalización asociadas con la producción de especies de oxígeno (ROS), aumento de la expresión de CAM en la superficie celular y la generación y liberación de quimioatrayentes que promueven la adhesividad de los leucocitos<sup>39</sup>.

Los neutrófilos son las primeras células reclutadas y las más predominantes en la fase aguda de la inflamación y, aunque la mayoría de las características de la inflamación aguda continúan a medida que la inflamación se vuelve crónica, incluida la expansión de los vasos sanguíneos (vasodilatación), el aumento del flujo sanguíneo y la permeabilidad capilar, sin embargo, la composición leucocitaria cambia en el tiempo, y los monocitos y linfocitos comienzan a reemplazar a los neutrófilos<sup>29</sup>.

### 1.2.1.1 Rodamiento de leucocitos

Los primeros pasos en la cascada de reclutamiento leucocitario son el anclaje y el posterior rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio vascular. Este proceso está mediado por selectinas, y se sabe que la activación de las CEs bajo condiciones patológicas como la obesidad o la arteriosclerosis provocan la expresión de las selectinas E y P en la pared vascular<sup>40</sup>. Las selectinas van reduciendo la velocidad de los leucocitos que ruedan a lo largo del endotelio al unirse al ligando de selectina P (PSGL-1). PSGL-1 es el principal ligando leucocitario para la P-selectina y un ligando importante para E-selectina, las interacciones entre PSGL-1 y las selectinas endoteliales pueden contribuir a la entrada de monocitos en el tejido adiposo, lo que a su vez puede desencadenar el estado inflamatorio crónico de bajo grado asociado con la obesidad<sup>41</sup>. Curiosamente, en los seres humanos, la regulación al alza de la P-selectina se produce incluso después de una sola ingesta de comidas hipercalóricas ricas en grasas<sup>42</sup>.

Los leucocitos también expresan diferentes ligandos que se pueden unir a las selectinas de las células endoteliales. Algunos ejemplos son el ligando-1 de E-selectina (ESL-1), el CD44 glicosilado, (que actúan como ligando para la E-selectina) y también la L-selectina, que es ligando de la molécula de adhesión celular dependiente de la glicosilación-1 (GlyCAM-1), la molécula de adhesión celular de direccionamiento vascular de la mucosa-1 (MadCAM-1) y la proteína similar a la mucina CD34, expresada en las células endoteliales<sup>43</sup>.



Modelos animales de obesidad han demostrado un aumento en las interacciones leucocito-endotelio en el tejido adiposo visceral que está mediado por una mayor expresión endotelial de P-selectina y E-selectina<sup>41</sup>.

### 1.2.1.2 Activación de leucocitos

Las interacciones reversibles leucocito-endotelio mediadas por selectinas y la generación de un gradiente quimioatrayente por parte del tejido inflamado generado por citocinas y quimiocinas, conduce a la activación de los leucocitos y coordina su locomoción a lo largo de la superficie endotelial<sup>44</sup>.

#### 1.2.1.2.1 Las citocinas

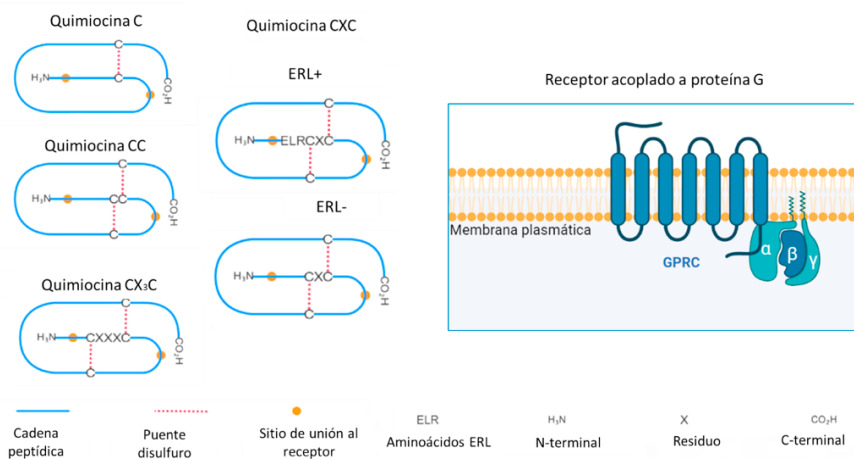
Las citocinas son pequeñas proteínas (5-30 kDa) liberadas por las células que actúan a través de receptores para regular el crecimiento, la maduración y la capacidad de respuesta de poblaciones celulares particulares, es decir, controlan el tráfico de células inmunitarias y la disposición celular de los órganos inmunitarios. Tienen posibles funciones autocrinas, paracrinas y endocrinas<sup>44</sup>.

Están producidas por una amplia variedad de células inmunitarias y no inmunitarias y existen muchos tipos diferentes: interleucinas (IL), interferones (IFN), factores de crecimiento (EGF) y quimiocinas. Funcionalmente, existen citocinas inmunomoduladoras tipo 1 y tipo 2. El tipo 1 favorece la regulación de las respuestas inmunitarias celulares (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , etc), mientras que las citocinas del tipo 2 favorecen la regulación de la producción de anticuerpos (TGF- $\beta$ , IL-4, IL-13, etc)<sup>45</sup>. Todos estos son factores solubles que se unen a los receptores de la superficie celular, desencadenando la expresión celular de genes pro-inflamatorios por parte de las células diana<sup>45</sup>.

#### 1.2.1.2.2 Las quimiocinas

Las quimiocinas son citocinas con actividad quimiotáctica de muy bajo peso molecular (8–13 kDa) y se liberan desde distintos tipos celulares. Son

muy importantes en el proceso inflamatorio porque dirigen el movimiento de los leucocitos circulantes a los sitios de inflamación o lesión. Se han clasificado en 4 subfamilias: CXC, CC, C y CX<sub>3</sub>C en base al posicionamiento de los 2 residuos de cisteína (C) amino-terminales. El "X" en la quimiocina podría ser cualquier residuo de aminoácido (**Figura 5**)<sup>46</sup>. Las quimiocinas pueden unirse con uno o más receptores y desencadenar diferentes respuestas debido a las distintas afinidades de unión y a los distintos receptores de quimiocinas. Ejercen sus funciones a través de receptores acoplados a proteína G (GPCR) que se localizan en las membranas celulares de diferentes tipos de células, entre ellas los leucocitos<sup>46,47</sup>.



**Figura 5. Estructura de la familia de quimiocinas.** Las quimiocinas contienen cisteínas en posiciones conservadas. El espacio entre las dos primeras cisteínas determina el tipo de quimiocina. La subfamilia C contiene solo una de las cisteínas N-terminal proximal. En la subfamilia CC, las dos primeras cisteínas son adyacentes entre sí. En la familia CXC hay un aminoácido entre las dos primeras cisteínas y se dividen en dos subgrupos, las que tienen el motivo de aminoácidos ácido glutámico-leucina-arginina (ELR+) y las que carecen de dicho motivo (ELR-). En la familia CX<sub>3</sub>C las dos cisteínas separadas por tres aminoácidos. La señalización del receptor acoplado a proteína G canónica (GPCR) se produce mediante el acoplamiento a proteínas G heterotriméricas (G $\alpha$ , G $\beta$  y G $\gamma$ )<sup>A</sup>.

Las quimiocinas inducen la activación y la adhesión celular de los leucocitos a la pared del vaso, los cambios morfológicos, la extravasación en el tejido inflamado y la quimiotaxis a lo largo del gradiente de quimiocinas hasta el sitio de la lesión o infección<sup>48</sup>. Además de sus funciones en el tráfico de leucocitos, la activación de los receptores de quimiocinas puede dar lugar a una variedad de respuestas celulares y tisulares adicionales, que incluyen la proliferación, la diferenciación, el remodelado de la matriz extracelular, la angiogénesis y la metástasis<sup>49</sup>. Debido a sus funciones centrales en la inflamación, muchos receptores de quimiocinas (y, en menor medida, las quimiocinas) se han identificado como dianas terapéuticas potenciales en una amplia gama de enfermedades inflamatorias<sup>49</sup>.

#### 1.2.1.2.3 Factor de necrosis tumoral- $\alpha$

El Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) es una proteína de 26 kDa que se expresa en la membrana plasmática, donde puede ser escindida en el dominio extracelular por las metaloproteinasas de la matriz, lo que resulta en la liberación de una forma soluble de 17 kDa. Está producida por macrófagos activados y linfocitos T, pero también se expresa en otros tipos celulares como las células asesinas naturales (NK), los neutrófilos, las células endoteliales y los adipocitos maduros<sup>50</sup>.

El TNF $\alpha$  interactúa con las células endoteliales para inducir moléculas de adhesión conocidas como ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina, permitiendo la salida de los granulocitos hacia los lugares inflamatorios y también es un potente activador de los neutrófilos, mediando la adherencia y la quimiotaxis<sup>51</sup>. Sus efectos se ejercen a través de los receptores de TNF $\alpha$  tipo I y II.

Los dos receptores también están expresados en los adipocitos. En el tejido adiposo, el TNF $\alpha$  suprime genes implicados en la captación y almacenamiento de ácidos grasos no esterificados y glucosa, así como factores de transcripción implicados en la adipogénesis y la lipogénesis. Además, se ha observado mediante técnicas *in vitro* que TNF $\alpha$  aumenta la expresión de varios factores secretados por los adipocitos, incluyendo IL-6 y MCP-1<sup>52</sup>.

### 1.2.1.3 Adhesión firme de leucocitos

La adhesión firme entre los leucocitos y las células endoteliales desempeña un papel clave en el reclutamiento de leucocitos durante las enfermedades inflamatorias. Este proceso requiere que se activen previamente las integrinas expresadas en la superficie de los leucocitos mediante las quimiocinas<sup>38</sup>.

Las integrinas son receptores transmembrana heterodiméricos que constan de dos subunidades:  $\alpha$  (alfa) y  $\beta$  (beta). Las integrinas más destacadas involucradas en la adhesión leucocitaria son: VLA -4 (el antígeno muy tardío-4); el LFA-1 (el antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos), que se expresa en todos los leucocitos efectoros y Mac-1 (el antígeno macrófago-1), que puede encontrarse en los granulocitos y los monocitos<sup>39</sup>.

Las CAM de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgCAM) son proteínas transmembrana que tienen de uno a siete dominios de inmunoglobulina extracelular anclados a la membrana plasmática por una sola hélice transmembrana. Las CAM interactúan con las integrinas y uniéndose y proporcionando la adherencia firme. Las CAM más estudiadas se expresan mayormente en las células endoteliales, entre las que se encuentran: ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1), ICAM-2 (molécula de adhesión intercelular-2), VCAM-1 (molécula de adhesión de células vasculares-1), PECAM-1 (molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas-1) y JAM (moléculas de adhesión de unión)<sup>39</sup>.

### 1.2.1.4 Transmigración de leucocitos

Una vez que los leucocitos están firmemente adheridos al endotelio, reorganizan su citoesqueleto de actina y extienden su membrana para arrastrarse por el endotelio siguiendo el gradiente quimioatrayente hacia el foco inflamatorio. Cuando encuentran un sitio permisivo migran a través de las células endoteliales<sup>40</sup>. Pueden utilizar la vía paracelular o vía transcelular, siendo la primera mucho más común que la segunda.

## 1.3. La angiogénesis

La angiogénesis se define como el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente. Los nuevos vasos capilares "brotan" cuando las células endoteliales reciben estímulos angiogénicos y posteriormente, rompen la membrana basal para migrar y proliferar creciendo de manera organizada hacia el estímulo<sup>53</sup>.

El remodelado de la vasculatura mediante la angiogénesis tiene un papel fundamental durante el desarrollo postnatal y en respuesta a muchos estímulos fisiológicos. En los adultos, la vasculatura de la mayoría de los tejidos permanece inactiva y está muy bien controlada durante procesos fisiológicos como el crecimiento de tejido, la reparación de heridas y el ciclo reproductivo femenino. En cambio, la activación de la angiogénesis se asocia en muchos casos a eventos patológicos como el cáncer y la inflamación crónica<sup>54</sup>.

El proceso de angiogénesis se encuentra regulado por la expresión de factores proangiogénicos o angiogénicos, y antiangiogénicos o angiostáticos. Un balance correcto entre ambos tipos de factores conlleva al desarrollo del proceso de angiogénesis en condiciones fisiológicas relacionadas con el desarrollo normal, mientras que un exceso de factores proangiogénicos da lugar al aumento de la angiogénesis implicada en diferentes procesos patológicos. Los factores angiogénicos más estudiados son el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), los Factores de Crecimiento Transformante alfa y beta (TGF $\alpha$  y TGF $\beta$ ), las angiopoyetinas y algunas quimiocinas, entre otros<sup>55</sup>.

Estos factores angiogénicos tienen una expresión elevada en tumores y otros tejidos patológicos isquémicos, como es el caso del tejido adiposo en la obesidad. Por lo tanto, la hipoxia es probablemente el estímulo más potente para la angiogénesis, y la expresión de factores inducibles por hipoxia (HIF).

La inflamación es otro modulador importante de la angiogénesis. Como se ha expuesto anteriormente, la inflamación se caracteriza por la invasión tisular

de células inflamatorias, que, a su vez, secretan una serie de citocinas vasoactivas y factores de crecimiento. En la inflamación crónica, las CEs se activan y experimentan un cambio proangiogénico, donde las interleucinas y el TNF $\alpha$  estimulan la formación de nuevos brotes. Además, los macrófagos pueden secretar factores proangiogénicos clásicos, como VEGF, lo que impulsa aún más el brote vascular, pero a menudo de manera poco coordinada, lo que da como resultado una estructura y función vascular anormales<sup>56</sup>.

### 1.3.1 Etapas de la angiogénesis

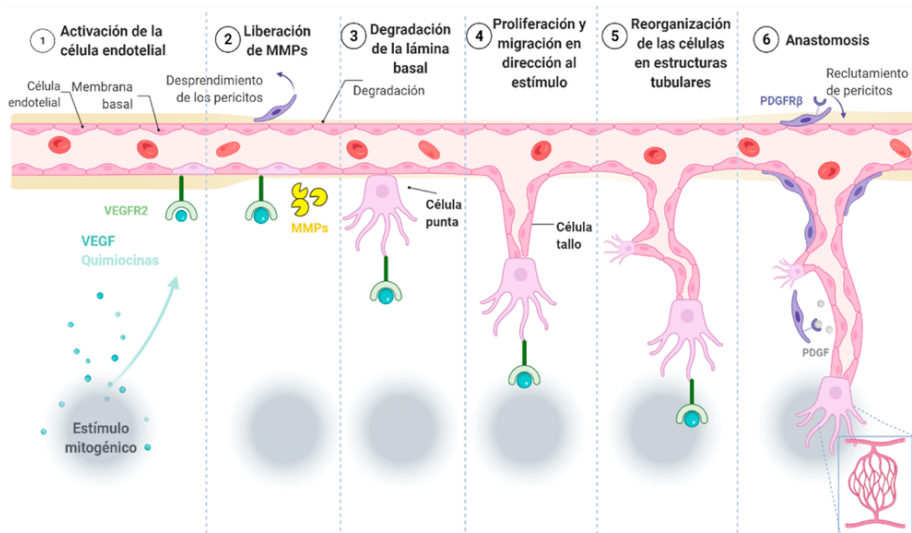
Durante la angiogénesis, las células endoteliales sufren cambios considerables: la proliferación, la migración dirigida a través de la matriz extracelular, el establecimiento de uniones intercelulares, la formación de un lumen, la anastomosis con los vasos existentes y el establecimiento de la circulación (**Figura 6**). Los pasos de la angiogénesis se describen a continuación<sup>56,57</sup>:

- 1) Activación:** Las células endoteliales responden a las señales extracelulares de diferentes factores proangiogénicos como las citocinas, las quimiocinas, los factores de crecimiento y también a la matriz extracelular, a través de diferentes receptores acoplados a proteína G. Después de la activación, estos receptores se coordinan con las moléculas intracelulares para transmitir y amplificar las señales, controlar los cambios de forma y la motilidad de las células a través del citoesqueleto, así como la proliferación y la degradación de la matriz.
- 2) Liberación de MMPs:** En respuesta a los gradientes de dichos factores proangiogénicos, las células endoteliales activadas secretan metaloproteasas de matriz (MMPs), como MMP1, para digerir enzimáticamente las proteínas de la membrana basal y provoca el desprendimiento de los pericitos. Esto libera más factores proangiogénicos para apoyar la brotación, aunque también se liberan factores antiangiogénicos para evitar la brotación excesiva y asegurar una estabilidad adecuada de los neovasos.

- 3) Degradación de la lámina basal:** La degradación de la matriz y el desprendimiento de las células murales (pericitos y células del músculo liso vascular), permite el movimiento de las células endoteliales a través de un entorno tridimensional sólido.
- 4) Proliferación y migración en dirección al estímulo:** Posteriormente se forman las "células punta" caracterizadas por la formación de filopodios que se alargan hacia la dirección del gradiente y sirven de guía para la formación de nuevos vasos, ya que marcan camino a seguir siguiendo el gradiente de factores proangiogénicos. El resto de las células llamadas "células del tallo", proliferan y siguen a las células punta y forman la luz del vaso.
- 5) Reorganización de las células en estructuras tubulares:** El brote en desarrollo establece un lumen para integrarse dentro de la vasculatura. Las estructuras recién formadas, generan vasos permeables, que permiten un nuevo flujo de sangre.
- 6) Anastomosis:** Las "células punta" vecinas se fusionan formando uniones y, a medida que se forman nuevas conexiones, se establecen nuevos circuitos de vasos. La maduración y estabilización de nuevos vasos se logra mediante el reclutamiento de células murales y la estabilización de la lámina basal.

### 1.3.2 Uniones endoteliales

En las CE, cada tipo de unión contiene proteínas especializadas que responden de manera diferente a las señales angiogénicas. Los dos tipos principales de unión son las uniones estrechas y las adherentes que se entremezclan entre los lados apical y basal de la célula. Ambos tipos de uniones se asocian con el citoesqueleto de actina y la formación y maduración de estos contactos célula-célula implica la reorganización del mismo.



**Figura 6.** Esquema del proceso de formación de nuevos vasos. **(1)** Cuando un vaso inactivo experimenta concentraciones aumentadas de factores proangiogénicos, las células endoteliales se activan, liberando citocinas y **(2)** enzimas que promueven el desprendimiento de los pericitos y **(3)** la degradación de la lámina basal. Las células activadas adquieren el fenotipo de células de punta y células de tallo. **(4)** Las células punta migran hacia los lugares de mayor concentración de factores de crecimiento proangiogénicos, con las células del tallo proliferando para formar un brote vascular. **(5)** Posteriormente las células se reorganizan en estructuras tubulares y **(6)** se anastomosan para formar la vasculatura<sup>A</sup>.

Las uniones estrechas regulan la vía paracelular para el movimiento de iones y solutos entre las células<sup>25,58</sup> y las uniones adherentes están compuestas principalmente por cadherinas y proteínas asociadas que proporcionan estabilidad mecánica al endotelio. Las CE expresan VE-cadherina (cadherina endotelial vascular) y N-cadherina (cadherina neural) que son glicoproteínas transmembrana de un solo paso. La VE-cadherina promueve la unión homófila y la adhesión entre las células endoteliales y parece ser necesaria para la formación y el mantenimiento de los vasos. La molécula de adhesión de células endoteliales y plaquetas-1 (PECAM-1), se ubica entre las uniones adherentes y la lámina basal, al igual que la VE-cadherina. PECAM-1 promueve



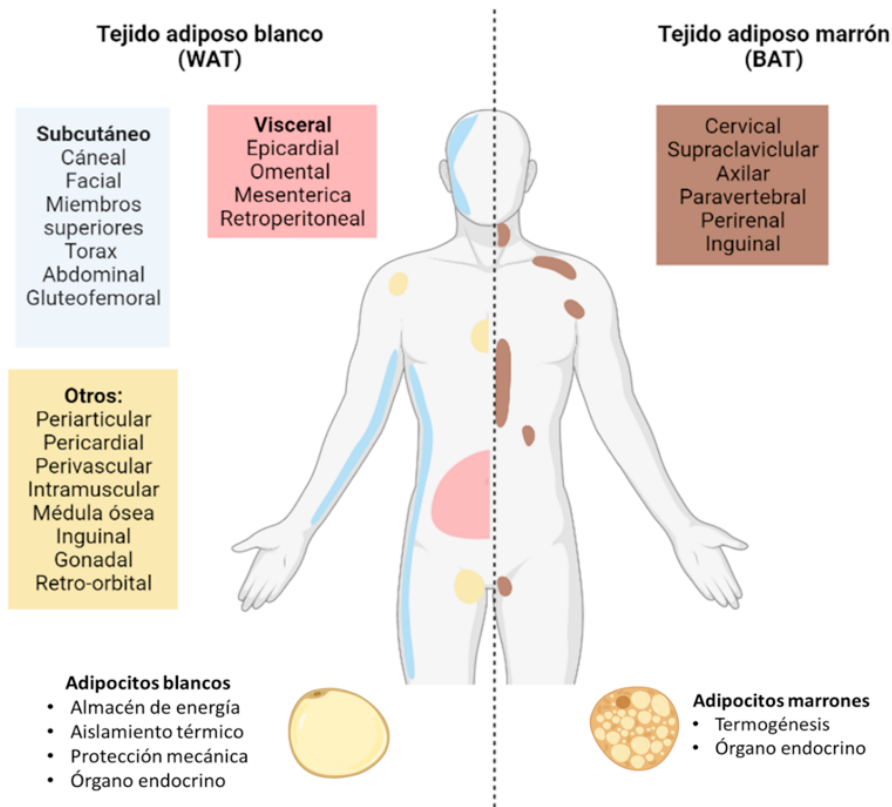
la unión homofílica en condiciones de reposo<sup>57</sup>. Los filamentos de actina son muy dinámicos durante la angiogénesis y sirven para generar fuerza para la migración dirigida, la formación del lumen, la polaridad celular, la endocitosis, la exocitosis y la estabilidad de los vasos. Estas funciones variadas de la actina durante la angiogénesis la han convertido en un importante objetivo farmacológico. La actina logra estas diversas funciones a través de la polimerización para formar redes de filamentos y fibras agrupadas que se asocian con el lamelipodio y el filopodio, las uniones célula-célula, la membrana luminal y los contactos de adhesión célula-matriz<sup>59</sup>.

## 1.4. El tejido adiposo

### 1.4.1 Clasificación y funciones

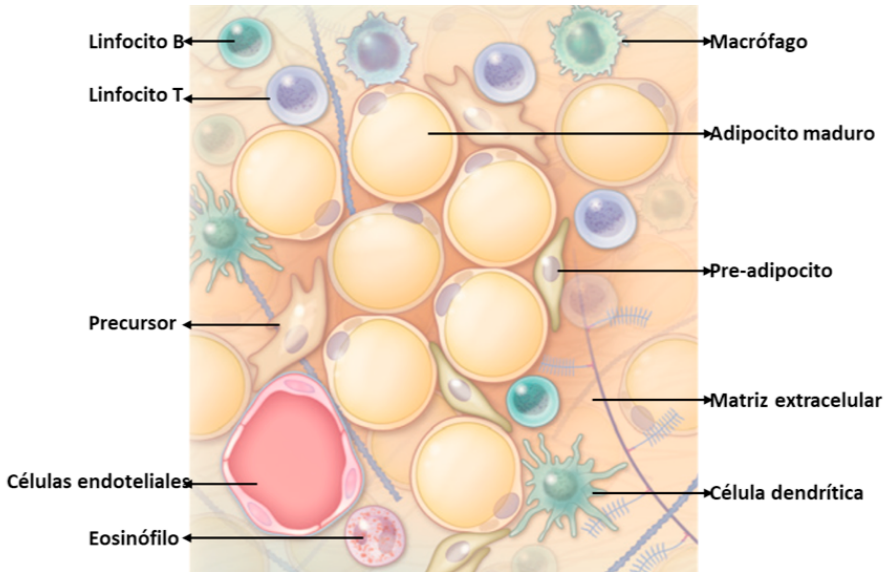
El tejido adiposo es un órgano endocrino con múltiples funciones, las cuales ejerce a través de una gran variedad de hormonas y citocinas denominadas adipocinas que sirven como mediadores entre el tejido adiposo y los órganos adyacentes y también a distancia, como el endotelio, el hígado, el músculo, el páncreas, las glándulas suprarrenales y el sistema nervioso. En base su papel funcional y perfil de expresión génica, el tejido adiposo (TA) o "grasa" en humanos, se clasifica en dos tipos principales (**Figura 7**), el tejido adiposo blanco (WAT, por sus siglas en inglés) y el tejido adiposo marrón (BAT)<sup>60</sup>.

Desde un punto de vista anatómico, el BAT está formado por adipocitos marrones, que son células multiloculares con abundantes mitocondrias responsables de la actividad termogénica característica de este tejido<sup>61</sup>. El BAT representa aproximadamente 4.3% de la grasa total en adultos y se encuentra en varias regiones corporales, predominantemente en las áreas interescapular y supraclavicular. Los adipocitos marrones están especializados en el gasto de energía y utilizan la energía química para la termogénesis, que desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la temperatura corporal central<sup>62</sup>.



**Figura 7.** Distribución y tipos de grasa corporal. El tejido adiposo (TA) se clasifica en dos tipos principales: el TA blanco y el TA marrón <sup>Δ</sup>.

En cambio, el WAT es un tejido muy heterogéneo que está formado por los adipocitos blancos y la fracción estromal vascular (FVS). Entre las células que constituyen el estroma vascular se encuentran pre-adipocitos, macrófagos, células madre, células endoteliales, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos<sup>61</sup> (**Figura 8**). Los adipocitos blancos se caracterizan por la presencia de una gran gota lipídica unilocular que ocupa el 90% del volumen celular y que funciona como un compartimento de almacenamiento para los triglicéridos. Durante épocas de exceso calórico, los adipocitos blancos secuestran ácidos grasos libres de la circulación y los almacenan como triglicéridos<sup>63</sup>.



**Figura 8.** Composición del tejido adiposo blanco (WAT). Está formado por los adipocitos blancos y la fracción estromal vascular (SVF)<sup>64</sup>.

El WAT representa el mayor porcentaje de la masa de tejido adiposo en humanos y tiene dos reservorios principales, a nivel subcutáneo, que se conoce como tejido adiposo subcutáneo (SAT) y alrededor de los órganos internos, que se conoce como tejido adiposo visceral (VAT). Este último se concentra en la cavidad abdominal (depósitos mesentéricos, omentales, perirrenales y peritoneales) y también, en menor medida, se localiza en otras partes como la vasculatura<sup>64</sup> (**Figura 8**). Aproximadamente el 60% (en SAT) y el 80% (en VAT) de las células de WAT no son adipocitos maduros, sino que corresponden a la SVF y ésta a su vez varía composición según su localización. Las funciones fisiológicas del WAT son el aislamiento y el almacenamiento de energía. Además, los adipocitos blancos también están involucrados en funciones como la secreción de hormonas y la función inmune. En momentos de necesidad calórica, los adipocitos blancos proporcionan un combustible metabólico a largo plazo a través de la lipólisis y la liberación de ácidos grasos.

El tejido adiposo también ha sido reconocido como un órgano endocrino ya que los adipocitos, las células precursoras, las endoteliales e inmunes, los fibroblastos y otras contribuyen a la liberación de moléculas fisiológicamente activas como adiponectina, leptina y resistina, así como citocinas inflamatorias como la interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF). Estos productos de secreción de los adipocitos son citocinas denominadas adipocinas.<sup>65</sup> Las adipocinas contribuyen a nivel sistémico a la regulación del apetito y la saciedad, la distribución de grasa, la secreción y sensibilidad a la insulina, el gasto energético, la función endotelial, la inflamación, la presión arterial y la hemostasia. Asimismo, contribuyen a modular la adipogénesis, la migración de células inmunitarias al tejido adiposo, la inflamación, la angiogénesis, el metabolismo y la función de los adipocitos. Por lo tanto, las alteraciones en la secreción de adipocinas relacionan la obesidad con sus comorbilidades inflamatorias, metabólicas y cardiovasculares<sup>66</sup>.

### 1.4.2 Expansión y remodelado del tejido adiposo en la obesidad

La expansión del WAT en respuesta al exceso calórico puede ocurrir de dos maneras diferentes: de manera patológica a través del agrandamiento de los adipocitos existentes (hipertrofia) y de manera saludable, a través de un aumento en el número de adipocitos (hiperplasia)<sup>4</sup>. Estos procesos cambian la estructura y la función del TA, es por ello que se definen como remodelado del TA<sup>11</sup>.

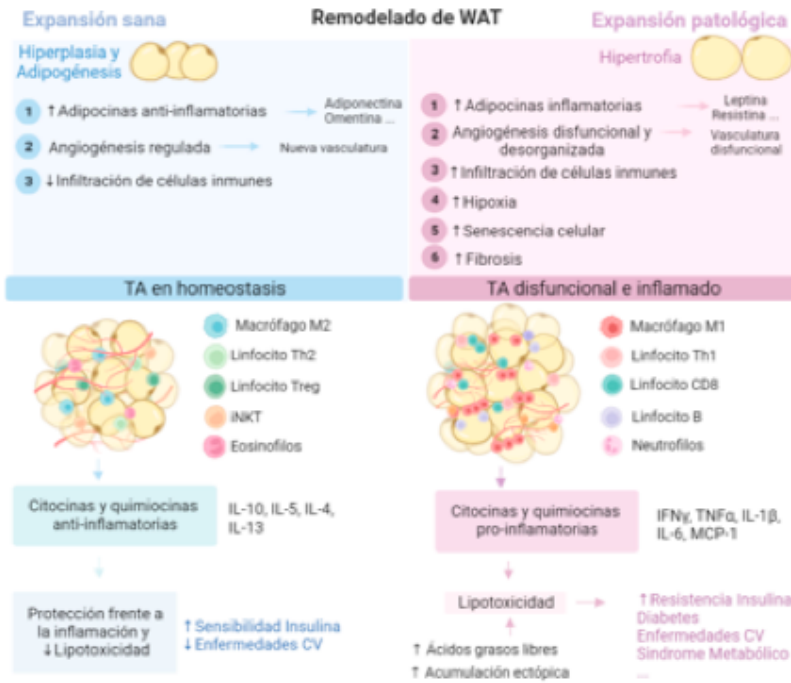
En condiciones normales, como consecuencia de la ingesta calórica, se produce una expansión saludable del TA, existe una hipertrofia inicial del adipocito para almacenar el exceso de energía, esto sirve de estímulo para iniciar la adipogénesis y la posterior hiperplasia para mantener la función normal del tejido adiposo. La hiperplasia del tejido adiposo se produce a través del reclutamiento de pre-adipocitos y su diferenciación en nuevos adipocitos funcionales pequeños con el fin de almacenar el exceso de energía en forma de triglicéridos. Este proceso aumenta la capacidad del tejido adiposo para almacenar el excedente energético y mantener un estado metabólico estable<sup>63</sup>.

Por otro lado, en condiciones patológicas como la obesidad, la expansión patológica de TA se produce a través de la hipertrofia (agrandamiento) de los adipocitos que conlleva a la disfunción del TA, este es el tipo de expansión que tiene lugar en el VAT en la obesidad mórbida. La disfunción del TA se asocia con inflamación, hipoxia, fibrosis, una angiogénesis inadecuada y con aparición temprana de resistencia a la insulina<sup>4</sup>. Tanto la inflamación como la angiogénesis en la expansión patológica del TA son dos procesos claves en el remodelado patológico del TA en la obesidad, que se detallan en los siguientes apartados.

### 1.4.3 Disfunción del tejido adiposo y obesidad

Durante la obesidad, la incapacidad del TA para expandirse a través de la hiperplasia saludable en combinación con una angiogénesis inadecuada, sobrecarga a los adipocitos de triglicéridos, y a medida que alcanzan su máxima capacidad de almacenamiento, se produce muerte celular, entrada de células inmunitarias, inflamación y lipotoxicidad, es decir, acumulación ectópica de lípidos en órganos no adiposos, como el hígado (lo que puede desencadenar complicaciones cardiometabólicas, como la RI tanto local como sistémica<sup>67</sup>).

La hipertrofia de los adipocitos induce una desregulación en la secreción de adipocinas, junto con la infiltración de células inmunitarias en la SVF con su consecuente expresión de quimiocinas pro-inflamatorias, especies reactivas de oxígeno y MMPs. Como el TA se expande más allá de la capacidad del tejido para obtener una angiogénesis adecuada, esto conduce a una hipoxia persistente, fibrosis, senescencia celular y muerte necrótica de adipocitos. Este proceso provoca inflamación local y sistémica<sup>3</sup> y es por lo que la obesidad se ha descrito como una enfermedad inflamatoria crónica de bajo grado (**Figura 9**).



**Figura 9.** Diferencias entre la expansión sana y patológica en el tejido adiposo blanco. En estado de obesidad, la disfunción del tejido adiposo se origina con una expansión patológica del mismo. Los adipocitos sobrecargados de triglicéridos provocan la entrada de células inmunitarias e inflamación, un estado de hipoxia, angiogénesis disfuncional, fibrosis y muerte celular. La entrada de células inmunitarias produce un cambio en el fenotipo del SVF, haciendo que este más inflamado y eso genere a su vez la liberación de quimiocinas pro-inflamatorias que perpetúan el evento. La inflamación local y sistémica y la lipotoxicidad desencadenan enfermedades cardiovasculares y metabólicas<sup>A</sup>.

A continuación, se describen los eventos característicos más importantes en la disfunción del WAT causada por hipertrofia en la obesidad.

### 1.4.3.1 Hipoxia y angiogénesis disfuncional en la obesidad

La vasculatura en el tejido adiposo tiene muchas funciones que incluyen: proporcionar nutrientes y oxígeno esenciales para el mantenimiento de la supervivencia y las funciones de los adipocitos; eliminar productos metabólicos del tejido adiposo; el transporte de factores de crecimiento, liberación de citoquinas y hormonas para modular las funciones y el crecimiento de los adipocitos; la regulación paracrina y yuxtacrina de las funciones de los adipocitos a través de la producción de varios factores y citoquinas de las células vasculares; suministro de células madre y precursoras de la pared del vaso; suministro de otros tipos de células tales como células inflamatorias que afectan secundariamente la función de los adipocitos y la alteración del microambiente adiposo como la hipoxia y la acidosis<sup>68</sup>.

El tejido adiposo experimenta constantemente crecimiento, expansión y contracción durante toda la vida<sup>69</sup>. La plasticidad del TA para expandirse requiere una angiogénesis coordinada para garantizar distribución adecuada de los factores circulantes esenciales a todas las células. En condiciones normales, ocurre una "angiogénesis saludable" durante la expansión del tejido adiposo. La vasculatura suministra a los adipocitos el oxígeno, nutrientes, hormonas y factores de crecimiento para la viabilidad y el crecimiento del TA y además elimina productos de desecho. El TA secreta diferentes adipocinas e inhibidores endógenos de la angiogénesis para modular el equilibrio de la formación de nuevos vasos sanguíneos, incluida la adiponectina, leptina, resistina, etc. Por lo tanto, en el tejido adiposo sano, los vasos están revestidos de una única monocapa de EC inactivas, que pueden cambiar rápidamente al estado angiogénico/proliferativo en presencia de señales angiogénicas y metabólicas para formar nuevos vasos sanguíneos. Esto sugiere una función autoreguladora para la angiogénesis en el VAT<sup>68</sup>.

En cambio, durante la expansión patológica del tejido adiposo en la obesidad, ocurre una "angiogénesis patológica". Los adipocitos grandes (hipertrofos) aumentan el espacio intercelular, donde se encuentran los microvasos, lo que conlleva a un aumento del espacio entre los capilares sanguíneos. Por lo tanto, la perfusión de sangre y el oxígeno disponible por el adipocito están

disminuidos en el tejido adiposo obeso en comparación con los individuos no obesos<sup>4</sup>. La hipoxia es un desencadenante importante de la respuesta inflamatoria y del mantenimiento o crecimiento inadecuado de los vasos lo que conlleva a una angiogénesis desorganizada y patológica.

En la obesidad, la expresión de factores proangiogénicos de las células del tejido adiposo, incluidos los adipocitos, los macrófagos y las células endoteliales, aumenta para contrarrestar la hipoxia del tejido adiposo<sup>68</sup>. Por ejemplo, uno de los principales mediadores proangiogénicos de la respuesta a hipoxia, son los factores de transcripción del factor inducible por hipoxia (HIF). Sin embargo, tal presión proangiogénica induce la senescencia y el deterioro de la función de las células endoteliales, lo que conduce a una red vascular defectuosa. La hipoxia resultante y el reclutamiento de células inmunitarias puede a su vez aumentar de nuevo la angiogénesis y también el depósito de tejido fibrótico en el tejido adiposo dando lugar a un círculo vicioso<sup>55</sup>.

Dada la importancia de una adecuada vascularización para la TA expansión, la angiogénesis se ha propuesto como una potencial diana terapéutica el tratamiento de la obesidad y sus alteraciones metabólicas asociadas.

### 1.4.3.2 El fenotipo del tejido adiposo blanco

En la expansión del TA sano se expresan adipocinas y quimiocinas que regulan la inflamación y la resuelven junto con una angiogénesis adaptativa y reparadora. En cambio, en la obesidad, la disfunción del tejido adiposo promueve un estado de hipoxia y angiogénesis disfuncional que conlleva a que los adipocitos comiencen a secretar adipocinas proinflamatorias tanto a nivel local como sistémico. En consecuencia, se produce la activación y el reclutamiento de células inmunitarias<sup>70</sup>, lo que provoca un cambio en el fenotipo del estroma haciendo que esté más inflamado y eso genere a su vez la liberación de quimiocinas pro-inflamatorias que perpetúan el evento. La inflamación local y sistémica y la lipotoxicidad altera la función normal del propio TA, así como la de órganos remotos y desencadena el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas.



Los adipocitos secretan adipocinas como MCP-1, IL-6, TNF $\alpha$  y leptina. Algunas de las adipocinas secretadas por el tejido adiposo en condiciones de homeostasis y en la obesidad se resumen en la **Tabla 3**<sup>71</sup>.

Desde este punto de vista, el TA puede considerarse un órgano inmune y secretor, y la obesidad una enfermedad inmune inflamatoria. Por lo tanto, en la obesidad, el perfil inmunológico del tejido adiposo cambia a un estado proinflamatorio a través de la infiltración de células inmunes<sup>61</sup>.

**Tabla 3.** Adipocinas secretadas por el TA, su función y expresión en la obesidad.

Adipocina	Expresión	Función	Obesidad
<b>Leptina</b>	WAT/ hipotálamo/ epitelio gástrico/ placenta/ gónadas	Regula la ingesta de energía y el apetito. También regula el almacenamiento de grasa y la señalización de la insulina	↑
<b>Resistina</b>	Macrófagos/ monocitos/ WAT	Implicado en el metabolismo de la glucosa. Papel proinflamatorio en humanos	↑
<b>Adiponectina</b>	WAT	Mejora la resistencia a la insulina y el metabolismo de la glucosa. Efecto antiinflamatorio	↓
<b>Omentina</b>	Corazón/ pulmones/ovario /placenta/WAT	Mejora la captación de glucosa en los adipocitos humanos y tiene un efecto antiinflamatorio	↓
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	Macrófagos/ adipocitos (VAT > SAT)	Afecta el metabolismo de la insulina y la glucosa. Provoca resistencia a la insulina y estimula la lipólisis	↑

Adipocina	Expresión	Función	Obesidad
<b>IL-6</b>	Adipocitos/ macrófagos/ músculo esquelético/ células endoteliales/ fibroblastos.	Afecta el metabolismo de la glucosa y la insulina	↑
<b>IL-10</b>	Monocitos/ macrófagos/ células dendríticas / linfocitos B/ linfocitos Treg	Mejora la sensibilidad a la insulina y el transporte de glucosa	↓
<b>IL-7</b>	Endotelio vascular / estroma vascular	Regula el peso corporal, la masa y la función del tejido adiposo y la señalización de la insulina	↑
<b>IL-8</b>	Macrófagos / adipocitos (VAT > SAT)	Quimiotaxis de neutrófilos	↑
<b>IL-1</b>	Macrófagos/ adipocitos	Papel en la quimiotaxis y termogénesis de los macrófagos	↑
<b>MCP-1</b>	WAT	Afecta la sensibilidad a la insulina y aumenta el reclutamiento de monocitos en el tejido adiposo y la inflamación	↑
<b>Visfatina</b>	Hígado/ músculo/ WAT/ médula ósea y linfocitos	Papel en la sensibilidad a la insulina, la secreción de insulina y propiedades inflamatorias	↑
<b>Quemerina</b>	Placenta y WAT	Regula el desarrollo de los adipocitos y la función metabólica	↑

### 1.4.3.2.1 Fenotipo antiinflamatorio

En el tejido adiposo sano la FVS está formada por células inmunitarias antiinflamatorias que residen en el propio tejido y desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis y la función de este. Estas células son los macrófagos M2, los eosinófilos, los linfocitos Th2 CD4+, linfocitos T reguladores (Treg)<sup>9</sup> y las células T asesinas naturales invariantes (iNKT)<sup>64</sup>.

En cuanto a la línea mieloide, las más importantes para la homeostasis del TA son los macrófagos, que expresan un fenotipo M2 (activado alternativamente) y promueven la supresión inmunológica. Los macrófagos M2 son los encargados de la renovación de los adipocitos eliminando los muertos y los desechos a través de la fagocitosis y la activación lisosomal<sup>72</sup>. Los eosinófilos también juegan un papel importante en la homeostasis metabólica regulando a los macrófagos alternativamente activados. Por otro lado, el WAT también contiene células linfoides, entre ellas las innatas (ILC), que son una fuente importante de citocinas de tipo 2 y regulan el reclutamiento de eosinófilos, mantienen los macrófagos M2<sup>73</sup> y además producen citocinas antiinflamatorias como IL-5 e IL-13. También residen las células iNKT que producen IL-4, IL-13 e IL-10, antiinflamatorias.

En cuanto a los linfocitos, residen algunos T colaboradores (Th CD4+), que son los encargados de reconocer el antígeno presentado por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de células como macrófagos o linfocitos B. Una vez se activan los linfocitos Th dirigen a otras células inmunitarias al sitio de infección mediante la expresión de citocinas y quimiocinas. En este caso se expresan los linfocitos Treg y Th2 que son, generalmente, antiinflamatorios. Los linfocitos Treg, que están especializados en funciones supresoras y restringen la inflamación para prevenir el desarrollo de resistencia a la insulina. La señalización de su receptor de células T (TCR) es un requisito vital para su la diferenciación y mantenimiento<sup>70,72</sup>.

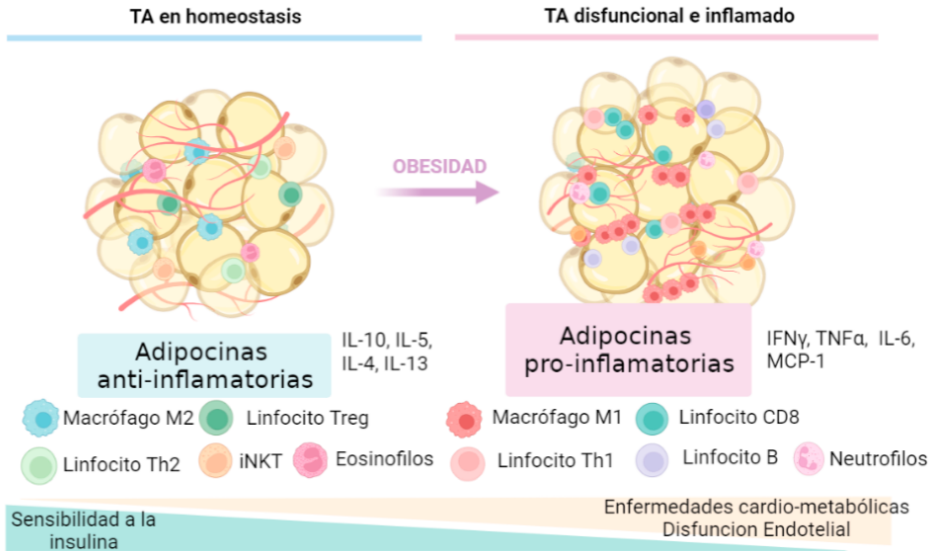
#### 1.4.3.2.2 Fenotipo proinflamatorio en la obesidad

Los adipocitos hipertróficos secretan cantidades aumentadas de factores como MCP-1, IL-6, TNF $\alpha$  y leptina. La hipoxia y la muerte celular de los adipocitos estimulan la activación y el reclutamiento de células inmunitarias que desplazan a las que ya residían previamente<sup>70</sup>. El WAT disfuncional en la obesidad presenta un mayor número de mastocitos, células dendríticas (DC), linfocitos Th1 y Th17 CD4+ y linfocitos T citotóxicos CD8+.

Los adipocitos hipertróficos expresan quimiocinas pro-inflamatorias, incluidas CCL2, CCL5 y CCL8, lo que conduce al reclutamiento de monocitos en el TA. Una vez allí, los monocitos se diferencian en macrófagos M1 (activados clásicamente), que son una fuente predominante de citocinas TNF $\alpha$  e IL-6<sup>3,74</sup>. Los macrófagos M1 se agrupan alrededor de los adipocitos muertos y forman estructuras en forma de corona. La producción de TNF $\alpha$  por los macrófagos reclutados desde la periferia inhibe la captación de glucosa por parte de los adipocitos al disminuir la expresión de los transportadores de glucosa. Posteriormente las señales inflamatorias se amplifican local y sistémicamente, conduciendo al reclutamiento de otras células inmunitarias, incluidas las células ILC1, linfocitos B y T CD8+, que finalmente reemplazan e inhiben la función de las células inicialmente residentes<sup>72</sup>.

La obesidad también se ha asociado con la regulación positiva de linfocitos B, mastocitos y células dendríticas. Los linfocitos B se expanden en el tejido adiposo obeso y promueven la activación de los macrófagos M1, así como los linfocitos Th1 y CD8+. Se ha demostrado que las células Th1, desempeñan un papel proinflamatorio durante la obesidad<sup>75</sup>, por ejemplo, segregan IFN $\gamma$  TNF $\alpha$ , lo que promueve la diferenciación de los macrófagos a M1. En conjunto, múltiples tipos de células inmunitarias de los tipos innato y adaptativo del sistema inmunitario se infiltran en el tejido adiposo durante la obesidad para participar en la cascada inflamatoria que culmina en la resistencia a la insulina y la disfunción metabólica<sup>76</sup>. Esta amplia participación de las células inmunitarias en la regulación metabólica demuestra la complejidad del sistema inmunológico y la inflamación del TA en la obesidad.

En la **Figura 10** se resumen los cambios en las células inmunes que ocurren en el WAT durante la obesidad:

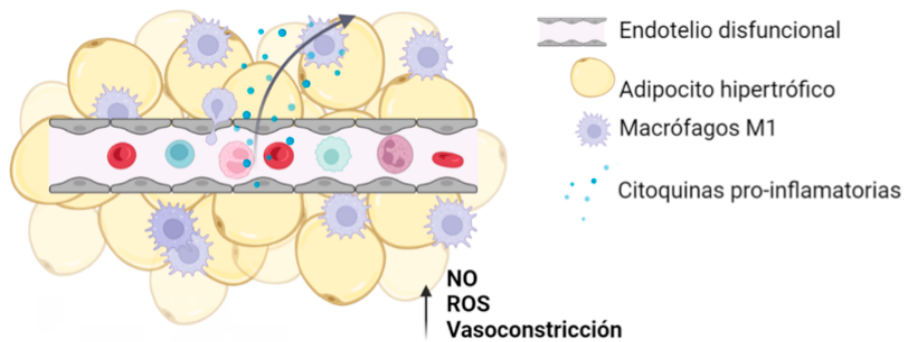


**Figura 10.** Diferencias en el fenotipo de WAT con y sin obesidad. El tejido adiposo tiene células inmunitarias antiinflamatorias y células inmunitarias que contribuyen a la homeostasis entre ellas predominan, linfocitos TReg, eosinófilos, linfocitos Th2, macrófagos M2, ILC2 y células iNKT. La obesidad desplaza a estas células para facilitar el reclutamiento de células inmunitarias inflamatorias como los macrófagos M1, linfocitos Th1, linfocitos T CD8+, las células NK, las ILC1 y linfocitos B. Este efecto está mediado, al menos en parte, por señales de estrés hipóxico, así como por quimiocinas como MCP-1<sup>A</sup>

### 1.4.3.3 Disfunción endotelial

La disfunción endotelial (**Figura 11**) se caracteriza por la reducción de la producción y biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), el deterioro de la vasodilatación, la alteración de la capacidad fibrinolítica, aumento de la permeabilidad vascular, una mayor expresión de moléculas de adhesión y genes inflamatorios y una mayor generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que conduce a alteraciones funcionales y estructurales del endotelio<sup>77</sup>.

En respuesta a la obesidad, el aumento de los niveles de ácidos grasos libres y citocinas liberados por los adipocitos desencadena el desarrollo de disfunción endotelial local en el TA. La disfunción del TA y la secreción de adipocinas proinflamatorias, causan a su vez el deterioro de la homeostasis vascular. Estas perturbaciones contribuyen de manera independiente y sinérgica a la reducción de la biodisponibilidad del NO, que se considera un paso importante en la progresión de la disfunción endotelial<sup>78</sup>. La sobreexpresión de estímulos proangiogénicos y proinflamatorios en la obesidad también puede derivar en una disfunción de las CE y a su vez las CE disfuncionales no pueden inducir una angiogénesis normal, lo que conduce a una menor formación de vasos sanguíneos<sup>68</sup>. Esto demuestra que la obesidad, la capacidad angiogénica y la disfunción endotelial están estrechamente relacionadas.



**Figura 11. Disfunción endotelial en el tejido adiposo.** En respuesta a la obesidad, la vasculatura del tejido adiposo se vuelve más escasa y también desarrolla disfunción endotelial que está caracterizada por una funcionalidad alterada y la secreción de moléculas proinflamatorias, lo que promueve aún más la inflamación del tejido adiposo y el reclutamiento de células inmunes<sup>A</sup>.

En la obesidad los leucocitos circulantes invaden el TA principalmente a través de las vénulas postcapilares en la microcirculación, diferentes estudios que investigan el impacto de la obesidad en la microcirculación han demostrado la aparición de disfunción microvascular en modelos animales y en humanos

obesos<sup>60</sup>. La disfunción endotelial contribuye de manera importante a la progresión de las enfermedades cardiovasculares, hay mucha evidencia disponible que relaciona la disfunción endotelial y la aterosclerosis resultante, con la resistencia a la insulina y la diabetes en la obesidad<sup>79</sup>.

#### 1.4.4 Diferencias entre SAT y VAT en el riesgo cardiometabólico asociado a la obesidad

Cuando se excede la capacidad de almacenamiento de SAT, se incrementa la acumulación de grasa en los tejidos ectópicos y en el VAT. En la obesidad, el exceso de VAT está estrechamente relacionado con complicaciones metabólicas, como la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2, en comparación con SAT. La acumulación grasa glúteo-femoral (subcutánea) se asocia negativamente con estas complicaciones adversas<sup>80</sup>. La expresión de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias como la interleucina (IL)-6, la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) está aumentada en VAT en comparación con SAT. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios han encontrado que las CE de la grasa visceral son más susceptibles a la disfunción endotelial que las de la grasa subcutánea, lo cual está en consonancia con que la grasa visceral se considere más propensa a la disfunción endotelial, la inflamación y a las complicaciones cardiometabólicas<sup>77</sup>.

#### 1.4.5 Vías de señalización implicadas en la disfunción del TA

Las vías de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) tienen un papel clave en la transducción de señales extracelulares e intracelulares, éstos se reconocen inicialmente por receptores en membrana celular y se transmiten hasta el núcleo mediante fosforilaciones hasta la activación de MAPK donde se producirán los cambios necesarios en la expresión génica que permitirán la adaptación celular frente a las nuevas condiciones ambientales<sup>81</sup>. Hay tres familias principales de MAPK: las quinasas reguladas por señales ex-

tracelulares (ERK), las quinasas Jun amino terminales (JNK) y las proteínas quinasas p38 activadas por estrés. Estas rutas regulan procesos metabólicos, de supervivencia, proliferación, migración e inflamación entre otros (**Figura 12**).

En el TA las señales inflamatorias percibidas a nivel celular están mediadas por los correspondientes receptores de citocinas/quimiocinas y las correspondientes quinasas específicas intracelulares. Estas proteínas quinasas aumentan la expresión de genes proinflamatorios, responsable de la disfunción del TA. La activación de estas señales por factores proangiogénicos, puede ser responsable de la expresión de genes encargados de la proliferación y la actividad angiogénica<sup>82</sup>.

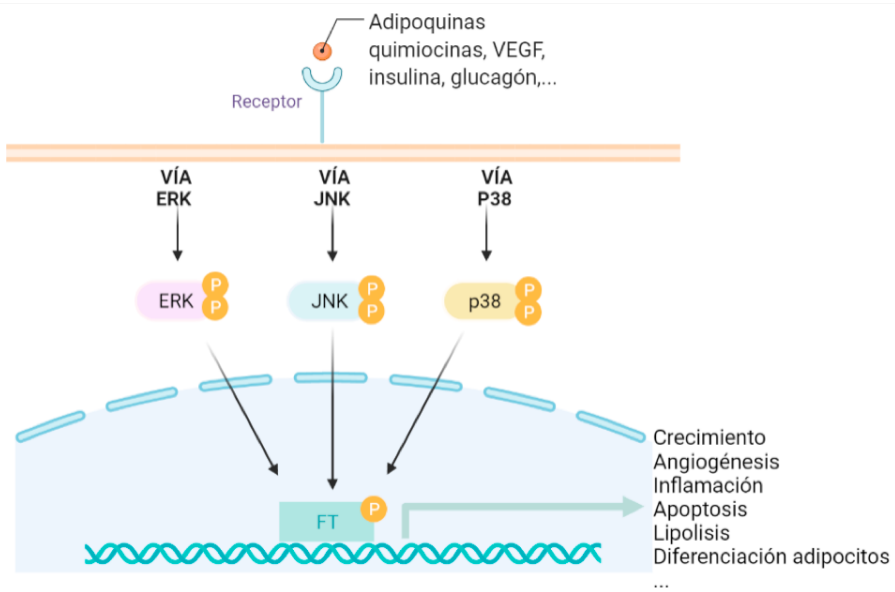
La vía de señalización de ERK, se activa en el citoplasma mediante señales inflamatorias y responde principalmente a factores de crecimiento y mitógenos para inducir el crecimiento y la diferenciación celular. La activación de ERK1/2 (proteína quinasas activadas por mitógeno p44/42) se ha caracterizado como un evento clave en la señalización de insulina y la diabetes ya que participa en la absorción y el metabolismo de la glucosa en el hígado y el músculo esquelético, regula la secreción de insulina y la producción de insulina a nivel transcripcional y traduccional. La secreción de insulina mediada por hormonas también aumenta la actividad de ERK1/2 por lo que desempeña un papel importante en la señalización y el metabolismo de la insulina<sup>27</sup>. Cabe señalar que la cascada ERK1/2 es una parte importante de la señalización de insulina mediante el receptor IRS1 en los tejidos diana, por lo tanto, un defecto en la señalización de IRS1 podría ser responsable, en parte, de la resistencia a la insulina durante la obesidad<sup>83</sup>.

ERK1/2 también determina la respuesta inflamatoria durante la obesidad, ya que tiene un papel importante en el proceso de selección positiva y maduración de los linfocitos T CD4+ y CD8+ y también en desarrollo de macrófagos. También existe evidencia de que ejerce su papel en la inflamación metabólica<sup>82</sup>.

La proteína p38 se encuentra entre las MAPK activadas por estrés. Su familia está compuesta por cuatro miembros:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  y la expresión de las isoformas de p38 varía entre tejidos. La activación de la vía p38 MAPK contribuye a la



inflamación, la apoptosis, la diferenciación celular y la regulación del ciclo celular. La activación de p38 MAPKs provoca lipotoxicidad en adipocitos y células estrelladas y también mejora la insulina y la captación de glucosa inducida por AMPK al activar su receptor GLUT4<sup>84</sup>.



**Figura 12. Regulación del metabolismo celular por MAPK.** Las citocinas (como  $\text{TNF}\alpha$ ), la insulina, otras hormonas como el glucagón, los factores de crecimiento (como IGF1 o EGF) y el estrés ambiental convergen en los nodos de señalización de MAPK que, directa o indirectamente, regulan numerosos factores y procesos metabólicos a través de factores de transcripción (FT)<sup>A</sup>.

## 1.5. Ejes de quimiocinas estudiados en la presente Tesis Doctoral

### 1.5.1 El eje CXCL9/CXCL10/CXCL11 - CXCR3

La familia de quimiocinas C-X-C, promueve el tráfico de leucocitos y regulan la angiogénesis, en particular en las enfermedades cardiovasculares. Se caracterizan porque poseen 2 residuos de cisteína separados por un solo residuo aminoácido<sup>85</sup>. Esta familia incluye 16 quimiocinas (CXCL1-16) las cuales ejercen sus funciones a partir de sus receptores (CXCR1-7). Las quimiocinas CXC pueden subdividirse en dos grupos dependiendo de presencia o ausencia del 'motivo ELR' (la secuencia Glu-Leu-Arg). Si poseen la secuencia ERL (ERL+) se comportan como potentes promotores de la angiogénesis, reclutan leucocitos y neutrófilos en los tejidos inflamados, en cambio, si no poseen la secuencia ERL (ERL-), tienden a inhibir la proliferación de células endoteliales y son principalmente angiostáticas<sup>85</sup>.

Las quimiocinas CXCL4/PF4 (factor plaquetario 4), CXCL9/MIG (monocina inducida por interferón gamma), CXCL10/IP-10 (proteína 10 inducida por interferón gamma) y CXCL11/I-TAC (quimioatrayente de células T inducible por interferón gamma), desempeñan un papel clave en muchas enfermedades inflamatorias y están inducidas por interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Al igual que otras quimiocinas, regulan el tráfico leucocitario hacia los sitios inflamatorios y agravan la inflamación. Además, estas quimiocinas no poseen el motivo ERL y, por lo tanto, son angiostáticas. Se secretan por diferentes tipos de células incluyendo células endoteliales, epiteliales, linfocitos T, NK, fibroblastos, neutrófilos, monocitos y células dendríticas<sup>86</sup>.

CXCL9, CXCL10 y CXCL11 ejercen su acción a través del receptor 3 de quimiocinas con motivo C-X-C (CXCR3), también denominado GPR9 y CD183. CXCR3 es un receptor altamente expresado en los linfocitos T activados. Se cree que estas quimiocinas son cruciales para dirigir a los linfocitos T activados a los sitios de inflamación donde juegan un papel importante en las respuestas inmunes mediadas por Th1. La expresión de las quimiocinas dirigidas hacia CXCR3 se

ha demostrado en varias enfermedades inflamatorias crónicas como incluida la colitis ulcerosa, la esclerosis múltiple, la arterosclerosis, o el cáncer<sup>87</sup>.

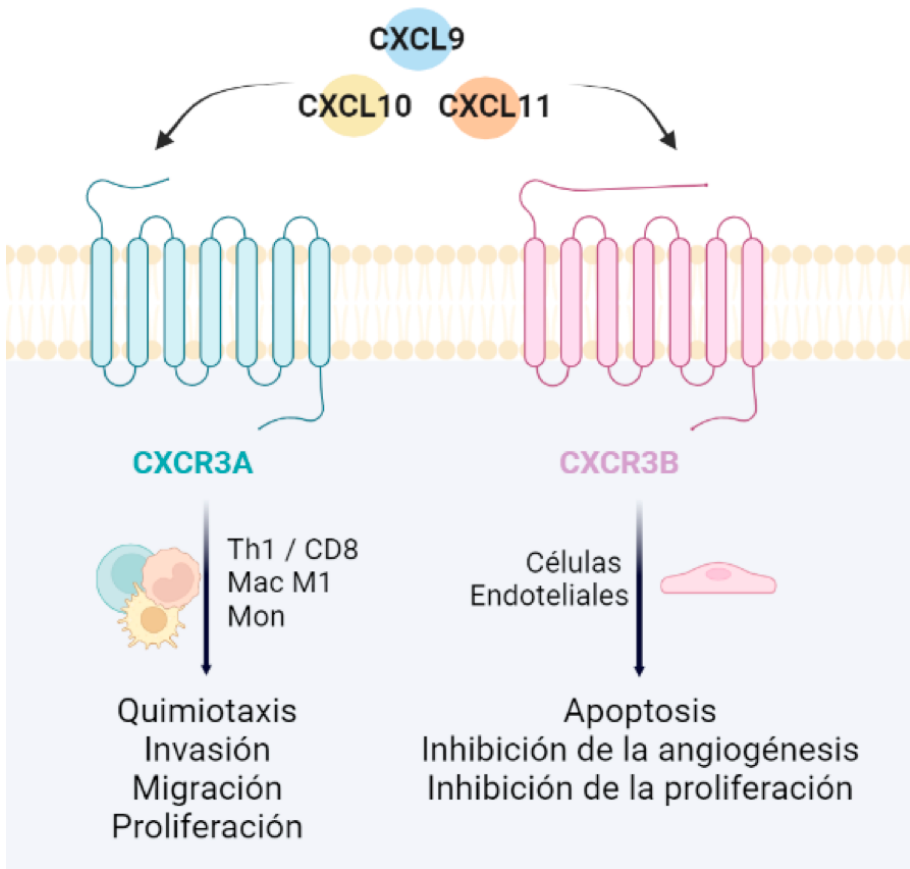
Estudios recientes han demostrado que algunas de estas quimiocinas también participan en el reclutamiento, la migración y la activación de las células inmunitarias en el TA en estado de obesidad<sup>88</sup>. Como todos los receptores G de quimiocinas, CXCR3 se acopla a la proteína G $\alpha$ i y se internaliza tras la activación de alguno de sus ligandos. Esto conduce a la entrada de calcio y a la activación de una cascada de señalización que involucra a las MAPK, reordenando el citoesqueleto y el movimiento celular<sup>89</sup>.

CXCR3 se expresa en linfocitos T activados (incluidos Th1 y CD8), células NK, así como monocitos, macrófagos M1, eosinófilos, mastocitos, células dendríticas, células endoteliales (CEs) y células de músculo liso vascular (SMC). CXCR3 también se expresa en varias células tumorales y en los adipocitos (**Figura 14**)<sup>90,91</sup>.

Hay tres isoformas del receptor CXCR3 en humanos formadas mediante empalme alternativo que poseen diferentes afinidades por las quimiocinas: CXCR3-A (342 aminoácidos), CXCR3-B (451 aminoácidos, ya que posee 51 a.a adicionales en su extremo N-terminal) y la forma alternativa CXCR3-alt (267 a.a)<sup>87,92</sup>. CXCR3A está acoplada a la subunidad G $\alpha$ i/0 y al interactuar con las quimiocinas se activa y promueve la movilización de calcio en la célula, lo que conduce a la quimiotaxis de las células del sistema inmunitario. Por el contrario, CXCR3B está acoplado a la subunidad G $\alpha$ s y la señalización de  $\beta$ -arrestina y ejerce los efectos angiostáticos de CXCL4, CXCL9, CXCL10 y CXCL11<sup>93</sup> (**Figura 13**). Estudios recientes han demostrado que en las células endoteliales microvasculares humanas los efectos angiostáticos, aparentemente, está mediado por CXCR3B y la subsecuente activación de la vía p38 MAPK<sup>85</sup>.

En consecuencia, el eje CXCR3 se ha convertido en una nueva diana para el desarrollo de fármacos. Se han desarrollado varias familias de moléculas con aplicaciones clínicas potenciales, como el fármaco AMG487 que es un antagonista selectivo del receptor CXCR3 y ha demostrado actividad biológica en modelos preclínicos de reclutamiento celular<sup>94</sup>.

Asimismo, el eje CXCR3 se ha estudiado en diferentes patologías cardiovasculares incluyendo aterosclerosis, hipertensión, insuficiencia cardíaca e infarto de miocardio<sup>90, 95, 96</sup>, no obstante, en el contexto de la obesidad en humanos, no ha sido explorado.



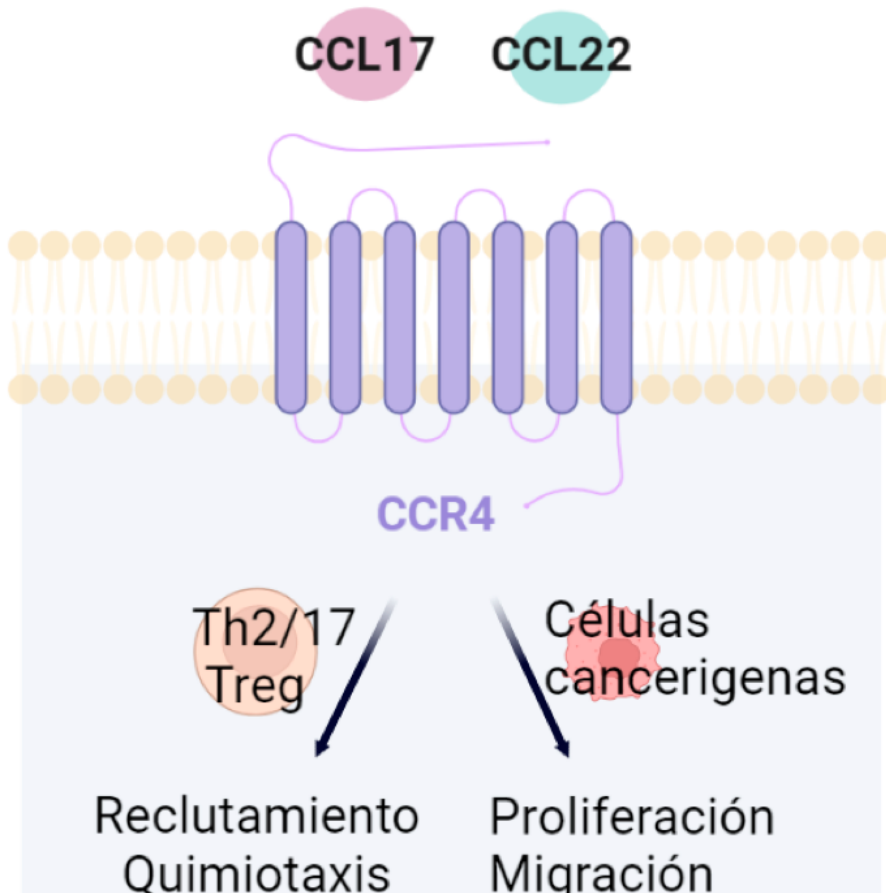
**Figura 13.** Resumen esquemático del efecto de las quimiocinas CXCL9 – 11 sobre las isoformas CXCR3A y CXCR3B. Después de la unión a las quimiocinas, CXCR3A media funciones celulares, como la quimiotaxis, la proliferación celular y la migración. En humanos, se identifica una segunda isoforma, conocida como CXCR3B, que se expresa principalmente en las células endoteliales y tiene propiedades antiangiogénicas. Éstas incluyen promover la apoptosis celular e inhibir la proliferación y migración celular<sup>A</sup>.

## 1.5.2 El eje CCL17/CCL22 - CCR4

La familia C-C de quimiocinas se caracteriza porque tiene dos de los cuatro residuos de cisteína adyacentes. Esta familia consta de 28 miembros (CCL1-28) que realizan su función a través de los receptores CCR1-10. Estos receptores se expresan mayormente en los linfocitos T, monocitos y macrófagos predominantemente en situaciones de inflamación crónica. Además, tienen un papel fundamental en el reclutamientos de monocitos, linfocitos T y macrófagos durante la homeostasis y la inflamación, los cuales son imprescindibles para el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis y la inflamación del TA<sup>97</sup>.

Las quimiocinas CCL17/TARC (quimiocina con activación regulada por el timo) y CCL22/MDC (quimiocina derivada de macrófagos) son los ligandos del receptor 4 de quimiocinas con motivo C-C (CCR4). Estas dos quimiocinas se expresan principalmente en el timo y se han estudiado más a fondo en el cáncer debido a que se ha observado su expresión en células tumorales y que aumentan la proliferación la migración e invasión de las mismas. También ejercen efectos quimiotácticos para los linfocitos Th2, Treg y también para los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), debido a la expresión del receptor en estas células. Actualmente no hay estudios que muestren los efectos directos de CCL17 y CCL22 sobre la angiogénesis, pero se ha demostrado que las Treg reclutadas por CCL17 y CCL22 ejercen propiedades proangiogénicas de manera indirecta al secretar VEGF<sup>98</sup>.

CCL17 se expresa también en células endoteliales y fibroblastos, y CCL22 se expresa en los macrófagos, monocitos y las células dendríticas presentes en la lesión aterosclerótica<sup>99</sup>. En cuanto a su receptor CCR4, se ha observado su expresión en otros subconjuntos de linfocitos T, como CLA+, Treg, Th17, Th22, CD8+ Tc2, NK, NKT y eosinófilos. Además, CCR4 se expresa en plaquetas y media la activación plaquetaria (**Figura 14**)<sup>100</sup>.



**Figura 14.** Resumen esquemático sobre el efecto de las quimiocinas CCL17 y CCL22 mediante el receptor CCR4. Se han observado efectos quimiotácticos para los linfocitos Th2, Th17 y Treg. Por otro lado, se ha visto que aumentan la proliferación y la migración e invasión de las células tumorales<sup>4</sup>.

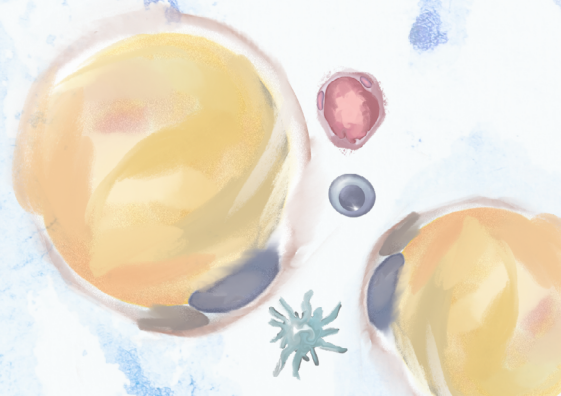
Además de estas quimiocinas, se ha descubierto recientemente el factor similar a la quimiocina-1 (CKLF-1) que ejerce diferentes efectos a través de CCR4 como atraer neutrófilos, linfocitos y estimular la proliferación y diferenciación celular en enfermedades inflamatorias<sup>101</sup>.

El eje CCR4 está implicado en enfermedades inflamatorias como la dermatitis atópica, artritis reumatoide<sup>100</sup>, insuficiencia hepática<sup>102</sup>, o en cáncer como la leucemia y el linfoma de Hodgkin<sup>103</sup>. No obstante, no hay estudios que hayan abordado el papel de CCR4 en la obesidad. En la práctica clínica se está aplicando el bloqueo del receptor CCR4 mediante un anticuerpo humanizado monoclonal anti-CCR4 (Mogamulizumab). Este fármaco ha sido aprobado recientemente por la Agencia Española del Medicamento para el tratamiento de de pacientes adultos con micosis fungoide o el síndrome de Sézary, una forma agresiva del linfoma cutáneo de células T. Actualmente también se está probando su eficacia en los tumores sólidos<sup>99</sup>.





## 2. OBJETIVOS



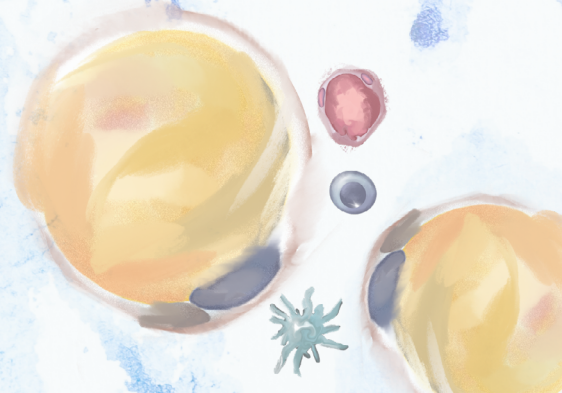


## 2. Objetivos

1. La obesidad es una enfermedad inflamatoria crónica de bajo grado asociada a determinadas complicaciones metabólicas y cardiovasculares, como la resistencia a la insulina y la diabetes. Diferentes estudios han demostrado que el eje CXCR3 está implicado en diferentes patologías inflamatorias<sup>104</sup>. No obstante, su función en la obesidad no está del todo estudiada. Por lo tanto, **el primer objetivo** de la presente Tesis Doctoral ha sido evaluar la expresión y función del eje CXCR3 en el tejido adiposo de pacientes con obesidad y su asociación con diferentes parámetros clínicos y metabólicos.
2. La alteración en la angiogénesis está relacionada con la disfunción del tejido adiposo, la inflamación y la resistencia a insulina en pacientes con obesidad mórbida<sup>105</sup>. Los ligandos de receptor CXCR3 son reguladores de la angiogénesis en diferentes contextos patológicos como el cáncer<sup>106</sup>. Es por ello que, **el segundo objetivo**, ha sido investigar los efectos en la angiogénesis del bloqueo funcional ex vivo del receptor CXCR3 en el tejido adiposo de pacientes con obesidad mórbida.

3. En la obesidad, la disfunción del tejido adiposo visceral aumenta el riesgo de padecer comorbilidades asociadas a la obesidad<sup>107-109</sup>. Se ha demostrado que el eje CCR4 está aumentado en diferentes patologías inflamatorias<sup>100,110</sup>. Por lo tanto, el **tercer objetivo** ha sido determinar la expresión y la función del eje CCR4 en el plasma y el tejido adiposo de pacientes con obesidad y su asociación con diferentes parámetros cardiometabólicos. También, se ha realizado un inmunofenotipado de la sangre de pacientes obesos y controles, para identificar la expresión del receptor CCR4 en las diferentes subpoblaciones leucocitarias.
4. La inflamación del tejido adiposo en los pacientes obesos se relaciona con el desarrollo de disfunción endotelial que se considera un factor de riesgo temprano para el desarrollo de enfermedades cardiometabólicas<sup>79</sup>. La producción de citocinas proinflamatorias como el TNF $\alpha$  conduce al desarrollo de disfunción endotelial<sup>111</sup>. Por lo tanto, **el cuarto objetivo** fue el estudio de la adhesión leucocito-endotelio en células estimuladas con TNF $\alpha$ , utilizando sangre de pacientes obesos.

# 3. MATERIALES Y MÉTODOS





## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Materiales y métodos del primer estudio: Implicación del eje CXCL10/CXCL11-CXCR3 en la angiogénesis y la inflamación del tejido adiposo en pacientes con obesidad mórbida

#### 3.1.1 Estudio poblacional

Todos los participantes que fueron sometidos a cirugía bariátrica firmaron un consentimiento informado y también se obtuvo la aprobación del Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Valencia. El estudio se realizó de acuerdo con los principios la Declaración de Helsinki.

Se seleccionaron 50 pacientes con obesidad mórbida que fueron referidos a la Unidad de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico Universitario de Valencia (Valencia, España) para someterse a un bypass gástrico en Y de Roux (RYGB). El grupo de pacientes estaba compuesto por 33 mujeres y 17 hombres, con una edad media de  $44 \pm 1$  años y con un IMC medio de  $44 \pm 1$  kg/m<sup>2</sup>. Los criterios de inclusión de los pacientes están basados en las recomendaciones del Instituto Nacional de Salud (NIH, por sus siglas en inglés) y fueron los siguientes; mujeres y hombres de 18 a 60 años, con un IMC > 40 kg/m<sup>2</sup> que han intentado, durante los últimos 5 años, controlar su estado de obesidad realizando cambios en su estilo de vida. Los criterios de exclusión fueron: embarazo e historial actual de enfermedades inflamatorias, infecciosas o malignas.

Una semana antes de realizar la cirugía bariátrica se les realizaron exámenes físicos con medidas antropométricas y de la presión arterial. También se estudió la historia médica completa (demografía, hábitos alimentarios, antecedentes dietéticos completos, actividad física, tabaquismo, factores de riesgo vasculares y antecedentes personales o familiares de enfermedades). El diámetro abdominal a la altura de la cintura se midió en centímetros (cm) en el punto medio entre el borde superior de la cresta iliaca y la zona inferior de la última costilla. El IMC se calculó como el peso (kg) dividido por la altura (m<sup>2</sup>). Además, se tomó y registró la media de dos mediciones para la presión arterial sistólica y diastólica. La resistencia a la insulina se calculó mediante la evaluación del modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina (HOMA-IR, por sus siglas en inglés):

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Insulina ayuno } (\mu\text{U}/\text{ml}) \times \text{Glucosa ayuno } (\text{mmol}/\text{L})}{22,5}$$

Adicionalmente, una semana antes de la cirugía, se obtuvieron muestras de sangre de los pacientes tras un periodo de 10 horas de ayuno, entre las 09:00h y las 10:00h AM. La sangre se extrajo en tubos heparinizados con el fin de obtener los parámetros bioquímicos, incluyendo los niveles de glucosa en sangre, de insulina, perfil lipídico y la proteína C reactiva, los cuales se midieron por procedimientos estándar<sup>112</sup>.

Paralelamente se reclutaron 25 sujetos no obesos, normolipidémicos y no diabéticos de la misma edad, con el fin de evaluar los niveles plasmáticos iniciales, estos sujetos no fueron sometidos a ninguna intervención quirúrgica. Los criterios de inclusión fueron: IMC <30 kg/m<sup>2</sup>, colesterol total plasmático <200 mg/dL, triglicéridos <150 mg/dL, glucosa plasmática en ayunas <100 mg/dL y ausencia de antecedentes personales o familiares de dislipidemia, enfermedad cardiovascular o diabetes.

Adicionalmente, se recolectaron muestras de sangre venosa en tubos heparinizados con el fin de obtener las muestras de plasma tanto de los pacientes obesos como de los sujetos control. Tras su extracción, la sangre se



centrifugó a 1300-2000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se guardaron inmediatamente en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis (Figura 15).

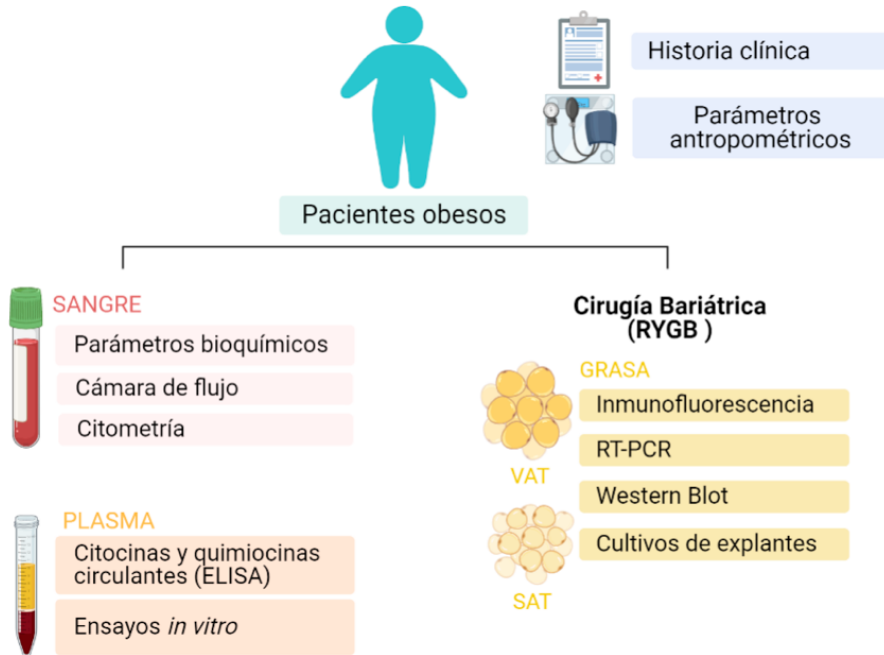


Figura 15. Resumen esquemático del estudio <sup>Δ</sup>.

### 3.1.2 Obtención de las muestras de TA durante la cirugía bariátrica

Todos los pacientes fueron intervenidos por el mismo equipo de cirugía en el Hospital Clínico Universitario de Valencia. El procedimiento laparoscópico consistió en la creación de un pequeño reservorio gástrico, de unos 20 a 30 mL, un asa alimentaria de unos 200 cm y un asa biliopancreática de 70-80 cm.

Durante la cirugía bariátrica se extrajeron muestras pareadas de VAT y SAT desde el epiplón mayor y la pared abdominal inferior respectivamente. Dichas muestras fueron recogidas y se guardaron en tampón fosfato salino 1X (PBS 1X; pH 7,4, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, tampón fosfato 12 mM) a 4°C. Posteriormente, algunas biopsias de SAT y VAT se guardaron a -80°C para su posterior análisis y otras fueron fijadas en paraformaldehído (PFA) al 4% para estudios inmunohistoquímicos. Adicionalmente, se realizaron cultivos de explantes para los diferentes estudios funcionales (**Figura 15**).

### **3.1.3 Cuantificación de los niveles plasmáticos de las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11**

La cuantificación de los niveles plasmáticos de las quimiocinas circulantes CXCL9, CXCL10 y CXCL11, tanto de los pacientes obesos como de los sujetos control, se determinó mediante el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) utilizando los kits de ELISA Quantikine® (#DCX900, #DIP100, #DCX110, respectivamente; R&D Systems, Abingdon, Reino Unido). El procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Los valores de quimiocinas se expresaron como pg/mL de quimiocina circulante.

### **3.1.4 Estudio de la expresión de ARNm de las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 y del receptor CXCR3**

Se utilizaron muestras pareadas de SAT y VAT para la extracción de ácido ribonucleico (ARN) y la posterior determinación de los niveles de expresión del ARN mensajero (ARNm) de las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11, así como del receptor CXCR3, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa por transcripción reversa (RT-qPCR).

### 3.1.4.1 Extracción del ARNm de SAT y VAT

En primer lugar, el TA se homogeneizó empleando el homogeneizador ULTRA-TURRAX® y se realizó la lisis celular empleando TRIzol® Reagent (#15596018, Invitrogen™, Carlsbad, California, EE. UU). Las muestras se purificaron con "RNeasy Lipid Tissue Mini Kit" (Qiagen, Werfen, Barcelona, España) y posteriormente fueron tratadas con DNasa (RNase-free DNase Set, Qiagen) con el fin de eliminar cualquier fragmento de ADN genómico.

Posteriormente, se cuantificó el ARNm utilizando el espectrofotómetro NanoDrop-100 (Thermo Fisher Scientific). La concentración se expresó en ng/ $\mu$ L y para la obtener la pureza del ARN se calculó la ratio de absorbancia a 260/280nm, cuyo resultado tenía que ser mayor que 1,8.

### 3.1.4.2 Transcripción reversa (RT) del ARNm

Posteriormente se llevó a cabo la transcripción reversa (RT, por sus siglas en inglés) empleando 1 $\mu$ g del ARN obtenido con el fin de obtener el ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc). Para ello se empleó el kit de transcripción reversa MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/ $\mu$ L; Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) junto con el volumen necesario de Master Mix. La mezcla de reactivos se detalla en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Composición del Master Mix para la RT

Reactivos	Volumen por muestra ( $\mu$ L)
Tampón de RT (10X)	2
Mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs 25X, 100 mM)	0,8
Cebadores aleatorios (10X)	2
MultiScribe™ Trascriptasa Reversa	1
Inhibidor de ARNasas (1 unidad/ $\mu$ l; Applied Biosystems)	1
Agua ultrapura tratada con dietilpirocarbonato (Invitrogen)	4,2
ARN	1 $\mu$ g

Dicho proceso tuvo lugar en un termociclador *SimpliAmp Thermal Cycler* (Applied Biosystems) utilizando el programa de temperaturas detallado en la **Tabla 5**. Cuando el programa finalizó, el ADNc se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso posterior.

**Tabla 5.** Programa de temperaturas para la RT.

Paso	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	Tiempo (min)
1	25	10
2	37	120
3	85	5
4	4	$\infty$

### 3.1.4.3 Análisis por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Por último, para determinar la expresión de los genes CXCL9/CXCL10/CXCL11 y de su receptor CXCR3 se amplificó el ADNc por la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) utilizando el kit Taqman™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Los componentes utilizados en las mezclas se detallan en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Reactivos de la PCR.

Reactivo	Volumen por muestra ( $\mu\text{L}$ )
TaqMan™ Universal PCR Master Mix	6,25
Sonda Taqman™	0,625
cDNA	2,5
Agua ultrapura tratada con dietilpirocarbonato	4,3

Para ello se utilizaron sondas TaqMan™ específicas para cada uno de los genes de interés y del control endógeno ARN ribosómico 18S (ARNr 18s) (Tabla 7).

**Tabla 7.** *Sondas empleadas en la qPCR*

Sonda	Referencia de la sonda TaqMan™ (Applied Biosystems)
<b>CXCL9</b>	Hs00171065_m1
<b>CXCL10</b>	Hs00171042_m1
<b>CXCL11</b>	Hs00171138_m1
<b>CXCR3</b>	Hs01847760_s1
<b>18sARN</b>	Hs99999901_s1

Para llevar a cabo la reacción se utilizó un termociclador ABI Cyler 7900 Fast System (Applied Biosystems), de acuerdo con las condiciones del ciclo explicadas en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** *Ciclos de temperaturas empleado para la qPCR.*

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Pretratamiento con uracilo-ADN glicosilasa	50	2 min	1
Desnaturalización inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	15 s	40
Anillado/Extensión	60	30 s	

La cuantificación relativa de las diferentes transcripciones se determinó por el método comparativo del ciclo umbral o Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Este método se basa en la normalización de los datos obtenidos con respecto al control endógeno ARNr 18s.

## 3.1.5 Estudio de la expresión del receptor CXCR3 en el TA mediante Western Blot

### 3.1.5.1 Extracción y cuantificación proteica

Con el fin de determinar la expresión del receptor CXCR3 en el TA, en primer lugar, se les adicionó a las muestras el tampón de lisis (Pierce™ IP Lysis Buffer, #87787, ThermoFisher), cuya composición fue: 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA y 5% glicerol junto con un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa *Thermo Scientific Halt™* (100X, #1861281, Thermo Fisher). Posteriormente, las muestras se homogeneizaron mediante el empleo de un homogeneizador (*Polytron™* Thermo Fisher), se sonicaron (Bioruptor® Plus) y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 1 hora a 4°C. Se obtuvo el contenido proteico de las muestras y se congeló a -80 C hasta su análisis.

El contenido proteico se cuantificó mediante el ensayo del ácido bicinónico (BCA)<sup>113</sup>, utilizando el kit para análisis del contenido proteico BCA Pierce™ (Thermo Fisher) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cálculo de la concentración de proteína de cada muestra se realizó interpolando los datos de la absorbancia con los datos de absorbancia de la curva patrón.

### 3.1.5.2 Análisis por Western Blot

Para el análisis por Western Blot (WB) se utilizaron 15 µg de proteína por muestra. Las muestras se diluyeron en tampón Laemmli 4X y se desnaturalizaron calentándolas a 95°C durante 5 minutos. Todos los tampones utilizados en el WB se detallan en la [Tabla 9](#).

Posteriormente se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) cargando las muestras en geles al 12% de acrilamida (composición detallada en la [Tabla 10](#)). Para llevar a cabo la electroforesis, se utilizó un campo eléctrico de 50V por gel durante 90 minutos a 4°C con los geles sumergidos en tampón de desplazamiento 1X.

**Tabla 9.** Composición de los tampones empleados en el Western Blot.

Tampón	Composición	Concentración
<b>Laemmli 4x</b>	Tris-HCl pH 6.8	0,25 M
	Dodecilsulfato sódico (SDS)	0,28 M
	Glicerol	40 %
	2-Mercaptoetanol	20 %
	Azul de bromofenol	0,005 %
<b>Tris salino 10X (TBS, pH 7.6)</b>	TBS	1X
	Tween-20	0,05%
	Tris	0,2 M
	NaCl	1.5 M
<b>Lavado</b>	TBS	1X
	Tween-20	0,05%
<b>Tampón de desplazamiento 10X (pH 8.3)</b>	Tris	25 mM
	SDS	0,1 %
	Glicina	192 mM
<b>Tampón de transferencia 10X (pH 8.3)</b>	Tris Base	25 mM
	Metanol	20%
	Glicina	192 mM

**Tabla 10.** Composición de los geles utilizados en el Western Blot.

Gel separador (12%)		Gel concentrador (6%)	
Reactivo	Volumen	Reactivo	Volumen
Acrilamida	3 mL	Acrilamida	500 µL
Tris (pH 8,8)	2,5 mL	Tris (pH 6.8)	630 µL
SDS (20%)	50 µL	SDS 20%	25 µL
H <sub>2</sub> O	4,3mL	H <sub>2</sub> O	3,8 mL
TEMED	5 µL	TEMED	5 µL
APS (10%)	50 µL	APS (10%)	25 µL

Abreviaturas: TEMED=N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina; APS=Persulfato de amonio

A continuación, las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare, Life Sciences, Germany) mediante electrotransferencia a 60V durante 2 horas a 4°C sumergidas en tampón de transferencia 1X.

Tras el bloqueo de los sitios de unión no específicos utilizando 5% de BSA en tampón tris salino (TBS 1X) durante 1 hora, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios para CXCR3, CXCR3B,  $\beta$ -actina los cuales se detallan en la **Tabla 11**. Tras el periodo de incubación, las membranas se lavaron con tampón de lavado y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con HRP (**Tabla 11**) a temperatura ambiente durante una hora.

Por último, las membranas se revelaron por quimioluminiscencia utilizando los reactivos de detección de ECL *Select*<sup>™</sup> (#RPN2235 Amersham, Reino Unido) y el revelador ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, Suecia). Se realizó el análisis de las bandas obtenidas por densitometría empleando el programa de procesamiento de imágenes ImageJ<sup>™</sup> (NIH, Bethesda, Maryland, EE. UU).

**Tabla 11.** Anticuerpos empleados en el ensayo de Western Blot

Anticuerpos primarios	Dilución	Isotipo / especie	Referencia (#)	Fabricante
<b>Anti-CXCR3 humano</b>	1:200	Monoclonal EPR7469(B) / conejo	ab154845	Abcam
<b>Anti-CXCR3B humano</b>	1:200	Monoclonal IgG2b / ratón	60065	ProteinTech
<b>Anti- <math>\beta</math>-actina humana</b>	1:2000	Monoclonal IgG2b / ratón	3700	Cell Signaling Technology
Anticuerpos secundarios	Dilución	Isotipo / especie	Referencia (#)	Fabricante
<b>Anti-IgG de ratón unido a HRP</b>	1:2000	Policlonal IgG /cabra	P0447	Dako
<b>Anti-IgG de conejo unido a HRP</b>	1:2000	Policlonal IgG /cabra	P0448	Dako



## 3.1.6 Análisis histológico de SAT y VAT

### 3.1.6.1 Preparación de los cortes histológicos del TA

Muestras pareadas de SAT y VAT fijadas en 4% de PFA fueron deshidratadas empleando PBS 1X, etanol a concentraciones crecientes (70 %, 80 %, 96 % y 100 %) y xileno. Posteriormente las muestras se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones transversales de 5  $\mu\text{m}$  con un micrótopo LEICA RM2245 (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Alemania) las cuales se montaron en portaobjetos (Superfrost® Plus, Thermo Fisher).

### 3.1.6.2 Desparafinación de los cortes histológicos

A continuación, las secciones de TA montadas en el portaobjetos se desparafinaron y fueron rehidratadas sumergiendo los portaobjetos en xileno y posteriormente en soluciones de etanol a concentraciones decrecientes (100 %, 95 %, 70 % y 50 %), agua ultrapura y PBS 1X.

### 3.1.6.3 Determinación de la infiltración linfocitaria (CD3) y la vascularización (CD31) del TA mediante inmunohistoquímica

Tras la desparafinación, la peroxidasa endógena se inactivó utilizando una solución de bloqueo con peroxidasa (Peroxidase-Blocking Solution, Dako, Glostrup, Dinamarca). A continuación, se desenmascaró el antígeno con Proteinasa K (Dako) y se bloqueó durante 1 h con suero de cabra al 15% en PBS1X. Las secciones de TA se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios anti-CD3 y anti-CD31 o IgG control los cuales se detallan en la [Tabla 12](#).

**Tabla 12.** Anticuerpos utilizados en el análisis histológico

Anticuerpo primario	Dilución	Isotipo / especie	Referencia (#)	Fabricante
Anti-CD31 humano	1:50	Policlonal IgG / conejo	ab32457	Abcam
Anti-CD3 humano	1:50	Policlonal IgG / conejo	A0452	Dako
Anti-CXCR3 humano	1:50	Monoclonal IgG1 / ratón	MAB160	R&D systems
Anti-CXCR3B humano	1:50	Monoclonal IgG2b / ratón	60065	ProteinTech
Anti-CXCL11/ITAC humano	1:100	Monoclonal IgG2A / ratón	MAB672	R&D systems
Anti- CXCL10/IP-10 humano	1:100	Monoclonal IgG1 / ratón	MAB266	R&D systems
Isotipo Control de ratón	1:50	Control IgG / ratón	31903	Thermo Fisher

Anticuerpo secundario	Dilución	Isotipo / especie	Referencia (#)	Fabricante
Alexa-Fluor® 488 Anti-IgG de ratón	1:1000	Policlonal IgG / cabra	A32723	Molecular Probes
Alexa-Fluor® 594 Anti-IgG de conejo	1:1000	Policlonal IgG / cabra	<b>A11012</b>	Molecular Probes

Tras dos lavados con PBS1X de 10 minutos, se incubaron durante 2 horas con anticuerpos secundarios conjugados con un polímero marcado con peroxidasa de rábano (HRP; #K4065 Dako). La tinción se reveló utilizando una solución de cromógeno con 3,3'-diaminobenzidina (DAB, #K4065, Dako), seguido de una contratinción con hematoxilina de Harris (#HHS32, Sigma-Aldrich).

Los cortes se rehidrataron utilizando disoluciones de etanol a concentraciones crecientes (70%, 95% y 100%) y xileno y para finalizar se montaron en un medio sintético para histología Bio-Mount (Bio-Optica, Milan, Italia). Posteriormente, se realizaron micrografías de al menos 5 campos aleatorios mediante el empleo de un microscopio (Axio Observer A1; Carl Zeiss, NY) utilizando un aumento de 40x. Se cuantificaron el número de células CD3 Y CD31 positivas por unidad de área.

#### 3.1.6.4 Expresión de las quimiocinas CXCL10 y CXCL11 y de su receptor CXCR3 en el TA mediante estudios de inmunofluorescencia

Para los estudios de inmunofluorescencia, las secciones histológicas desparafinadas de TA se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios frente a CXCL10, CXCL11, CXCR3 o CXCR3B (**Tabla 12**). Y paralelamente, también se realizaron dobles inmunofluorescencias empleando los anticuerpos anti-CD31 (microvasos) y anti-CD3 (linfocitos), con el fin de analizar la localización de estas quimiocinas y de su receptor.

Tras realizar 3 lavados con PBS1X de 10 minutos cada uno, se incubaron durante 1 hora con anticuerpos secundarios específicos Alexa Fluor<sup>®</sup> marcados con distintos fluorocromos los cuales se describen y detallan en la **Tabla 12**. Además, para confirmar la especificidad de dichos anticuerpos se realizaron controles negativos, incubando solamente con el anticuerpo secundario. Los núcleos de las células se tiñeron con colorante 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Molecular Probes).

Para finalizar, después de los lavados con PBS1x, las muestras se montaron utilizando Slow Fade<sup>™</sup> (#S36936, Invitrogen<sup>®</sup>) y se realizaron micrografías de al menos 5 campos aleatorios utilizando un aumento de 40x, en el microscopio de fluorescencia (Axio Observer A1).

### 3.1.7 Cultivos de explantes de TA

Adicionalmente, se realizaron estudios funcionales mediante el cultivo de los explantes de TA obtenidos durante la cirugía bariátrica. Para ello, las muestras frescas de VAT y SAT se lavaron con PBS 1X y se cultivaron en medio EBM-2 durante 48 horas. Posteriormente los sobrenadantes fueron guardados a -80°C para la cuantificación de los niveles de las quimiocinas CXCL10, CXCL11 y CXCL9 liberadas en dicho medio. Para su cuantificación, se realizó una aproximación similar a la indicada en el [apartado 3.1.3](#) mediante ensayos de ELISA.

#### 3.1.7.1 Cuantificación in vitro de la angiogénesis en los explantes de TA

De manera similar se realizaron ensayos funcionales para analizar la capacidad angiogénica del TA. Para ello, las muestras frescas de VAT y SAT se cultivaron en la matriz densa Matrigel<sup>®</sup> (Corning, Bedford, EE. UU) utilizando un procedimiento previamente descrito<sup>14</sup>. Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo la digestión del TA con colagenasa de tipo I (Gibco<sup>™</sup>, Thermo Fisher) durante 30 minutos a 37°C. Después de lavar con PBS1X, se cortaron en trozos de aproximadamente 1mm<sup>3</sup>.

Estos explantes fueron cultivados en Matrigel<sup>®</sup> sin factores de crecimiento con el fin de simular la matriz extracelular. Para preparar los explantes, los trozos previamente cortados se añadieron junto con el Matrigel en placas de 48 pocillos. Posteriormente se incubaron a 37°C hasta la polimerización del Matrigel. Después se añadió medio de cultivo EBM-2 suplementado con medio de crecimiento endotelial (EGM-2, ambos de Lonza, Verviers, Bélgica), penicilina (50U/mL), estreptomycin (50 mg/mL), L-glutamina (2 mM), y suero fetal bovino al 10% (FBS, Biowest, Nuaille, Francia) y se mantuvieron en el incubador a 37°C durante 14 días. El medio de cultivo se reemplazó cada dos días.

La angiogénesis fue cuantificada realizando la media del número total de brotes de 5 explantes por paciente, observados a un aumento a 5x en el microscopio.

### 3.1.7.2 Análisis de la expresión de CXCR3 y CXCR3B en los cultivos de explantes de VAT y SAT

Para el análisis de la expresión y localización del receptor CXCR3 y CXCR3B se realizaron técnicas de inmunofluorescencia. Tras los 14 días en cultivo de los explantes en Matrigel, y la realización del recuento de los brotes capilares, las muestras fueron fijadas con PFA al 4% y permeabilizadas con una solución de tritón 100X al 0,5% en PBS. Los explantes se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios anti-CXCR3, anti CXCR3B y anti-CD31 y posteriormente se utilizaron anticuerpos secundarios específicos Alexa Fluor marcados con distintos fluorocromos (detallados anteriormente en la [Tabla 12](#)). Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI.

Por último, se realizaron micrografías de distintos campos de cada sección utilizando un microscopio confocal (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Múnich, Alemania).

### 3.1.7.3 Estudio del efecto de la neutralización del receptor CXCR3 sobre la angiogénesis en los explantes de TA

Con el fin de evaluar los efectos de las quimiocinas CXCL10 y CXCL11 en la angiogénesis, algunos de los cultivos explantes de VAT se trataron con vehículo o con las proteínas recombinantes humanas (hr) CXCL10 o CXCL11 (R&D Systems) a la concentración de 10 ng/mL, durante un periodo de 7 días.

Adicionalmente, con el fin de evaluar los efectos de la neutralización del receptor CXCR3 en la formación de los brotes capilares, algunos explantes fueron incubados paralelamente con el anticuerpo neutralizante de la función del receptor CXCR3 humano (1 µg/mL, cat#MAB160, R&D Systems) o con un anticuerpo control (1 µg/mL, cat#MAB002, R&D Systems). Para finalizar se cuantificó la angiogénesis realizando la media del número total de brotes de 5 explantes por paciente y tratamiento, utilizando un aumento a 5x en un microscopio.

### 3.1.7.4 Estudio de la fosforilación y activación de la vía p38 MAPK en el TA

Tras cultivar los explantes de SAT y VAT durante 48h, se procedió a estudiar la vía de señalización intracelular p38 MAPK. Para ello se realizó un análisis por Western Blot siguiendo el mismo protocolo indicado en el apartado 3.1.5. En este ensayo las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios anti-fosfo-p38 MAPK y el anticuerpo control frente a  $\beta$ -actina detallados en la **Tabla 13**.

**Tabla 13.** Anticuerpos utilizados en el estudio de la vía p38 MAPK.

Anticuerpos primarios	Dilución	Isotipo / especie	Referencia (#)	Fabricante
<b>Anti-fosfo-p38 MAPK humano</b>	1:300	Policlonal IgG / conejo	9211	Cell Signaling Technology
<b>Anti- <math>\beta</math>-actina humano</b>	1:2000	Monoclonal IgG2b / ratón	3700	Cell Signaling Technology

### 3.1.7.5 Estudio del efecto de la neutralización del receptor CXCR3 en la activación de la vía de señalización p38 MAPK en el TA

Adicionalmente, se determinaron los efectos de las quimiocinas CXCL10 y CXCL11 y la neutralización del receptor CXCR3 en la vía p38 MAPK. Para ello, los explantes de grasa visceral se cultivaron en presencia de hrCXCL10 o hrCXCL11 (10 ng/mL) durante 1 hora. Paralelamente, algunos explantes fueron tratados previamente con anticuerpo de ratón anti-CXCR3 humano durante 15 minutos. Posteriormente, se procedió a realizar el ensayo de Western Blot utilizando los mismos anticuerpos detallados en el apartado anterior frente a p38 MAPK y  $\beta$ -actina.

## 3.2. Materiales y métodos del segundo estudio: Implicación del eje CCL17/CCL22-CCR4 en la disfunción endotelial en pacientes con obesidad mórbida

### 3.2.1 Estudio poblacional

Se seleccionaron 60 pacientes con obesidad mórbida referidos a la Unidad de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico Universitario de Valencia (Valencia, España) para someterse a un *bypass gástrico en Y de Roux* (RYGB). Todos los participantes firmaron su consentimiento informado por escrito y se obtuvo la aprobación del Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Valencia. El estudio se realizó de acuerdo con los principios éticos formulados en la Declaración de Helsinki.

El grupo de pacientes obesos estaba compuesto por 40 mujeres y 20 hombres, con una edad media de  $44 \pm 1,5$  años y con un IMC medio de  $44 \pm 0,8$  kg/m<sup>2</sup>. También se reclutaron 25 sujetos no obesos, normolipidémicos y no diabéticos de la misma edad, con el fin de evaluar los niveles plasmáticos iniciales. Los criterios de inclusión y de exclusión fueron los mismos que en el **apartado 3.1.1** en ambos casos.

Antes de la operación, fue incluida la historia médica completa y también se les extrajeron muestras de sangre con el fin de obtener parámetros bioquímicos, y plasma sanguíneo, tal y como se explica en el **apartado 3.1.1**.

Todos los pacientes fueron operados por el mismo equipo de cirugía en el Hospital Clínico Universitario de Valencia. Durante la cirugía se obtuvieron muestras pareadas de VAT y SAT. Posteriormente las muestras fueron guardadas tal y como se indica en el **apartado 3.1.2**.

### 3.2.2 Cuantificación de los niveles plasmáticos de las quimiocinas CCL17 y CCL22 mediante ELISA

La cuantificación de los niveles plasmáticos de las quimiocinas circulantes CCL17 y CCL22, tanto de los pacientes obesos como de los sujetos control, se realizó mediante ensayo ELISA utilizando los kits de ELISA Quantikine® (#DY36405 y DY336, respectivamente; R&D Systems). El procedimiento se realizó siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

### 3.2.3 Estudio de la expresión de ARNm de las quimiocinas CCL17 y CCL22 y del receptor CCR4

Para la extracción de ARNm las muestras de TA se homogenizaron en TRIzol® Reagent (Invitrogen) y se purificaron con "RNeasy Lipid Tissue Mini Kit" (Qiagen). Posteriormente se empleó TaqMan Reverse Transcription Reagent Kit (Applied Biosystems,) para transcribir 1µg del ARN. Los protocolos fueron similares a los detallados en los apartados [3.1.4.1](#) y [3.1.4.2](#).

Para determinar la expresión de los genes CCL17, CCL22 y CCR4 se amplificó el ADNc por qPCR. Las reacciones de amplificación se realizaron en un sistema de PCR en tiempo real 7900HT utilizando la Universal Master Mix (Applied Biosystems). Los componentes utilizados en las mezclas y las condiciones del ciclo se detallan en el [apartado 3.1.4.3](#).

En este caso se utilizaron sondas TaqMan™ específicas (Applied Biosystems) para cada uno de los genes de interés del eje CCR4 y del control endógeno ARNr 18s ([Tabla 14](#)). La cuantificación relativa de las diferentes transcripciones se determinó con el método del método comparativo del ciclo umbral o Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).



**Tabla 14.** Sondas Taqman® específicas para la qPCR

Sonda	Referencia de la sonda TaqMan™ (Applied Biosystems)
<b>CCL17</b>	Hs00171074_m1
<b>CCL22</b>	Hs01574247_m1
<b>CCR4</b>	Hs00747615_s1
<b>ARNr 18s</b>	Hs99999901_s1

### 3.2.4 Estudio de la expresión del receptor CCR4 en el TA

El análisis del contenido y la cuantificación proteica se realizó siguiendo los procedimientos descritos en los apartados 3.1.5.1 y 3.1.5.2. Las muestras se separaron en un gel de electroforesis SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Tras el bloqueo de los sitios de unión no específicos con solución de bloqueo (5% de BSA en TBS 1X), las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios para CCR4 y  $\beta$ -actina diluidos en TBS1X. Después se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con HRP (Tabla 15) durante una hora y las bandas se detectaron utilizando el revelador *ImageQuant LAS 500*.

**Tabla 15.** Anticuerpos utilizados en el Western Blot de TA.

Anticuerpos primarios	Dilución	Isotipo / especie	Referencia (#)	Fabricante
<b>Anti-CCR4 humano</b>	1:200	Policlonal IgG / conejo	NB100-56336	Novus Biologicals
<b>Anti-<math>\beta</math>-actina</b>	1:1000	Monoclonal IgG/ ratón	SAB1305546	Sigma-Aldrich
Anticuerpos secundarios	Dilución	Isotipo / especie	Referencia (#)	Fabricante
<b>Anti-IgG de ratón unido a HRP</b>	1:2000	Policlonal IgG / cabra	P0447	Dako
<b>Anti-IgG de conejo unido a HRP</b>	1:2000	Policlonal IgG / cabra	P0448	Dako

### 3.2.5 Análisis histológico del TA

Las muestras pareadas de SAT y VAT fueron deshidratadas, incluidas en parafina, cortadas en secciones trasversales de 5  $\mu\text{m}$  y posteriormente montadas en un portaobjetos, tal y como se describe en el [apartado 3.1.6](#).

#### 3.2.5.1 Expresión del eje CCR4 por inmunofluorescencia en el TA

Para los estudios de inmunofluorescencia se desenmascaró el antígeno con Proteinasa K (Dako) y se bloqueó durante 1h con suero de cabra al 15% en PBS1X. Posteriormente se incubaron las muestras con los anticuerpos primarios: anti-CCL17, anti-CCL22, y anti-CCR4, a 4°C durante toda la noche. Tras sucesivos lavados del anticuerpo primario con PBS1X, se incubaron durante 1 hora con anticuerpos secundarios específicos Alexa Fluor® (Molecular Probes) marcados con distintos fluorocromos (todos los anticuerpos se encuentran detallados en la [Tabla 16](#)).

Con el fin de analizar la localización de estas quimiocinas y de su receptor, se realizaron dobles inmunofluorescencias empleando anticuerpos marcadores de células endoteliales anti-CD31 (microvasos), frente a CD3 para la detección de los linfocitos en las muestras de TA y MAC-3<sup>+</sup> para detectar macrófagos. Los núcleos de las células se tiñeron con Hoechst (2'-[4'-etoxifenil]-5-[4-metilpiperazin-1-il]-2,5'-bis-1h-benzimidazol-trihidrocloruro-trihidrato;1:4000, #62249, Thermo Fisher). Posteriormente, se realizaron micrografías de al menos 5 campos aleatorios utilizando un aumento de 40x, en el microscopio de fluorescencia (Axio Observer A1).

**Tabla 16.** *Anticuerpos primarios utilizados en la inmunofluorescencia.*

Anticuerpo primario	Dilución	Isotipo / especie	Referencia (#)	Fabricante
Anti-CD31 humano	1:50	Policlonal IgG / conejo	ab32457	Abcam
Anti-CD3 humano	1:100	Policlonal IgG / conejo	C7930	Sigma-Aldrich
Anti-Mac-3 humano	1:100	Monoclonal IgG1 / rata	sc-19991	Santa Cruz Biotechnology
Anti-CCL17/TARC humano	1:50	Monoclonal IgG1 /ratón	DY364-05	R&D Systems
Anti-CCL22/MDC humano	1:50	Monoclonal IgG1 /ratón	DY336	R&D Systems
Anti- CCR4 humano	1:100	Policlonal IgG/ cabra	ab1669	Abcam

Anticuerpo secundario	Dilución	Isotipo / especie	Referencia (#)	Fabricante
Alexa-Fluor® 594 Anti-IgG de ratón	1:1000	Policlonal IgG / cabra	A1105	Molecular Probes
Alexa-Fluor® 594 Anti-IgG de rata	1:1000	Policlonal IgG / cabra	A1107	Molecular Probes
Alexa-Fluor® 488 Anti-IgG de conejo	1:1000	Policlonal IgG / cabra	A11034	Molecular Probes
Alexa-Fluor® 488 Anti-IgG de rata	1:1000	Policlonal IgG / burro	A21208	Molecular Probes
Alexa-Fluor® 594 Anti-IgG de cabra	1:1000	Policlonal IgG / pollo	A21468	Molecular Probes

### 3.2.6 Cultivos de explantes de TA

Para medir la secreción de quimiocinas, los explantes se cultivaron durante 48 h en una placa de 6 pocillos con medio completo (EBM-2) con FBS 10% y antibiótico a 37°C. La cuantificación de la secreción de CCL17 y CCL22 de los explantes se realizó utilizando los mismos kits de ELISA que en el apartado 3.2.2.

### 3.2.7 Estudios con células aórticas endoteliales humanas (HAECs)

#### 3.2.7.1 Cultivos celulares

Las HAECs (#CC-2535, Lonza) se cultivaron y mantuvieron en medio de cultivo completo EMB-2 con FBS 10%.

#### 3.2.7.2 Expresión del receptor CCR4 por inmunofluorescencia en HAECs

Las HAECs se sembraron en placas de 12 pocillos, las cuales fueron añadidas sobre un cubreobjetos de vidrio redondo incluido en el fondo del pocillo. Se cultivaron hasta el 100% de confluencia, posteriormente se fijaron con PFA al 4% y se bloquearon con BSA al 1% en solución de PBS 1X con el fin de evitar las uniones inespecíficas.

La expresión de CCR4 se detectó usando un anticuerpo primario de cabra anti-CCR4 humano (dilución 1:100). Como anticuerpo secundario se utilizó un Alexa-Fluor® 488 anti-cabra (dilución 1:1000). Los núcleos se marcaron con Hoechst (1:4000). Las fotografías se obtuvieron a un aumento de 63x, con un microscopio de fluorescencia.

#### 3.2.7.3 Ensayo de proliferación endotelial

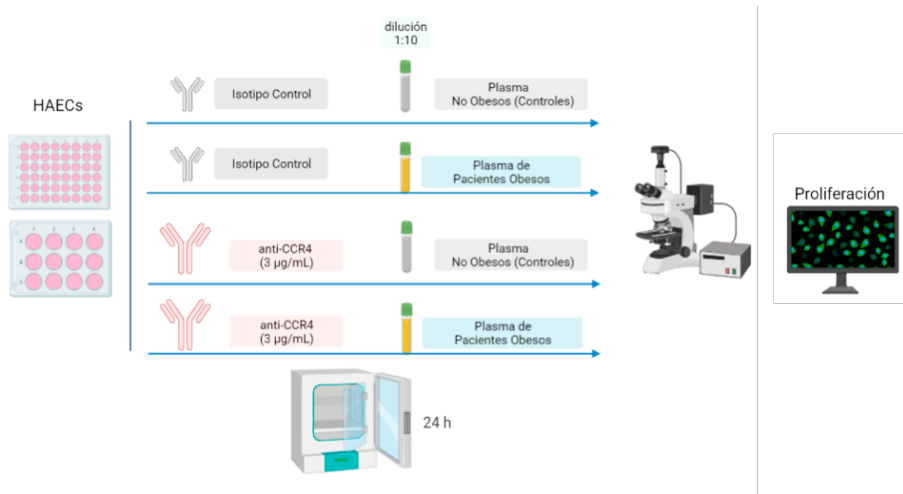
El ensayo de proliferación se realizó mediante la incorporación de bromodesoxiuridina (5-bromo-2-desoxiuridina, BrdU) utilizando un protocolo experi-

mental previamente descrito<sup>115</sup>. El BrdU es un análogo sintético de la timidina, que se incorpora selectivamente al ADN celular en la fase S del ciclo celular. En primer lugar, las HAECs se sembraron en placas de 12 pocillos sobre un cubreobjetos de vidrio redondo incluido en el fondo del pocillo. Cuando alcanzaron un 30-40% de confluencia, las HAECs se incubaron con proteína recombinante humana para CCL17 y CCL22 (10 ng/mL, #300-30 y # 500-P107 respectivamente, ambas de PeproTech), o con vehículo.

En otros pocillos se les adicionó el plasma diluido (1:10 en medio EBM-2 al 1% de FBS) de pacientes con obesidad mórbida o de sujetos control durante 24 h. Paralelamente, algunas placas se incubaron con un anticuerpo neutralizante de ratón anti-CCR4 humano (3 µg/mL, *Mogamulizumab*, #ab00726, Absolute Antibody, Oxford, Reino Unido), o un anticuerpo IgG control a la misma concentración (#31903, Thermo Fischer Scientific). El esquema se detalla en la **Figura 16**.

Posteriormente, se determinó la proliferación celular incubando las HAECs con 5-bromodesoxiuridina (BrdU, # B23151, 50 µM) durante 5 horas. Después, las células se fijaron con PFA al 4% durante 20 min, se permeabilizaron con 1% Tritón X-100 diluido en PBS 1X durante 15 min y se bloquearon con PBS que contenía suero de cabra al 10% durante 1 h a temperatura ambiente. Las células positivas para BrdU se detectaron mediante inmunofluorescencia adicionando un anticuerpo anti-BrdU Alexa Fluor-488 (2 mg/mL, #B35130, Invitrogen). La tinción nuclear se realizó con Hoechst (1: 4000).

Para finalizar se realizaron micrografías de diferentes campos con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Observer A1 195 (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH) a un aumento de 40x. La proliferación celular se determinó como el porcentaje de células positivas para BrdU en relación con el recuento total de células por campo.



**Figura 16.** Resumen esquemático de los tratamientos utilizados en el ensayo de proliferación <sup>Δ</sup>.

### 3.2.7.4 Análisis de la organización citoesquelética por inmunofluorescencia

Con el fin de evaluar el efecto de las quimiocinas CCL17 y CCL22 en la organización citoesquelética, se estimularon HAECs durante 4 horas con proteína recombinante humana para CCL17 y CCL22 (10ng/mL, #300-30 y # 500-P107 respectivamente, ambas de PeproTech), o vehículo (DMSO 0,1%). Antes de la estimulación, algunos pocillos se incubaron durante 15 minutos con Mogamulizumab (anti-CCR4 humano, 3 µg/mL, #ab00726, Absolute Antibody).

Las células se fijaron con PFA al 4% y se permeabilizaron con Triton-X100 al 0,1%. Posteriormente se incubaron con un anticuerpo de conejo anti-VE-cadherina humana (1: 100, #2158, Cell Signaling) durante la toda la noche a 4°C. Después de lavarlas, las células se incubaron durante 1 hora con Alexa-Fluor® 488 de cabra anti-conejo (1: 1000, #A11034, Molecular Probes) y posteriormente, se incubaron con el reactivo para detectar, Rodamina y Faloidina (1:1000, ab235138, Abcam) durante 1 hora. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (1:4000).

Las imágenes se obtuvieron con un microscopio Zeiss Axio Observer A1 (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH) con un aumento de 63x

### 3.2.7.5 Estudio de la expresión de CCR4 y de la fosforilación de p44/42 MAPK (ERK1/2) en HAECs mediante Western Blot

Con el fin de estudiar la activación de la vía de fosforilación ERK1/2, las HAECs se sembraron en placas de 6 pocillos y se cultivaron hasta alcanzar la máxima confluencia. Las células fueron tratadas en medio de ayuno con las proteínas recombinantes humanas hrCCL17 o hrCCL22 (10ng/mL) durante 30 minutos. Algunas de estas placas se pre-incubaron previamente con el anticuerpo neutralizante frente a CCR4 durante 10 minutos.

Posteriormente, con el fin de obtener el contenido proteico, las células se lavaron con PBS1X frío y se añadió el tampón de lisis (Pierce™ IP Lysis Buffer) y el cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas *Thermo Scientific Halt™* (100X, #1861281, Thermo Fisher). Las células se recogieron utilizando un raspador celular de placas, se agitaron con un vórtex y se sonicaron las muestras. El homogenado resultante se centrifugó a 7000 g durante 20 minutos a 4°C y se guardaron los sobrenadantes a -80 °C para el posterior análisis proteico.

La concentración de proteína se midió en los sobrenadantes mediante el ensayo de BCA al igual que se describe en el [apartado 3.1.5.1](#). Las muestras se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (siguiendo el mismo protocolo que en el [apartado 3.2.4](#)). Posteriormente, se bloquearon los sitios de unión no específicos durante 1 hora con solución de bloqueo compuesta de tampón tris salino (TBS 1X) al 5% de BSA. Posteriormente, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios frente a CCR4, fosfo-ERK1/2 MAPK, ERK1/2 MAPK y  $\beta$ -actina (detallados en la [Tabla 17](#)). Tras lavar las membranas con TBS1X, se incubaron con anticuerpos secundarios unidos a HRP ([Tabla 17](#)) durante 1 hora. Las membranas se revelaron y el análisis de densitometría de las bandas proteicas se realizó utilizando el software ImageJ (NIH).

**Tabla 17.** Anticuerpos empleados en el estudio de la fosforilación de ERK 1/2

Anticuerpos primarios	Dilución	Isotipo / especie	Referencia (#)	Fabricante
<b>Anti-CCR4 humano</b>	1:200	Policlonal IgG / conejo	NB100-56336	Novus Biologicals
<b>Anti- fosfo-ERK1/2 MAPK</b>	1:500	Monoclonal IgG/ conejo	4377	Cell Signalling
<b>Anti- ERK1/2 MAPK</b>	1:500	Monoclonal IgG/ conejo	4695	Cell Signalling
<b>Anti-<math>\beta</math>-actina</b>	1:1000	Monoclonal IgG/ ratón	SAB1305546	Sigma-Aldrich

Anticuerpos secundarios	Dilución	Isotipo / especie	Referencia (#)	Fabricante
<b>Anti-IgG de ratón unido a HRP</b>	1:2000	Policlonal IgG / cabra	P0447	Dako
<b>Anti-IgG de conejo unido a HRP</b>	1:2000	Policlonal IgG / cabra	P0448	Dako

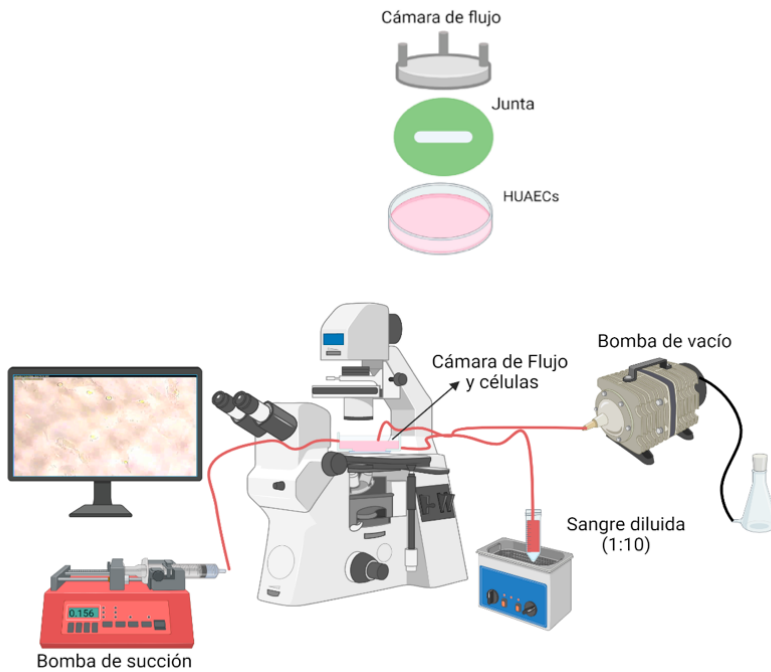
### 3.2.7.6 Efecto de la neutralización de CCR4 en las interacciones leucocito-endotelio en condiciones dinámicas de flujo

Para determinar el papel del receptor CCR4 en la adhesión leucocitaria, las HAECs se sembraron en placas redondas de 35 mm de diámetro y se estimularon algunas de estas placas con TNF $\alpha$  (20 ng/mL) o vehículo durante las 24 horas previas al ensayo. Paralelamente, 30 min antes del ensayo, algunas de estas placas se trataron con el anticuerpo neutralizante anti-CCR4 humano (3  $\mu$ g/mL) o un anticuerpo control.



Tras los tratamientos, se realizó el ensayo en cámara de flujo paralelo, el cual permite visualizar la adhesión leucocitaria bajo condiciones dinámicas de flujo, es decir, mimetizando las condiciones fisiológicas. El modelo se basa en una pequeña cámara (GlycotTech flow, EEUU) acoplada a la placa de 35 mm de células y una fina junta de silicona que controla el diámetro de la cámara. Esta cámara dispone de un puerto de entrada, a través del cual se perfunden la sangre y los medios; un puerto de salida, donde se le acopla una bomba de succión y un tercer puerto unido a una bomba de vacío. De esta forma, se forma así un circuito cerrado de flujo sobre la monocapa de células endoteliales. La velocidad de infusión está regulada por la propia bomba de succión y se ajusta a  $0,5 \text{ dinas/cm}^2$ . Se muestra un dibujo representativo en la **Figura 17**.

Para estudiar las interacciones leucocito-endotelio *ex vivo*, en primer lugar, se diluyó la sangre de los pacientes obesos y de los controles (1:10) en tampón *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS; #H3BE10-543F, Lonza) y se atemperó a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente, la sangre se perfundió a través de la monocapa de HAECs previamente estimuladas con los diferentes tratamientos a una velocidad de flujo de  $0,156 \text{ mL/min}$  (que corresponde a  $0,5 \text{ dinas/cm}^2$ ). La adhesión leucocito-endotelio se determinó después de 5 minutos de flujo continuo. Posteriormente se perfundió medio a la misma velocidad y los leucocitos adheridos se cuantificaron con un microscopio de contraste de fases (Axio Observer A1, Carl Zeiss). En todos los estudios, las interacciones leucocito-endotelio, se registraron y grabaron mediante una cámara de video (SSC-C80P, Sony, Tokio, Japón). Para la cuantificación de las células adheridas, se analizaron 5 campos aleatorios para cada una de las placas y tratamientos.



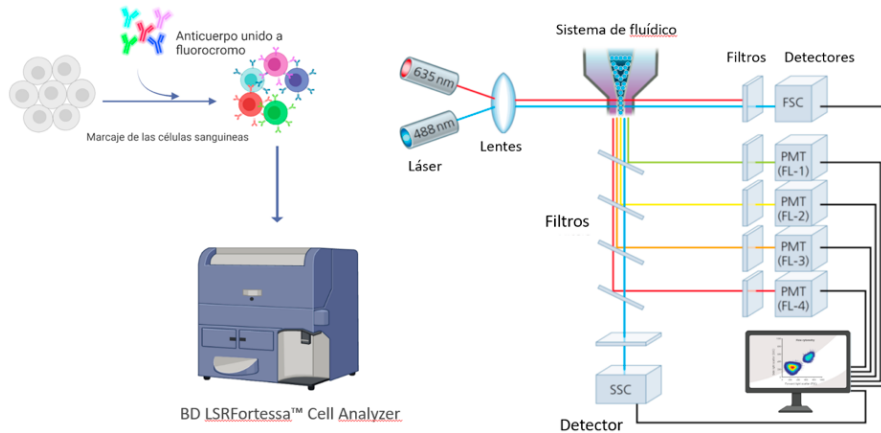
**Figura 17.** Dibujo representativo de la cámara de flujo paralelo <sup>Δ</sup>.

### 3.2.8 Inmunofenotipado con citometría de flujo

La citometría de flujo es una herramienta que permite, entre otras aplicaciones, el recuento de células e identificar marcadores celulares. Con ello se puede conseguir el inmunofenotipado de diferentes tejidos o muestras, entre ellas la sangre humana.

En general, las células se marcan con un anticuerpo unido a fluorocromo que va dirigido a una diana específica. Estas células se resuspenden en un tampón salino y pasan individualmente por el citómetro (**Figura 18**)<sup>116</sup>. Este consta de varios láseres y cuando las células inciden individualmente sobre ellos, los datos de la luz que es reflejada y refractada se registran. Los parámetros que

se registran son: *dispersión frontal* (FSC) el cual indica el tamaño de las células, la granularidad o complejidad relativa mediante la *dispersión lateral* (SSC) y la *intensidad media de fluorescencia* (MIF) cuando la muestra es marcada con un anticuerpo unido a fluorocromo.



**Figura 18.** Esquema ilustrativo del marcaje de células con fluorocromos y del citómetro de flujo. Imagen adaptada de Rahman M. (2014)<sup>16</sup>.

Una vez recogidas todas las señales, se transforman en una señal eléctrica, a través de los fotodetectores y posteriormente dicha señal se amplifica mediante tubos fotomultiplicadores (PMT). Al final, la información generada se ordena en archivos informáticos denominados *estándar de citometría de flujo* (FCS) y es mostrada en la pantalla mediante el uso de diferentes programas informáticos, lo que permite el análisis de las poblaciones celulares y los marcadores de interés<sup>117,118</sup>.

Las muestras de sangre venosa, tanto de los pacientes obesos, como de los sujetos control, se recolectaron en tubos heparinizados para el análisis de leucocitos o tubos con citrato sódico (0,105M, 3.2%; BD Vacutainer®; BD Biosciences) para el análisis de las plaquetas.

### 3.2.8.1 Análisis de la activación de las plaquetas

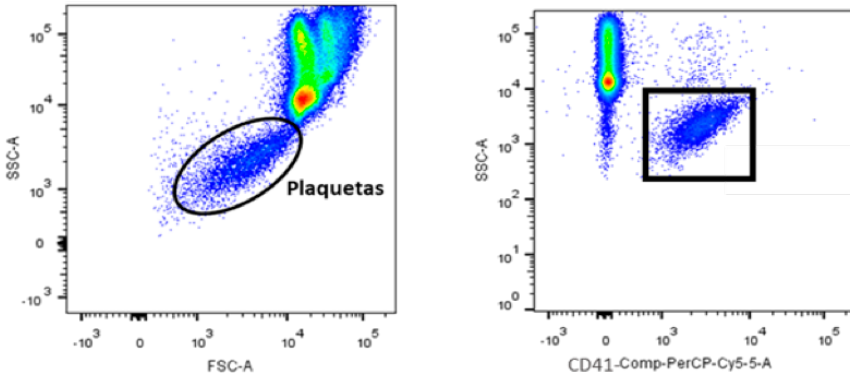
Con el fin de determinar la activación de las plaquetas, se añadieron en un tubo 6,25  $\mu\text{L}$  de sangre con citrato de obeso o control, diluida previamente 1:10 en tampón glucosa (1mg/mL en PBS1X con 0,35% BSA) y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad y temperatura ambiente con anticuerpos mostrados en la **Tabla 18**.

**Tabla 18.** Anticuerpos empleados para detectar la activación plaquetaria.

Activación de plaquetas						
Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Referencia (#)	Fabricante
Anti-CD41a	PerCP-Cy5.5	IgG, $\kappa$	HIP8	2,5	333148	BD Biosciences
Anti-P-selectina	APC	IgG1, $\kappa$	AK-4	1,25	561920	BD Biosciences

Abreviaturas: FITC=Isotiocianato de fluoresceína; APC=Aloficocianina; PerCP=peridinina-clorofila; Cy=Cianina

Posteriormente las muestras se procesaron el citómetro de flujo (LSRFortessa™ Cell Analyzer, BD Biosciences). Y los datos se analizaron con el programa FlowJo® v10.0.7 (FlowJo LLC, Ashland, EE. UU). La estrategia para seleccionar las plaquetas y su activación se determinó mediante el SSC y FSC y el anticuerpo CD41<sup>+</sup>, tal y como se explica en la **Figura 19**.



**Figura 19.** Estrategia de selección de plaquetas humanas en sangre entera. Las plaquetas se seleccionaron de acuerdo con la SSC y FSC. Posteriormente se seleccionaron las CD41+.

### 3.2.8.2 Análisis de la expresión de CCR4 en las plaquetas

Para determinar la expresión de CCR4 en las plaquetas, se pipetearon 20  $\mu\text{L}$  de sangre con citrato en un tubo Eppendorf® por cada una de las muestras y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad y temperatura ambiente con anticuerpos mostrados en la [Tabla 19](#).

**Tabla 19.** Anticuerpos utilizados para detectar CCR4 en plaquetas.

Plaquetas						
Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Referencia (#)	Fabricante
Anti-CD41a	PerCP-Cy5.5	IgG, $\kappa$	HIP8	2,5	333148	BD Biosciences
Anti-CCR4	PE	IgG1, $\kappa$	L291H4	5	359412	BioLegend®

Abreviaturas: PerCP=Peridínina-Clorofila; Cy=Cianina; PE=Ficoeritrina

Posteriormente, se lisaron los eritrocitos con tampón de lisis 1x (BD FACS 10X, #10141013, BD Biosciences) durante 20 minutos. Después se procesaron en el citómetro. Finalmente se seleccionaron las plaquetas tal y como se muestra en el apartado anterior (3.2.8.1, **Figura 19**). Los resultados se expresaron como el porcentaje de plaquetas positivas para CCR4.

### 3.2.8.3 Análisis de las subpoblaciones leucocitarias circulantes: linfocitos T y monocitos

Con el fin determinar la activación y la expresión de CCR4 en las diferentes subpoblaciones leucocitarias de la sangre de los pacientes obesos y controles, se pipetearon 50µL de las muestras de sangre heparinizada en un tubo y se incubaron junto a diferentes anticuerpos (**Tabla 20** y **Tabla 21**) para detectar linfocitos T, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T colaboradores (T helper) y sus subpoblaciones (Th1, Th2, Th17 y Treg) y monocitos, durante 30 minutos en oscuridad y temperatura ambiente.

**Tabla 20.** Anticuerpos utilizados para detectar CCR4 en las subpoblaciones de linfocitos.

Subpoblaciones linfocitarias						
Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	Volumen (µL)	Referencia (#)	Fabricante
Anti-CD3	APC-H7	IgG1, κ	SK7	1,25	560275	BD Biosciences
Anti-CD4	BUV395	IgG1, κ	SK3	1,25	563552	BD Biosciences
Anti-CD8	FITC	IgG1, κ	HIT8a	10	560960	BD Biosciences
Anti-CCR6	PE-Cy7	IgG2b, κ	G034E3	2,5	353417	BioLegend®
Anti-CXCR3	APC	IgG1, κ	G025H7	10	353707	BioLegend®
Anti-CD127	BV650	IgG1, κ	A019D5	2,5	351325	BioLegend®
Anti-CD25	BV421	IgG1, κ	M-A251	2,5	356113	BioLegend®
Anti-CD69	BV711	IgG1, κ	FN50	2,5	310943	BioLegend®
Anti-CCR4	PE	IgG1, κ	L291H4	5	359412	BioLegend®

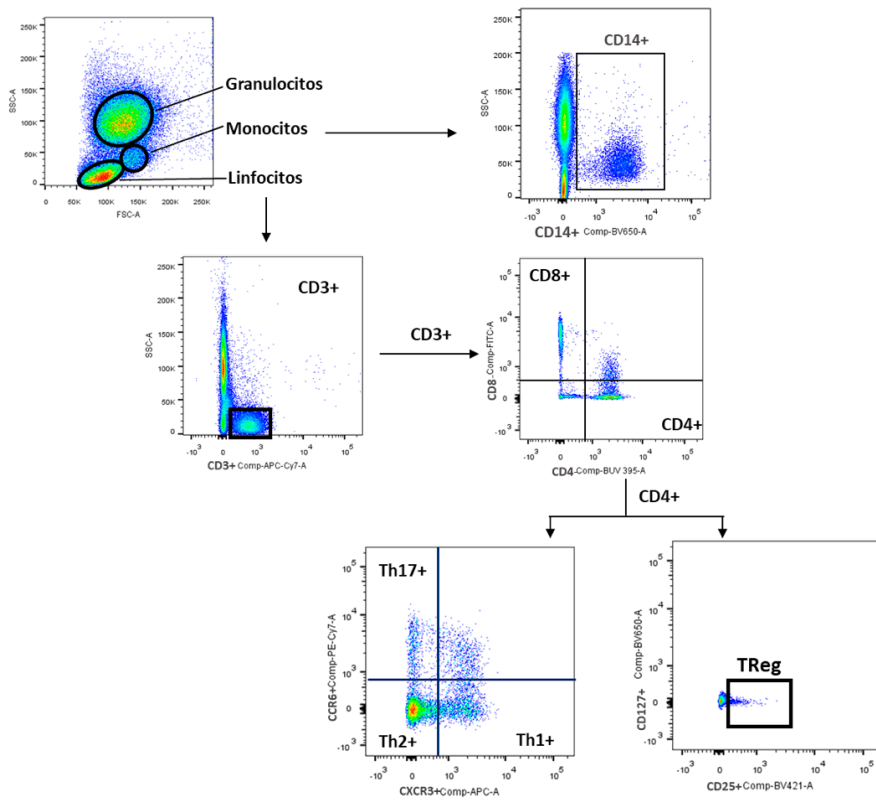
Abreviaturas: APC-H7=Alofocianina conjugada en tándem con cianina; BUV395=Brilliant Ultraviolet™; FITC=Isotiocianato de fluoresceína; PE-Cy7=Ficoeritrina conjugada en tándem con cianina; APC=Alofocianina; BV=Brilliant Violet™; PE=Ficoeritrina

**Tabla 21.** Anticuerpos utilizados para detectar CCR4 en monocitos.

Monocitos						
Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	Volumen (μL)	Referencia (#)	Fabricante
Anti-CD14	BV 650	IgG2a, κ	M5E2	1,25	563420	BD Biosciences
Anti-CD11b	APC	IgG1, κ	ICRF44	2,5	301309	BioLegend®
Anti-CCR4	PE	IgG1, κ	L291H4	5	359412	BioLegend®

Abreviaturas: APC-H7=Alofocianina conjugada en tándem con cianina; BUV395=Brilliant Ultraviolet™; FITC=Isotiocianato de fluoresceína; PE-Cy7=Ficoeritrina conjugada en tándem con cianina; APC=Alofocianina; BV=Brilliant Violet™; PE=Ficoeritrina

Posteriormente, se lisaron los eritrocitos con tampón de lisis 1X durante 20 minutos, se resuspendieron en PBS1X y se procesaron por el citómetro de flujo. Finalmente se seleccionaron las subpoblaciones tal y como se muestra en la **Figura 20** y los resultados se expresaron como el porcentaje de células positivas para cada una de ellas y en combinación con el receptor CCR4.



**Figura 20.** Estrategia de selección de linfocitos T (CD3+), CD4+ y CD8+ en sangre entera heparinizada. También se seleccionaron las subpoblaciones CD4+ "T helper": Th1+ (CXCR3+/CCR6-), Th2 (CXCR3-/CCR6-) y Th17 (CXCR3-/CCR6+), T Reguladoras (CD127-/CD25+) y monocitos (CD14+).

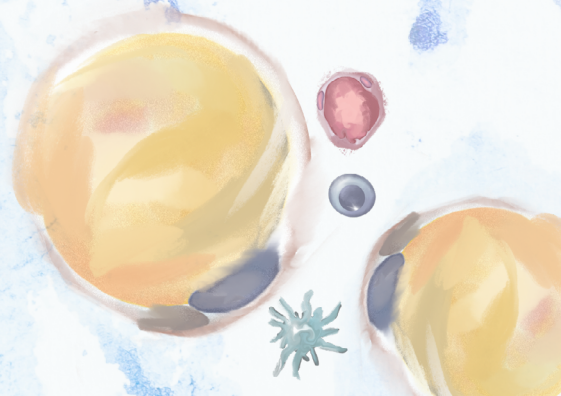


### 3.3. Análisis estadístico

Todos los estudios estadísticos se realizaron con el programa de análisis GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, EE. UU) y el programa IBM SPSS Statistic®. Los datos con distribución normal se expresaron como la media  $\pm$  ESM (error estándar de la media). Los datos no paramétricos se expresaron como la mediana y rango intercuartil. Los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando  $P < 0,05$ . Para comparaciones entre dos grupos no pareados, primero se evaluó la normalidad en la distribución de los datos, y para ello se realizó el *test de Kolmogorov-Smirnov* y el de igualdad de varianzas (*test de Levene*). Posteriormente a los datos que pasaron estos dos test, se aplicó el *test de la T de Student*. En cambio, a los datos no paramétricos se les aplicó el *test U de Mann Whitney*. Por otro lado, para comparaciones entre dos grupos pareados que pasaron el test de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) como el de igualdad de varianzas (test de Levene), se utilizó el test de la T de Student. Sin embargo, a los que no pasaron el test, se les aplicó el test no paramétrico de Wilcoxon. Para la comparación entre múltiples grupos se aplicó el análisis de varianzas (ANOVA) unidireccional seguido de un análisis post hoc (test de Bonferroni) para datos que pasaron tanto el test de normalidad como el de igualdad de varianzas; para el resto de los datos se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido análisis post hoc de Dunn. Adicionalmente, se calcularon algunas correlaciones de los niveles plasmáticos de las quimiocinas y las características clínicas utilizando los métodos de correlación de Spearman.



# 4. RESULTADOS





## 4. Resultados

### 4.1. Resultados del primer estudio: Implicación del eje CXCL10/CXCL11-CXCR3 en la angiogénesis y la inflamación del TA en pacientes con obesidad mórbida

#### 4.1.1 Los niveles circulantes de las quimiocinas CXCL10 y CXCL11 están elevados en pacientes con obesidad mórbida.

Se citaron 50 pacientes con obesidad mórbida una semana antes de la cirugía bariátrica para realizarles una extracción de sangre y las mediciones de parámetros bioquímicos y clínicos como la presión arterial, y medidas antropométricas. Paralelamente, se estudiaron 25 sujetos control no obesos para el estudio de dichos parámetros. En la [Tabla 22](#) se resumen las medidas obtenidas.

**Tabla 22.** Características clínicas y bioquímicas de los pacientes con obesidad mórbida y los sujetos control. Los valores están expresados como la media  $\pm$  ESM; \*  $p < 0,05$  vs controles.

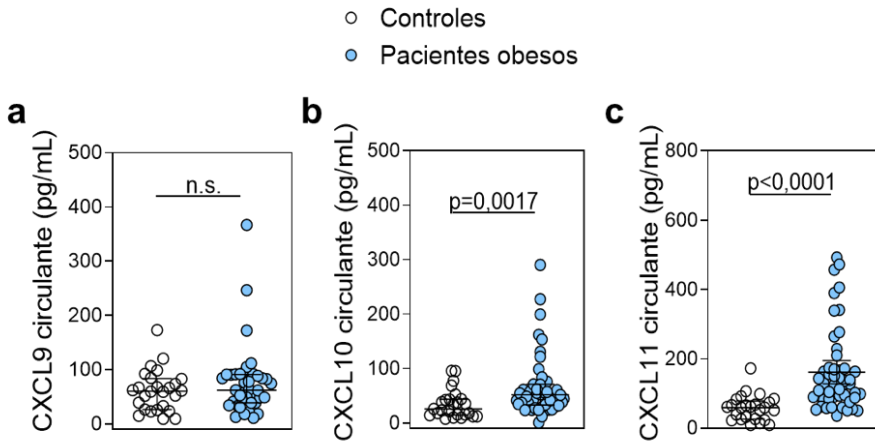
Características clínicas y bioquímicas	Pacientes obesos mórbidos (n=50)	Controles (n=25)	P valor
Edad	44 $\pm$ 1	42 $\pm$ 1	0,837
Sexo femenino, % (n)	66 (33)	60 (15)	0,379
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	44 $\pm$ 1	25 $\pm$ 1	<0,0001*
Peso (kg)	125 $\pm$ 3,4	73 $\pm$ 3	<0,0001*
Diámetro de cintura (cm)	129 $\pm$ 2,1	81,4 $\pm$ 2,4	<0,0001*
Glucosa en ayunas (mg/dL)	98,2 $\pm$ 3,8	87 $\pm$ 3,5	0,101
Insulina en plasma (mUI/mL)	21,9 $\pm$ 2,1	8,3 $\pm$ 0,1	0,0001*
Índice HOMA-IR	5,4 $\pm$ 0,6	1,9 $\pm$ 0,3	0,0018*
Triglicéridos (mg/dL)	107,9 $\pm$ 5,8	70,8 $\pm$ 3,2	0,0001*
Colesterol total (mg/dL)	157,9 $\pm$ 4,4	160 $\pm$ 7,1	0,780
Colesterol LDL (mg/dL)	104,6 $\pm$ 4,0	115 $\pm$ 1,7	0,118
Colesterol HDL (mg/dL)	41,0 $\pm$ 1,2	43,5 $\pm$ 1,3	0,206
Proteína C Reactiva (mg/dL)	7,7 $\pm$ 1	1,2 $\pm$ 0,3	0,0001*
Presión arterial sistólica (mmHg)	128,4 $\pm$ 2,6	116,4 $\pm$ 2,9	0,0043*
Presión arterial diastólica (mmHg)	80,5 $\pm$ 5,8	70,7 $\pm$ 1,9	0,0020*
Diabetes, % (n)	28 (14)	-	-
Hipertensión, % (n)	26 (13)	-	-

IMC: índice de masa corporal; LDL: Lipoproteína de baja densidad; HDL: Lipoproteína de alta densidad.

A continuación, se cuantificaron los niveles plasmáticos de las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 mediante la técnica ELISA. Tal y como se muestra en la **Figura 21**, no se observaron diferencias significativas de los niveles plasmáticos de CXCL9 entre los pacientes obesos (mediana 62,05 pg/mL, rango 11,5 a 366,7 pg/mL) y los controles (mediana 60,67 pg/mL, rango 9,93 a 173,1 pg/mL) (**Figura 21a**).

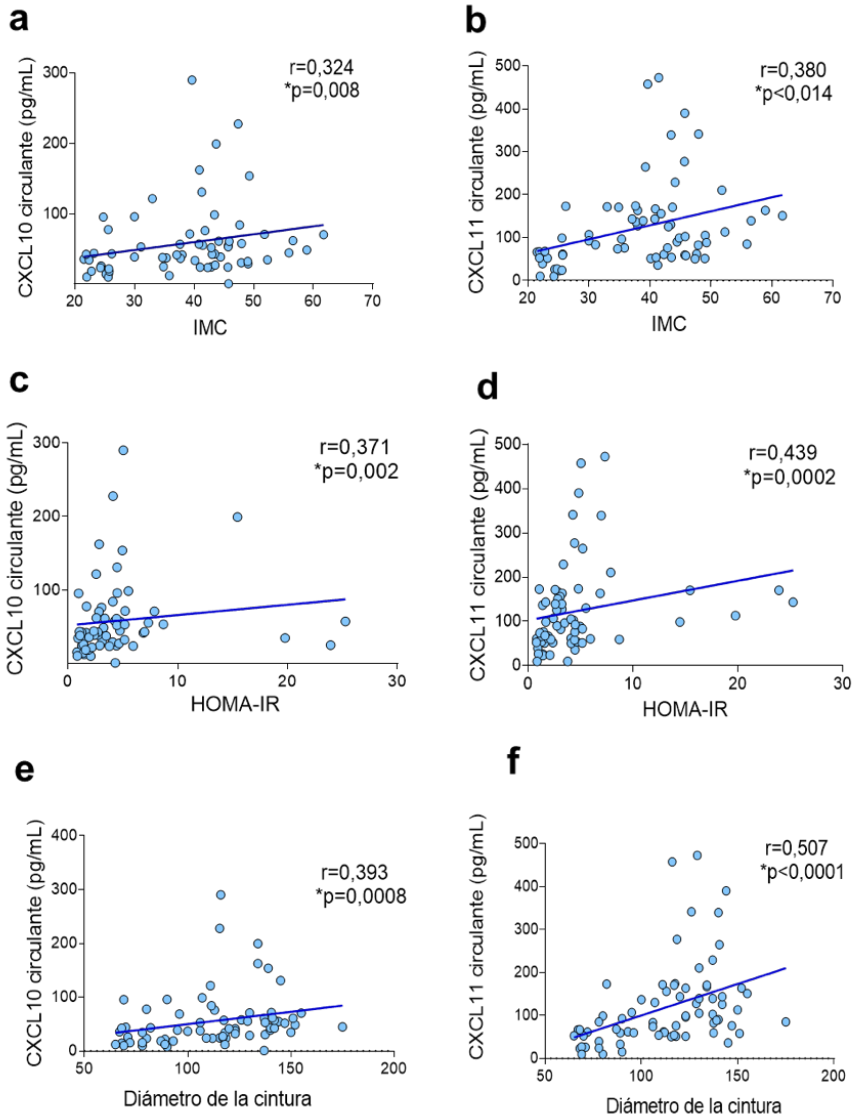
Por el contrario, los niveles plasmáticos de CXCL10 estaban significativamente aumentados en los pacientes obesos (mediana 51,1 pg/mL, rango 0,8 a 290,2 pg/mL) en comparación a los controles (mediana 25,9 pg/mL, rango

7,9 a 95,9 pg/mL) (**Figura 21b**). De manera similar, los niveles plasmáticos de CXCL11 también estaban aumentados en obesos (mediana 128,1 pg/mL, rango 35,9 a 492,7 pg/mL) en comparación a los controles (59,6 pg/mL, rango 9,9 a 173,1 pg/mL) (**Figura 21c**).



**Figura 21.** Cuantificación de los niveles de quimiocinas circulantes CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en pacientes obesos y controles. Los niveles de las quimiocinas (a) CXCL9, (b) CXCL10 y (c) CXCL11 se midieron en el plasma de las muestras de pacientes obesos (n=50) y controles (n=20). La comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de Mann Whitney. Los gráficos de puntos de dispersión muestran la mediana con rango intercuartílico.

Posteriormente se procedió a correlacionar los valores de las quimiocinas circulantes con el IMC, el índice HOMA-IR y el diámetro de la cintura. Para ello se aplicó el coeficiente de correlación de Spearman, el cual mostró una correlación positiva entre quimiocinas CXCL10 y CXCL11 con: el IMC ( $r=0,324$ ;  $p=0,008$  y  $r=0,380$ ;  $p<0,01$ ; respectivamente **Figura 22 a y d**), el índice HOMA-IR ( $r=0,371$ ;  $p=0,002$  y  $r=0,439$ ;  $p=0,002$ ; respectivamente **Figura 22b y e**) con el diámetro de la cintura ( $r=0,393$ ;  $p=0,0008$  y  $r=0,507$ ;  $p<0,0001$ ; respectivamente **Figura 22c y f**).



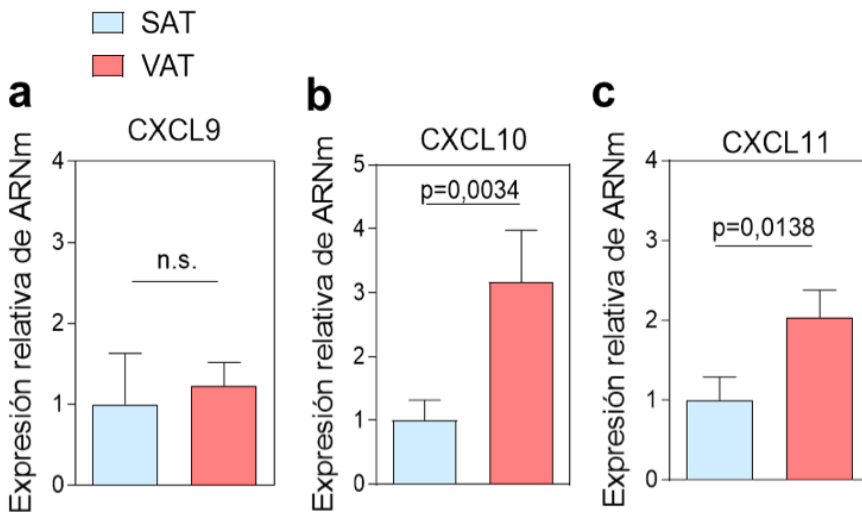
**Figura 22.** Gráficos correspondientes a las correlaciones obtenidas entre niveles plasmáticos de CXCL10 y CXCL11 con los parámetros antropométricos. Las correlaciones se realizaron entre las quimiocinas CXCL10 y CXCL11 y (a, b) el IMC, (c, d) el índice HOMA-IR y (e, f) el diámetro de la cintura (n= 25 sujetos control y n= 50 pacientes con obesidad mórbida). Para el análisis se aplicó la correlación de Spearman.



### 4.1.2 La expresión de las quimiocinas CXCL10 y CXCL11 está aumentada en el VAT con respecto al SAT de los pacientes con obesidad mórbida.

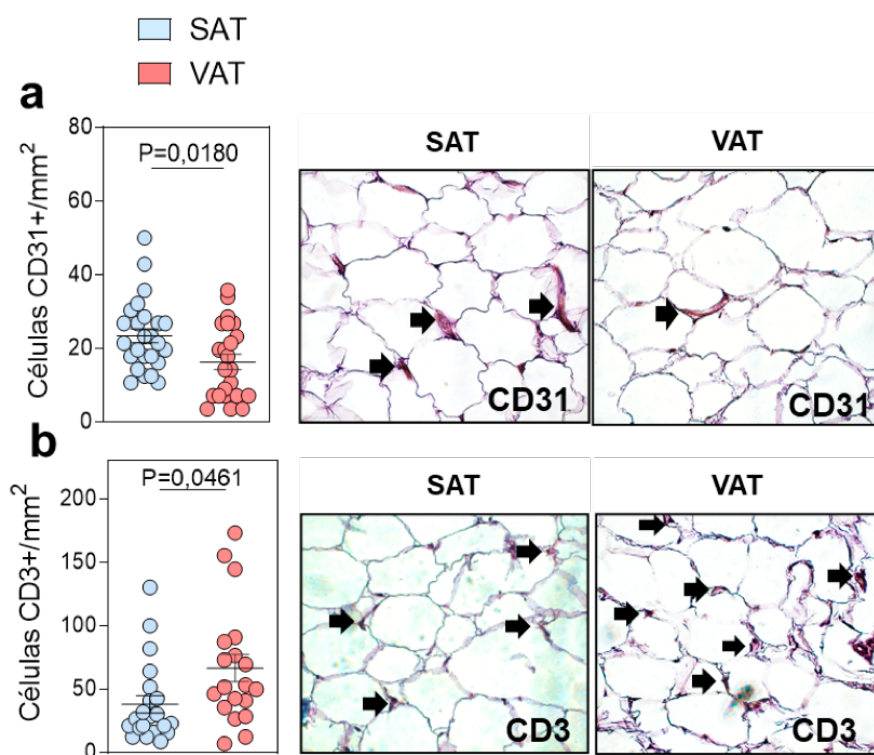
Una vez hallados los niveles aumentados de las quimiocinas CXCL10 y CXCL11 en el plasma de los pacientes obesos, posteriormente se procedió a determinar su expresión génica en las muestras pareadas de SAT y VAT mediante el empleo de la técnica de RT-qPCR.

No se observaron diferencias significativas en la expresión de ARNm de CXCL9 entre SAT y VAT (Figura 23a,  $p=0,8$ ), por el contrario, sí que observó un aumento expresión de CXCL10 (Figura 23b,  $p=0,0034$ ) y CXCL11 (Figura 23c,  $p=0,0138$ ) en la grasa visceral comparado con la subcutánea.



**Figura 23.** Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de las quimiocinas: (a) CXCL9, (b) CXCL10 y (c) CXCL11 en muestras pareadas de SAT y VAT en pacientes con obesidad mórbida. Las comparaciones entre los grupos se realizaron con la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Los valores están expresados como la media  $\pm$  ESM (n=40).

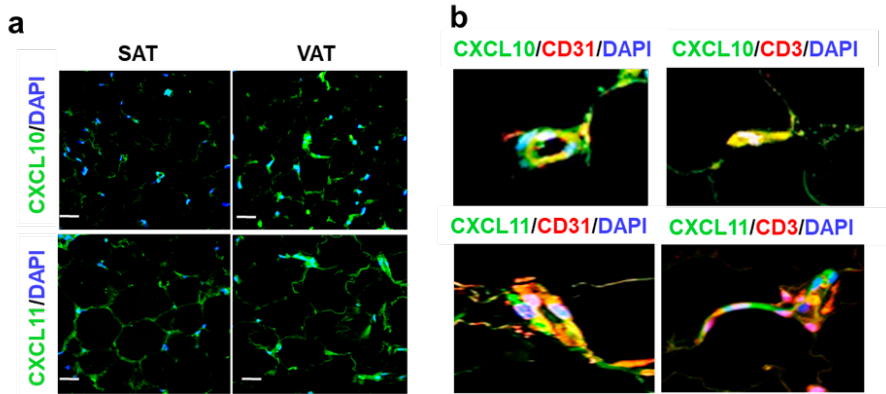
A continuación, se realizó un análisis inmunohistoquímico en muestras pareadas de TA de los pacientes obesos. Se observó que el número de células positivas para CD31 (marcador de células endoteliales), fue significativamente menor en VAT que en SAT (**Figura 24a**,  $p=0,0180$ ). Por el contrario, el número de células positivas para CD3 (indicativo de infiltración de linfocitos T) fue mayor en VAT que en SAT (**Figura 24b**,  $p=0,0461$ ).



**Figura 24.** Análisis de la expresión de células endoteliales y linfocitos T. Estudio inmunohistoquímico del (a) número de células CD31+ y (b) CD3+ por mm<sup>2</sup> en muestras pareadas de SAT y VAT. Las comparaciones entre los grupos se realizaron con la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Los valores están expresados como la media ± ESM (n=18-20). Se muestran imágenes representativas de la inmunohistoquímica.

Con el fin de corroborar los datos de ARNm, las secciones de TA se tiñeron mediante inmunofluorescencia con anticuerpos para las quimiocinas CXCL10 y CXCL11, lo que reveló que la expresión de la proteína CXCL10 y CXCL11 estaba aumentada en VAT en comparación a SAT (**Figura 25a**).

Paralelamente, se realizó un doble marcaje por inmunofluorescencia donde se observó que la expresión de CXCL10 y CXCL11 se localizaba principalmente en células endoteliales y linfocitos T (**Figura 25b**).



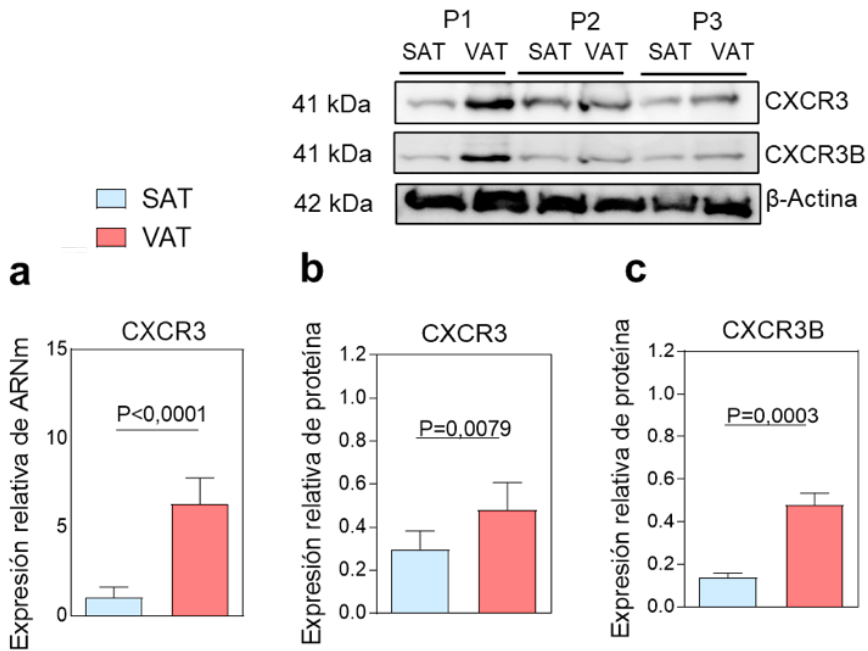
**Figura 25.** Expresión de las quimiocinas CXCL10 y CXCL11 en de secciones de SAT y VAT de pacientes con obesidad. **(a)** Las secciones fueron incubadas con un anticuerpo anti-CXCL10 y anti-CXCL11, la señal se visualizó utilizando un anticuerpo Alexa Fluor 488 (verde). **(b)** Imágenes representativas que muestran la colocalización de CD31/CXCL10 y CD31/CXCL11; o CD3/CXCL10 y CD3/CXCL11 en VAT. La señal se visualizó utilizando Alexa Fluor 488 (CXCL10 y CXCL11, verde) y Alexa Fluor 594 (CD31 o CD3, rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul).

### 4.1.3 La expresión del receptor CXCR3 está aumentada en el VAT con respecto al SAT de los pacientes con obesidad mórbida.

A continuación, evaluamos la expresión del receptor de dichas quimiocinas CXCR3 en las muestras de TA pareadas de los pacientes obesos. El análisis por RT-qPCR determinó que la expresión del ARNm de CXCR3 era significativamente mayor en VAT que en SAT ( $p < 0,001$ ; **Figura 26a**).

Estos resultados fueron confirmados mediante análisis por Western Blot, donde se observó un aumento significativo de la expresión proteica de CXCR3 en VAT en comparación con SAT (**Figura 26b**,  $p = 0,007$ ).

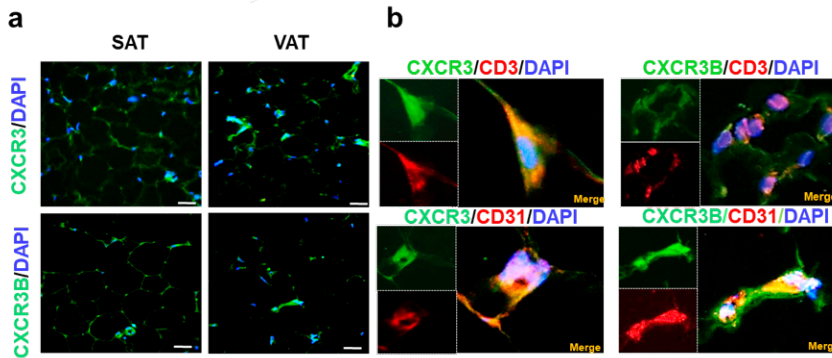
Estudios previos han observado que los efectos angiostáticos que ejercen los ligandos de CXCR3, están asociados con la activación de la isoforma CXCR3B del receptor<sup>119</sup>, es por ello que se procedió a la determinación de su expresión en el TA. Mediante Western Blot se observó un aumento significativo de la expresión de la proteína CXCR3B en VAT (**Figura 26c**,  $p = 0,0003$ ).



**Figura 26.** Diferencias en la expresión del receptor CXCR3 en muestras pareadas de SAT y VAT de pacientes con obesidad mórbida. **(a)** Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de CXCR3. Las columnas muestran un aumento de la expresión de ARNm en VAT relativo a SAT (n=45). Análisis por Western Blot de la expresión de las proteínas **(b)** CXCR3 y **(c)** CXCR3B. Las comparaciones entre los grupos se realizaron con la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Los valores de la densitometría de proteína están expresados como la media  $\pm$  ESM (n = 8). Se muestran Western Blot representativos de tres pacientes con obesidad mórbida diferentes (P1-3).

Posteriormente se llevó a cabo un análisis mediante inmunofluorescencia de las secciones histológicas de AT de pacientes obesos y se observó una mayor señal de fluorescencia de los receptores CXCR3 y CXCR3B en VAT comparación con SAT (**Figura 27a**).

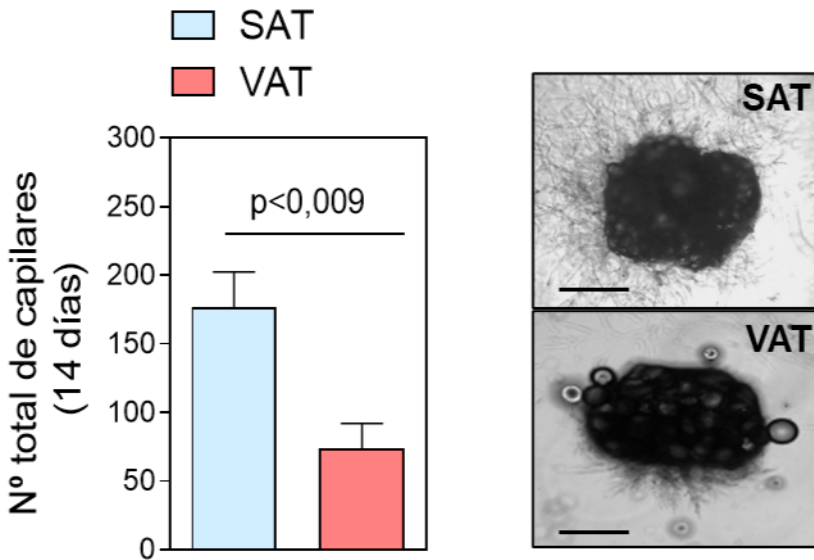
Paralelamente, se realizó una doble tinción por inmunofluorescencia donde se observó la expresión de CXCR3 principalmente en células endoteliales (CD31+) linfocitos (CD3+) en VAT, mientras que la isoforma del receptor CXCR3B se detectó solamente en las células endoteliales (**Figura 27b**).



**Figura 27.** Expresión de los receptores CXCR3 y CXCR3B en secciones de SAT y VAT de pacientes con obesidad. (a) Las secciones fueron incubadas con un anticuerpo anti-CXCR3 y anti-CXCR3B, la señal se visualizó utilizando un anticuerpo Alexa Fluor 488 (verde). (b) Imágenes representativas que muestran la colocalización de CD31/CXCR3 y CD31/CXCR3B en VAT. La señal se visualizó utilizando Alexa Fluor 488 (CXCR3 y CXCR3B, verde) y Alexa Fluor 594 (CD31 o CD3, rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul).

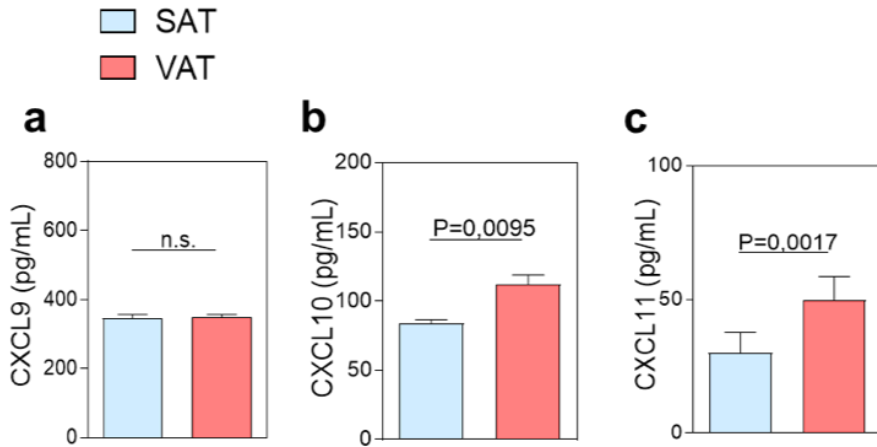
#### 4.1.4 El bloqueo del receptor CXCR3 mejora la angiogénesis en el tejido adiposo visceral de los pacientes con obesidad mórbida.

Dada la mayor expresión de estos receptores y quimiocinas en el VAT, el siguiente objetivo fue evaluar la actividad funcional y analizar la capacidad angiogénica de los mismos. Para ello, se realizaron estudios *ex vivo* cultivando los explantes de TA pareados durante 14 días en Matrigel de pacientes con obesidad mórbida. A los 14 días, se observó que el recuento total de brotes capilares fue significativamente menor en VAT que en SAT del mismo paciente ( $176,5 \pm 25$  vs VAT  $73,9 \pm 18$ ,  $p < 0,009$ ; **Figura 28**).



**Figura 28.** El número total de brotes capilares fue menor en la grasa visceral de los pacientes obesos. Explantes pareados de VAT y SAT fueron cultivados en Matrigel y el número total de brotes capilares se contó después de 14 días de incubación. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba de T de Student. Los paneles de la derecha muestran imágenes representativas de los explantes de grasa en Matrigel. Barra de escala, 500μm. Los datos muestran la media  $\pm$  ESM (n=15).

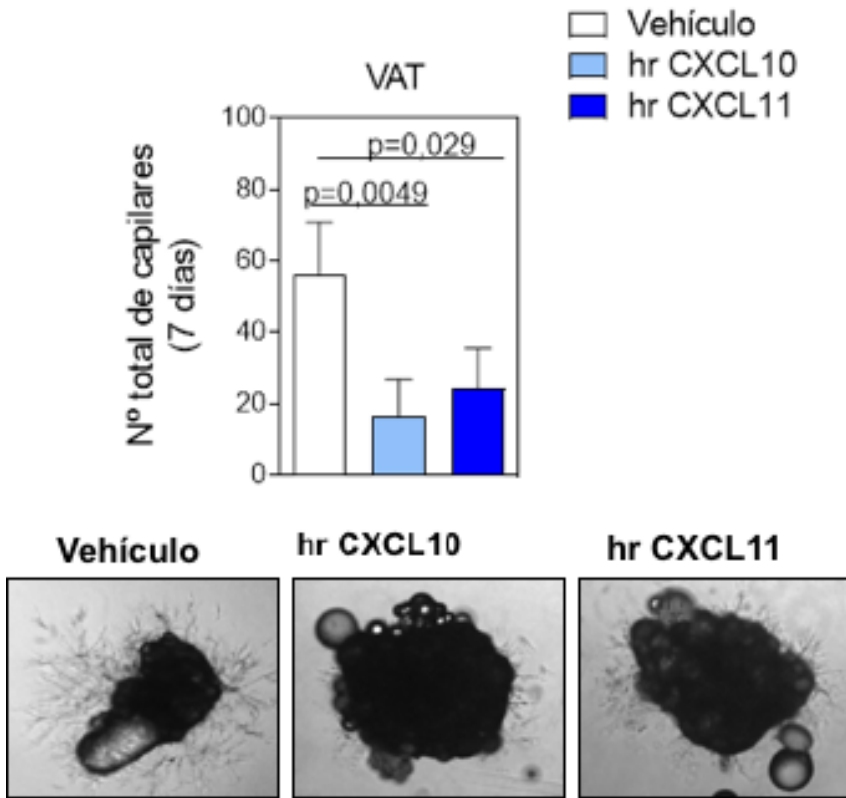
Posteriormente, se evaluó la liberación de quimiocinas en el secretoma de los explantes de TA incubados durante 48h. Se observó que la liberación de CXCL9 fue similar en VAT y SAT (Figura 29a,  $p > 0,05$ ), sin embargo, la liberación de CXCL10 y CXCL11 fue significativamente mayor en los explantes de VAT en comparación con SAT del mismo paciente (Figura 29 b y c).



**Figura 29.** Aumento de la expresión de las quimiocinas angiostáticas CCL10 y CCL11 en el secretoma de la grasa visceral de pacientes obesos. La liberación de (a) CXCL9, (b) CXCL10 y (c) CXCL11 en el secretoma del tejido adiposo se determinó tras 48 horas de cultivo de los explantes. La secreción de quimiocinas se expresa como pg/mL. La comparación entre grupos se ha realizado con la prueba Mann Whitney. Los valores se expresan como media  $\pm$  ESM (n = 15).

Con el fin de estudiar, los efectos directos de CXCL10 y CXCL11 sobre la angiogénesis, realizamos ensayos adicionales en Matrigel con explantes de VAT en presencia de proteína recombinante hr CXCL10 (10 ng/mL), o hr CXCL11 (10 ng/mL), o vehículo, durante 7 días. En estos estudios, se observó que ambas quimiocinas disminuyeron de forma significativa la capacidad angiogénica del VAT (Figura 30,  $p=0,004$  y  $p=0,02$  respectivamente).

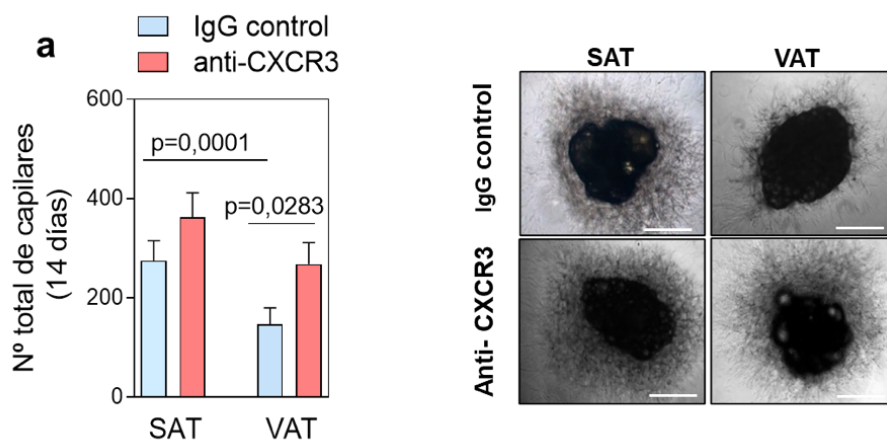




**Figura 30.** El tratamiento de VAT con los ligandos de CXCR3 disminuye la capacidad angiogénica de VAT de pacientes con obesidad mórbida. Los explantes de VAT se incubaron con hr CXCL10 o hr CXCL11 (10ng/mL). Posteriormente, se analizó el número total de brotes capilares tras una semana de tratamiento. La comparación entre grupos se realizó con el análisis de variancia 1way-ANOVA. Los paneles muestran imágenes representativas de los explantes de grasa en Matrigel. Barra de escala, 500µm. Los valores se expresan como media ± ESM.

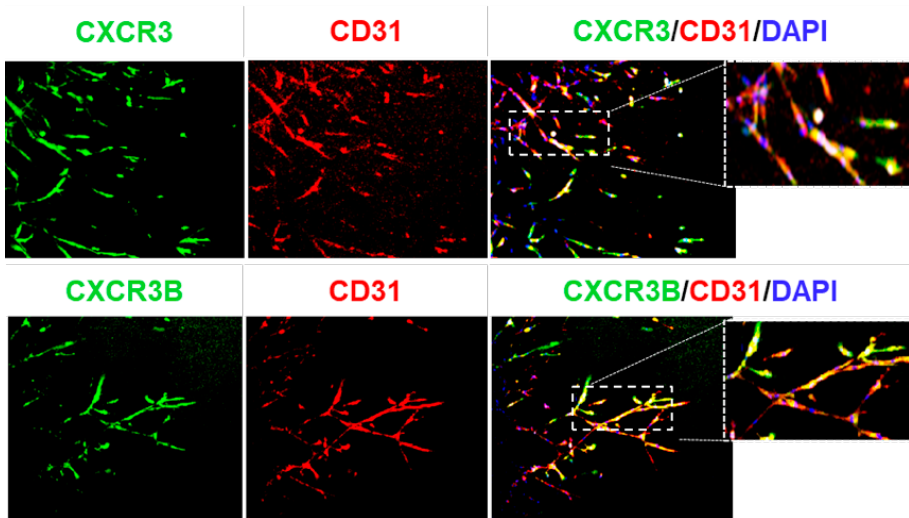
Posteriormente nos planteamos si la reducción de la respuesta angiogénica observada en la grasa visceral podría estar mediada a través de la activación del receptor CXCR3. Para ello, incubamos explantes de grasa visceral y subcutánea en Matrigel con un anticuerpo neutralizante CXCR3 (1 µg/mL) o un control IgG durante 14 días, y se analizó la formación de brotes capilares. En presencia de un anticuerpo irrelevante, el VAT mostró de nuevo, una capacidad angiogénica

reducida en comparación con el SAT (**Figura 31**,  $p=0,0001$ ). Sin embargo, la neutralización de la función CXCR3 en el VAT aumentó de forma significativa el número de brotes capilares (anti-CXCR3:  $259 \pm 44$  frente a IgG de control:  $145 \pm 34$ ; **Figura 31**  $p=0,02$ ). En cambio, cuando se realizó el mismo estudio con explantes de SAT, no se observaron diferencias significativas en la formación de brotes capilares entre las muestras incubadas con un anticuerpo neutralizante de CXCR3 o un anticuerpo irrelevante (**Figura 31**,  $p > 0,05$ ).



**Figura 31.** El bloqueo del receptor CXCR3 con un anticuerpo neutralizante aumenta la capacidad angiogénica del VAT de pacientes con obesidad mórbida. Las muestras se incubaron en presencia de un anticuerpo neutralizante monoclonal de ratón anti-CXCR3 (1 µg/mL) o en presencia de un IgG control. Se tomaron imágenes de contraste de fase después de 14 días y se contó el número de brotes capilares. La comparación entre grupos se realizó con el análisis de variancia unidireccional ANOVA. Los datos representan la media  $\pm$  ESM ( $n=26$ ). En el panel derecho se muestran imágenes representativas. Barras de escala, 500 µm.

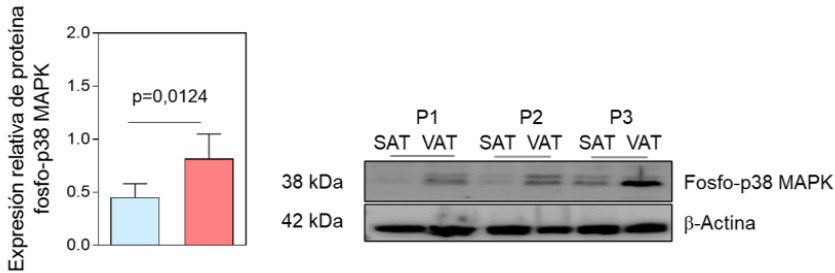
Finalmente, se realizó mediante doble inmunofluorescencia por microscopía confocal, un análisis de los marcadores expresados en el VAT. Se observaron redes capilares que se tiñeron positivas tanto para el marcador específico del endotelio (CD31) como para el receptor CXCR3 o CXCR3B (**Figura 32**).



**Figura 32.** Inmunofluorescencia de los brotes capilares de VAT en Matrigel. Los brotes capilares se tiñeron con doble marcaje para CD31/CXCR3 o CD31 /CXCR3B. La inmunorreactividad se visualizó usando Alexa Fluor 488 (CXCR3, CXCR3B, verde) y Alexa Fluor 594 (CD31, rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul).

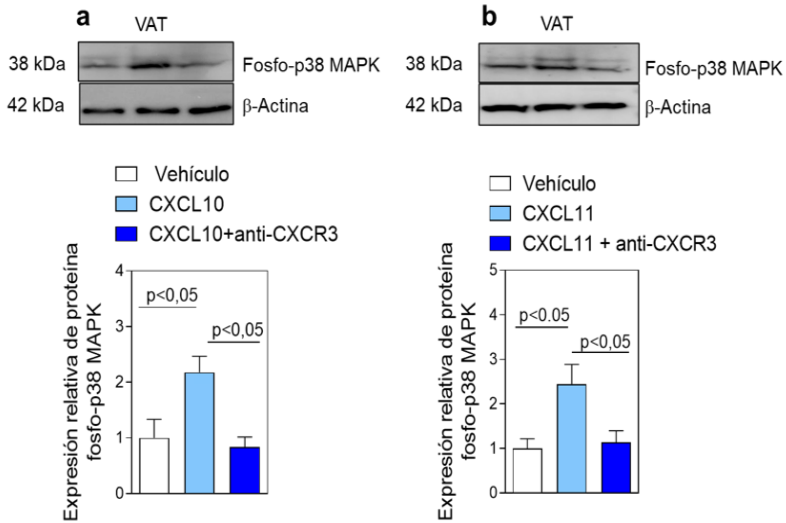
#### 4.1.5 CXCL10 y CXCL11 activan la vía de señalización p38 MAPK en el TA de pacientes obesos

Investigaciones previas han demostrado que los efectos angiostáticos de CXCR3 están mediados por la activación de la cascada de señalización de p38 MAPK<sup>120</sup>. Por lo tanto, el siguiente objetivo fue analizar esta vía de señalización en el TA de pacientes con obesidad mórbida. Los análisis por western blot demostraron un aumento significativo de los niveles de fosforilación de p38 MAPK en el VAT con respecto al SAT para cada paciente (Figura 33,  $p=0,012$ ).



**Figura 33.** Activación de vía de señalización de p38 MAPK en el VAT de pacientes con obesidad mórbida. Análisis mediante Western Blot de fosfo-p38 MAPK en muestras pareadas de SAT y VAT en pacientes con obesidad mórbida. Se muestran las transferencias de Western representativas de tres pacientes diferentes (P1-3). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba de la “t” de Student. Los valores de la densitometría de proteína están expresados como la media  $\pm$  ESM (n = 6). Se muestra Western Blots representativos de tres pacientes con obesidad mórbida diferentes (P1-3).

Nuestro siguiente objetivo fue investigar si los ligandos de CXCR3 modulaban la vía de señalización p38 MAPK. Por ello algunos explantes del VAT se trataron con CXCL10 o CXCL11 recombinante humano (10 ng/mL) durante 20 minutos. Algunos de estos explantes fueron pretratados previamente con un anticuerpo neutralizante de CXCR3 (1  $\mu$ g/mL) durante 10 minutos. Tal y como se observa en la **Figura 34**, se detectó un aumento significativo de la fosforilación de p38 MAPK en los explantes incubados con CXCL10 o CXCL11, en cambio en los explantes cuyo receptor CXCR3 había sido bloqueado, se observó una reducción de la fosforilación inducida por CXCL10 o CXCL11 (**Figura 34a y b**).



**Figura 34.** CXCL10 y CXCL11 a través del receptor CXCR3 activan la vía p38 MAPK en el tejido adiposo. Los explantes de VAT se incubaron con vehículo (a) hrCXCL10(10 ng / mL) o (b) hrCXCL11 (10 ng / mL) durante 20 minutos. Algunos explantes se pretrataron con un anticuerpo anti-CXCR3 humano (1  $\mu$ g / mL) 10 minutos antes del tratamiento. La comparación entre grupos se realizó con el análisis de variancia unidireccional ANOVA. Los valores de expresión proteica analizados por densitometría están expresados como la media  $\pm$  ESM (n = 4).

## 4.2. Resultados del segundo estudio: Implicación del eje CCL17/CCL22-CCR4 en la disfunción endotelial en pacientes con obesidad mórbida

### 4.2.1 Los niveles circulantes de quimiocinas CCL17 y CCL22 están aumentados en pacientes con obesidad mórbida

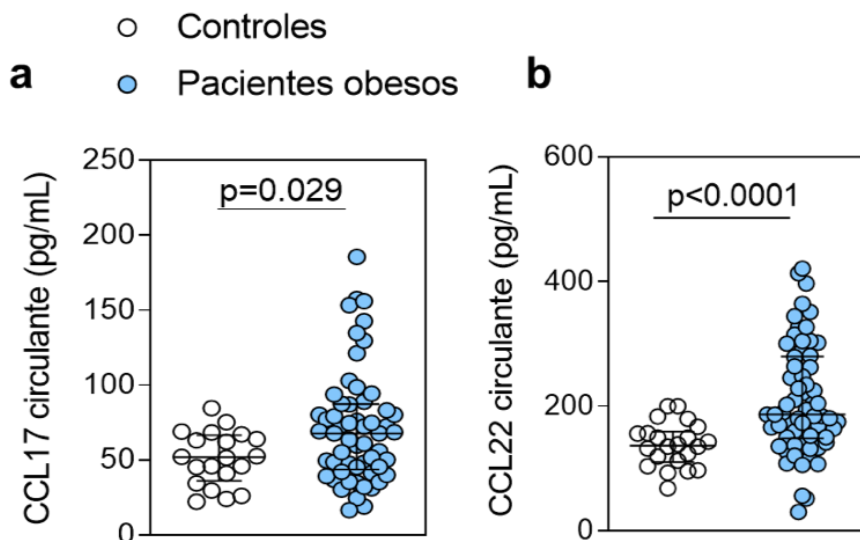
Para el segundo estudio de la presente Tesis doctoral, se citaron 60 pacientes obesos una semana antes de la cirugía bariátrica y 20 sujetos controles no obesos a los que, al igual que en el estudio anterior, se les realizó una extracción sangre y se midieron distintos parámetros bioquímicos. En la [Tabla 23](#) se resumen las medidas obtenidas.

A continuación, se cuantificaron los niveles plasmáticos de las quimiocinas CCL17 y CCL22 mediante ensayo de ELISA. Se observó que los niveles de CCL17 eran significativamente más altos en pacientes con obesidad (mediana de 67,8 pg/mL, rango de 16,6 a 185,6 pg/mL) en comparación con los sujetos control (mediana de 51,8 pg/mL, rango de 22,2 a 84,5 pg/mL) ([Figura 35a](#)). Asimismo, en los pacientes con obesidad los niveles de CCL22 estaban significativamente elevados (mediana de 186,6 pg/mL, rango de 30,3 a 420,8 pg/mL) con respecto a los controles (mediana 136,8 pg/mL, rango de 68,2 a 200,3 pg/mL) ([Figura 35b](#)).

**Tabla 23.** Características clínicas y bioquímicas de los pacientes con obesidad mórbida y los sujetos controles no obesos. Los valores están expresados como la media  $\pm$  ESM; \*  $p < 0,05$  vs controles.

Características clínicas y bioquímicas	Pacientes obesos mórbidos (n=60)	Controles (n=20)	P valor
Edad	45,04 $\pm$ 1,5	44,15 $\pm$ 1,4	0,7621
Sexo femenino, % (n)	66,7 (40)	60 (12)	-
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	44,1 $\pm$ 0,8	25,6 $\pm$ 0,8	<0,0001*
Peso (kg)	121,7 $\pm$ 2,9	71,5 $\pm$ 3,0	<0,0001*
Diámetro de cintura (cm)	128,3 $\pm$ 1,9	80,9 $\pm$ 2,8	<0,0001*
Glucosa en ayunas (mg/dL)	96,3 $\pm$ 3,2	90,1 $\pm$ 3,0	0,2919
Insulina en plasma (mUI/mL)	20,4 $\pm$ 1,5	8,6 $\pm$ 1,0	<0,0001*
Índice HOMA-IR	5,1 $\pm$ 0,5	2,0 $\pm$ 0,3	0,0015 *
Triglicéridos (mg/dL)	107,5 $\pm$ 5,6	68,1 $\pm$ 4,2	<0,0001*
Colesterol total (mg/dL)	150,7 $\pm$ 4,0	164 $\pm$ 8,2	0,1981
Colesterol LDL (mg/dL)	103 $\pm$ 3,6	111 $\pm$ 1,7	0,126
Colesterol HDL (mg/dL)	40,3 $\pm$ 1,1	42,9 $\pm$ 1,6	0,081*
Proteína C Reactiva (mg/dL)	9,2 $\pm$ 1,0	1,7 $\pm$ 0,2	0,0047*
Presión arterial sistólica (mmHg)	131,5 $\pm$ 2,1	117,3 $\pm$ 3,4	0,0008*
Presión arterial diastólica (mmHg)	83,0 $\pm$ 1,2	70,9 $\pm$ 2,2	<0,0001*
Diabetes, % (n)	45 (27)	-	-
Hipertensión, % (n)	36,7 (22)	-	-

IMC: índice de masa corporal; LDL: Lipoproteína de baja densidad; HDL: Lipoproteína de alta densidad.

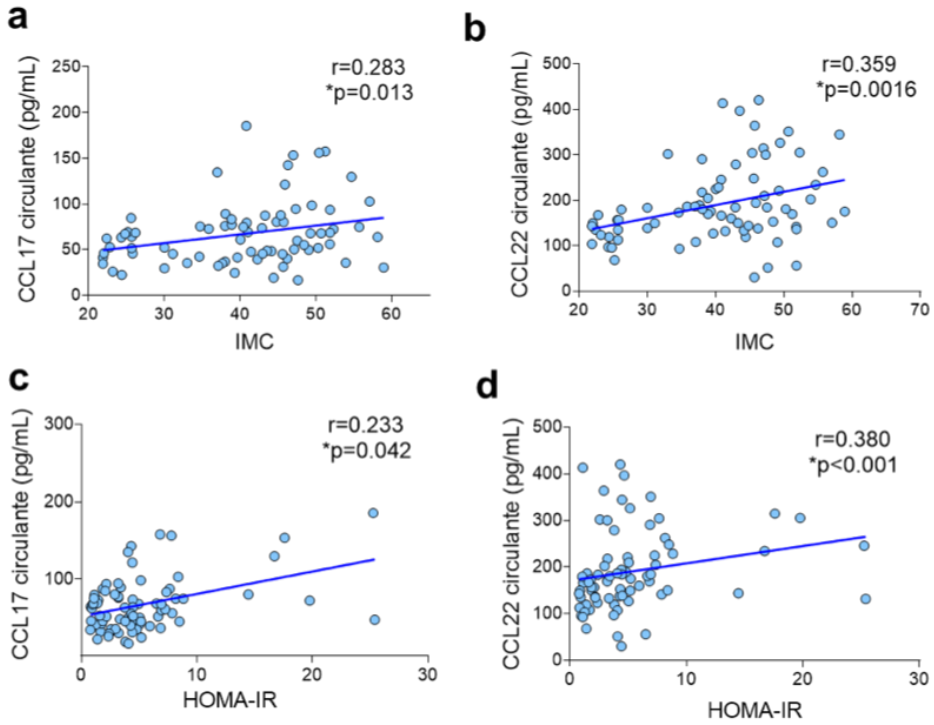


**Figura 35.** Cuantificación de los niveles de quimiocinas circulantes CCL17 y CCL22 en pacientes obesos y controles sanos. Los niveles de las quimiocinas (a) CCL17 y (b) CCL22 se midieron en el plasma de las muestras de pacientes obesos (n=60) y controles (n=20). La comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de Mann Whitney. Los gráficos de puntos de dispersión que muestran la mediana con rango intercuartílico.

#### 4.2.2 Los niveles circulantes de quimiocinas CCL17 y CCL22 se correlacionan positivamente con el IMC y el índice HOMA-IR

Posteriormente, nos preguntamos si las variaciones en los niveles de CCL17 y CCL22 estaban asociadas con los parámetros clínicos de los pacientes obesos. Para ello se realizó un análisis de correlación de Spearman y se observó una correlación positiva de los niveles circulantes de CCL17 y CCL22 con el IMC ( $r=0,233$ ;  $p=0,042$  y  $r=,38$ ;  $p<0,001$ , respectivamente, **Figura 36 a y b**), y con el índice HOMA-IR ( $r=0,283$ ;  $p=0,013$  y  $r=0,359$ ;  $p=0,0016$ , respectivamente **Figura 36 c y d**).

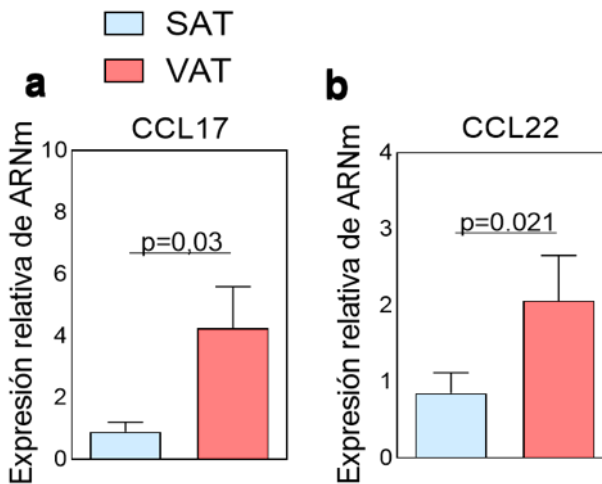




**Figura 36.** Gráficos correspondientes a las correlaciones obtenidas entre niveles plasmáticos de CCL17 y CCL22 con los parámetros antropométricos. Las correlaciones se realizaron entre las quimiocinas CCL17 y CCL22 y (a, b) el IMC y (c, d) el índice HOMA-IR. (n = 20 sujetos de control y n = 60 pacientes con obesidad mórbida). Para el análisis se aplicó la correlación de Spearman.

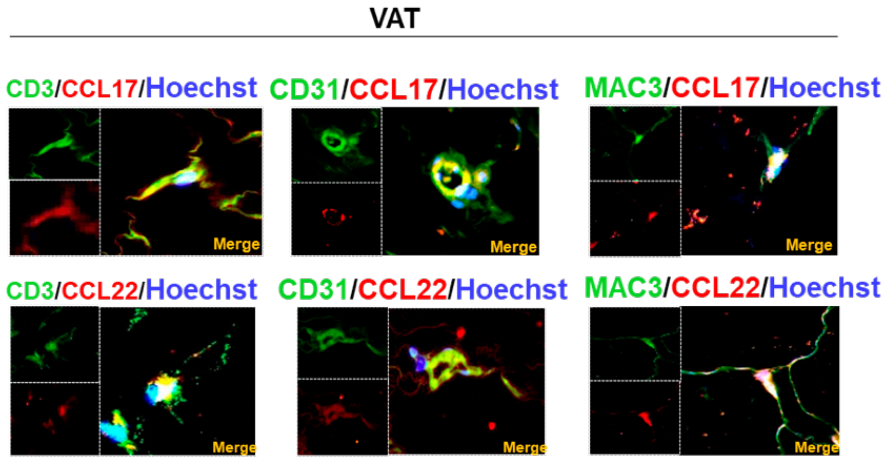
### 4.2.3 La expresión de las quimiocinas CCL17 y CCL22 está aumentada en el VAT de los pacientes con obesidad mórbida

Dada la observación de los niveles aumentados de los ligandos del receptor CCR4 en el plasma de los pacientes obesos, nos propusimos evaluar la expresión génica de dichos ligandos, mediante RT-qPCR, en los explantes de TA obtenido mediante cirugía bariátrica realizada en los obesos mórbidos. Tal y como se indica en la **Figura 37**, se observó un aumento significativo de la expresión de ARNm de CCL17 y CCL22 en el VAT en comparación con el SAT ( $p=0,03$  y  $p=0,021$ , respectivamente).



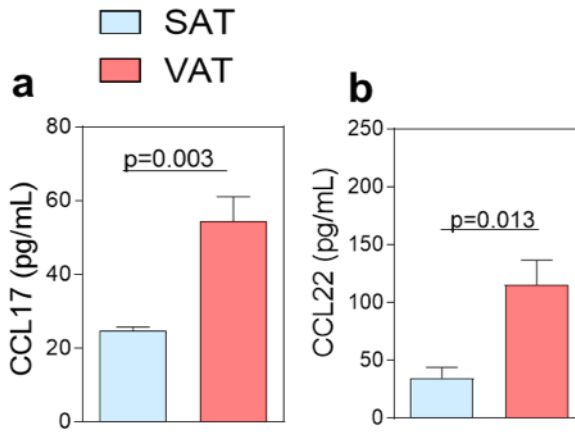
**Figura 37.** Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de las quimiocinas CCL17 y CCL22. (a) CCL17 y (b) CCL22 en muestras pareadas de SAT y VAT en pacientes con obesidad mórbida. Las comparaciones entre los grupos se realizaron con la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Los valores están expresados como la media  $\pm$  ESM ( $n = 33$ ).

A continuación, se realizó una doble tinción por inmunofluorescencia en VAT, donde se detectó, la expresión de CCL17 y CCL22 principalmente en linfocitos (CD3 +), células endoteliales (CD31+) y macrófagos (Mac3+) (**Figura 38**).



**Figura 38.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia que muestran la expresión de CCL17 y CCL22 en VAT. Las secciones representativas muestran la colocalización de CCL17 y CCL22 en las células CD31+, CD3+ y MAC3+. La señal se visualizó utilizando Alexa Fluor 488 (CD31, CD3, Mac-3, verde) y Alexa Fluor 594 (CCR4, rojo). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul).

Con el fin de evaluar la secreción de los ligandos de CCR4 al medio de cultivo, se cultivaron los explantes de SAT y VAT durante 48 horas, y posteriormente se cuantificó la concentración de dichas quimiocinas mediante técnica de ELISA. Se observó un aumento significativo de CCL17 (mediana de 27,69 pg/mL, rango de 8,46 a 22,27 pg/ML) y CCL22 (mediana de 46,28 pg/mL, rango de 2,06 a 185,0 pg/mL) en los sobrenadantes del VAT en comparación con el SAT (**Figura 39**).

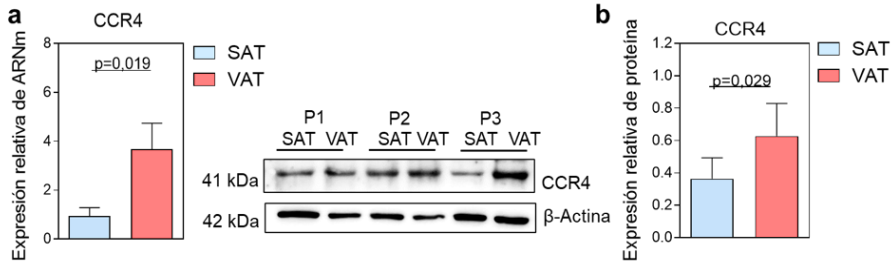


**Figura 39.** Aumento de la expresión de las quimiocinas CCL17 y CCL22 en el secretoma de los explantes de grasa visceral en pacientes obesos. La liberación de (a) CCL17 y (b) CCL22 en el secretoma, se determinó tras 48h de cultivo. La secreción de las quimiocinas se expresa como pg/mL. La comparación entre grupos se ha realizado con la prueba Mann Whitney. Los valores están expresados como la media  $\pm$  ESM (n = 22).

#### 4.2.4 La expresión del receptor CCR4 está aumentada en el VAT de los pacientes con obesidad mórbida

A continuación, evaluamos la expresión del gen CCR4 en las muestras de TA de los pacientes obesos. El análisis por PCR muestra que la expresión del ARNm de CCR4 está significativamente aumentada en el VAT comparado con el SAT del mismo paciente obeso ( $p=0,019$ ; **Figura 40a**).

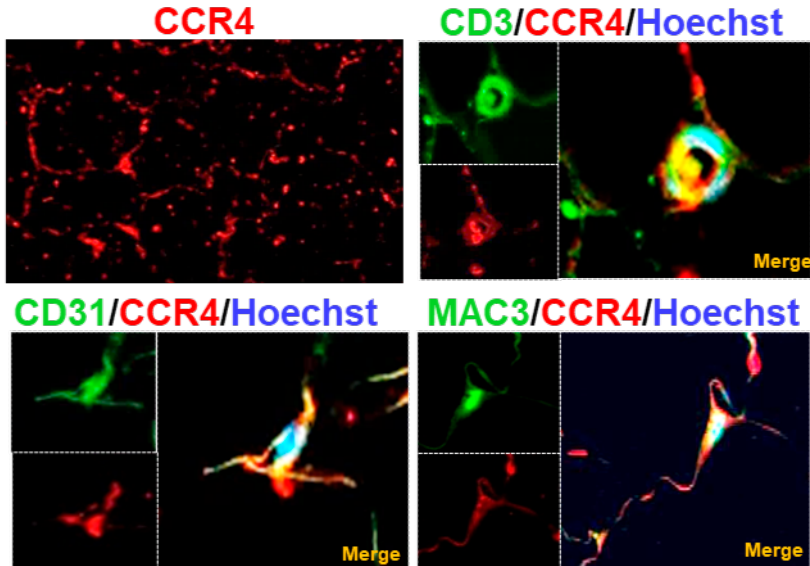
Para corroborar estos datos, se llevó a cabo un análisis de la expresión de la proteína CCR4 mediante Western Blot en el TA de los pacientes. Como se muestra en la **Figura 40b**, se observó un aumento significativo de la expresión de CCR4 en el VAT comparado con el SAT ( $p=0,029$ ).



**Figura 40.** Diferencias en la expresión del receptor CCR4 en muestras pareadas del SAT y VAT de pacientes con obesidad mórbida. **(a)** Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de CCR4. Las columnas muestran un aumento de la expresión de ARNm en VAT relativo a SAT. Los valores están expresados como la media  $\pm$  ESM ( $n = 33$ ). **(b)** Análisis por Western Blot de la expresión del receptor CCR4. Se muestran Western Blots representativos de tres pacientes con obesidad mórbida diferentes (P1-3). Las comparaciones entre los grupos se realizaron con la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Los valores de la densitometría de proteína están expresados como la media  $\pm$  ESM ( $n = 6$ ).

Paralelamente, se realizó una doble tinción por inmunofluorescencia en VAT donde se observó que CCR4 se expresa en células endoteliales (CD31+), linfocitos (CD3+) y macrófagos (MAC3 +) (**Figura 41**).

## VAT



**Figura 41.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia que muestran la expresión de CCR4 en VAT. Las secciones representativas muestran la colocalización de CCR4 en las células CD31+, CD3+ y MAC3+. La señal se visualizó utilizando Alexa Fluor 488 (CD31, CD3, Mac-3, verde) y Alexa Fluor 594 (CCR4, rojo). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul).

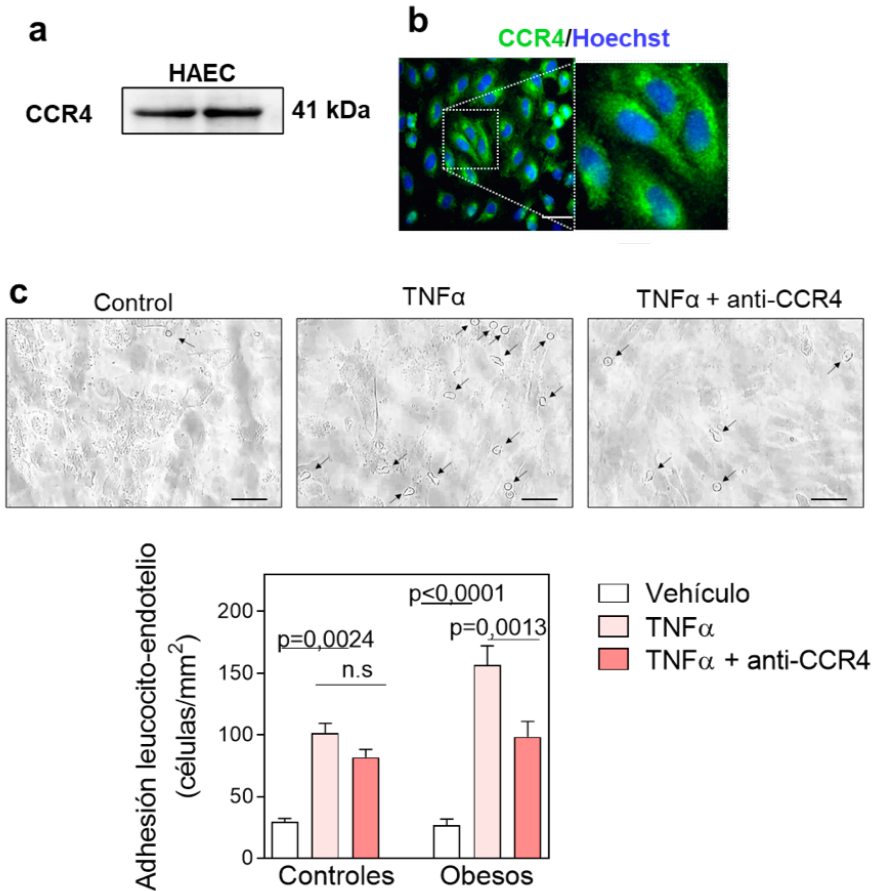
#### 4.2.5 El bloqueo funcional del receptor CCR4 en las células endoteliales disminuye la adhesión leucocitaria inducida por $TNF\alpha$ en pacientes con obesidad mórbida

La obesidad promueve la progresión de la disfunción endotelial vascular que es la etapa más temprana de la aterogénesis. Se caracteriza por un aumento en la adhesividad de los leucocitos al endotelio y su posterior migración al espacio subendotelial arterial<sup>121</sup>. Con el fin de estudiar la disfunción endotelial en pacientes con obesidad nos propusimos observar el efecto de la neutralización del receptor CCR4 en las interacciones leucocito-endotelio mediante la cámara de flujo paralelo.

Para ello, primero nos aseguramos de la expresión de CCR4 en células endoteliales. Realizamos un Western Blot de HAECs donde se observó, una banda a 41 kDa correspondiente al receptor CCR4 (Figura 42a). A continuación, confirmamos la expresión de CCR4 en la superficie de las células endoteliales mediante un análisis por inmunofluorescencia (Figura 42b).

Posteriormente, llevamos a cabo el estudio funcional *ex vivo* en cámara de flujo paralelo con sangre entera de pacientes con obesidad mórbida y sujetos control, con el fin de cuantificar las interacciones de los leucocitos con las células endoteliales (Figura 42c). Para realizar estos ensayos, se estimularon placas de células endoteliales humanas aórticas con TNF $\alpha$  (20 ng/mL) y después se perfundió sangre heparinizada de pacientes o controles sanos a través de la monocapa de células endoteliales.

En estos estudios, encontramos que la estimulación de las HAEC con TNF $\alpha$  antes de la perfusión sanguínea aumentó la adhesión leucocitaria en comparación con el vehículo tanto en pacientes como en controles, no obstante, fue significativamente mayor para los pacientes con obesidad mórbida ( $p=0,0024$  vs  $p<0,0001$ ). Cabe destacar que el bloqueo de la actividad de CCR4 en la superficie de las células endoteliales usando un anticuerpo neutralizante, dio como resultado una disminución significativa en la adhesión leucocitaria (previamente estimulada por TNF $\alpha$ ) en la sangre de los pacientes, pero no de los controles ( $p=0,0013$ ). Esto puede indicar un papel importante de CCR4 en el reclutamiento de leucocitos y la disfunción endotelial en la obesidad mórbida.

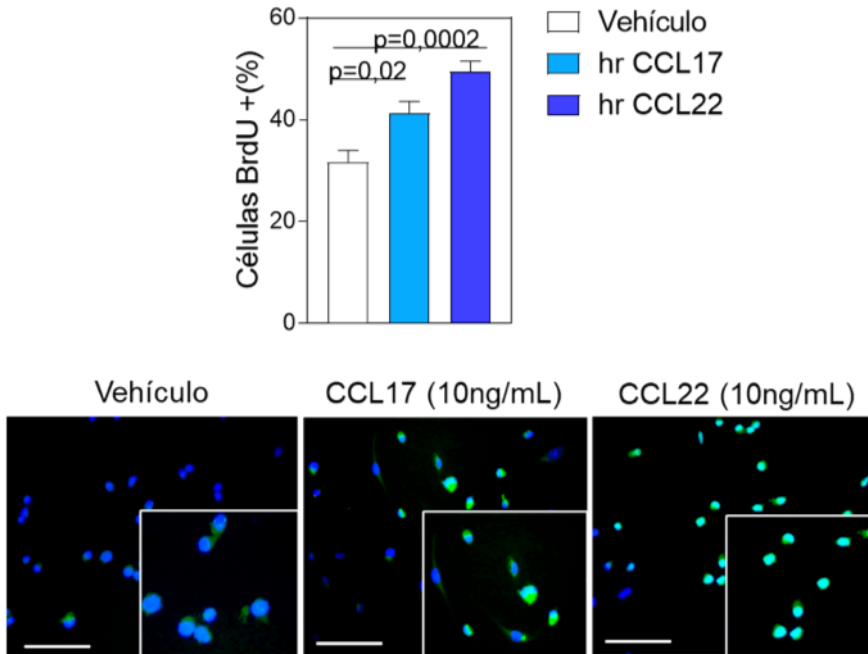


**Figura 42.** El bloqueo ex vivo del receptor CCR4 disminuye la adhesión leucocito-entotelio inducida por TNF $\alpha$  en los pacientes obesos. (a) Se muestra la expresión proteica mediante Western Blot del receptor CCR4. (b) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de la expresión de CCR4 en HAEC. Barra = 50 $\mu$ m (c) Las imágenes representativas muestran los leucocitos adheridos a la monocapa de células endoteliales. Las HAECs fueron estimuladas con TNF $\alpha$  (20 ng/mL) durante 24 horas. Posteriormente, se perfundió sangre diluida (1:10) de pacientes obesos (n=16) y controles (n=9) sobre monocapas endoteliales durante 5 minutos a 0,5 din/cm<sup>2</sup> y se cuantificó el número de leucocitos adheridos. Algunas células se incubaron con un anticuerpo neutralizante frente a CCR4 (3  $\mu$ g/mL). La comparación entre grupos se realizó con el análisis de variancia unidireccional ANOVA. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM. Barras =100  $\mu$ m.



### 4.2.6 La neutralización del receptor CCR4 disminuye la proliferación inducida por el plasma de pacientes con obesidad mórbida

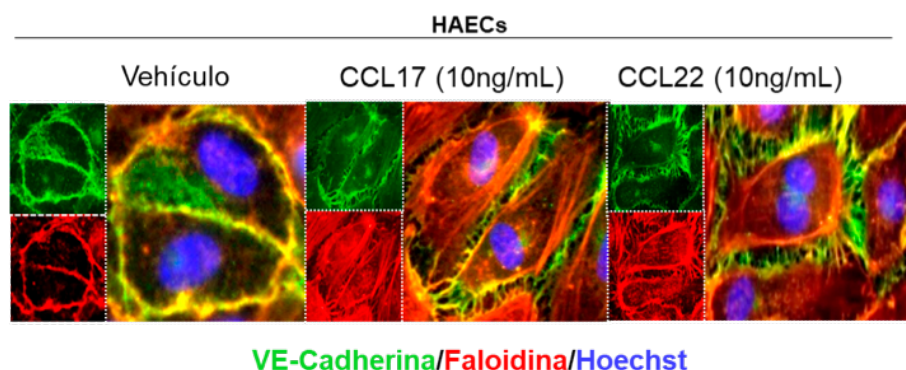
Como previamente observamos un aumento de los niveles plasmáticos de las quimiocinas CCL17 y CCL22, posteriormente nos propusimos determinar el efecto de dichas quimiocinas sobre la proliferación endotelial en HAECs. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de proliferación endotelial en presencia de hr CCL17 o hr CCL22 (10ng/mL) o vehículo. Como se muestra en la **Figura 43**, se observó aumento en la proliferación celular cuando las células eran tratadas con hr CCL17 o hr CCL22 ( $p=0,02$  y  $p=0,0002$ , respectivamente), en comparación con el grupo de vehículos.



**Figura 43.** Efecto de las quimiocinas CCL17 y CCL22 sobre la proliferación de las células endoteliales. Las HAEC se incubaron con 10 ng/mL de hr-CCL17/CCL22 y se analizó el porcentaje de células endoteliales en proliferación mediante incorporación de BrdU. Los datos representan la media  $\pm$  ESM del porcentaje de células BrdU+ (n=5).

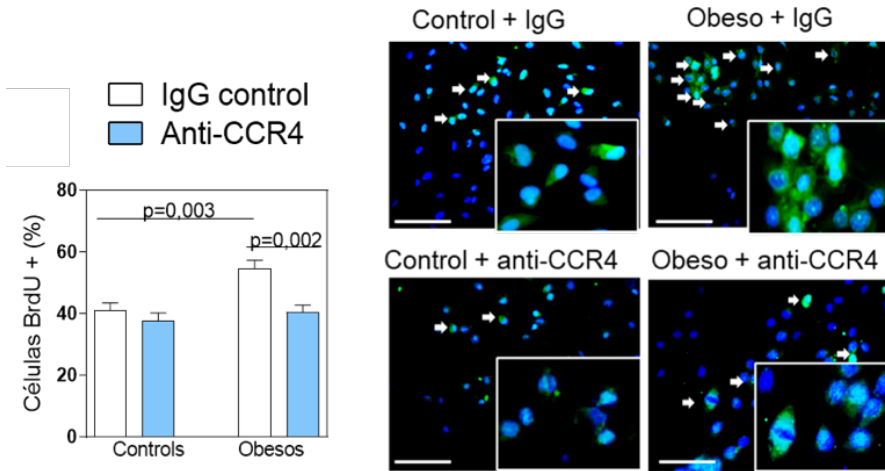
La angiogénesis consta de diferentes etapas durante las cuales las células endoteliales se polarizan, proliferan, migran y establecen contactos célula-célula. Estos pasos dependen de la organización y el reordenamiento del citoesqueleto de actina<sup>122</sup> y las interacciones celulares dependen de la VE-cadherina. Estudios previos han demostrado que una disminución de la VE-cadherina aumentaba la formación de brotes capilares *in vitro*<sup>25</sup>. Con el fin de determinar si CCL17 y CCL22 podrían estar involucradas en la remodelación de las células endoteliales, se realizó una doble inmunofluorescencia para evaluar la organización de la cadherina endotelial vascular (VE-cadherina) y F-actina (tinción faloidina).

Como se muestra en la **Figura 44**, se observó una reorientación de las uniones célula-célula inicialmente lineales y estables, en una orientación perpendicular cuando se trataron HAEC durante 4 horas con hr CCL17 y hr CCL22 en comparación con el vehículo. De manera similar, en asociación con estos cambios fenotípicos asociados a las uniones célula-célula, se observó una distribución diferente de F-actina en presencia de hr CCL17 y hr CCL22. Las imágenes muestran que la F-actina permanece en la periferia celular en condiciones basales, sin embargo, el tratamiento con hr CCL17 y hr CCL22 induce nuevos filopodios que cubren el interior de la célula.



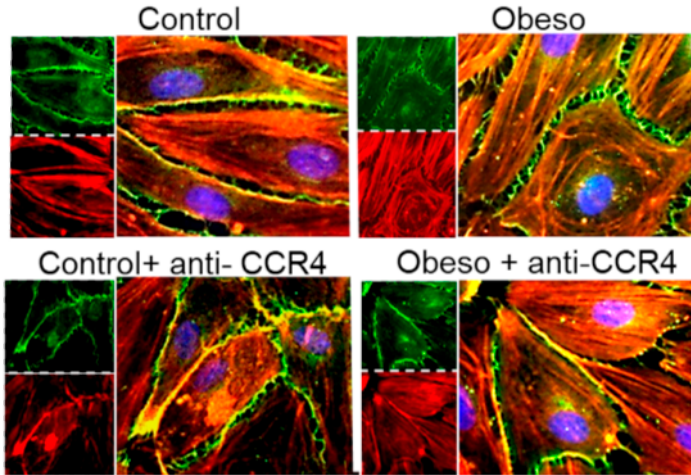
**Figura 44.** Efecto de las quimiocinas CCL17 y CCL22 sobre la organización de la cadherina endotelial vascular (VE-cadherina) y F-actina. Imágenes representativas de inmunofluorescencia que muestran la remodelación de VE-cadherina (Alexa Fluor 488, verde) y faloidina (Alexa Fluor 594, rojo) en HAEC incubadas con hr CCL17/CCL22. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul).

Paralelamente también estudiamos en las células endoteliales el efecto del bloqueo de CCR4 en la proliferación celular. Observamos una disminución significativa de la proliferación celular ( $p=0,002$ ; **Figura 45**) inducida por plasma de pacientes obesos.



**Figura 45.** La neutralización de CCR4 reduce la proliferación inducida por el suero de pacientes con obesidad mórbida. Las HAEC se pre-incubaron en presencia de un anticuerpo neutralizante de CCR4 ( $3\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o IgG control durante 24 h. Las células se incubaron con plasma (diluido 1:10 en HBSS) de pacientes obesos ( $n=16$ ) o de controles ( $n=10$ ). Se tomaron imágenes de inmunofluorescencia después de 5 h de incubación con BrdU y se analizó el porcentaje de células positivas en proliferación mediante incorporación de BrdU. Barra de escala,  $200\mu\text{M}$ . La comparación entre grupos se realizó con el análisis de variancia unidireccional ANOVA. Los datos representan la media  $\pm$  ESM.

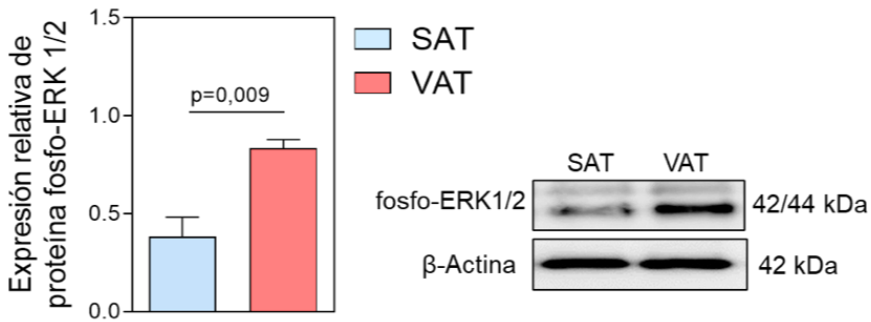
Posteriormente nos planteamos estudiar cómo afectaba la neutralización del receptor a la remodelación de las uniones de las células endoteliales. Mediante estudios de inmunofluorescencia, se observó una reorientación de las uniones célula-célula inicialmente lineales y estables en una adhesión perpendicular cuando se estimularon las HAEC con plasma de pacientes obesos en comparación con los controles. Además, se apreció una distribución diferente de F-actina cuando las células se estimularon con plasma de pacientes obesos en comparación con los controles (**Figura 46**).



**Figura 46.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia que muestran la remodelación celular de VE-cadherina y faloidina. La VE-cadherina (Alexa Fluor 488, verde) y faloidina (Alexa Fluor 594, rojo) en HAEC incubadas con un anticuerpo neutralizante para CCR4. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul).

#### 4.2.7 La activación de la vía de señalización ERK1/2 MAPK está aumentada el VAT de pacientes obesos en comparación con el SAT

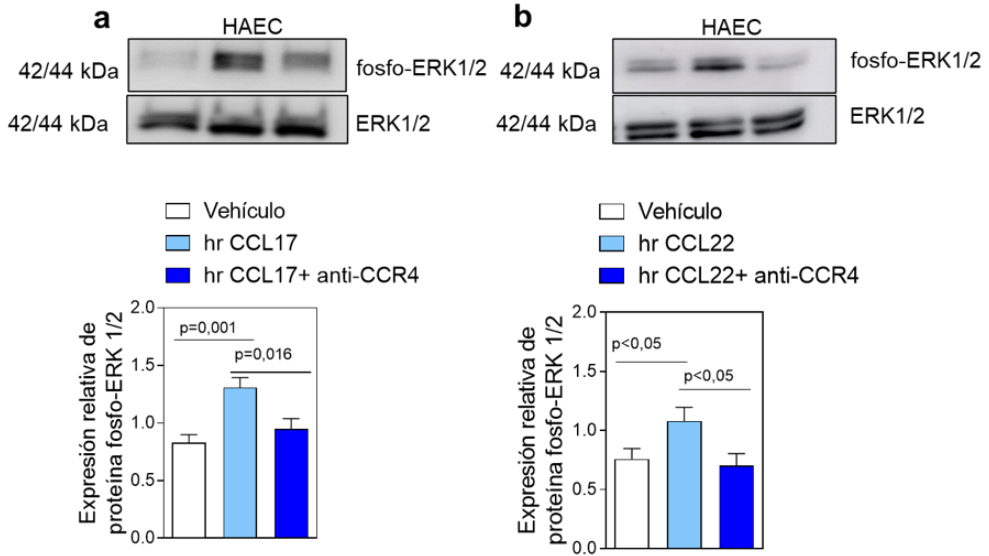
La vía de señalización ERK1/2 media en muchos aspectos de la proliferación celular y diferenciación<sup>123</sup>. Por lo tanto, a continuación, examinamos la fosforilación de ERK1/2 *ex vivo* en VAT y SAT de pacientes obesos mórbidos. El análisis proteico reveló que los niveles de fosforilación basal de ERK1 / 2 están significativamente aumentados en el VAT de pacientes obesos en comparación con el SAT ( $p=0,009$ ; **Figura 47**).



**Figura 47.** Activación de fosfo-ERK1/2 MAPK en el VAT de pacientes con obesidad mórbida. Análisis mediante Western Blot de ERK1/2 en muestras pareadas de SAT y VAT en pacientes con obesidad mórbida. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba de la “t” de Student. Los valores de cuantificación proteica se analizaron por densitometría y están expresados como la media  $\pm$  ESM (n = 6).

#### 4.2.8 Las quimiocinas CCL17 y CCL22 activan la vía de señalización ERK1/2 MAPK en las HAECs

Estudios previos han observado que la activación de CCR4 implica la fosforilación de ERK1/2 en varios tipos de células<sup>124</sup>. Además, se caracterizó esta vía de señalización en presencia de en células endoteliales aórticas. El análisis por Western Blot reveló un aumento de la fosforilación de la vía ERK1/2 cuando las células se pre-incubaron con hr CCL17 (p=0,001; **Figura 48a**) o hr CCL22 (p<0,05; **Figura 48b**). Además, se detectó una disminución significativa de la dicha fosforilación inducida por CCL17 y CCL22 en presencia de un anticuerpo neutralizante de CCR4 (p=0,016 y p <0,05; **Figura 48a y b**).



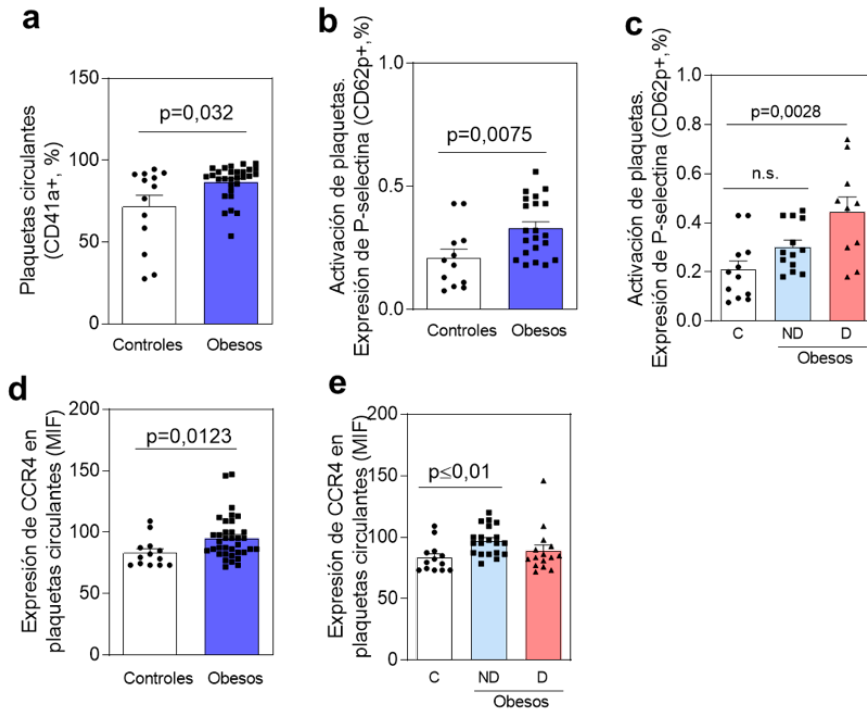
**Figura 48.** CCL17 o CCL22 a través de la activación de CCR4 aumentan la fosforilación de ERK 1/2 en HAEC. Las células se incubaron con vehículo, (a) hr CCL17 o (b) hr CCL22 (10 ng/mL) durante 20 minutos. Algunas células se pretrataron con un anticuerpo de bloqueo anti-CCR4 humano (3 $\mu$ g/mL) durante 10 minutos antes del tratamiento. Se muestran Western Blot representativos. La comparación entre grupos se realizó con el análisis de variancia 1way-ANOVA. Los valores de la densitometría están expresados como la media  $\pm$  ESM (n = 7).

### 4.2.9 El porcentaje de plaquetas circulantes, la activación plaquetaria y la expresión de CCR4 en plaquetas está aumentada en pacientes con obesidad mórbida

Estudios recientes muestran que la obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares que se asocian con un proceso aterotrombótico acelerado, hiperreactividad plaquetaria y reducción de la sensibilidad a terapias antiagregantes en pacientes obesos<sup>125</sup>. A continuación analizamos el porcentaje de plaquetas en sangre, su nivel de activación y la expresión del receptor CCR4 mediante citometría de flujo de sangre citrada de pacientes con obesidad mórbida y controles.

Se observó un aumento en el porcentaje de plaquetas circulantes en pacientes obesos con respecto a los controles ( $p=0,032$ , **Figura 49a**). Posteriormente se analizó el grado de activación plaquetaria y se observó un aumento en la expresión de P-selectina (CD62P) en los pacientes obesos en comparación con los controles ( $p=0,0075$ , **Figura 49b**). De estos pacientes obesos, los que mostraron más activación plaquetaria fueron los diabéticos ( $p=0,002$ , **Figura 49c**) en comparación con los no diabéticos.

Posteriormente estudiamos la expresión del receptor CCR4 en las plaquetas y observamos un aumento significativo en los pacientes obesos en comparación con los controles ( $p=0,012$ , **Figura 49d**). De estos pacientes obesos, los que mostraron más expresión de CCR4 fueron los no diabéticos ( $p\leq 0,01$ , **Figura 49e**) en comparación con los diabéticos, los cuales no mostraban diferencias significativas con respecto al grupo control.



**Figura 49.** El porcentaje de plaquetas, la activación plaquetaria y la expresión del receptor CCR4 es mayor en pacientes con obesidad. Análisis por citometría de flujo de sangre tratada con citrato de pacientes obesos y controles, teñida con marcadores específicos para determinar (a) las plaquetas (CD41), (b, c) la activación plaquetaria (CD41 y CD62P) y (d, e) la expresión del receptor CCR4 (CD41 y CCR4). Los resultados se presentan como el porcentaje de células positivas o como media de intensidad de fluorescencia (MIF). Los valores están expresados como la media  $\pm$  ESM. La comparación entre dos grupos se ha realizado con la prueba Mann Whitney ( $n=15$  sujetos control y  $n=36$  pacientes obesos) y para la comparación entre los tres grupos ( $n=15$  sujetos control y  $n=21$  pacientes obesos no diabéticos y  $n=15$  pacientes obesos diabéticos) se ha utilizado el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.



### 4.2.10 Los linfocitos T colaboradores presentan una mayor activación y expresan mayores niveles del receptor CCR4 en pacientes con obesidad mórbida

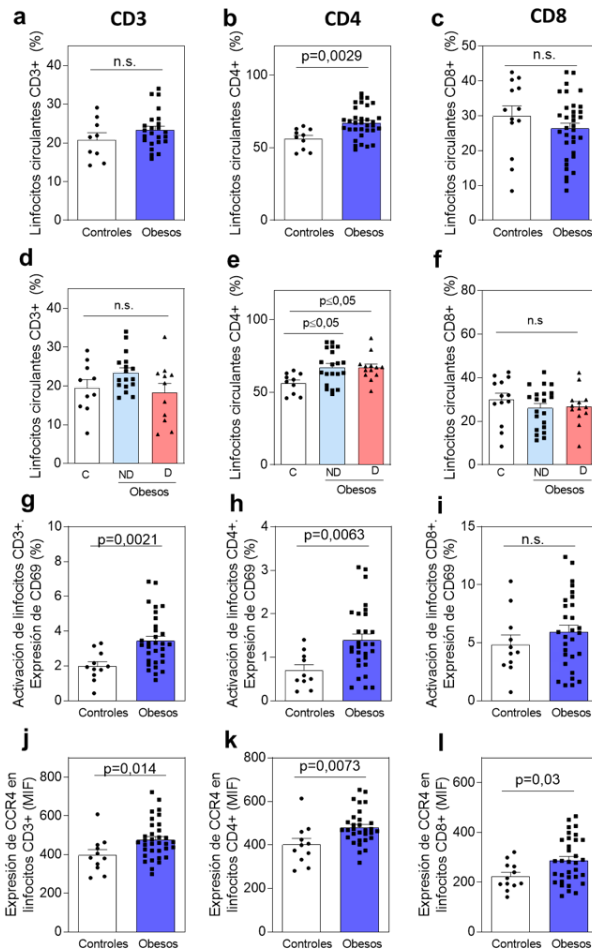
En la obesidad se produce una inflamación del tejido adiposo que posteriormente se traduce en una inflamación sistémica crónica de bajo grado que está asociada a diferentes patologías como la diabetes y el síndrome metabólico<sup>126</sup>. Investigaciones previas han estudiado la sangre periférica de pacientes obesos donde se ha observado un aumento de algunas subpoblaciones de linfocitos<sup>127</sup>.

A continuación, analizamos el porcentaje de linfocitos en sangre, su nivel de activación y la expresión del receptor CCR4 mediante citometría de flujo de sangre heparinizada de pacientes obesos y controles.

Se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos T circulantes CD4+ en pacientes con obesidad mórbida con respecto a los controles ( $p=0,0029$ , **Figura 50b**) no obstante no se observó ningún aumento de los linfocitos T totales CD3+ (**Figura 50a**) ni de los linfocitos CD8+ citotóxicos (**Figura 50c**). De estos pacientes obesos, tanto los diabéticos como los no diabéticos mostraron un aumento similar en el porcentaje de linfocitos CD4+ ( $p\leq 0,05$ , **Figura 50e**).

Posteriormente se analizó el grado de activación linfocitaria. El antígeno CD69 es una proteína transmembrana que se induce en leucocitos tras su activación y se expresa en linfocitos en distintas patologías. Se observó un aumento en la expresión de CD69 en los pacientes obesos en comparación con los controles en los linfocitos CD4+ ( $p=0,0021$ , **Figura 50h**). No obstante, en los linfocitos totales CD3+ ( $p=0,0021$ , **Figura 50g**), y, en los CD8+ no se observaron cambios en la activación (**Figura 50i**).

Después estudiamos la expresión del receptor CCR4, y observamos un aumento significativo de la expresión de CCR4 en los linfocitos CD3+ (**Figura 50j**), CD4+ (**Figura 50k**) y CD8+ (**Figura 50l**) de los pacientes obesos en comparación con los controles.



**Figura 50.** El porcentaje de linfocitos CD4+, la activación linfocitaria y la expresión del receptor CCR4 es mayor en pacientes con obesidad. Análisis por citometría de flujo de sangre heparinizada de pacientes obesos y controles, teñida con marcadores específicos para determinar el porcentaje de los linfocitos T (a,d) totales (CD3+), (b,e) colaboradores (CD4+) y (c,f) citotóxicos (CD8+). Posteriormente se observó (g-i) la activación linfocitaria co-tiñendolos con un marcador frente a CD69 y (j-l) la expresión del receptor CCR4. Los resultados se presentan como el porcentaje de células positivas o como media de intensidad de fluorescencia (MIF). Los valores están expresados como la media ± ESM. La comparación entre dos grupos se ha realizado con la prueba Mann Whitney (n=15 sujetos control y n= 36 pacientes obesos) y para la comparación entre los tres grupos (n=15 sujetos control y n= 21 pacientes obesos no diabéticos y n=15 pacientes obesos diabéticos) se ha utilizado el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

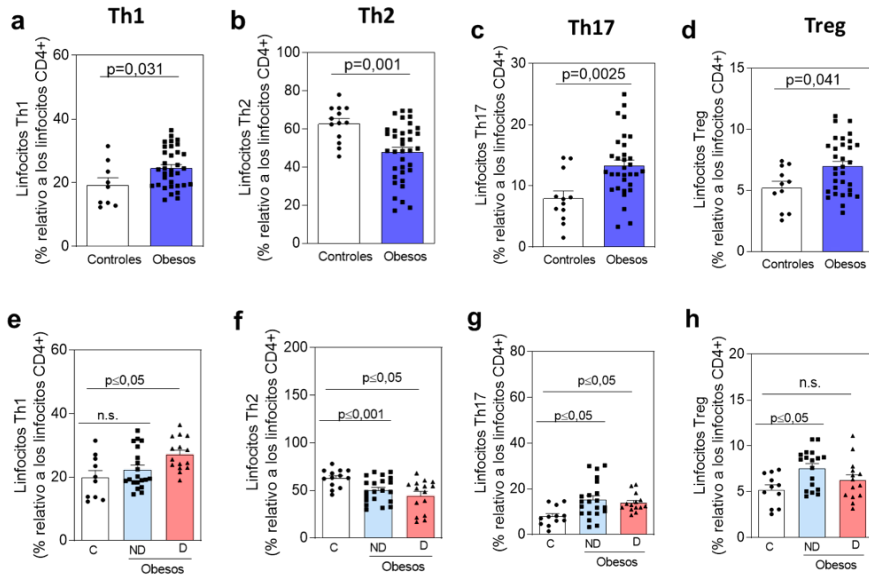
### 4.2.11 El porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos Th1, Th17 y Treg es mayor en pacientes con obesidad mórbida, mientras que la subpoblación Th2 se encuentra disminuida

Después de observar el aumento de los linfocitos CD3+CD4+ en los pacientes obesos, quisimos analizar las diferentes subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo marcando la sangre heparinizada de pacientes y controles con diferentes anticuerpos para determinar los linfocitos: Th1 (CXCR3+/CCR6-), Th2 (CXCR3-/CCR6-), Th17 (CXCR3-/CCR6+) y Treg (CD127-/CD25+).

Se observó un aumento en el porcentaje de las subpoblaciones Th1 ( $p=0,031$ , **Figura 51a**), Th17 ( $p=0,0025$ , **Figura 51c**) y Treg ( $p=0,04$ , **Figura 51d**) en pacientes obesos con respecto a los controles, en cambio se observó una disminución en el porcentaje de linfocitos Th2 ( $p=0,001$ , **Figura 51b**).

Posteriormente quisimos determinar la diferencia en el porcentaje de linfocitos entre los pacientes obesos diabéticos, no diabéticos y los controles. Se observó un aumento de los linfocitos Th1 en los pacientes obesos diabéticos en comparación con los controles ( $p \leq 0,05$ , **Figura 51e**). En cambio, no se observó diferencias entre los controles y los no diabéticos. Por el contrario, se observó un aumento de los linfocitos Treg en los pacientes obesos no diabéticos en comparación con los controles ( $p \leq 0,05$ , **Figura 48h**). No obstante, no se observó diferencias entre los controles y los diabéticos.

En cuanto a los linfocitos Th2 se observó una disminución significativa en los dos grupos de obesos con respecto a los controles, pero en el grupo de diabéticos la disminución fue mayor ( $p \leq 0,05$ , **Figura 51f**). Y, los linfocitos Th17 estaban aumentados en los pacientes obesos tanto diabéticos como no diabéticos en comparación con los controles ( $p \leq 0,05$ , **Figura 48g**).

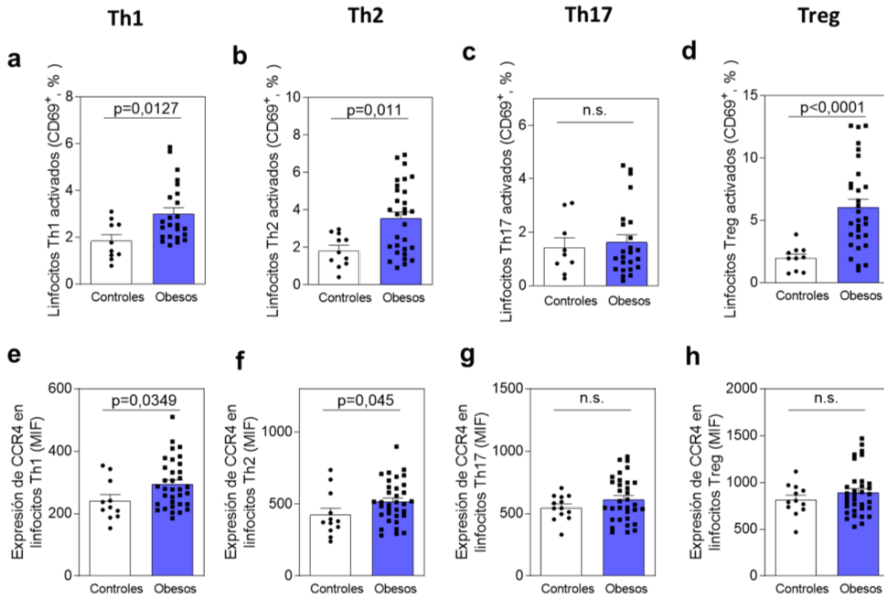


**Figura 51.** El porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos Th1, Th17 y Treg aumenta en pacientes con obesidad mórbida, mientras que la subpoblación Th2 disminuye.

Análisis por citometría de flujo de sangre heparinizada de pacientes obesos y controles, teñida con marcadores específicos para determinar el porcentaje de los linfocitos (a,e) Th1 (CXCR3+/CCR6-), (b,f) Th2 (CXCR3-/CCR6-) y (c,g) Th17 (CXCR3-/CCR6+) y (d,h) T Reguladores (CD127-/CD25+) Los resultados se presentan como el porcentaje de células positivas. Los valores están expresados como la media  $\pm$  ESM. La comparación entre dos grupos se ha realizado con la prueba Mann Whitney (n=15 sujetos control y n= 36 pacientes obesos) y para la comparación entre los tres grupos (n=15 sujetos control y n= 21 pacientes obesos no diabéticos y n=15 pacientes obesos diabéticos) se ha utilizado el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

## 4.2.12 Las subpoblaciones de linfocitos Th1, Th2 y Treg presentan una mayor activación y expresan mayores niveles del receptor CCR4 en pacientes con obesidad mórbida

Posteriormente se analizó el grado de activación linfocitaria, y se observó un aumento en la expresión de CD69 en los pacientes obesos de las subpoblaciones Th1, Th2 y Treg en comparación con los controles (**Figura 52 a,b y d**).



**Figura 52.** Las subpoblaciones de linfocitos Th1, Th2 y Treg están más activadas en pacientes con obesidad y expresan mayores niveles del receptor CCR4. Análisis por citometría de flujo de sangre heparinizada de pacientes obesos y controles, teñida con marcadores específicos para determinar (a-d) la activación linfocitaria (CD69+) y (e-h) la expresión del receptor CCR4. Los resultados se presentan como porcentaje de células positivas o como media de intensidad de fluorescencia (MIF). Los valores están expresados como la media  $\pm$  ESM. La comparación entre dos grupos se ha realizado con la prueba Mann Whitney ( $n=15$  sujetos control y  $n=36$  pacientes obesos).

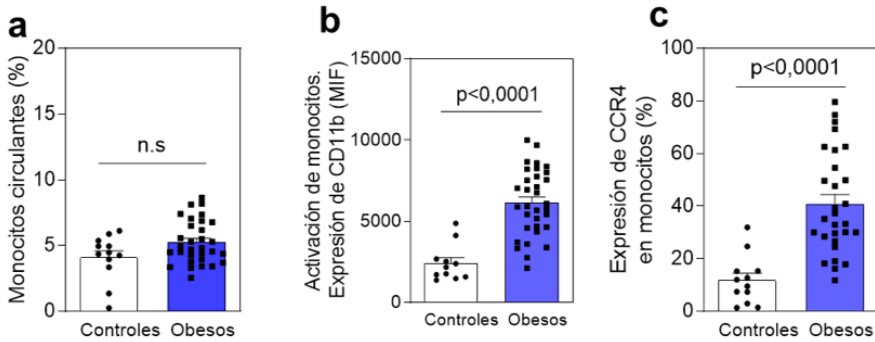
Después estudiamos la expresión del receptor CCR4 en las subpoblaciones linfocitarias, y observamos un aumento significativo de la expresión de CCR4 en los linfocitos de los pacientes obesos en comparación con los controles en las subpoblaciones Th1 y Th2 (**Figura 52 e y f**), en cambio no se observaron diferencias significativas en la expresión de CCR4 en las subpoblaciones Th17 y Treg (**Figura 52 g y h**).

### **4.2.13 Los monocitos presentan una mayor activación y expresan mayores niveles del receptor CCR4 en pacientes con obesidad mórbida**

Los macrófagos se acumulan en el tejido adiposo de las personas con obesidad y son la principal fuente de mediadores pro-inflamatorios. La migración de monocitos de sangre periférica contribuye a la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo<sup>128</sup>. Después de la activación de los monocitos, estos sobreexpresan la integrina  $\alpha M\beta 2$  (formada por las subunidades CD11b/CD18) que permite la adhesión y extravasación leucocitaria.

Estudiamos el porcentaje de población de monocitos, su activación y la expresión del receptor CCR4 en sangre heparinizada de pacientes con obesidad mórbida y controles. No observó ningún aumento en el porcentaje monocitos (CD14+) entre los pacientes obesos y los controles (**Figura 53 a**). En cambio, sí que se observó un aumento en la expresión de CD11b ( $p < 0,0001$ , **Figura 53 b**) en los pacientes obesos en comparación con los controles.

Para finalizar estudiamos la expresión del receptor CCR4 en los monocitos, y observamos un aumento significativo de la expresión de CCR4 en los monocitos de los pacientes obesos en comparación con los controles ( $p < 0,0001$ , **Figura 53 c**).

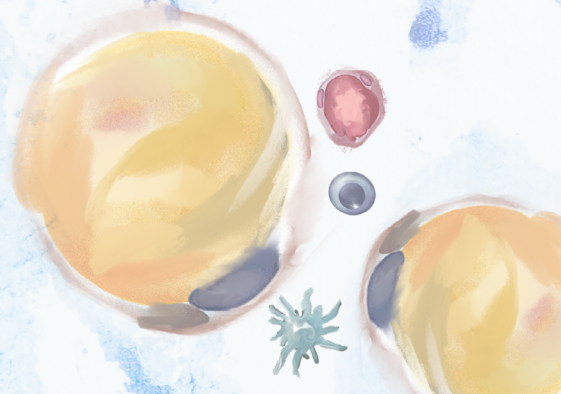


**Figura 53.** Los monocitos están más activados en pacientes con obesidad y expresan en mayor porcentaje el receptor CCR4. Análisis por citometría de flujo de sangre heparinizada de pacientes obesos y controles, teñida con marcadores específicos para determinar **(a)** el porcentaje de los monocitos circulantes, **(b)** la activación de los monocitos (CD11b) y **(c)** la expresión del receptor CCR4. Los resultados se presentan como el porcentaje de células positivas o como media de intensidad de fluorescencia (MIF). Los valores están expresados como la media  $\pm$  ESM. La comparación entre dos grupos se ha realizado con la prueba Mann Whitney (n=15 sujetos control y n= 36 pacientes obesos).





# 5. DISCUSIÓN





## 5. Discusión

### 5.1. Discusión del primer estudio: Implicación del eje CXCL10/CXCL11-CXCR3 en la angiogénesis y la inflamación del tejido adiposo en pacientes con obesidad mórbida

La obesidad es una enfermedad caracterizada por la acumulación excesiva de grasa corporal y su consecuente aumento del IMC. La grasa, sobre todo la visceral, sufre una remodelación patológica que conlleva a la inflamación y la vascularización inadecuada de la misma. Esta inflamación crónica en la obesidad se considera un factor de riesgo importante para el desarrollo de diferentes comorbilidades asociadas como las enfermedades metabólicas<sup>129-132</sup>, entre ellas la DMT2, las cardiovasculares y el cáncer<sup>133</sup>.

A nivel de salud pública, la obesidad representa un problema muy importante a nivel mundial ya que el aumento de la prevalencia de un IMC alto y la mortalidad resultante amenazan la salud de las personas en todos los países. El último estudio publicado por OMS (mayo 2022)<sup>134</sup> afirma que el 60% de los ciudadanos adultos en Europa presentan sobrepeso u obesidad, por lo tanto, su prevalencia se ha triplicado en los últimos 50 años, ésta alcanza su máximo entre los 50 y 65 años y es mayor en mujeres que en hombres<sup>135</sup>.

En España, la prevalencia de la obesidad alcanza el 23,8% de las personas adultas<sup>7</sup> y si las tendencias actuales se mantienen, en 2030 se estima que habrá unos 27 millones de casos de sobrepeso y obesidad. Actualmente el coste para el Sistema Nacional de Salud debido a la obesidad es de 2.000 millones de euros<sup>136</sup> y las estimaciones indican que hay unos 11.000 pacientes en lista de espera para someterse a cirugía bariátrica<sup>137</sup>.

Como factor de riesgo, la obesidad predispone a un estado inflamatorio crónico y sistémico a través del aumento de diferentes mediadores proinflamatorios, entre ellos las quimiocinas. Por lo tanto, identificar los factores reguladores específicos y los mecanismos moleculares implicados en la inflamación y la angiogénesis del tejido adiposo, puede ser de gran relevancia para prevenir o manejar las complicaciones asociadas.

En este primer estudio de la presente tesis doctoral se ha investigado la posible participación del eje CXCL9/CXCL10/CXCL11-CXCR3 en la fisiopatología del tejido adiposo con la intención de comprender su papel en la obesidad humana. En este estudio se muestra por primera vez la implicación del eje CXCR3 en la obesidad mórbida humana y su posible participación en las alteraciones metabólicas y vasculares asociadas a la obesidad.

En condiciones normales, la angiogénesis juega un papel fundamental en el mantenimiento de las funciones metabólicas del TA suministrando oxígeno y nutrientes a los adipocitos. En cambio, en la obesidad, se da una expansión patológica del TA donde la neovascularización es inadecuada, esto conduce a un estado de hipoxia que se acompaña de un aumento de la inflamación y de disfunción metabólica<sup>76,130</sup>.

Actualmente, hay nuevos estudios tanto en humanos como en modelos animales que proporcionan información sobre la regulación de la angiogénesis en el tejido adiposo visceral y también las vías de señalización que están implicadas en esta.

Hace aproximadamente 20 años, Judah Folkman demostró que la inhibición de la angiogénesis en ratones disminuía la expansión del tejido adiposo<sup>77</sup>. Pero posteriormente, estudios en ratones, demostraron que, al reducir la angiogénesis durante la expansión patológica del tejido adiposo en la obesidad, se agravaban las patologías metabólicas en vez de reducirlas. Se sobreexpresó y se delecionó genéticamente el VEGF-A, y se observó que el aumento en la expresión de VEGF-A protegía contra las comorbilidades asociadas a la obesidad, aumentando la

densidad vascular y en consecuencia disminuyendo la hipoxia<sup>80</sup>. Otros estudios en ratones con sobreexpresión específica del factor proangiogénico angiopoyetina-2 en el tejido adiposo, mostraron un aumento de la vascularización del TA, una mayor sensibilidad a la insulina y una disminución de la inflamación<sup>16</sup>. Realmente, no se entiende muy bien la relación entre la angiogénesis, la adipogénesis y los efectos metabólicos ya que, al manipular la angiogénesis en diferentes etapas de la remodelación del TA en la obesidad, se afecta de manera diferencial a la fisiopatología de la obesidad. Por ejemplo, un estudio mostró como el aumento de la angiogénesis en las primeras etapas de la obesidad en ratones tiene efectos beneficiosos y en cambio, la inhibición de los factores proangiogénicos en etapas posteriores también sería beneficioso<sup>138</sup>.

En los sujetos obesos, debido al estado proinflamatorio, la funcionalidad y la señalización de las células endoteliales está deteriorada. Por ejemplo, se mostró que la disminución de la angiogénesis en el tejido adiposo de pacientes obesos estaba asociada con la sobreexpresión de la isoforma anti-angiogénica VEGF-A165b<sup>114</sup>.

Las quimiocinas también están implicadas en la modulación de la angiogénesis. El estudio de Deiuliis et al<sup>91</sup> determinó una mayor expresión génica de CXCL10 y CXCR3 en el VAT de pacientes obesos en comparación con tejido equivalente de sujetos no obesos. En línea con estos hallazgos, en la presente Tesis, se ha mostrado la expresión diferencial de las quimiocinas angiostáticas CXCL10 y CXCL11 en dos tipos de grasa, VAT y SAT, de pacientes obesos, ya que sospechamos que también podrían ser responsables de la disminución de la vascularización en la grasa visceral.

Las quimiocinas coordinan el tráfico de leucocitos a los sitios inflamatorios. En individuos obesos, la regulación positiva de las quimiocinas CXCL se correlacionó con mediadores proinflamatorios IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, CCL2, CCL8, CCL20 y TNF $\alpha$ , que están implicados en la patogénesis de diferentes trastornos inflamatorios, incluida la aterosclerosis, la cardiopatía coronaria y la diabetes<sup>88</sup>.

Actualmente disponemos de bastante información sobre la sobreexpresión a nivel sistémico de los ligandos circulantes de CXCR3 en diferentes de trastornos inflamatorios y cardiovasculares<sup>90, 139</sup>. Sin embargo, su papel en la obesidad no está del todo estudiado. Un hallazgo importante en el presente trabajo ha sido la detección de un aumento de los niveles circulantes de CXCL10 y CXCL11 en pacientes con obesidad mórbida y su correlación positiva con el IMC. Pensamos, que dicha correlación podría explicarse por la asociación entre alteraciones metabólicas con el aumento de masa adiposa. Otros estudios también demostraron la asociación positiva de estas quimiocinas con diferentes patologías inflamatorias como la inflamación autoinmune pulmonar<sup>140</sup> y la esclerosis sistémica<sup>141</sup>.

Estudios recientes muestran la asociación de quimiocinas proinflamatorias con la resistencia a la insulina. Por ejemplo, en pacientes obesos se ha observado una asociación positiva entre CCL19 con resistencia a la insulina en el TA<sup>142</sup>. Cabe destacar que en nuestro trabajo observamos que los niveles circulantes de CXCL10 y CXCL11 se correlacionaban con una mayor resistencia a la insulina evaluada mediante el índice HOMA-IR. En este contexto, distintos estudios han mostrado que algunos marcadores inflamatorios incluyendo TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IFN $\gamma$  se detectan en mayor nivel en los pacientes obesos en comparación con los sujetos sanos y que además éstos se correlacionan positivamente con la resistencia a la insulina<sup>91,143</sup>. Tomadas en conjunto, estas asociaciones entre las quimiocinas y marcadores inflamatorios sugieren que, al inicio de la obesidad, las quimiocinas CXCL y las citocinas se producen en gran medida en el tejido adiposo inflamado, y pueden como consecuencia alterar la sensibilidad a la insulina<sup>88</sup>. Investigaciones previas mostraron que CXCL10 alteraba la función de las células  $\beta$ -pancreáticas a través de la señalización de TLR4 en pacientes con DMT2<sup>144</sup> y, más recientemente, se ha observado que los ratones con una deleción genética de CXCR3 muestran un retraso en el desarrollo de la DMT1<sup>145</sup>, esto sugiere que la producción de los ligandos de CXCR3 regulan la migración y actividad de los leucocitos en el tejido pancreático, influyendo en la función de las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos<sup>145</sup>. Además, Rocha et al<sup>146</sup> demostraron que los ratones obesos deficientes en CXCR3 tenían una mejor tolerancia a la glucosa y una disminución de los niveles plasmáticos de colesterol total<sup>146</sup>.

En estudios en humanos, CXCL10 y/o CXCL11 también se han identificado como posibles biomarcadores de infarto agudo de miocardio<sup>147</sup>, hipertensión<sup>148</sup> e insuficiencia cardíaca<sup>149</sup>. Dado nuestro hallazgo de niveles elevados de CXCL10 y CXCL11 en el plasma de pacientes obesos, se puede sugerir que quizá estos mediadores podrían contribuir a la isquemia y los trastornos vasculares en la obesidad más allá de su papel en el TA.

La inflamación del tejido adiposo en la obesidad se inicia y mantiene por adipocitos disfuncionales que secretan quimiocinas proinflamatorias (por ejemplo, CCL2, CCL5 y CXCL12)<sup>150</sup> y por la infiltración de células inmunitarias que a su vez amplían la respuesta y producen más citocinas y quimiocinas proinflamatorias, amplificando así el ambiente inflamatorio.

Estudios previos han observado que los adipocitos hipertróficos que expresan factores como CCL2, IL-6, TNF $\alpha$  y leptina, estimulan el reclutamiento de células inmunitarias, que desplazan a las que ya residían previamente<sup>70</sup>. Por ejemplo, la sobreexpresión de CCL2, CCL5 y CCL8, conduce al reclutamiento de monocitos que, después de diferenciarse a macrófagos M1, secretan TNF $\alpha$  e IL-6<sup>3,74</sup> o de linfocitos Th1 que liberan IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ <sup>75</sup>.

En cuanto las quimiocinas implicadas en nuestro estudio, CXCL10 y CXCL11, se ha visto que, además de sus efectos angiostáticos, son potentes mediadores inflamatorios que se encargan de reclutar células inmunes y participan en la regulación del tráfico leucocitario<sup>36,37</sup>. En el presente estudio observamos un aumento de la expresión del eje CXCR3 asociado con un aumento de la infiltración de linfocitos proinflamatorios en el tejido y una reducción de la vascularización en grasa visceral.

Otros estudios en modelos animales han demostrado que la delección de CXCL10 o CXCR3 en ratones deficientes en apolipoproteína E reducía la infiltración inflamatoria y el desarrollo de aterosclerosis<sup>36,38</sup>. Además, los ratones hipercolesterolémicos que carecen de CXCR3 mostraron una mejor tolerancia a la glucosa y una menor infiltración de leucocitos en el VAT<sup>91</sup>.

En la presente Tesis, también observamos que el empalme alternativo (o “*splicing*”) de CXCR3 tiene lugar en el contexto de la obesidad humana, asimismo hemos investigado su función. Estudios previos han demostrado que CXCR3B puede mediar señales inhibitoras del crecimiento tumoral<sup>151</sup>, y la regulación positiva de CXCR3B se asoció con una menor invasión tumoral, menor metástasis y un pronóstico favorable para algunos tipos de cáncer<sup>152</sup>.

Otras investigaciones adicionales demostraron que los efectos antiangiogénicos de los ligandos de CXCR3 están mediados en parte, a través de la isoforma CXCR3B<sup>153</sup>, y que las células endoteliales solo expresan esta isoforma. En la misma línea y utilizando un enfoque *ex vivo*, observamos que el bloqueo de la función CXCR3 con un anticuerpo neutralizante que, también reconoce la isoforma CXCR3B<sup>154</sup>, revirtió significativamente la vascularización en la grasa visceral de pacientes obesos. Por lo tanto, dada la sobreexpresión de CXCR3B y de sus ligandos CXCL10 y CXCL11 en la grasa visceral, es posible que CXCR3B sea, en parte, responsable de la alteración en el tejido adiposo en el contexto de la obesidad.

La activación de la vía de señalización p38MAPK está implicada en múltiples mecanismos relacionados con la síntesis de quimiocinas, apoptosis o proliferación de las células endoteliales<sup>155-158</sup>. Además, la activación de la vía p38MAPK ha sido asociada a un mecanismo de respuesta a la hipoxia<sup>159</sup>.

En nuestro trabajo encontramos un aumento en la fosforilación basal de p38MAPK en el VAT de pacientes con obesidad mórbida. Igualmente, mediante técnicas *ex vivo* con explantes de tejido adiposo de pacientes, determinamos que la adición de CXCL10 o CXCL11 redujo la angiogénesis y aumentó aún más la activación de p38MAPK, que se redujo en presencia de un anticuerpo neutralizante frente a CXCR3, lo que significa que p38MAPK se activa en este proceso patológico. Hay dos líneas de evidencia que apoyan a nuestra hipótesis; la primera, Petrai et al<sup>120</sup> demostraron que la activación de p38MAPK está involucrada en los efectos angiostáticos mediados tras la activación de CXCR3B; y, la segunda, donde las señales inducidas por CXCR3B en las células de cáncer de mama promueven un aumento de la fosforilación de p38MAPK<sup>151</sup>. Estos datos,



junto con nuestros hallazgos sugieren que los efectos angiostáticos de CXCL10 y CXCL11 en el TA humano están mediados, al menos en parte, por la activación de la señalización de p38MAPK.

En general, nuestras observaciones sugieren que la sobreexpresión del eje CXCR3 puede ser importante en la obesidad humana. Nuestros resultados *ex vivo* nos llevan a proponer que los altos niveles de los ligandos de CXCR3 en pacientes obesos podría obstaculizar la perfusión microvascular durante la expansión del TA, lo que daría lugar a una disfunción metabólica y desarrollo de resistencia a insulina.

## 5.2. Discusión del segundo estudio: Implicación del eje CCL17/CCL22-CCR4 en la disfunción endotelial en pacientes con obesidad mórbida

En esta segunda parte se abordó el estudio del eje CCL17/CCL22-CCR4 en el contexto de la obesidad, basándonos en otras investigaciones previas que mostraban su implicación en diferentes patologías inflamatorias<sup>110,160</sup> y cardiovasculares<sup>161-163</sup>, así como en algunos tipos de cáncer como la leucemia y el linfoma de Hodgkin<sup>103</sup>. No obstante, no existen estudios previos que hayan explorado el papel del eje CCR4 en la obesidad.

En este estudio detectamos un aumento significativo de las quimiocinas circulantes CCL17 y CCL22 en pacientes con obesidad mórbida en comparación con los sujetos control, esto concuerda con otras investigaciones previas donde también se detectó un aumento de estos ligandos de CCR4 en el plasma de pacientes con otras patologías inflamatorias como el infarto agudo de miocardio<sup>110</sup>, la cardiopatía isquémica<sup>160</sup>, la aterosclerosis, el aneurisma aórtico abdominal<sup>164</sup>, la enfermedad inflamatoria intestinal<sup>162</sup>, el asma, la artritis reumatoide<sup>100</sup>, o el cáncer<sup>165</sup>.

En este sentido, estudios en humanos detectaron niveles más altos de la quimiocina CCL22 circulante en pacientes con infarto agudo de miocardio en comparación con los sujetos de control<sup>160</sup>. Por otro lado, en ratones apoE<sup>-/-</sup>, también se detectó un aumento sistémico de la quimiocina CCL22, que se correlacionó con la presencia de ateromas de mayor tamaño, sugiriendo que CCL22 podría estar involucrada en el inicio y progresión de aterosclerosis<sup>166</sup>.

Igualmente se ha observado un aumento de los niveles de CCL17 en arterias humanas que se correlacionaron con lesiones ateroscleróticas avanzadas<sup>167</sup> y en plasma de pacientes con enfermedad coronaria que se asoció con patología coronaria y la aterosclerosis, independientemente de los factores de riesgo cardiovascular tradicionales<sup>168</sup>. Asimismo, en estudios preclínicos con ratones, la deficiencia de CCL17 redujo la lesión aterosclerótica en ratones apoE<sup>-/-</sup><sup>169</sup> y más recientemente en un modelo de hipertrofia cardiaca inducido por Ang-II en ratón knockout (KO) en CCL17, se ha demostrado que la deficiencia de CCL17 mejoraba la hipertrofia cardiaca, la fibrosis y la respuesta inflamatoria causada por la infusión de Ang-II. En esta misma línea, se observó que la neutralización de la actividad de CCL17, era capaz de disminuir la disfunción miocárdica<sup>170</sup>. Es más, en ratones CCL17-KO con infarto agudo de miocardio, se ha demostrado que la delección de esta quimiocina mejora la función sistólica del ventrículo derecho en respuesta al infarto, aumenta el reclutamiento de linfocitos Treg en el tejido cardiaco y disminuye el reclutamiento de macrófagos proinflamatorios<sup>171</sup>.

En el presente estudio hemos detectado correlaciones positivas entre los niveles sistémicos de CCL17 y CCL22 con el IMC y la resistencia a la insulina en pacientes con obesidad mórbida. Además, al igual que en el anterior estudio, la presente investigación es coherente con la asociación entre el aumento de masa del tejido adiposo visceral y alteraciones metabólicas como la diabetes<sup>172</sup>. En esta línea, estudios con ratones prediabéticos detectaron células que sobre-expresaban la quimiocina CCL17 en los infiltrados de los islotes pancreáticos. Asimismo, se observó un aumento de la expresión de CCL22 en el páncreas de ratones que promovió el reclutamiento de células CCR4+, dando lugar a un empeoramiento de la diabetes tipo 1<sup>173</sup>.

Hoy en día es conocido que existen diferencias entre la grasa visceral y la subcutánea, siendo la primera mucho más patogénica que la segunda. La grasa visceral se asocia a un mayor riesgo metabólico<sup>174-176</sup>, sin embargo, los mecanismos involucrados en estas diferencias no están del todo esclarecidos. En nuestro estudio hemos mostrado que en la grasa visceral se expresan y secretan, en mayor grado, CCL17 y CCL22 en comparación con la grasa subcutánea de pacientes obesos. Curiosamente, sobreexpresión de estas quimiocinas se correlaciona con una mayor expresión del receptor CCR4 en células endoteliales, linfocitos CD3 y macrófagos en la grasa visceral, lo que sugiere que estos mediadores podrían amplificar la respuesta inflamatoria durante la expansión del TA a través de efectos autocrinos y/o paracrinos que producirían una disfunción metabólica en pacientes obesos.

Una de las primeras etapas de la aterogénesis es la disfunción endotelial, un fenotipo proinflamatorio y protrombótico del endotelio que estimula la adhesión y extravasación de leucocitos al espacio subendotelial<sup>177</sup>. Se ha descrito previamente una correlación entre inflamación y disfunción endotelial en pacientes con obesidad<sup>143,178</sup>. En sujetos obesos, el VAT muestra un fenotipo pro-aterogénico al aumentar la liberación de quimiocinas que inducen disfunción endotelial y reclutamiento de células inmunes, contribuyendo así a la aterogénesis y las subsiguientes complicaciones cardiovasculares<sup>179,180</sup>.

Debido a que se sabe muy poco sobre el eje CCR4 y las interacciones leucocito-endotelio en la obesidad mórbida humana, nuestro siguiente objetivo fue evaluar su importancia funcional utilizando un modelo *ex vivo* de endotelio disfuncional. Utilizamos un modelo de cámara de flujo dinámico para explorar las consecuencias funcionales de las interacciones leucocito-endotelio, encontrando que la adhesión de leucocitos a las células endoteliales humanas, estimuladas o no con TNF $\alpha$ , fue significativamente mayor en el grupo de obesidad mórbida. El aumento de la adhesión al endotelio funcional (no estimulado) probablemente se debió a la activación de neutrófilos y monocitos en los pacientes obesos y la consiguiente sobreexpresión de la integrina CD11b/CD18, que interactúa con la molécula 1 de adhesión celular intercelular (ICAM-1) expresada de manera constitutiva en el endotelio. Esta investigación parece asimismo indicar

que CCR4 es fundamental para la adhesión de leucocitos al endotelio arterial disfuncional, ya que el bloqueo de su función reduce la adhesión leucocitaria a los niveles encontrados en el grupo de control.

Este aumento de las quimiocinas CCL17 y CCL22 en sangre periférica de pacientes obesos mórbidos nos permite, igualmente, especular que estas quimiocinas contribuyen al tráfico leucocitario y a la disfunción endotelial en la obesidad, es decir, su función se extiende más allá de su papel como agentes quimiotácticos en el tejido adiposo<sup>181</sup>. No obstante, se necesita más investigación en esta área para llegar a resultados concluyentes.

Nuestros hallazgos *in vitro* también sugieren que CCL17 y CCL22 eran capaces de producir un aumento de la proliferación de células endoteliales aórticas a través de la activación de CCR4. Este efecto se asoció con una pérdida de la integridad de VE-cadherina en las células endoteliales. De hecho, diferentes estudios han demostrado que la pérdida de VE-cadherina conduce a un aumento en la permeabilidad de los vasos y a la infiltración de leucocitos, deteriorando la estabilidad y funcionalidad vascular<sup>182</sup>.

Además, observamos un aumento similar en la proliferación endotelial, cuando las HAEC se incubaron con plasma de sujetos con obesidad mórbida. En nuestros estudios el tratamiento con un anticuerpo frente a CCR4 disminuyó la proliferación de las células endoteliales. Estos resultados están en consonancia con otros llevados a cabo por diferentes investigadores en los que se ha detectado que la quimiocina CCL17 a través la interacción de CCR4, promueve la proliferación de células cancerígenas de cuello uterino humano<sup>183</sup>, así como la migración de células de cáncer de colon<sup>184</sup>. Además, se ha observado en un modelo de carcinoma hepático en ratones, que los macrófagos promueven la invasividad a través del eje CCL22/CCR4<sup>185</sup>.

Estudios previos han demostrado la activación de la vía de señalización ERK1/2 en alteraciones metabólicas como la diabetes<sup>186</sup> o la inflamación vascular asociada a la obesidad<sup>82</sup>. Así, encontramos que la grasa visceral mostró

una mayor activación (fosforilación) de la vía de señalización ERK1/2 en comparación con la grasa subcutánea de pacientes obesos. Además, tanto CCL22 como CCL17 aumentaron la proliferación y diferenciación endotelial mediante activación de ERK1/2, la cual fue revertida por el bloqueo del receptor CCR4. Estos datos indican que la vía de señalización ERK1/2 podría estar implicada en el mecanismo de acción de los ligandos de CCR4. En este contexto, hallazgos previos han demostrado que el eje CCL17-CCR4 está involucrado en la señalización ERK1/2 que media la migración e invasión de células cancerosas<sup>123</sup>. Los resultados de nuestras observaciones sugieren que la vía de señalización ERK1/2 está involucrada en los efectos de CCL17 y CCL22 en la disfunción endotelial relacionada con la obesidad. Sin embargo, se necesitan estudios más exhaustivos con modelos animales de obesidad para corroborar estos hallazgos.

La obesidad igualmente se asocia a un bajo grado de inflamación sistémica, no obstante, el efecto de la obesidad a nivel sistémico sobre leucocitos y plaquetas circulantes, así como su papel en el riesgo trombótico y/o el desarrollo de otras patologías cardiovasculares requiere de más estudios, puesto que los pacientes con obesidad constituyen un grupo muy heterogéneo. De hecho, los estudios realizados en este ámbito muestran una elevada disparidad en los resultados<sup>187</sup>. Mediante el empleo de la citometría de flujo, hemos observado un aumento en el porcentaje y activación de las plaquetas en pacientes obesos con respecto a los controles y, además, esta activación era más pronunciada en pacientes obesos con diabetes que aquellos que no presentaban esta alteración metabólica.

Estos resultados son concordantes con otros trabajos previos donde los recuentos de plaquetas estaban aumentados en un modelo animal de obesidad en rata<sup>188</sup> y también en individuos obesos<sup>189</sup>. Asimismo, las concentraciones de P-selectina soluble estaban incrementadas en pacientes obesos con resistencia a la insulina en comparación con los controles<sup>190</sup> y la expresión de CD62p (P-selectina) era más elevada en pacientes obesos con DMT2<sup>191</sup>.

Al analizar diferentes subpoblaciones leucocitarias, se ha detectado diferentes resultados relevantes como el aumento en el porcentaje de linfocitos

CD4+ en sujetos obesos mórbidos, sin afectar al de linfocitos CD8+. En estudios previos se detectó un aumento del recuento absoluto de leucocitos en sangre periférica de pacientes obesos<sup>192</sup> y los niveles de linfocitos CD4+ circulantes se correlacionaron positivamente con el aumento del IMC en humanos<sup>193</sup>, por tanto, es muy probable que estos eventos estén asociados a la disfunción metabólica en la obesidad.

Al estudiar en detalle las subpoblaciones linfocitarias CD4+, comprobamos el aumento de la subpoblación Th1 en pacientes obesos y también su mayor activación. Estudios clínicos han establecido correlaciones positivas entre los linfocitos Th1 circulantes con la obesidad y la disfunción metabólica<sup>194,195</sup>, concordante con nuestros hallazgos. Por otro lado, el porcentaje de la subpoblación leucocitaria Th2 estaba disminuida en pacientes con obesidad y disminuyó aún más en aquellos obesos diabéticos. Aunque este fenómeno está poco explorado, existe un estudio que muestra que la frecuencia de linfocitos Th2 en sangre tiene una correlación inversa con la resistencia a la insulina, lo que sugiere un posible efecto protector de estas células<sup>196</sup>.

El análisis en los linfocitos T reguladores (Treg), a los cuales se les atribuye un efecto ateroprotector en pacientes con enfermedad coronaria, en el escenario de la obesidad los resultados descritos en diferentes estudios previos han sido discrepantes. Mientras que algún estudio mostró que los sujetos obesos presentan niveles elevados de linfocitos Treg<sup>192</sup>, otros estudios indican que la frecuencia de linfocitos Treg está reducida en individuos obesos metabólicamente enfermos en comparación con sujetos obesos metabólicamente sanos<sup>197</sup> y que los pacientes diabéticos presentaban frecuencias más bajas de linfocitos Treg en sangre periférica que los controles no diabéticos<sup>193</sup>. En nuestro estudio observamos un aumento de los linfocitos Treg en pacientes obesos, pero una disminución en su frecuencia en aquellos que además tenían DMT2.

Respecto a los monocitos, estudios previos detectaron niveles más elevados en obesidad<sup>198</sup>, aunque otros no los encontraron<sup>199</sup>. En nuestro análisis no hemos observado un aumento de los monocitos totales de los pacientes obesos

con respecto a los controles. No obstante sí que observamos una mayor expresión de la integrina de superficie CD11b/CD18, tal y como demuestran otras investigaciones<sup>195</sup> donde se correlaciona la expresión de CD11b/CD18 con anomalías clínicas en el contexto de la obesidad como la resistencia a la insulina<sup>200</sup>, ya que esta integrina es un marcador de activación de la población monocítica.

El aumento de la expresión de CCR4 observado en plaquetas, monocitos y linfocitos de pacientes obesos sugiere una posible implicación en el desarrollo de la inflamación sistémica asociada a la obesidad, no obstante, son necesarios más estudios para poder corroborarlo.

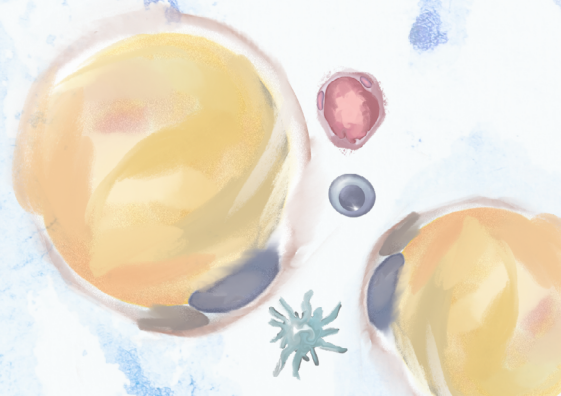
Es necesario señalar algunas limitaciones del presente estudio. No hemos tenido acceso al tejido adiposo de sujetos no obesos y, por lo tanto, no hemos podido estudiar la expresión de estos ejes de quimiocinas en tejido adiposo en sujetos controles. Por lo tanto, la replicación de estos hallazgos en una cohorte más grande de pacientes obesos y en modelos animales sería necesaria como un próximo paso en la evaluación de la importancia de los ejes CCR4 y CXCR3 en la inflamación, disfunción vascular y en su relación con las complicaciones cardiometabólicas asociadas a la obesidad.

En conclusión, los resultados de la presente Tesis Doctoral sugieren que la sobreexpresión de los ejes CXCL10/CXCL11-CXCR3 y CCL17/CCL22-CCR4 juegan un papel importante en la obesidad mórbida. Por lo tanto, la modulación farmacológica de la expresión y/o función de CXCR3, CCR4 y sus ligandos podría ser una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de las complicaciones cardiovasculares asociadas a la obesidad.





## 6. CONCLUSIONES



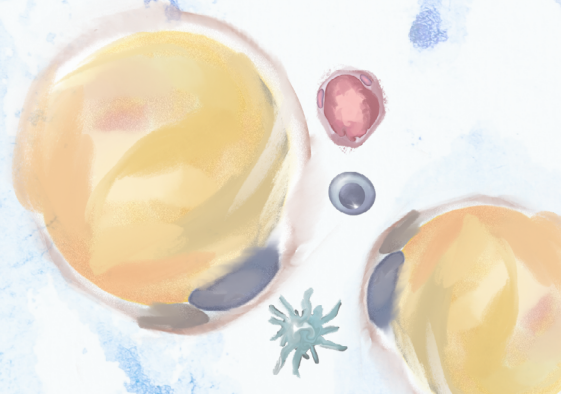


## 6. Conclusiones

1. En pacientes con obesidad mórbida, el eje CXCR3 está sobreexpresado en el tejido adiposo visceral comparando con el subcutáneo, localizándose principalmente en los linfocitos T y las células endoteliales. Los niveles de los ligandos de CXCR3, CXCL10 y CXCL11 están aumentados en el plasma de dichos pacientes, correlacionándose positivamente con el IMC y el HOMA-IR, sugiriendo que la expresión de este eje está relacionada con las alteraciones metabólicas producidas en la obesidad mórbida.
2. Los estudios *ex vivo* mostraron que la angiogénesis era menor en explantes de tejido adiposo visceral de pacientes obesos comparado con los del subcutáneo, relacionándose con los efectos angiostáticos de CXCL10 y CXCL11. El bloqueo *ex vivo* del receptor CXCR3 y su isoforma CXCR3B con un anticuerpo monoclonal, revirtieron dichos efectos angiostáticos, observándose que la vía de señalización p38 MAPK mediaba estos efectos. Por lo tanto, la modulación farmacológica de la expresión y función de CXCR3 podría ser una estrategia prometedora para regular la vascularización del tejido adiposo.
3. El eje CCR4 está sobreexpresado en el tejido adiposo visceral en comparación con el subcutáneo de los pacientes con obesidad mórbida, localizándose principalmente en los linfocitos T, las células endoteliales y los macrófagos. Los ligandos CCL17 y CCL22 están aumentados en el plasma de dichos pacientes, correlacionándose positivamente con el IMC y el HOMA-IR, sugiriendo que la expresión del eje CCR4 está implicado en el desarrollo de diferentes patologías cardiovasculares relacionadas con la obesidad.

4. Los estudios *in vitro* mostraron que el bloqueo funcional del receptor CCR4 en las células endoteliales disminuyeron la adhesión leucocito-endotelio, proceso clave en la aterogénesis. El bloqueo de CCR4 también produjo una disminución de la proliferación celular inducida por plasma de obesos y mediado a través de la activación de ERK 1/2.
5. Finalmente, la citometría de flujo reveló un aumento en el porcentaje de plaquetas, de linfocitos CD4+ y las subpoblaciones Th1, Th17 y Treg en sangre de pacientes con obesidad mórbida, así como un aumento en la expresión del receptor CCR4 en plaquetas, monocitos y linfocitos CD4+. Por lo tanto, la inhibición de CCR4 y su función podría ser una diana terapéutica prometedora para el tratamiento de la disfunción del tejido adiposo y de las complicaciones cardiovasculares asociadas a la obesidad.

# 7. BIBLIOGRAFÍA





## 7. Bibliografía

Δ. Ilustraciones creadas con BioRender. <https://biorender.com/>

†. Ilustraciones creadas con iStock. <https://iStock.com/>

1. Chooi, Y.C., Ding, C. & Magkos, F. The epidemiology of obesity. *Metabolism: clinical and experimental* **92**, 6-10 (2019).
2. Khattak, Z.E. & Zahra, F. Evaluation of Patients With Obesity. in *StatPearls* (StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC., Treasure Island (FL), 2022).
3. Blaszczak, A.M., Jalilvand, A. & Hsueh, W.A. Adipocytes, Innate Immunity and Obesity: A Mini-Review. *Frontiers in immunology* **12**, 650768-650768 (2021).
4. Kawai, T., Autieri, M.V. & Scalia, R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. **320**, C375-C391 (2021).
5. Piché, M.E., Tchernof, A. & Després, J.P. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circulation research* **126**, 1477-1500 (2020).
6. Caballero, B. Humans against Obesity: Who Will Win? *Adv Nutr* **10**, S4-S9 (2019).
7. Lecube, A., Sánchez, E., Monereo, S., Medina-Gómez, G., Bellido, D., García-Almeida, J.M., Martínez de Icaya, P., Malagón, M.M., Goday, A. & Tinahones, F.J. Factors Accounting for Obesity and Its Perception among the Adult Spanish Population: Data from 1,000 Computer-Assisted Telephone Interviews. *Obesity Facts* **13**, 322-332 (2020).
8. Blüher, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature reviews. Endocrinology* **15**, 288-298 (2019).
9. WHO. Global Health Observatory Data Repository. <https://apps.who.int/gho/data/node.main.A900A?lang=en> (2021).

10. Hruby, A. & Hu, F.B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics* **33**, 673-689 (2015).
11. Zatterale, F., Longo, M., Naderi, J., Raciti, G.A., Desiderio, A., Miele, C. & Beguinot, F. Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front Physiol* **10**, 1607-1607 (2020).
12. Shariq, O.A. & McKenzie, T.J. Obesity-related hypertension: a review of pathophysiology, management, and the role of metabolic surgery. *Gland Surg* **9**, 80-93 (2020).
13. Carbone, S., Lavie, C.J., Elagizi, A., Arena, R. & Ventura, H.O. The Impact of Obesity in Heart Failure. *Heart failure clinics* **16**, 71-80 (2020).
14. Aras, M., Tchang, B.G. & Pape, J. Obesity and Diabetes. *Nursing Clinics of North America* **56**, 527-541 (2021).
15. Guglielmi, V. & Sbraccia, P. Obesity phenotypes: depot-differences in adipose tissue and their clinical implications. *Eating and weight disorders : EWD* **23**, 3-14 (2018).
16. Müller, T.D., Blüher, M., Tschöp, M.H. & DiMarchi, R.D. Anti-obesity drug discovery: advances and challenges. *Nature reviews. Drug discovery* **21**, 201-223 (2022).
17. Tsatsoulis, A. & Paschou, S.A. Metabolically Healthy Obesity: Criteria, Epidemiology, Controversies, and Consequences. *Current Obesity Reports* **9**, 109-120 (2020).
18. Kaila, B. & Raman, M. Obesity: A review of pathogenesis and management strategies. *Canadian Journal of Gastroenterology* **22**, 61-68 (2008).
19. Ross, R., Neeland, I.J., Yamashita, S., Shai, I., Seidell, J., Magni, P., Santos, R.D., Arsenault, B., Cuevas, A., Hu, F.B., Griffin, B.A., Zambon, A., Barter, P., Fruchart, J.C., Eckel, R.H., Matsuzawa, Y. & Després, J.P. Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a Consensus Statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity. *Nature reviews. Endocrinology* **16**, 177-189 (2020).
20. Pulipati, V.P. & Pannain, S. Pharmacotherapy of obesity in complex diseases. *Clinical obesity* **12**, e12497 (2022).
21. Lin, X. & Li, H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Frontiers in endocrinology* **12**, 706978 (2021).



22. Pasquali, R., Casanueva, F., Haluzik, M., van Hulsteijn, L., Ledoux, S., Monteiro, M.P., Salvador, J., Santini, F., Toplak, H. & Dekkers, O.M. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline: Endocrine work-up in obesity. *European journal of endocrinology* **182**, G1-g32 (2020).
23. Nguyen, N.T. & Varela, J.E. Bariatric surgery for obesity and metabolic disorders: state of the art. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **14**, 160-169 (2017).
24. Rutledge, R., Kular, K. & Manchanda, N. The Mini-Gastric Bypass original technique. *International journal of surgery (London, England)* **61**, 38-41 (2019).
25. Cao, J., Ehling, M., März, S., Seebach, J., Tarbashevich, K., Sixta, T., Pitulescu, M.E., Werner, A.-C., Flach, B., Montanez, E., Raz, E., Adams, R.H. & Schnittler, H. Polarized actin and VE-cadherin dynamics regulate junctional remodelling and cell migration during sprouting angiogenesis. *Nature Communications* **8**, 2210 (2017).
26. Paludan, S.R., Pradeu, T., Masters, S.L. & Mogensen, T.H. Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation. *Nat Rev Immunol* **21**, 137-150 (2021).
27. Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X. & Zhao, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **9**, 7204-7218 (2018).
28. Kaur, B.P. & Secord, E. Innate Immunity. *Pediatric clinics of North America* **66**, 905-911 (2019).
29. Pahwa, R., Goyal, A. & Jialal, I. Chronic Inflammation. in *StatPearls* (StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC., Treasure Island (FL), 2022).
30. Marshall, J.S., Warrington, R., Watson, W. & Kim, H.L. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology* **14**, 49 (2018).
31. Monteiro, R. & Azevedo, I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators of inflammation* **2010**(2010).

32. Chelko, S.P., Asimaki, A., Lowenthal, J., Bueno-Beti, C., Bedja, D., Scalco, A., Amat-Alarcon, N., Andersen, P., Judge, D.P., Tung, L. & Saffitz, J.E. Therapeutic Modulation of the Immune Response in Arrhythmogenic Cardiomyopathy. **140**, 1491-1505 (2019).
33. Berbudı, A., Rahmadika, N., Tjahjadi, A.I. & Ruslami, R. Type 2 Diabetes and its Impact on the Immune System. *Curr Diabetes Rev* **16**, 442-449 (2020).
34. Araki, Y. & Mimura, T. The Mechanisms Underlying Chronic Inflammation in Rheumatoid Arthritis from the Perspective of the Epigenetic Landscape. *Journal of Immunology Research* **2016**, 6290682 (2016).
35. Greten, F.R. & Grivennikov, S.I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* **51**, 27-41 (2019).
36. Scalia, R. The microcirculation in adipose tissue inflammation. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* **14**, 69-76 (2013).
37. Muller, W.A. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. **50**, 7-22 (2013).
38. Mauersberger, C., Hinterdobler, J., Schunkert, H., Kessler, T. & Sager, H.B. Where the Action Is—Leukocyte Recruitment in Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med* **8**, 813984-813984 (2022).
39. Piqueras, L. & Sanz, M.J. Angiotensin II and leukocyte trafficking: New insights for an old vascular mediator. Role of redox-signaling pathways. *Free radical biology & medicine* **157**, 38-54 (2020).
40. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* **7**, 678-689 (2007).
41. Russo, H.M., Wickenheiser, K.J., Luo, W., Ohman, M.K., Franchi, L., Wright, A.P., Bodary, P.F., Núñez, G. & Eitzman, D.T. P-selectin glycoprotein ligand-1 regulates adhesive properties of the endothelium and leukocyte trafficking into adipose tissue. *Circulation research* **107**, 388-397 (2010).
42. Preston, K.J., Rom, I., Vrakas, C., Landesberg, G., Etwebi, Z., Muraoka, S., Autieri, M., Eguchi, S. & Scalia, R. Postprandial activation of leukocyte-endothelium interaction by fatty acids in the visceral adipose tissue microcirculation. **33**, 11993-12007 (2019).

43. McEver, R.P. & Zhu, C. Rolling cell adhesion. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**, 363-396 (2010).
44. Nourshargh, S. & Alon, R. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity* **41**, 694-707 (2014).
45. Ramani, T., Auletta, C.S., Weinstock, D., Mounho-Zamora, B., Ryan, P.C., Salcedo, T.W. & Bannish, G. Cytokines: The Good, the Bad, and the Deadly. *International Journal of Toxicology* **34**, 355-365 (2015).
46. Strang, H., Kaul, A., Parikh, U., Masri, L., Saravanan, S., Li, H., Miao, Q. & Balaji, S. Chapter 11 - Role of cytokines and chemokines in wound healing. in *Wound Healing, Tissue Repair, and Regeneration in Diabetes* (eds. Bagchi, D., Das, A. & Roy, S.) 197-235 (Academic Press, 2020).
47. Hughes, C.E. & Nibbs, R.J.B. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J* **285**, 2944-2971 (2018).
48. Ortega, R., Collado, A., Selles, F., Gonzalez-Navarro, H., Sanz, M.J., Real, J.T. & Piqueras, L. SGLT-2 (Sodium-Glucose Cotransporter 2) Inhibition Reduces Ang II (Angiotensin II)-Induced Dissecting Abdominal Aortic Aneurysm in ApoE (Apolipoprotein E) Knockout Mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **39**, 1614-1628 (2019).
49. Xue, W., Fan, Z., Li, L., Lu, J., Zhai, Y. & Zhao, J. The chemokine system and its role in obesity. *Journal of cellular physiology* **234**, 3336-3346 (2019).
50. Bradley, J.R. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of pathology* **214**, 149-160 (2008).
51. Borish, L.C. & Steinke, J.W. 2. Cytokines and chemokines. *The Journal of allergy and clinical immunology* **111**, S460-475 (2003).
52. Tzanavari, T., Giannogonas, P. & Karalis, K.P. *TNF- $\alpha$  and Obesity*.
53. Cao, Y. Angiogenesis and vascular functions in modulation of obesity, adipose metabolism, and insulin sensitivity. *Cell metabolism* **18**, 478-489 (2013).
54. Duran, C.L., Howell, D.W., Dave, J.M., Smith, R.L., Torrie, M.E., Essner, J.J. & Bayless, K.J. Molecular Regulation of Sprouting Angiogenesis. *Comprehensive Physiology* **8**, 153-235 (2017).

55. Cao, Y. *Angiogenesis in Adipose Tissue*, (Springer New York, 2013).
56. Warmke, N., Walker, A.M.N. & Cubbon, R.M. Angiogenesis. in *Encyclopedia of Cardiovascular Research and Medicine* (eds. Vasan, R.S. & Sawyer, D.B.) 85-96 (Elsevier, Oxford, 2018).
57. Gealekman, O., Guseva, N., Hartigan, C., Apotheker, S., Gorgoglione, M., Gurav, K., Tran, K.V., Straubhaar, J., Nicoloro, S., Czech, M.P., Thompson, M., Perugini, R.A. & Corvera, S. Depot-specific differences and insufficient subcutaneous adipose tissue angiogenesis in human obesity. *Circulation* **123**, 186-194 (2011).
58. Vestweber, D. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **28**, 223-232 (2008).
59. Seebach, J., Klusmeier, N. & Schnittler, H. Autoregulatory “Multitasking” at Endothelial Cell Junctions by Junction-Associated Intermittent Lamellipodia Controls Barrier Properties. **11**(2021).
60. Oikonomou, E.K. & Antoniades, C. The role of adipose tissue in cardiovascular health and disease. *Nature reviews. Cardiology* **16**, 83-99 (2019).
61. Maurizi, G., Della Guardia, L., Maurizi, A. & Poloni, A. Adipocytes properties and crosstalk with immune system in obesity-related inflammation. *Journal of cellular physiology* **233**, 88-97 (2018).
62. Cheng, L., Wang, J., Dai, H., Duan, Y., An, Y., Shi, L., Lv, Y., Li, H., Wang, C., Ma, Q., Li, Y., Li, P., Du, H. & Zhao, B. Brown and beige adipose tissue: a novel therapeutic strategy for obesity and type 2 diabetes mellitus. *Adipocyte* **10**, 48-65 (2021).
63. Hepler, C. & Gupta, R.K. The expanding problem of adipose depot remodeling and postnatal adipocyte progenitor recruitment. *Mol Cell Endocrinol* **445**, 95-108 (2017).
64. Choe, S.S., Huh, J.Y., Hwang, I.J., Kim, J.I. & Kim, J.B. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Frontiers in endocrinology* **7**, 30 (2016).
65. Ahmed, B., Sultana, R. & Greene, M.W. Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **137**, 111315 (2021).

66. Pereira, S. & Alvarez-Leite, J. Adipokines: Biological functions and metabolically healthy obese profile. *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research* **2014**, 15-25 (2014).
67. Sam, S. Differential effect of subcutaneous abdominal and visceral adipose tissue on cardiometabolic risk. *Hormone molecular biology and clinical investigation* **33**(2018).
68. Herold, J. & Kalucka, J. Angiogenesis in Adipose Tissue: The Interplay Between Adipose and Endothelial Cells. *Front Physiol* **11**, 624903-624903 (2021).
69. Cao, Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *The Journal of clinical investigation* **117**, 2362-2368 (2007).
70. Michailidou, Z., Gomez-Salazar, M. & Alexaki, V.I. Innate Immune Cells in the Adipose Tissue in Health and Metabolic Disease. *Journal of innate immunity* **14**, 4-30 (2022).
71. Makki, K., Froguel, P. & Wolowczuk, I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN inflammation* **2013**, 139239 (2013).
72. Man, K., Kallies, A. & Vasanthakumar, A. Resident and migratory adipose immune cells control systemic metabolism and thermogenesis. *Cellular & Molecular Immunology* **19**, 421-431 (2022).
73. Molofsky, A.B., Nussbaum, J.C., Liang, H.-E., Van Dyken, S.J., Cheng, L.E., Mohapatra, A., Chawla, A. & Locksley, R.M. Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *Journal of Experimental Medicine* **210**, 535-549 (2013).
74. Zatterale, F., Longo, M., Naderi, J., Raciti, G.A., Desiderio, A., Miele, C. & Beguinot, F. Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front Physiol* **10**, 1607 (2019).
75. McLaughlin, T., Ackerman, S.E., Shen, L. & Engleman, E. Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. *The Journal of clinical investigation* **127**, 5-13 (2017).
76. Guzik, T.J., Skiba, D.S., Touyz, R.M. & Harrison, D.G. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. *Cardiovascular research* **113**, 1009-1023 (2017).

77. Ioannidou, A., Fisher, R.M. & Hagberg, C.E. The multifaceted roles of the adipose tissue vasculature. **23**, e13403 (2022).
78. Graupera, M. & Claret, M. Endothelial Cells: New Players in Obesity and Related Metabolic Disorders. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **29**, 781-794 (2018).
79. Li, M., Qian, M., Kyler, K. & Xu, J. Adipose Tissue-Endothelial Cell Interactions in Obesity-Induced Endothelial Dysfunction. **8**(2021).
80. Sung, H.K., Doh, K.O., Son, J.E., Park, J.G., Bae, Y., Choi, S., Nelson, S.M., Cowling, R., Nagy, K., Michael, I.P., Koh, G.Y., Adamson, S.L., Pawson, T. & Nagy, A. Adipose vascular endothelial growth factor regulates metabolic homeostasis through angiogenesis. *Cell metabolism* **17**, 61-72 (2013).
81. Nandipati, K.C., Subramanian, S. & Agrawal, D.K. Protein kinases: mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance. *Mol Cell Biochem* **426**, 27-45 (2017).
82. Kassouf, T. & Sumara, G. Impact of Conventional and Atypical MAPKs on the Development of Metabolic Diseases. **10**, 1256 (2020).
83. Hotamisligil, G.S. & Davis, R.J. Cell Signaling and Stress Responses. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, a006072 (2016).
84. Donohoe, F., Wilkinson, M., Baxter, E. & Brennan, D.J. Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and Obesity-Related Cancer. *International journal of molecular sciences* **21**(2020).
85. Balestrieri, M.L., Balestrieri, A., Mancini, F.P. & Napoli, C. Understanding the immunoangiostatic CXC chemokine network. *Cardiovascular research* **78**, 250-256 (2008).
86. Smith, J.S., Alagesan, P., Desai, N.K., Pack, T.F., Wu, J.-H., Inoue, A., Freedman, N.J. & Rajagopal, S. C-X-C Motif Chemokine Receptor 3 Splice Variants Differentially Activate Beta-Arrestins to Regulate Downstream Signaling Pathways. **92**, 136-150 (2017).
87. Karin, N. & Razon, H. Chemokines beyond chemo-attraction: CXCL10 and its significant role in cancer and autoimmunity. *Cytokine* **109**, 24-28 (2018).
88. Kochumon, S., Madhoun, A.A., Al-Rashed, F., Azim, R., Al-Ozairi, E., Al-Mulla, F. & Ahmad, R. Adipose tissue gene expression of CXCL10 and CXCL11

- modulates inflammatory markers in obesity: implications for metabolic inflammation and insulin resistance. *Ther Adv Endocrinol Metab* **11**, 2042018820930902-2042018820930902 (2020).
89. Lacotte, S., Brun, S., Muller, S. & Dumortier, H. CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1173**, 310-317 (2009).
  90. Szentes, V., Gazdag, M., Szokodi, I. & Dézsi, C.A. The Role of CXCR3 and Associated Chemokines in the Development of Atherosclerosis and During Myocardial Infarction. **9**(2018).
  91. Deilulis, J.A., Oghumu, S., Duggineni, D., Zhong, J., Rutsky, J., Banerjee, A., Needleman, B., Mikami, D., Narula, V., Hazey, J., Satoskar, A.R. & Rajagopalan, S. CXCR3 modulates obesity-induced visceral adipose inflammation and systemic insulin resistance. *Obesity (Silver Spring, Md.)* **22**, 1264-1274 (2014).
  92. Berchiche, Y.A. & Sakmar, T.P. CXC Chemokine Receptor 3 Alternative Splice Variants Selectively Activate Different Signaling Pathways. *Molecular pharmacology* **90**, 483-495 (2016).
  93. Aguilera-Durán, G. & Romo-Mancillas, A. Computational Study of C-X-C Chemokine Receptor (CXCR)3 Binding with Its Natural Agonists Chemokine (C-X-C Motif) Ligand (CXCL)9, 10 and 11 and with Synthetic Antagonists: Insights of Receptor Activation towards Drug Design for Vitiligo. **25**, 4413 (2020).
  94. Andrews, S.P. & Cox, R.J. Small Molecule CXCR3 Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **59**, 2894-2917 (2016).
  95. Altara, R., Manca, M., Brandao, R.D., Zeidan, A., Booz, G.W. & Zouein, F.A. Emerging importance of chemokine receptor CXCR3 and its ligands in cardiovascular diseases. *Clinical science (London, England : 1979)* **130**, 463-478 (2016).
  96. Satarkar, D. & Patra, C. Evolution, Expression and Functional Analysis of CXCR3 in Neuronal and Cardiovascular Diseases: A Narrative Review. *Frontiers in cell and developmental biology* **10**, 882017 (2022).
  97. White, G.E., Iqbal, A.J. & Greaves, D.R. CC Chemokine Receptors and Chronic Inflammation—Therapeutic Opportunities and Pharmacological Challenges. **65**, 47-89 (2013).

98. Korbecki, J., Kojder, K., Simińska, D., Bohatyrewicz, R., Gutowska, I., Chlubek, D. & Baranowska-Bosiacka, I. CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of the Ligands of Receptors CCR1, CCR2, CCR3, and CCR4. *International journal of molecular sciences* **21**(2020).
99. Yoshie, O. CCR4 as a Therapeutic Target for Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)* **13**, 5542 (2021).
100. Yoshie, O. & Matsushima, K. CCR4 and its ligands: from bench to bedside. *International immunology* **27**, 11-20 (2015).
101. Liu, Y., Liu, L., Zhou, Y., Zhou, P., Yan, Q., Chen, X., Ding, S. & Zhu, F. CKLF1 Enhances Inflammation-Mediated Carcinogenesis and Prevents Doxorubicin-Induced Apoptosis via IL6/STAT3 Signaling in HCC. *Clinical Cancer Research* **25**, 4141-4154 (2019).
102. Cheng, X., Wu, H., Jin, Z.-J., Ma, D., Yuen, S., Jing, X.-Q., Shi, M.-M., Shen, B.-Y., Peng, C.-H., Zhao, R. & Qiu, W.-H. Up-regulation of chemokine receptor CCR4 is associated with Human Hepatocellular Carcinoma malignant behavior. *Scientific reports* **7**, 12362-12362 (2017).
103. Ou, B., Zhao, J., Guan, S., Feng, H., Wangpu, X., Zhu, C., Zong, Y., Ma, J., Sun, J., Shen, X., Zheng, M. & Lu, A. CCR4 promotes metastasis via ERK/NF- $\kappa$ B/MMP13 pathway and acts downstream of TNF- $\alpha$  in colorectal cancer. *Oncotarget* **7**, 47637-47649 (2016).
104. Van Raemdonck, K., Van den Steen, P.E., Liekens, S., Van Damme, J. & Struyf, S. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine & growth factor reviews* **26**, 311-327 (2015).
105. Crewe, C., An, Y.A. & Scherer, P.E. The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. *The Journal of clinical investigation* **127**, 74-82 (2017).
106. Shen, D. & Cao, X. Potential role of CXCR3 in proliferation and invasion of prostate cancer cells. *International journal of clinical and experimental pathology* **8**, 8091-8098 (2015).
107. Sohn, W., Lee, H.W., Lee, S., Lim, J.H., Lee, M.W., Park, C.H. & Yoon, S.K. Obesity and the risk of primary liver cancer: A systematic review and meta-analysis. *Clin Mol Hepatol* **27**, 157-174 (2021).



108. Wu, X., Zhang, X., Hao, Y. & Li, J. Obesity-related protein biomarkers for predicting breast cancer risk: an overview of systematic reviews. *Breast Cancer* **28**, 25-39 (2021).
109. Sarma, S., Sockalingam, S. & Dash, S. Obesity as a multisystem disease: Trends in obesity rates and obesity-related complications. *Diabetes Obes Metab* **23 Suppl 1**, 3-16 (2021).
110. Ye, Y., Yang, X., Zhao, X., Chen, L., Xie, H., Zeng, Y., Shen, Z., Fan, Z., Liu, Z. & Zhang, S. Serum chemokine CCL17/thymus activation and regulated chemokine is correlated with coronary artery diseases. *Atherosclerosis* **238**, 365-369 (2015).
111. Viridis, A., Colucci, R., Bernardini, N., Blandizzi, C., Taddei, S. & Masi, S. Microvascular Endothelial Dysfunction in Human Obesity: Role of TNF- $\alpha$ . *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **104**, 341-348 (2018).
112. Pedro, T., Martinez-Hervas, S., Tormo, C., Garcia-Garcia, A.B., Saez-Tormo, G., Ascaso, J.F., Chaves, F.J., Carmena, R. & Real, J.T. Oxidative stress and antioxidant enzyme values in lymphomonocytes after an oral unsaturated fat load test in familial hypercholesterolemic subjects. *Transl Res* **161**, 50-56 (2013).
113. Walker, J.M. The bichinchonic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **32**, 5-8 (1994).
114. Ngo, D.T., Farb, M.G., Kikuchi, R., Karki, S., Tiwari, S., Bigornia, S.J., Bates, D.O., LaValley, M.P., Hamburg, N.M., Vita, J.A., Hess, D.T., Walsh, K. & Gokce, N. Antiangiogenic actions of vascular endothelial growth factor-A165b, an inhibitory isoform of vascular endothelial growth factor-A, in human obesity. *Circulation* **130**, 1072-1080 (2014).
115. Hueso, L., Rios-Navarro, C., Ruiz-Sauri, A., Chorro, F.J., Nunez, J., Sanz, M.J., Bodi, V. & Piqueras, L. Dynamics and implications of circulating anti-angiogenic VEGF-A(165)b isoform in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Scientific reports* **7**, 9962 (2017).
116. M., R. Introduction to Flow Citometry. (2014).
117. Flores-Gonzalez, J., Cancino-Díaz, J.C. & Chavez-Galan, L. Flow Cytometry: From Experimental Design to Its Application in the Diagnosis and Monitoring of Respiratory Diseases. **21**, 8830 (2020).

118. Grant, D., Wanner, N., Frimel, M., Erzurum, S. & Asosingh, K. Comprehensive phenotyping of endothelial cells using flow cytometry 2: Human. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **99**, 257-264 (2021).
119. Strieter, R.M., Burdick, M.D., Gomperts, B.N., Belperio, J.A. & Keane, M.P. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 593-609 (2005).
120. Petrai, I., Rombouts, K., Lasagni, L., Annunziato, F., Cosmi, L., Romanelli, R.G., Sagrinati, C., Mazzinghi, B., Pinzani, M., Romagnani, S., Romagnani, P. & Marra, F. Activation of p38(MAPK) mediates the angiostatic effect of the chemokine receptor CXCR3-B. *The international journal of biochemistry & cell biology* **40**, 1764-1774 (2008).
121. Kwaifa, I.K., Bahari, H., Yong, Y.K. & Noor, S.M. Endothelial Dysfunction in Obesity-Induced Inflammation: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Biomolecules* **10**, 291 (2020).
122. Fraccaroli, A., Franco, C.A., Rognoni, E., Neto, F., Rehberg, M., Aszodi, A., Wedlich-Söldner, R., Pohl, U., Gerhardt, H. & Montanez, E. Visualization of endothelial actin cytoskeleton in the mouse retina. *PLoS one* **7**, e47488-e47488 (2012).
123. Zhao, H., Bo, Q., Wang, W., Wang, R., Li, Y., Chen, S., Xia, Y., Wang, W., Wang, Y., Zhu, K., Liu, L., Cui, J., Wang, S., Liu, Q., Wu, Z., Guo, H. & Shi, B. CCL17-CCR4 axis promotes metastasis via ERK/MMP13 pathway in bladder cancer. *J Cell Biochem* (2018).
124. Rasheed, K., Abdulsalam, I., Fismen, S., Grimstad, Ø., Sveinbjørnsson, B. & Moens, U. CCL17/TARC and CCR4 expression in Merkel cell carcinoma. *Oncotarget* **9**, 31432-31447 (2018).
125. Barrachina, M.N., Hermida-Nogueira, L., Moran, L.A., Casas, V., Hicks, S.M., Sueiro, A.M., Di, Y., Andrews, R.K., Watson, S.P., Gardiner, E.E., Abian, J., Carrascal, M., Pardo, M. & García, Á. Phosphoproteomic Analysis of Platelets in Severe Obesity Uncovers Platelet Reactivity and Signaling Pathways Alterations. **41**, 478-490 (2021).
126. Rodríguez, C.P., González, M.C., Aguilar-Salinas, C.A. & Nájera-Medina, O. Peripheral Lymphocytes, Obesity, and Metabolic Syndrome in Young Adults: An Immunometabolism Study. *Metabolic Syndrome and Related Disorders* **16**, 342-349 (2018).

127. Donninelli, G., Del Cornò, M., Pierdominici, M., Scazzocchio, B., Vari, R., Varano, B., Pacella, I., Piconese, S., Barnaba, V., D'Archivio, M., Masella, R., Conti, L. & Gessani, S. Distinct Blood and Visceral Adipose Tissue Regulatory T Cell and Innate Lymphocyte Profiles Characterize Obesity and Colorectal Cancer. *Frontiers in immunology* **8**, 643 (2017).
128. Friedrich, K., Sommer, M., Strobel, S., Thrum, S., Blüher, M., Wagner, U. & Rossol, M. Perturbation of the Monocyte Compar<sup>tm</sup>ent in Human Obesity. **10** (2019).
129. Ye, J. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *International journal of obesity (2005)* **33**, 54-66 (2009).
130. Goossens, G.H., Bizzarri, A., Venteclef, N., Essers, Y., Cleutjens, J.P., Konings, E., Jocken, J.W., Cajlakovic, M., Ribitsch, V., Clement, K. & Blaak, E.E. Increased adipose tissue oxygen tension in obese compared with lean men is accompanied by insulin resistance, impaired adipose tissue capillarization, and inflammation. *Circulation* **124**, 67-76 (2011).
131. Booth, A., Magnuson, A. & Foster, M. Detrimental and protective fat: body fat distribution and its relation to metabolic disease. *Hormone molecular biology and clinical investigation* **17**, 13-27 (2014).
132. Mathieu, P., Boulanger, M.C. & Despres, J.P. Ectopic visceral fat: a clinical and molecular perspective on the cardiometabolic risk. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* **15**, 289-298 (2014).
133. Yoo, H.J. & Choi, K.M. Adipokines as a novel link between obesity and atherosclerosis. *World J Diabetes* **5**, 357-363 (2014).
134. Kluge, H.H.P. WHO European Regional Obesity Report 2022. (2022).
135. Boutari, C. & Mantzoros, C.S. A 2022 update on the epidemiology of obesity and a call to action: as its twin COVID-19 pandemic appears to be receding, the obesity and dysmetabolism pandemic continues to rage on. *Metabolism: clinical and experimental*, 155217 (2022).
136. Hernández, Á., Zomeño, M.D., Dégano, I.R., Pérez-Fernández, S., Goday, A., Vila, J., Civeira, F., Moure, R. & Marrugat, J. Excess Weight in Spain: Current Situation, Projections for 2030, and Estimated Direct Extra Cost for the Spanish Health System. *Revista española de cardiología (English ed.)* **72**, 916-924 (2019).

137. Arteaga-González, I.J., Martín-Malagón, A.I., Ruiz de Adana, J.C., de la Cruz Vigo, F., Torres-García, A.J. & Carrillo-Pallares, A.C. Bariatric Surgery Waiting Lists in Spain. *Obesity surgery* **28**, 3992-3996 (2018).
138. Sun, K., Wernstedt Asterholm, I., Kusminski, C.M., Bueno, A.C., Wang, Z.V., Pollard, J.W., Brekken, R.A. & Scherer, P.E. Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 5874-5879 (2012).
139. Altara, R., Manca, M., Brandao, R.D., Zeidan, A., Booz, G.W. & Zouein, F.A. Emerging importance of chemokine receptor CXCR3 and its ligands in cardiovascular diseases. *BioFactors (Oxford, England)* **130**, 463-478 (2016).
140. Kameda, M., Otsuka, M., Chiba, H., Kuronuma, K., Hasegawa, T., Takahashi, H. & Takahashi, H. CXCL9, CXCL10, and CXCL11; biomarkers of pulmonary inflammation associated with autoimmunity in patients with collagen vascular diseases—associated interstitial lung disease and interstitial pneumonia with autoimmune features. *PLOS ONE* **15**, e0241719 (2020).
141. Crescioli, C., Corinaldesi, C., Riccieri, V., Raparelli, V., Vasile, M., Del Galdo, F., Valesini, G., Lenzi, A., Basili, S. & Antinozzi, C. Association of circulating CXCL10 and CXCL11 with systemic sclerosis. **77**, 1845-1846 (2018).
142. Kochumon, S., Al-Rashed, F., Abu-Farha, M., Devarajan, S., Tuomilehto, J. & Ahmad, R. Adipose tissue expression of CCL19 chemokine is positively associated with insulin resistance. *Diabetes/metabolism research and reviews* **35**, e3087 (2019).
143. Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A. & Chen, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* **112**, 1821-1830 (2003).
144. Schulthess, F.T., Paroni, F., Sauter, N.S., Shu, L., Ribaux, P., Haataja, L., Strieter, R.M., Oberholzer, J., King, C.C. & Maedler, K. CXCL10 impairs beta cell function and viability in diabetes through TLR4 signaling. *Cell metabolism* **9**, 125-139 (2009).
145. Burke, S.J., Karlstad, M.D., Eder, A.E., Regal, K.M., Lu, D., Burk, D.H. & Collier, J.J. Pancreatic beta-Cell production of CXCR3 ligands precedes diabetes onset. **42**, 703-715 (2016).

146. Rocha, V.Z., Folco, E.J., Ozdemir, C., Sheikine, Y., Christen, T., Sukhova, G.K., Tang, E.H., Bittencourt, M.S., Santos, R.D., Luster, A.D., Cohen, D.E. & Libby, P. CXCR3 controls T-cell accumulation in fat inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **34**, 1374-1381 (2014).
147. Keeley, E.C., Moorman, J.R., Liu, L., Gimple, L.W., Lipson, L.C., Ragosta, M., Taylor, A.M., Lake, D.E., Burdick, M.D., Mehrad, B. & Strieter, R.M. Plasma chemokine levels are associated with the presence and extent of angiographic coronary collaterals in chronic ischemic heart disease. *PLoS One* **6**, e21174 (2011).
148. Youn, J.C., Yu, H.T., Lim, B.J., Koh, M.J., Lee, J., Chang, D.Y., Choi, Y.S., Lee, S.H., Kang, S.M., Jang, Y., Yoo, O.J., Shin, E.C. & Park, S. Immunosenescent CD8+ T cells and C-X-C chemokine receptor type 3 chemokines are increased in human hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* **62**, 126-133 (2013).
149. Altara, R., Manca, M., Hessel, M.H., Gu, Y., van Vark, L.C., Akkerhuis, K.M., Staessen, J.A., Struijker-Boudier, H.A., Booz, G.W. & Blankesteyn, W.M. CXCL10 Is a Circulating Inflammatory Marker in Patients with Advanced Heart Failure: a Pilot Study. *J Cardiovasc Transl Res* **9**, 302-314 (2016).
150. Chan, P.C. & Hsieh, P.S. The Chemokine Systems at the Crossroads of Inflammation and Energy Metabolism in the Development of Obesity. *International journal of molecular sciences* **22**(2021).
151. Balan, M. & Pal, S. A novel CXCR3-B chemokine receptor-induced growth-inhibitory signal in cancer cells is mediated through the regulation of Bach-1 protein and Nrf2 protein nuclear translocation. *The Journal of biological chemistry* **289**, 3126-3137 (2014).
152. Hu, M., Li, K., Maskey, N., Xu, Z., Yu, F., Peng, C., Li, Y. & Yang, G. Overexpression of the chemokine receptor CXCR3 and its correlation with favorable prognosis in gastric cancer. *Human pathology* **46**, 1872-1880 (2015).
153. Lasagni, L., Francalanci, M., Annunziato, F., Lazzeri, E., Giannini, S., Cosmi, L., Sagrinati, C., Mazzinghi, B., Orlando, C., Maggi, E., Marra, F., Romagnani, S., Serio, M. & Romagnani, P. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med* **197**, 1537-1549 (2003).

154. Bodnar, R.J., Rodgers, M.E., Chen, W.C. & Wells, A. Pericyte regulation of vascular remodeling through the CXC receptor 3. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **33**, 2818-2829 (2013).
155. Sanz, M.J., Albertos, F., Otero, E., Juez, M., Morcillo, E.J. & Piqueras, L. Retinoid X receptor agonists impair arterial mononuclear cell recruitment through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **189**, 411-424 (2012).
156. Zarubin, T. & Han, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell research* **15**, 11-18 (2005).
157. Martorell, S., Hueso, L., Gonzalez-Navarro, H., Collado, A., Sanz, M.J. & Piqueras, L. Vitamin D Receptor Activation Reduces Angiotensin-II-Induced Dissecting Abdominal Aortic Aneurysm in Apolipoprotein E-Knockout Mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **36**, 1587-1597 (2016).
158. Hueso, L., Rios-Navarro, C., Ruiz-Sauri, A., Chorro, F.J., Nunez, J., Sanz, M.J., Bodi, V. & Piqueras, L. Dynamics and implications of circulating anti-angiogenic VEGF-A165b isoform in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Scientific reports* **7**, 9962 (2017).
159. Ohta, T., Eguchi, R., Suzuki, A., Miyakaze, S., Ayuzawa, R. & Kaji, K. Hypoxia-induced apoptosis and tube breakdown are regulated by p38 MAPK but not by caspase cascade in an in vitro capillary model composed of human endothelial cells. *Journal of cellular physiology* **211**, 673-681 (2007).
160. Safa, A., Rashidinejad, H.R., Khalili, M., Dabiri, S., Nemati, M., Mohammadi, M.M. & Jafarzadeh, A. Higher circulating levels of chemokines CXCL10, CCL20 and CCL22 in patients with ischemic heart disease. *Cytokine* **83**, 147-157 (2016).
161. Heiseke, A.F., Faul, A.C., Lehr, H.A., Förster, I., Schmid, R.M., Krug, A.B. & Reindl, W. CCL17 promotes intestinal inflammation in mice and counteracts regulatory T cell-mediated protection from colitis. *Gastroenterology* **142**, 335-345 (2012).
162. Stutte, S., Quast, T., Gerbitzki, N., Savinko, T., Novak, N., Reifenberger, J., Homey, B., Kolanus, W., Alenius, H. & Förster, I. Requirement of CCL17 for CCR7- and CXCR4-dependent migration of cutaneous dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8736-8741 (2010).

163. Weber, C., Meiler, S., Döring, Y., Koch, M., Drechsler, M., Megens, R.T., Rowinska, Z., Bidzhekov, K., Fecher, C., Ribechini, E., van Zandvoort, M.A., Binder, C.J., Jelinek, I., Hristov, M., Boon, L., Jung, S., Korn, T., Lutz, M.B., Förster, I., Zenke, M., Hieronymus, T., Junt, T. & Zernecke, A. CCL17-expressing dendritic cells drive atherosclerosis by restraining regulatory T cell homeostasis in mice. *J Clin Invest* **121**, 2898-2910 (2011).
164. Golledge, J., Clancy, P., Moran, C., Biros, E., Rush, C., Walker, P. & Norman, P. The novel association of the chemokine CCL22 with abdominal aortic aneurysm. *Am J Pathol* **176**, 2098-2106 (2010).
165. Jafarzadeh, A., Fooladseresht, H., Minaee, K., Bazrafshani, M.R., Khosravimashizi, A., Nemati, M., Mohammadizadeh, M., Mohammadi, M.M. & Ghaderi, A. Higher circulating levels of chemokine CCL22 in patients with breast cancer: evaluation of the influences of tumor stage and chemokine gene polymorphism. *Tumor Biology* **36**, 1163-1171 (2015).
166. Kimura, S., Wang, K.Y., Yamada, S., Guo, X., Nabeshima, A., Noguchi, H., Watanabe, T., Harada, M. & Sasaguri, Y. CCL22/Macrophage-derived Chemokine Expression in Apolipoprotein E-deficient Mice and Effects of Histamine in the Setting of Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* **22**, 599-609 (2015).
167. Karpov, A., Rvacheva, A., Shogenova, M., Merova, R., Naumov, V. & Valerij, M. Association between blood levels of CCR4 expressing T-helper cells, chemokine CCL17 and severity of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* **263**, e116 (2017).
168. Ye, Y., Yang, X., Zhao, X., Chen, L., Xie, H., Zeng, Y., Shen, Z., Fan, Z., Liu, Z. & Zhang, S. Serum chemokine CCL17/thymus activation and regulated chemokine is correlated with coronary artery diseases. *Atherosclerosis* **238**, 365-369 (2015).
169. Weber, C., Meiler, S., Döring, Y., Koch, M., Drechsler, M., Megens, R.T.A., Rowinska, Z., Bidzhekov, K., Fecher, C., Ribechini, E., van Zandvoort, M.A.M.J., Binder, C.J., Jelinek, I., Hristov, M., Boon, L., Jung, S., Korn, T., Lutz, M.B., Förster, I., Zenke, M., Hieronymus, T., Junt, T. & Zernecke, A. CCL17-expressing dendritic cells drive atherosclerosis by restraining regulatory T cell homeostasis in mice. *The Journal of clinical investigation* **121**, 2898-2910 (2011).

170. Zhang, Y., Ye, Y., Tang, X., Wang, H., Tanaka, T., Tian, R., Yang, X., Wang, L., Xiao, Y., Hu, X., Jin, Y., Pang, H., Du, T., Liu, H., Sun, L., Xiao, S., Dong, R., Ferrucci, L., Tian, Z. & Zhang, S. CCL17 acts as a novel therapeutic target in pathological cardiac hypertrophy and heart failure. *The Journal of experimental medicine* **219**(2022).
171. Feng, G., Bajpai, G., Ma, P., Koenig, A., Bredemeyer, A., Lokshina, I., Lai, L., Förster, I., Leuschner, F., Kreisel, D. & Lavine, K.J. CCL17 Aggravates Myocardial Injury by Suppressing Recruitment of Regulatory T Cells. *Circulation* **145**, 765-782 (2022).
172. Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G.A., Beguinot, F. & Miele, C. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci* **20**, 2358 (2019).
173. Kim, S.H., Cleary, M.M., Fox, H.S., Chantry, D. & Sarvetnick, N. CCR4-bearing T cells participate in autoimmune diabetes. *The Journal of clinical investigation* **110**, 1675-1686 (2002).
174. Fuster, J.J., Ouchi, N., Gokce, N. & Walsh, K. Obesity-Induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. *Circ Res* **118**, 1786-1807 (2016).
175. Zuriaga, M.A., Fuster, J.J., Gokce, N. & Walsh, K. Humans and Mice Display Opposing Patterns of “Browning” Gene Expression in Visceral and Subcutaneous White Adipose Tissue Depots. *Front Cardiovasc Med* **4**, 27 (2017).
176. Tran, T.T., Yamamoto, Y., Gesta, S. & Kahn, C.R. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab* **7**, 410-420 (2008).
177. Landmesser, U., Hornig, B. & Drexler, H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* **109**, li27-33 (2004).
178. Gregor, M.F. & Hotamisligil, G.S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual review of immunology* **29**, 415-445 (2011).
179. Trayhurn, P. Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity. **93**, 1-21 (2013).
180. Csige, I., Ujvárosy, D., Szabó, Z., Lőrincz, I., Paragh, G., Harangi, M. & Somodi, S. The Impact of Obesity on the Cardiovascular System. *Journal of Diabetes Research* **2018**, 3407306 (2018).



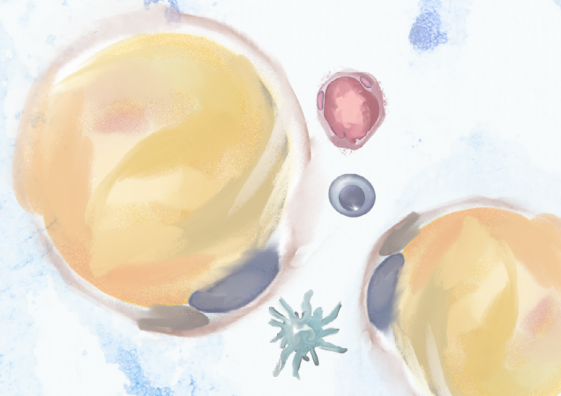
181. Hueso, L., Ortega, R., Selles, F., Wu-Xiong, N.Y., Ortega, J., Civera, M., Ascaso, J.F., Sanz, M.J., Real, J.T. & Piqueras, L. Upregulation of angiostatic chemokines IP-10/CXCL10 and I-TAC/CXCL11 in human obesity and their implication for adipose tissue angiogenesis. *International journal of obesity (2005)* **42**, 1406-1417 (2018).
182. Abraham, S., Yeo, M., Montero-Balaguer, M., Paterson, H., Dejana, E., Marshall, C.J. & Mavria, G. VE-Cadherin-mediated cell-cell interaction suppresses sprouting via signaling to MLC2 phosphorylation. *Current biology : CB* **19**, 668-674 (2009).
183. Liu, L.B., Xie, F., Chang, K.K., Shang, W.Q., Meng, Y.H., Yu, J.J., Li, H., Sun, Q., Yuan, M.M., Jin, L.P., Li, D.J. & Li, M.Q. Chemokine CCL17 induced by hypoxia promotes the proliferation of cervical cancer cell. *Am J Cancer Res* **5**, 3072-3084 (2015).
184. Al-haidari, A.A., Syk, I., Jirström, K. & Thorlacius, H. CCR4 mediates CCL17 (TARC)-induced migration of human colon cancer cells via RhoA/Rho-kinase signaling. *Int J Colorectal Dis* **28**, 1479-1487 (2013).
185. Yeung, O.W.H., Lo, C.-M., Ling, C.-C., Qi, X., Geng, W., Li, C.-X., Ng, K.T.P., Forbes, S.J., Guan, X.-Y., Poon, R.T.P., Fan, S.-T. & Man, K. Alternatively activated (M2) macrophages promote tumour growth and invasiveness in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* **62**, 607-616 (2015).
186. Carlson, C.J., Koterski, S., Sciotti, R.J., Pocard, G.B. & Rondinone, C.M. Enhanced Basal Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases in Adipocytes From Type 2 Diabetes. *Potential Role of p38 in the Downregulation of GLUT4 Expression* **52**, 634-641 (2003).
187. Purdy, J.C. & Shatzel, J.J. The hematologic consequences of obesity. *European journal of haematology* **106**, 306-319 (2021).
188. Vera, R.H., Vilahur, G. & Badimon, L. Obesity with insulin resistance increase thrombosis in wild-type and bone marrow-transplanted Zucker fatty rats. *Thrombosis and haemostasis* **109**, 319-327 (2013).
189. Samocho-Bonet, D., Justo, D., Rogowski, O., Saar, N., Abu-Abeid, S., Shenkerman, G., Shapira, I., Berliner, S. & Tomer, A. Platelet Counts and Platelet Activation Markers in Obese Subjects. *Mediators of inflammation* **2008**, 834153 (2008).

190. Santilli, F., Vazzana, N., Liani, R., Guagnano, M.T. & Davì, G. Platelet activation in obesity and metabolic syndrome. **13**, 27-42 (2012).
191. Schneider, D.J., Hardison, R.M., Lopes, N., Sobel, B.E. & Brooks, M.M. Association between increased platelet P-selectin expression and obesity in patients with type 2 diabetes: a BARI 2D (Bypass Angioplasty Revascularization Investigation 2 Diabetes) substudy. *Diabetes care* **32**, 944-949 (2009).
192. van der Weerd, K., Dik, W.A., Schrijver, B., Schweitzer, D.H., Langerak, A.W., Drexhage, H.A., Kiewiet, R.M., van Aken, M.O., van Huisstede, A., van Dongen, J.J., van der Lelij, A.J., Staal, F.J. & van Hagen, P.M. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4+ T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype. *Diabetes* **61**, 401-408 (2012).
193. Chng, M.H.Y., Alonso, M.N., Barnes, S.E., Nguyen, K.D. & Engleman, E.G. Adaptive Immunity and Antigen-Specific Activation in Obesity-Associated Insulin Resistance. *Mediators of inflammation* **2015**, 593075 (2015).
194. Ip, B.C., Hogan, A.E. & Nikolajczyk, B.S. Lymphocyte roles in metabolic dysfunction: of men and mice. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **26**, 91-100 (2015).
195. Viardot, A., Heilbronn, L.K., Samocha-Bonet, D., Mackay, F., Campbell, L.V. & Samaras, K. Obesity is associated with activated and insulin resistant immune cells. *Diabetes/metabolism research and reviews* **28**, 447-454 (2012).
196. McLaughlin, T., Liu, L.F., Lamendola, C., Shen, L., Morton, J., Rivas, H., Winer, D., Tolentino, L., Choi, O., Zhang, H., Hui Yen Chng, M. & Engleman, E. T-cell profile in adipose tissue is associated with insulin resistance and systemic inflammation in humans. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **34**, 2637-2643 (2014).
197. Jagannathan-Bogdan, M., McDonnell, M.E., Shin, H., Rehman, Q., Hasturk, H., Apovian, C.M. & Nikolajczyk, B.S. Elevated Proinflammatory Cytokine Production by a Skewed T Cell Compartment Requires Monocytes and Promotes Inflammation in Type 2 Diabetes. **186**, 1162-1172 (2011).
198. Kullo, I.J., Hensrud, D.D. & Allison, T.G. Comparison of numbers of circulating blood monocytes in men grouped by body mass index (<25, 25 to <30, > or =30). *The American journal of cardiology* **89**, 1441-1443 (2002).

199. Rogacev, K.S., Ulrich, C., Blömer, L., Hornof, F., Oster, K., Ziegelin, M., Cremers, B., Grenner, Y., Geisel, J., Schlitt, A., Köhler, H., Fliser, D., Girndt, M. & Heine, G.H. Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *European heart journal* **31**, 369-376 (2010).
200. Pecht, T., Gu<sup>tm</sup>an-Tirosh, A., Bashan, N. & Rudich, A. Peripheral blood leucocyte subclasses as potential biomarkers of adipose tissue inflammation and obesity subphenotypes in humans. **15**, 322-337 (2014).



# ANEXO





## A1. Listado e histórico de tratamientos para la obesidad

Tabla A1. Histórico de tratamientos para la obesidad<sup>16</sup>

Fármaco	Compañía	Aprobación	Efectos secundarios
<b>Desacoplador mitocondrial</b>			
DNP	Universidad de stanford	Stanford 1933-1938 (ee. Uu.)	Hipertermia, taquicardia, fiebre, taquipnea, muerte
<b>Simpaticomimético</b>			
Dietilpropión/afepriamo	Merrell National Drug	1959–present (EU)	Náuseas, estreñimiento, insomnio, dolor de cabeza, tensión e irritación, convulsiones
Metanfetamina	Laboratorios Abbott	1947-1979 (EE. UU.)	Alto riesgo de abuso y adicción
Fenmetrazina	Ciba- Geigy Corp	1956-presente (EE. UU.)	Náuseas, diarrea, boca seca
Fendimetrazina	Carnick Laboratories	1959–presente (EE.UU.)	Náuseas, diarrea, boca seca
Fenilpropranolamina	Thompson Medical	1960–2000 (EE. UU.)	Accidente cerebrovascular hemorrágico
Fenfluramina y dexfenfluramina	Wyeth Ayerst	1973–1997 (EE. UU.)	Insuficiencia valvular cardíaca, hipertensión pulmonar
Catina (nor-pseudoefedrina) (53,3 mg, OD, oral)	Riemser Pharma	1975-presente (UE, solo para uso a corto plazo)	Taquicardia, aumento de la presión arterial, inquietud, trastornos del sueño, depresión
Sibutramina (10 mg, OD)	Laboratorios Abbott	1997–2010 (EE. UU., UE)	Infarto de miocardio no fatal y accidente cerebrovascular (en personas con ECV pre-existente)
Fentermina (15–30 mg, OD, oral)	Teva Pharmaceuticals	1959-presente (EE. UU., solo para uso a corto plazo)	Palpitaciones, presión arterial elevada

Fármaco	Compañía	Aprobación	Efectos secundarios
<b>Polifarmacia</b>			
Pastillas Rainbow	Clark & Clark	1961-1968 (EE.UU.)	Insomnio, palpitaciones, ansiedad, aumento de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial, muerte
<b>Bloqueador del receptor CB1</b>			
Rimonabant (20 mg, una vez al día)	Sanofi SA	2006-2009 (UE)	Depresión, ideación suicida
<b>Inhibidor de la lipasa pancreática</b>			
Orlistat (120 mg TID, oral)	Roche Pharmaceuticals	1999-presente (EE. UU., UE)	Lesión hepática, síntomas, gastrointestinales
<b>Agonista de serotonina 5-HT2C</b>			
Lorcaserina (10 mg, BID, oral)	Arena Pharmaceuticals, Eisai	2012-2020 (EE. UU.)	Depresión, ideación suicida, palpitaciones, síntomas gastrointestinales, mayor riesgo de cáncer
<b>Simpaticomimético/ anticonvulsivo</b>			
Fentermina/topiramato ER (15 mg/92 mg, OD, oral)	Vivus	2012-presente (EE. UU.)	Depresión, ideación suicida, eventos cardiovasculares, pérdida de memoria, defectos de nacimiento
<b>Antagonistas de los receptores opioides/ inhibidor de la recaptación de dopamina y noradrenalina</b>			
Naltrexona SR/bupropión SR (con titulación) (32 mg/360 mg, BID, oral)	Orexigen Therapeutics Inc.	2014-presente (EE. UU., UE)	Convulsiones, palpitaciones, elevaciones transitorias de la presión arterial
<b>Agonistas de GLP1R</b>			
Liraglutida (3,0 mg, OD, inyección subcutánea)	Novo Nordisk	2014-presente (EE. UU., UE)	Náuseas/vómitos, diarrea, estreñimiento, pancreatitis, cálculos biliares
Semaglutida (2,4 mg, una vez por semana, inyección subcutánea)	Novo Nordisk	2021 (EE. UU)	Náuseas/vómitos, diarrea, estreñimiento

*CB1, receptor cannabinoide 1; ECV, enfermedad cardiovascular; DNP, 2,4-dinitrofenol; ER, liberación prolongada; GLP1R, receptor del péptido 1 similar al glucagón; RS, liberación sostenida; TID, tres veces al día; OD, una vez al día, BID, dos veces al día.*



## A2. Listado de fármacos anti-obesidad en ensayo clínico

**Tabla A2.** Listado de fármacos anti-obesidad en ensayo clínico<sup>16</sup>

Fármaco	Compañía	Etapas de desarrollo	Indicación
<b>Agonistas duales de GLP1/ glucagón</b>			
Cotadutida (MEDI0382)	AstraZeneca	Fase II	DMT2, EHNA
Bi 456906	Boehringer Ingelheim	Fase II	Obesidad, DMT2
Efinopegdutida (LAPSGLP/GCG)	Hanmi Pharmaceutical	Fase II	EHNA
Oxm	Eli Lilly	Fase I	DMT2
<b>Agonistas duales GIP/ GLP1</b>			
Tirepatida	Eli Lilly	Fase III	Obesidad, DMT2
GIP/GLP péptido I	Eli Lilly	Fase I	DMT2
Péptido II de GIP/GLP	Eli Lilly	Fase I	DMT2
Nn9709	Novo Nordisk	Interrumpido	Obesidad, T2D
<b>Triagonistas GIP/ GLP1/ glucagón</b>			
HM15211 (lapstriple agonista)	Hanmi Pharmaceutical	Fase II	EHNA
Triagonista de GGG	Eli Lilly	Fase I	DMT2
Nn9423	Novo Nordisk	Interrumpido	Obesidad, T2D
<b>Agonistas de GIPR</b>			
Agonista de GIPR de acción prolongada	Eli Lilly	Fase I	DMT2
Zp 6590	Zealand Pharma	Preclínico	Obesidad
<b>Agonistas de GLP1R</b>			
Efpeglenatida (análogo lapsexid4)	Hanmi Pharmaceutical	Fase III	DMT2
Rybelso	Novo Nordisk	Fase III	Obesidad
Danulipron (PF-06882961)	Pfizer	Fase II	Obesidad, DMT2
Glp1r-npa	Eli Lilly	Fase I	DMT2
Pf-07081532	Pfizer	Fase I	DMT2
<b>Análogo de glucagón</b>			
HM15136	Hanmi Pharmaceutical	Fase I	Obesidad

Fármaco	Compañía	Etapas de desarrollo	Indicación
<b>Sensibilizantes de leptina</b>			
Withaferina A	Académico, no comercial	Fase I	Obesidad, DMT2
Celastrol	Académico, no comercial	Preclínico	Obesidad, DMT2
Leptina/amilina	Amylin Pharmaceuticals	Interrumpido	Obesidad, T2D
<b>Agonistas Y2R</b>			
Analógico PYY	Eli Lilly	Fase I	DMT2
Nn9748 (nn9747)	Novo Nordisk	Fase I	Obesidad, DMT2
NNC0165-1875+semaglutida	Novo Nordisk	Fase II	Obesidad, DMT2
<b>Agonistas duales de amilina/ calcitonina</b>			
Kbp-089	Nordic Biosciences	Fase I	DMT2
Kbp-042	Nordic Biosciences	Interrumpido	DMT2
Davalintida	Amylin Pharmaceuticals	Interrumpido	Obesidad, T2D
<b>Análogos de amilina</b>			
Cagrilintida	Novo Nordisk	Fase II	Obesidad, DMT2
Zp 8396	Zealand Pharma	Preclínico	Obesidad
<b>Fármacos dirigidos a la vía de la grelina</b>			
CYT009-ghrbq	Cytos Biotechnology	Fase I	Obesidad
Nox-B11	Noxxon Pharma	Preclínico	Obesidad
Azp-531	Millendo Therapeutics SAS	Interrumpido	Síndrome de Prader willi
<b>Desacoplador mitocondrial</b>			
Bam15	Continuum Biosciences	Preclínico	Obesidad, EHNA
<b>Otros supresores del apetito</b>			
Gdf15 (la-gfd15)	Novo Nordisk	Fase I	Obesidad
LY-3463251 (agonista de GDF15)	Lilly	Fase I	DMT2, obesidad
JNJ-9090/CIN-109 (agonista de GDF15)	Jansenn/CinFina Pharma	Fase I	Obesidad

*GDF15, factor de diferenciación de crecimiento 15; GIP, polipéptido inhibidor gástrico; GLP1, péptido similar al glucagón tipo 1; GLP1R, receptor de GLP1; NA, no aplicable; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica; OXM, oxintomodulina; PYY, péptido tirosina tirosina; DT2, diabetes tipo 2; Y2R, receptor de neuropéptido Y tipo 2.*