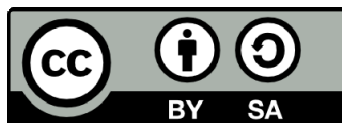




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Obesitat severa i ateroesclosi subclínica: biologia molecular, marcadors i efecte de la cirurgia bariàtrica

Júlia Carmona Maurici



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartitqual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartitqual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License.**



**OBESITAT SEVERA
I ATEROESCLEROSI SUBCLÍNICA:**

**Biologia molecular, marcadors
i efecte de la cirurgia bariàtrica**

Júlia Carmona Maurici

Barcelona, 2022





UNIVERSITAT DE
BARCELONA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOMEDICINA MOLECULAR

FACULTAT DE BIOLOGIA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

**OBESITAT SEVERA I ATEROESCLEROSI SUBCLÍNICA:
BIOLOGIA MOLECULAR, MARCADORS I EFECTE DE LA
CIRURGIA BARIÀTRICA**

Memòria presentada per:

JÚLIA CARMONA MAURICI

per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Aquesta tesi s'ha inscrit dins del programa de doctorat de Biomedicina del
Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular, Facultat de Biologia, de la
Universitat de Barcelona.

La interessada

Vist i plau de la
directora

Vist i plau de la tutora

Júlia Carmona
Maurici

Dra. Eva Pardina
Arrese

Dra. Maria Dolores
López Tejero

Dept. Bioquímica i
Biomedicina
Molecular

Dept. Bioquímica i
Biomedicina
Molecular

Facultat de Biologia

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona

Barcelona, 2022

AGRAÏMENTS

He tingut la sort de fer la tesi rodejada de persones que cada vegada que tenen discussions científiques, em fan pensar: jo "de gran" vull ser com ells. Moltes gràcies a tots els companys de laboratori pel bon ambient dia a dia.

M'agradaria començant amb un agraïment molt especial a l'Eva. Ella m'ho ha ensenyat tot des del primer cop que vaig trepitjar un laboratori i no sabia ni com agafar una pipeta. Gràcies per la teva ajuda incondicional i per acompanyar-me en tot aquest camí. També vull dedicar un gran agraïment al David, per fer de no-director, i per ensenyar-me el pensament crític, crec que mai deixaré d'aprendre de vosaltres. A la Dolores, a qui a més d'agraïment per tutoritzar la tesi, li tinc una gran admiració per tot el coneixement que té i com el transmet. A la Julia, per encomanar-me la passió per aquest projecte i animar-me a fer la tesi, i tota l'ajuda que m'ha regalat. També vull donar les gràcies a l'Anna, per la seva disposició sempre a ajudar en el que calgui. I a la Joana, per totes les estones i per compartir amb mi les seves experiències i consells sobre la tesi.

No puc deixar d'agrair als col·laboradors de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova. A les companyes de l'UDETMA, Teresa Vidal, Virtudes Maria i Àngels Betriu, per aportar la seva expertesa en les tècniques d'imatge. Al Dr. Baena i a l'Elena Cuello, per la feina a primera línia a l'hospital i el bon seguiments dels pacients.

Gràcies també a, l'Araceli, la Nora i la Natalia, per la determinació dels polimorfismes, per l'ajuda amb la interpretació genètica, i pels projectes que puguin venir.

Aquest treball tampoc hagués estat possible sense el Dr. Antoni Miñarro, a qui vull agrair els seus consells i la gran ajuda amb les anàlisis estadístiques.

Hi ha persones que no han participat directament al treball, però sense elles aquesta tesi no hagués estat possible. Vull donar les gràcies als meus amics, perquè malgrat estar desapareguda i tots els "no puc, tinc feina" m'han animat i recolzat com els que més, *merci* per carregar-me les piles quan calia.

Al meu pare, per l'ajuda amb els problemes tècnics de maquetació i per tot el suport, i a l'Alba, per fer-me desconnectar amb alegria i somriures.

A la meva mare i a la Marina, perquè són els meus puntals i sempre les he sentit a prop, sense elles no hagués ni començat la tesi.

I, per últim, vull donar les gràcies al Rafel. Per tot, per il·lusionar-te amb mi amb cada petit pas i per fer-me costat en els moments difícils durant tots aquests anys.

Mil gràcies a tots!

ABSTRACT

The worldwide prevalence of obesity has risen dramatically. Severe obesity (SE) is characterized by an accumulation of fat and increases the predisposition to comorbidities such as type 2 diabetes mellitus (T2DM), dyslipidemia (DLP) and hypertension. Obesity is also a risk factor for several of the world's leading causes of death, including cardiovascular diseases. Bariatric surgery (BS) is the most effective treatment for SE.

Atherosclerosis is a chronic progressive disease with a long asymptomatic phase during which an atheroma forms. Usually, because of its long silent subclinical phase, atherosclerosis it is not diagnosed until an acute event occurs.

Therefore, the aims of this study were, firstly, to evaluate the differences between subjects with and without plaques and the mechanisms underlying subclinical atherosclerosis in SE. Secondly to evaluate the effect of BS in subclinical atherosclerosis and cardiovascular risk. And finally, to assess the utility of circulating parameters as a biomarkers of subclinical atherosclerosis in subjects with SE.

Plasma samples from 66 subjects with SE were obtained before BS and 6 and 12 months after. This cohort was divided into two groups based on the presence of atheromatous plaques (detected by ultrasound imaging).

A plethora of mechanisms, including abnormalities in lipid metabolism, insulin resistance, inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction, have been observed in SE, especially in subjects with plaque. Endothelial dysfunction was characterized by impaired angiogenesis, vascular function and diapedesis.

After BS, most of the atherogenicity parameters decreased, including inflammation and oxidative stress, although the prognosis is better for patients without plaque. BS reduces the likelihood of new plaque formation or a change in existing plaque to a risk status.

We found 26 parameters which may have a critical role in plaque development and might be useful in assessing early atherosclerosis and its evolution after BS. We developed a multi-marker risk prediction model, incorporating traditional risk factors and multiple biomarkers simultaneously. Between those, DLP, T2D, Hba1c, glucose levels and TM have a 97% prediction capacity for the presence of atheromatous plaque.

Índex general

Índex de figures	VIII
Índex de taules	IX
Abreviatures	X
1. INTRODUCCIÓ.....	1
1.1. Obesitat	3
1.1.1. Classificació de l'obesitat	3
1.1.2. Epidemiologia de l'obesitat.....	4
1.1.3. Tractament de l'obesitat	6
1.1.4. El teixit adipós	9
El teixit adipós blanc.....	12
El teixit adipós beix.....	13
El teixit adipós marró	13
1.1.5. Comorbiditats associades.....	14
Hipertensió arterial	15
Dislipèmia	15
Diabetis mellitus tipus 2	20
1.2. Malalties cardiovasculars: aterosclerosi	22
1.2.1. Epidemiologia de les malalties cardiovasculars	22
1.2.2. Tractament de l'aterosclerosi	24
1.2.3. Factors de risc cardiovascular	25
Edat	25
Sexe	25
Hipertensió.....	26
Diabetis mellitus tipus 2	26
Dislipèmia.....	27
Obesitat	28
1.2.4. El sistema cardiovascular: vasos sanguinis i endoteli vascular	29
1.2.5. Patogènesi de l'aterosclerosi	33
Disfunció endotelial com a etapa inicial de l'aterogènesi.....	33
Procés de formació de la placa	37
1.2.6. Biologia molecular de l'aterosclerosi: processos implicats i possibles marcadors.....	40
Estrès oxidatiu	40
Inflamació.....	43

MicroRNA	48
Irisina	50
Perfil lipoproteic.....	51
2. OBJECTIUS	53
3. INFORME DE LA DIRECTORA DE TESI DEL FACTOR D'IMPACTE.....	57
4. PUBLICACIONS.....	61
4.1 Article 1: aterosclerosi subclínica i obesitat severa, funció endotelial mecànica	63
4.2 Article 2: inflamació i funció endotelial	75
4.3 Article 3: estrès oxidatiu.....	87
4.4 Article 4: glicoproteïnes (preparat per enviar).....	97
4.5 Article 5: microRNA (preparat per enviar)	119
4.6 Article 6: irisina (en revisió pels editors)	143
5. RESUM DE RESULTATS	163
5.1 Obesitat severa i característiques de la població d'estudi.....	166
5.1.1 Comorbiditats.....	168
5.2 Anàlisi de la funció endotelial	170
5.3 Anàlisi molecular de l'aterosclerosi	172
5.3.1 Estrès oxidatiu	172
5.3.2 Inflamació.....	175
5.3.3 miRNA.....	178
5.3.4 Irisina	179
5.3.5 Perfil lipoproteic.....	179
5.4 Biomarcadors i models predictius per la presència de placa.....	185
5.4.1 Model predictiu amb totes les variables estudiades	186
5.4.2 Model predictiu amb els nous biomarcadors	188
6. DISCUSSIÓ	191
6.1 L'obesitat severa com a factor de risc ateroscleròtic	194
6.1.1 L'obesitat s'acompanya de comorbiditats i la BS n'atenua el risc cardiovascular associat.....	194
6.1.2 L'obesitat severa es caracteritza per inflamació crònica de baix grau, que disminueix amb la BS.....	195
6.1.3 L'obesitat severa està associada a l'estrès oxidatiu, que disminueix amb la BS.....	196
6.1.4 Interaccions entre inflamació i OS en l'obesitat: el cercle viciós	198
6.2 El procés ateromatós durant l'obesitat severa	199
6.2.1 A l'inici, els estímuls mecànics promouen les lesions primerenques a l'endoteli vascular.....	199

6.2.2	La inflamació i l'OS causen disfunció endotelial i propicien l'ateroesclerosi a nivell molecular	200
	El to vascular: vasoconstrictor i protrombòtic durant l'obesitat severa.....	201
	Les cèl·lules de l'endoteli vascular danyat produeixen citoquines i molècules d'adhesió	202
6.2.3	La BS disminueix l'OS i la inflamació, el que millora la funció endotelial	204
6.2.4	L'acumulació lipídica a l'íntima és afavorida pel perfil lipídic aterogènic i per la disfunció endotelial. La BS redueix els nivells i l'oxidació lipídics.....	204
6.2.5	L'obesitat severa afavoreix la vulnerabilitat dels ateromes. La BS no suposa la remissió de les plaques, però podria prevenir-ne la ruptura.....	206
6.3	Perspectiva global: l'ateroesclerosi subclínica en l'obesitat severa i efecte de la BS.....	207
6.4	Biomarcadors potencials de la presència de placa.	210
6.4.1	Capacitat de predicció de la presència de placa dels biomarcadors descrits ...	211
7.	CONCLUSIONS	215
8.	BIBLIOGRAFIA	219
9.	ANNEXOS.....	245
	Annex 1: Resultats del cribratge de paràmetres d'estrès cel·lular	247
	Annex 2: Resultats del cribratge de citoquines.....	248
	Annex 3: Pòster del perfil de citoquines, presentat al congrés ECO, 2018.....	251
	Annex 4: Taules de resultats	255

Índex de figures

Figura 1: Tipus d'obesitat segons la distribució del teixit adipós.	4
Figura 2: Percentatge d'adults amb obesitat arreu del món al 2016;.....	5
Figura 3: Tipus de cirurgia bariàtrica.	7
Figura 4: Adipogènesi i salut metabòlica.	10
Figura 5: Tipus, morfologia i característiques del teixit adipós.	11
Figura 6: Comorbiditats associades a l'obesitat severa.....	14
Figura 7: Estructura i classificació de les lipoproteïnes.	17
Figura 8: Metabolisme de les lipoproteïnes.	19
Figura 9: Mapa sobre la taxa de mortalitat per malaltia cardiovascular al món al 2019, estandarditzat per edat.	23
Figura 10: Estructura dels vasos sanguinis.....	30
Figura 11: Funcions de l'endoteli vascular..	32
Figura 12: Esquema representatiu de les variables que determinen l'índex d'augmentació.	36
Figura 13: Exemple de mesures d'RHI amb resposta a la hiperèmia reactiva normal i disfuncional.....	37
Figura 14: Progressió de l'ateroesclerosi.	38
Figura 15: Vies de formació i eliminació de les espècies reactives de l'oxigen.....	41
Figura 16: Estructura i anàlisi de glicoproteïnes per ¹ HNMR.	47
Figura 17: Formació i funció dels miRNA.	49
Figura 18: Imatge representativa d'una membrana d'estrès cel·lular amb mostra de plasma humà.	173
Figura 19: Contingut de TAG a les diferents lipoproteïnes al llarg del temps segons la presència de placa.....	183
Figura 20: Contingut de colesterol a les diferents lipoproteïnes al llarg del temps segons la presència de placa.....	184
Figura 21: Corba ROC del model predictiu amb tots els paràmetres mesurats.	187
Figura 22: Corba ROC del model predictiu amb nous marcadors.	189
Figura 23: El cercle viciós entre OS i inflamació en l'obesitat severa.	198
Figura 24: Obesitat severa i aterosclerosi subclínica, factors que duen a la disfunció endotelial vascular.	208
Figura 25: De l'obesitat severa a l'ateroesclerosi subclínica, biologia molecular de l'aterogènesi.	209
Figura 26: Pòster del perfil de citoquines part 1: introducció, objectius i mètodes.....	251
Figura 27: Pòster del perfil de citoquines part 2: resultats.....	252
Figura 28: Pòster del perfil de citoquines part 3: resultats.....	253
Figura 29: Pòster del perfil de citoquines part 4: resultats i conclusions.....	254

Índex de taules

Taula 1. Classificació segons el BMI.....	3
Taula 2: Fàrmacs contra l'obesitat.	6
Taula 3: Valors de referència per al diagnòstic de DLP.....	16
Taula 4: Valors per al diagnòstic de T2DM.	21
Taula 5: Fàrmacs per al tractament de l'ateroesclerosi.....	24
Taula 6: Percentatge d'excés de pes perdut 6 i 12 mesos després de la BS.	167
Taula 7: Correlacions entre paràmetres estudiats.....	177
Taula 8: Perfil de lipoproteïnes mitjançant 1HNMR del grup control i dels individus amb obesitat severa.	181
Taula 9: Perfil de lipoproteïnes mitjançant 1HNMR en els grups amb i sense placa, abans i després de la cirurgia bariàtrica.....	182
Taula 10: Resum de les variables estudiades diferencials entre persones amb obesitat severa, amb placa i sense.	185
Taula 11: Taula resum del model amb tots els paràmetres mesurats, incloent els factors de risc més utilitzats en clínica (referència sense placa).	186
Taula 15: <i>Odds ratio</i> del model amb tots els paràmetres mesurats (referència sense placa).....	187
Taula 13: Taula resum del model amb nous marcadors (Referència sense placa). ..	188
Taula 14: <i>Odds ratio</i> del model amb nous marcadors (referència sense placa)	188
Taula 16: Resultats de les membranes de cribratge de paràmetres d'estrès cel·lular.	247
Taula 17: Resultats de les membranes de citoquines.	248
Taula 18: Característiques clíniques dels individus amb obesitat severa abans i després de la BS.	255
Taula 19: Paràmetres d'estrès oxidatiu dels individus amb obesitat severa abans i després de la BS.	256
Taula 20: Paràmetres inflamatoris dels individus amb obesitat severa abans i després de la BS.....	257
Taula 21: Paràmetres inflamatoris, glicoproteïnes, dels individus amb obesitat severa abans i després de la BS.....	258
Taula 22: Paràmetres relacionats amb la funció endotelial dels individus amb obesitat severa abans i després de la BS.	259
Taula 23: Perfil de lipoproteïnes mitjançant 1HNMR en els grups amb i sense placa, abans i després de la cirurgia bariàtrica.....	260
Taula 24: Contingut de colesterol i TAG a les diferents lipoproteïnes al llarg del temps segons la presència de placa.....	261
Taula 25: $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ dels miRNA amb diferències significatives..	262

Abreviatures

12M: temps de seguiment, 12 mesos després de la cirurgia bariàtrica

¹HNMR: ressonància magnètica nuclear de protó

6M: temps de seguiment, 6 mesos després de la cirurgia bariàtrica

AGB: banda gàstrica ajustable

Ago2: argonauta

AI: índex d'augmentació

AIP: índex aterogènic del plasma

Ang-1: angiopoietina-1

Ang-2: angiopoietina-2

Apo: apolipoproteïna

AT: teixit adipós

AUC: àrea sota la corba

BAROS: *Bariatric Analysis and Reporting Outcome System* (Anàlisi bariàtrica i sistema d'informació de resultats)

BDNF: factor neurotròfic derivat del cervell

BMI: Índex de Massa Corporal

BPD: derivació biliopancreàtica

BS: cirurgia bariàtrica

CAT: catalasa

CETP: proteïna transferidora d'èsters de colesterol

cHDL: colesterol en lipoproteïnes d'alta densitat

CI: interval de confiança

cIMT: gruix íntima-mitjana de l'artèria caròtida

cLDL: colesterol en lipoproteïnes de baixa densitat

CRP: proteïna C reactiva

cVLDL: colesterol en lipoproteïnes de molt baixa densitat

DLP: dislipèmia

eNOS: òxid nítric sintasa endotelial

E-sel: selectina endotelial

ET-1: endotelina-1

%EWL: percentatge de pèrdua d'excés de pes

FDR: *False Discovery Rate* (taxa de descobriments falsos)

FGF21: factor de creixement de fibroblasts 21

FNDC5: fibronectina tipus III amb 5 dominis

GlycA: concentracions plasmàtiques dels enllaços entre proteïnes i els grups N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina

GlycB: concentracions plasmàtiques dels enllaços entre proteïnes i l'àcid N-acetilneuramínic.

GlycF: concentració dels tres sucres lliures (no lligats a proteïnes) que tenen un grup amino (N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina i l'N-acetilneuramínic).

GPx: glutatió peroxidasa

H/W: *Height-to-Width* (alçada-amplada)

H₂O₂: peròxid d'hidrogen

HbA1c: hemoglobina glicada

HDL: lipoproteïnes d'alta densitat

HL: lipasa hepàtica

HOCl: àcid hipoclorós

HOMA-IR: avaluació del model homeostàtic per a la resistència a la insulina

HSP: *Heat Shock Proteins* (proteïnes de xoc tèrmic)

HT: hipertensió

ICAM: molècules d'adhesió intracel·lular

IDL: lipoproteïnes de densitat intermitja

IL6: interleuquina 6

IR: resistència a la insulina

JNK: Fosfo-quinasa c-Jun N-terminal

LASSO: *least absolute shrinkage and selection operator*

LCAT: lecitina-colesterol-acil-transferasa

LDL: lipoproteïnes de baixa densitat

LOOCV: *leave-one-out cross validation*

Lp(a): lipoproteïna (a)

LPL: lipoproteïna lipasa

L-sel: selectina leucocitària

MDA: malondialdehid

miRNA: micro àcid ribonucleic d'interferència

MMP-9: metal·loproteïnasa de matriu 9

NEFA: àcids grassos no esterificats

NF- κ B: factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules β activades

NO: monòxid de nitrogen

O₂⁻: anió superòxid

OB: temps de seguiment, un mes abans de la cirurgia bariàtrica

OH·: radical hidroxil

OONO·: peroxinitrit

OS: estrès oxidatiu

oxLDL: lipoproteïnes de baixa densitat oxidades

PAD: pressió arterial diastòlica

PAI-1: inhibidor de l'activador del plasminogen 1

PAS: pressió arterial sistòlica

PON1: paraoxonasa 1

P-sel: selectina plaquetària

QM: quilomicrons

R: receptors específics

RHI: Índex d'Hiperèmia Reactiva

RISC: complex silenciador induït per RNA

ROC: *Receiver Operating Characteristic* (Característica Operativa del Receptor)

ROS: espècies reactives de l'oxigen

RYGBP: bypass gàstric en Y-de-Roux

SG: gastrectomia tubular

SOD2: superòxid dismutasa 2

T2DM: diabetis tipus 2

TAG: triacilglicèrids

TM: trombomodulina

TNF α : factor de necrosi tumoral α

UA: unitats arbitràries

UCP1: proteïna desacoblant 1

VCAM: molècules d'adhesió de cèl·lules vasculars

VEGF: factor de creixement de l'endoteli vascular

VLDL: lipoproteïnes de molt baixa densitat

VSMC: cèl·lules musculars llises vasculars

VV: *vasa vasorum*

WHO: Organització Mundial de la Salut

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Obesitat

L'obesitat és una malaltia crònica, complexa i d'origen multifactorial influïda per factors genètics, metabòlics, psicològics, socials i culturals. És una patologia d'alta prevalença que s'associa a comorbiditats com ara la diabetis tipus 2 (T2DM), la dislipèmia (DLP) i la hipertensió (HT), així com a un major risc de desenvolupar malalties cardiovasculars⁽¹⁾.

Segons l'Organització Mundial de la Salut (WHO), l'obesitat es defineix com una acumulació anormal o excessiva de greix que pot ser perjudicial per a la salut. Aquesta acumulació sol derivar d'un desequilibri entre la ingesta calòrica i la despesa d'energia⁽²⁾.

1.1.1. Classificació de l'obesitat

Els comitès internacionals d'experts, així com la WHO, recomanen mesures antropomètriques per definir i classificar l'obesitat. La classificació internacional de l'obesitat en adults és la proposada per la WHO⁽³⁾ i es basa en l'Índex de Massa Corporal (BMI) o índex de Quetelet, que es calcula dividint el pes (en kg) pel quadrat de l'alçada (en metres)⁽⁴⁾. La Taula 1 mostra la classificació de l'obesitat en funció del BMI (igual per a tots dos sexes).

Taula 1. Classificació segons el BMI⁽³⁾

BMI (kg/m ²)	CLASSIFICACIÓ
< 18.5	Pes baix
18.5–24.9	Pes normal
25.0–29.9	Pre-obesitat o sobrepès
30.0–34.9	Obesitat classe I
35.0–39.9	Obesitat classe II
≥ 40	Obesitat classe III

Així, es considera que les persones que tenen un BMI igual o superior a 30 kg/m² tenen obesitat, i quan el BMI excedeix els 40 kg/m², indica obesitat de classe III o severa. No obstant, cal tenir en compte que l'ús del BMI té algunes

limitacions, per exemple, en persones d'edat avançada i en esportistes o persones amb una massa muscular elevada⁽³⁾.

El perímetre de cintura pot servir per complementar el BMI i indica obesitat abdominal o visceral si supera els 89 cm en dones i els 102 cm en homes⁽⁵⁾. Aquesta mesura aporta informació sobre la distribució del greix corporal. En funció de la distribució del teixit adipós (AT), es poden distingir dos tipus d'obesitat (Figura 1). S'anomena obesitat abdominal, visceral, o de tipus androide quan l'adipositat és a la part superior del cos, és a dir al coll, a les espatlles i a l'abdomen. En canvi, en l'obesitat femoro-glútia o ginoide, predomina l'adipositat als glutis, als malucs i a les cames⁽⁶⁾.

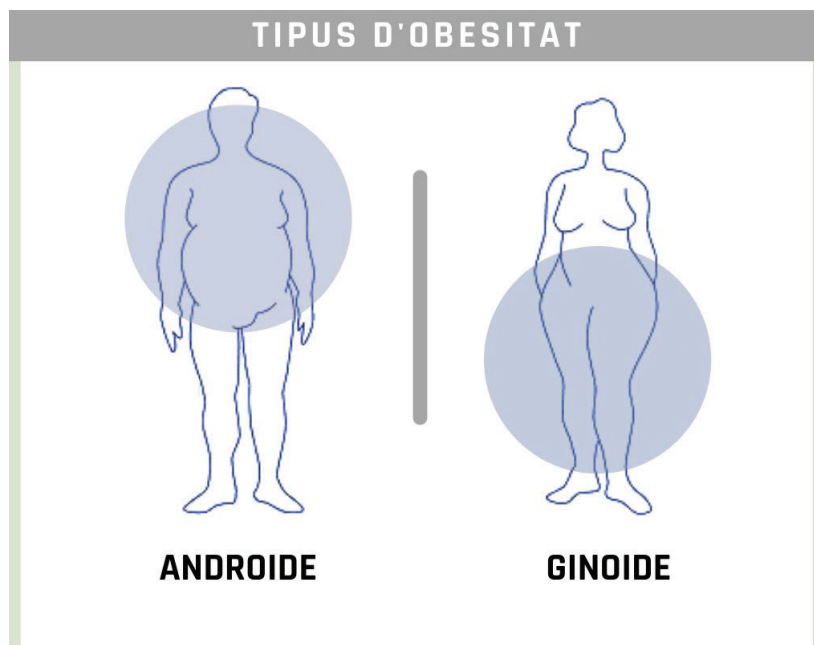


Figura 1: Tipus d'obesitat segons la distribució del teixit adipós.

1.1.2. Epidemiologia de l'obesitat

Durant els últims 50 anys, la prevalença de l'obesitat ha augmentat fins a proporcions pandèmiques⁽¹⁾. Pel que fa a l'evolució de la malaltia a escala mundial, la prevalença gairebé es va triplicar entre 1975 i 2016, i es preveu que segueixi augmentant fins al 2030⁽⁷⁾. Entre els adults, més de 1900 milions tenien sobrepès al 2016, dels quals 650 milions tenien obesitat, el que representa un 13% de la població adulta (l'11% dels homes i el 15% de les dones). A Espanya,

el 36% de la població tenia sobrepès i un 17% obesiata al 2016^(2,8). Pel que fa a l'obesitat severa, un 0.64% dels homes i un 1.6% de les dones patien aquesta malaltia a escala mundial i les dades segueixen en augment. Entre els infants, 38 milions de nens/es de menys de 5 anys i 340 milions d'edats entre 5 i 19 anys tenien sobrepès o obesiata al 2019^(1,7).

Al 2017, l'obesitat es va associar a 4.7 milions de morts, fet que confirma que és un factor de risc per a les principals causes de mort al món incloent les malalties cardiovasculars, la T2DM i alguns càncers⁽⁹⁾.

El mapa següent (Figura 2) mostra la incidència de l'obesitat en adults arreu del món al 2016. Es pot veure que la prevalença de l'obesitat tendeix a ser més alta als països més rics d'Europa, Nord Amèrica i Oceania. En canvi, les taxes són molt més baixes al sud d'Àsia i a l'Àfrica sud-sahariana. Com a exemple, als Estats Units més d'un terç dels adults (36%) tenia obesiata severa, mentre que a l'Índia el percentatge fou unes deu vegades menor (3.9%).

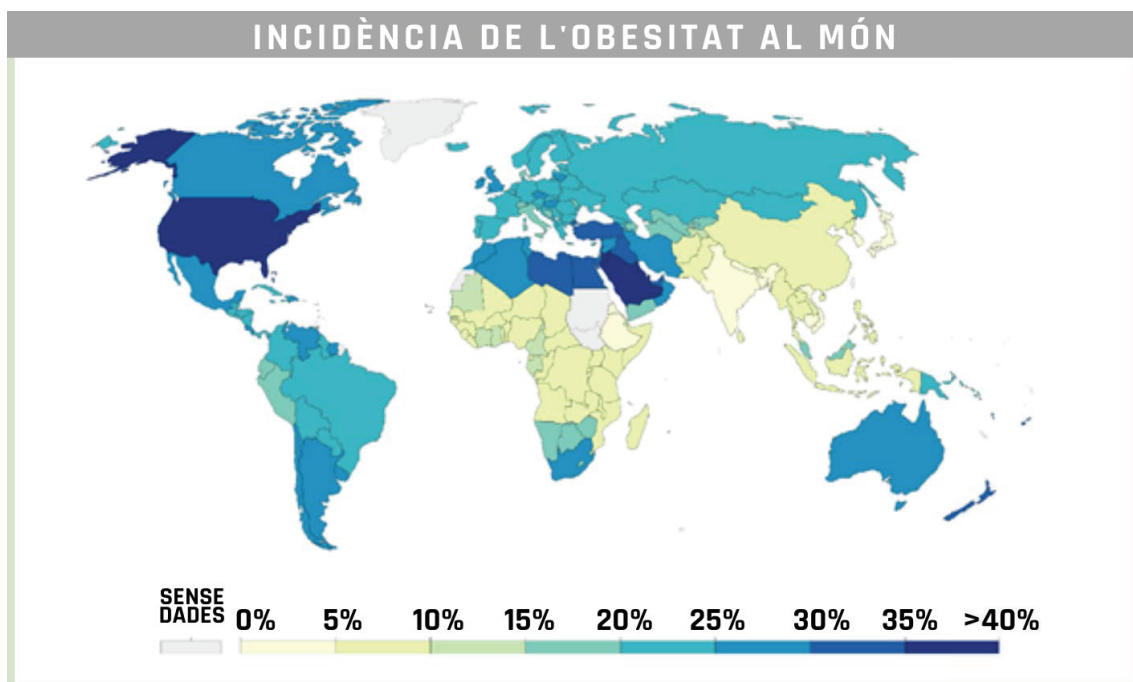


Figura 2: Percentatge d'adults amb obesiata arreu del món al 2016; calculat en funció del BMI (>30). FONT: Adaptat de WHO, *Global Health Observatory*⁽¹⁰⁾.

1.1.3. Tractament de l'obesitat

Per assolir i mantenir un pes saludable, és necessari que el tractament de l'obesitat sigui integral i multidisciplinari. Sovint es comença incloent canvis en la pauta alimentària i augmentant l'exercici físic. En funció del grau d'obesitat, es pot afegir l'administració de fàrmacs o, en el cas de l'obesitat severa, optar per la cirurgia bariàtrica (BS)⁽¹¹⁾.

Els medicaments contra l'obesitat aprovats es resumeixen a la Taula 2:

Taula 2: Fàrmacs contra l'obesitat.

Medicament	Any aprovació	Mecanisme d'acció	Pèrdua de pes mitjana (vs placebo) (%)	Autoritzat a
Per tractament de curta durada				
Fentermina ⁽¹²⁾	1959	Simpaticomimètic / Suprimeix la gana	4.4 a les 28 setmanes	EUA
Dietilpropion ⁽¹³⁾	1979	Simpaticomimètic / Suprimeix la gana	6.6 als 6 mesos	EUA
Per tractament de llarga durada				
Orlistat ⁽¹⁴⁾	1999	Inhibidor de la lipasa intestinal / Redueix l'absorció de greix fins a un 30%	3.8	EUA i Europa
Fentermina-topiramata ⁽¹⁵⁾	2012	Simpaticomimètic i inhibidor de l'anhidrasa carbònica / Disminueix la gana i els episodis d'afartament	8.6	EUA
Naltrexona-Bupropió ⁽¹⁶⁾	2014	Combinació d'un antagonista dels receptors opioïdes μ i d'un inhibidor de la recaptació neuronal de dopamina i norepinefrina / Disminueix la gana i els antulls	4.8	EUA i Europa
Liraglutida ⁽¹⁷⁾	2014	Anàleg del receptor GLP-1 (<i>glucagon like peptide-1</i>) / Disminueix la gana, augmenta la sacietat	5.4	EUA i Europa
Setmelanotida ⁽¹⁸⁾	2020	Agonista del receptor melanocortina-4 / Disminueix la gana	No aplica 12.5-25.6*	EUA
Semaglutida ⁽¹⁸⁾	2021	Agonista del receptor GLP-1 / Disminueix la gana, augmenta la sacietat	12.4	EUA i Europa

*Rang obtingut en un assaig sense control per placebo

Cal tenir en compte també, que en general els medicaments disponibles són de poca utilitat en l'obesitat severa⁽¹⁹⁾. Per aconseguir una pèrdua de pes important i sostinguda en el temps, la BS és el tractament més efectiu⁽²⁰⁾. Aquest procediment quirúrgic es recomana en persones amb un BMI de 40 kg/m² o superior, i en aquelles amb un BMI de 35 kg/m² amb comorbiditats coexistents com la T2DM, la DLP o l'HTA⁽²¹⁾.

Estudis a llarg termini han demostrat que amb la BS no només s'assoleix una pèrdua de pes significativa, sinó que en molts casos també s'aconsegueix una remissió de les comorbiditats, una millora dels factors de risc cardiovascular, i una reducció de la taxa de mortalitat⁽²²⁻²⁴⁾.

Hi ha diferents tècniques per dur a terme la BS (Figura 3), classificades com a restrictives, malabsortives o mixtes en funció dels canvis del tracte gastrointestinal i del seu impacte en la nutrició.

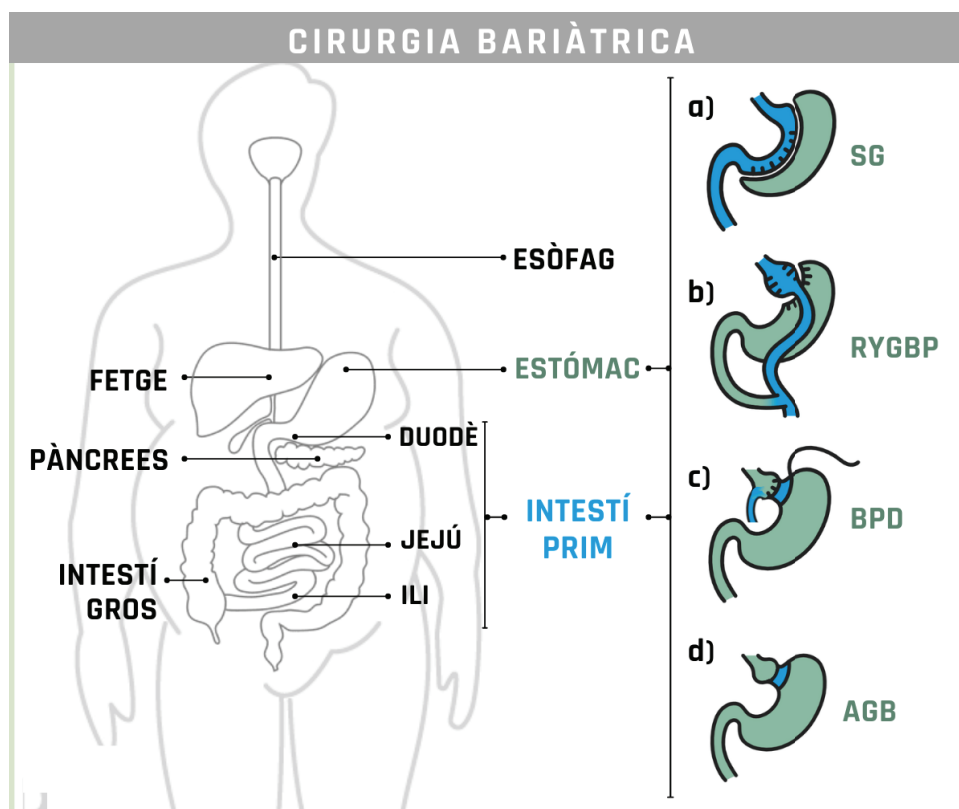


Figura 3: Tipus de cirurgia bariàtrica. Abreviatures: SG, gastrectomia tubular; RYGBP, bypass gàstric en Y-de-Roux; BPD, derivació bilio-pancreàtica; AGB, banda gàstrica ajustable.

Les tècniques quirúrgiques utilitzades amb més freqüència són la gastrectomia tubular (SG), que representa el 42% de les intervencions mundials; i el bypass gàstric en Y-de-Roux (RYGBP), que reuneix el 48% de les operacions. Aquestes dues són les tècniques que s'han dut a terme per tractar els individus inclosos en el present estudi, ambdues per laparoscòpia (sistema de cirurgia d'invasió mínima que permet la visió de la cavitat abdominopèlvica amb l'ajuda de dispositius òptics introduïts a través de petites incisions a la paret abdominal). En el 10% restant d'operacions s'aplica la tècnica de la derivació biliopancreàtica (BPD) o la banda gàstrica ajustable (AGB)⁽²⁵⁾.

L'**SG** és una tècnica restrictiva consistent a fer una escissió del 80% de l'estómac (Figura 3a). D'aquesta manera, disminueix la capacitat d'ingerir aliments reduint el volum de l'estómac. A això s'hi suma l'efecte de la cirurgia sobre les hormones gastrointestinals implicades en la regulació de la gana i la sacietat, com ara la grelina^(11,26).

El **RYGBP** és una tècnica mixta, és molt efectiva ja que inclou un component restrictiu (amb limitació de la ingesta oral deguda a la reducció de la mida de l'estómac) i un de malabsortiu (ja que limita l'absorció calòrica per l'escurçament de l'intestí prim). El procediment quirúrgic consisteix a dividir l'estómac en dues cambres (Figura 3b). La superior o reservori gàstric és petita (aproximadament 30 cm³) i rep els aliments. La cambra inferior queda exclosa del pas dels aliments. A més, l'intestí prim es divideix i un extrem es connecta directament al reservori gàstric. L'estómac i el duodè exclosos s'uneixen a l'intestí prim de manera que es permet que les secrecions gàstriques i biliopancreàtiques es trobin amb els aliments ingerits per facilitar el processat i l'absorció de nutrients. Així, els aliments avancen directament des de la petita bossa gàstrica cap a l'intestí prim, sense passar per la porció inferior de l'estómac, el duodè, ni part del jejú⁽¹¹⁾.

La **BPD** es considera una tècnica mixta, però amb predomini del component malabsortiu. Consisteix en realitzar, per una banda, una gastrectomia tubular i, d'altra banda, un bypass bilio-pancreàtic (Figura 3c) mitjançant el qual les secrecions digestives es deriven directament al final de l'intestí prim, el que altera de manera important l'absorció dels aliments. S'aconsegueix una pèrdua de pes major comparat amb les dues tècniques prèvies, però també pot tenir més

risc de complicacions com diarrea, deficiències nutricionals i desnutrició proteico-calòrica⁽²⁴⁾.

Finalment, l'**AGB** és una tècnica restrictiva. En aquest procediment es col·loca una banda al voltant de l'estómac propera a l'extrem superior, de manera que es crea una petita bossa i un conducte estret dins de la porció romanent més gran de l'estómac (Figura 3d). Aquest conducte retarda el buidat dels aliments des de la bossa i produeix una sensació de sacietat. La banda es pot ajustar per canviar la mida del conducte⁽²⁷⁾.

En tots els casos, després de l'operació els pacients segueixen una dieta estricta. En general, durant el primer mes la dieta ha de ser líquida per cicatritzar i desinflamar la porció de tub digestiu intervingut. Un mes post-BS, la dieta passa a ser tova: s'inclouen aliments sòlids bullits en petites quantitats i ben mastegats. Dos mesos després es passa a ingerir una dieta triturada i, després de 3 mesos de l'operació es canvia a dieta estàndard de manteniment.

1.1.4.El teixit adipós

És ben sabut que l'energia requerida per dur a terme les funcions vitals de l'organisme procedeix dels glúcids, dels lípids i de les proteïnes. En la regulació de la despesa energètica hi participen el sistema nerviós, l'aparell digestiu, i òrgans i teixits com el fetge, el pàncrees i l'AT. La capacitat d'emmagatzemar els sucres i proteïnes ingerits com a tal és limitada. En canvi, els dipòsits de greix sovint es poden expandir amb facilitat per acumular-ne més⁽²⁸⁾. Això és possible gràcies als adipòcits, que poden emmagatzemar energia en forma de triacilglicèrids (TAG). Tan és així que el desequilibri causat per l'increment de la ingesta i la disminució de la despesa d'energia es tradueix en l'augment de la mida dels adipòcits (hipertròfia) i del seu nombre (hiperplàsia)⁽²⁹⁾ (Figura 4). Al principi, l'augment d'adipòcits pot considerar-se saludable i adaptatiu, ja que el teixit és capaç de mantenir la vascularització i uns nivells correctes d'adipoquines. En canvi, en el context de l'obesitat té lloc l'expansió massiva dels adipòcits i, com a conseqüència, la hipòxia. Així, la vascularització passa a ser insuficient per la mida augmentada del teixit i, sota hipòxia, es donen processos com la fibrosi i la necrosi del teixit, promovent així la infiltració de cèl·lules immunitàries i la inflamació de l'AT.

Aquests factors, en combinació amb la disfunció de l'AT, contribueixen al desenvolupament de malalties metabòliques i causen l'acumulació tòxica de lípids en altres teixits com el múscul i el fetge⁽²⁹⁾.

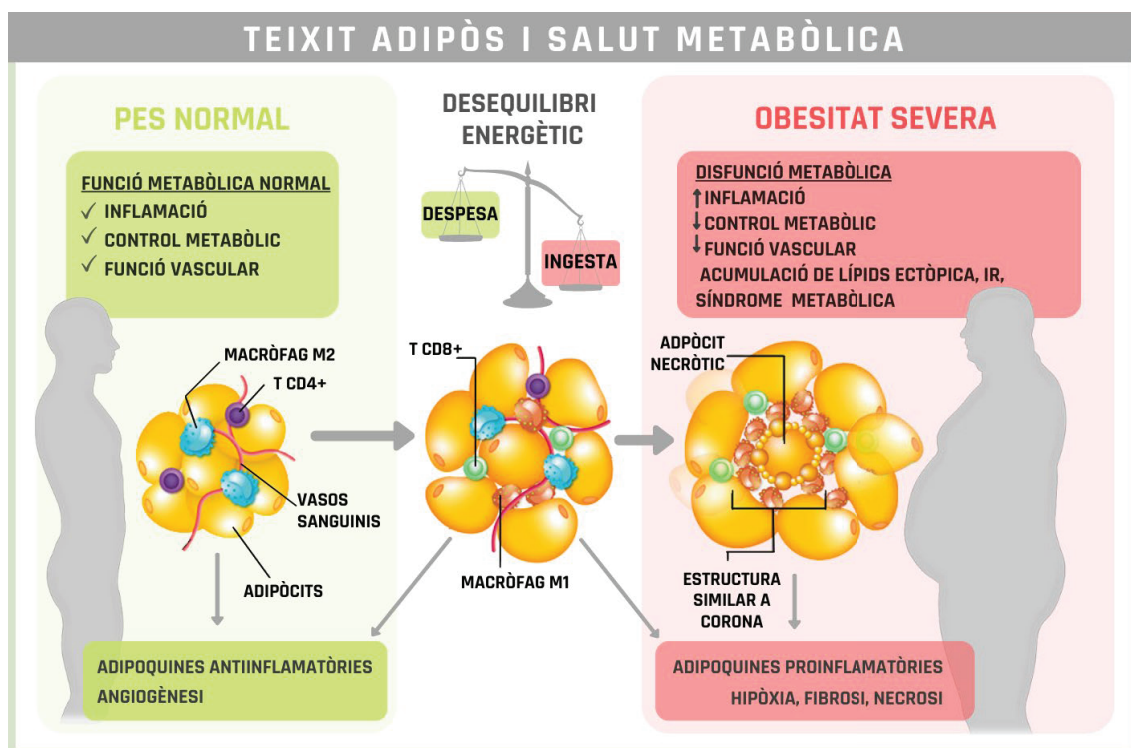


Figura 4: Adipogènesi i salut metabòlica. Abreviatures: IR, resistència a la insulina; T CD4+, limfòcits T CD4+ col·laboradors o *helpers*; T CD8+, limfòcits T CD8+ citotòxics;. FONT: Il·lustració dels adipòcits adaptada de Balisteri, R⁽³⁰⁾

Així, com que la funcionalitat de l'AT resulta afectada durant l'obesitat, és important conèixer-ne les característiques generals. Aquest teixit té com a funció principal emmagatzemar TAG durant la ingesta calòrica i alliberar àcids grassos segons les necessitats energètiques de l'organisme. Tanmateix, tot i que tradicionalment l'AT s'ha considerat com un simple teixit estructural per a brindar protecció, calor i energia, conforme avança el seu estudi s'ha posicionat també com un teixit amb funcions immunitàries i endocrines. Participa en la modulació de la funció de diferents cèl·lules i òrgans i intervé en la defensa i en l'homeòstasi de l'organisme. Als fets senyalats s'hi suma la seva capacitat de transdiferenciació d'AT blanc a marró, que pot ser reversible^(31,32).

A l'organisme coexisteixen tres tipus d'AT, classificats segons la seva estructura, localització, color, vascularització i funció, són l'AT blanc, el beix i el marró^(32,33) (Figura 5). En general, l'AT blanc té la funció d'emmagatzemar d'energia, mentre que l'AT marró la dissipa en forma de calor. Al seu torn, els adipòcits beix tenen un fenotip flexible i, d'acord amb les circumstàncies fisiològiques, poden emmagatzemar o dissipar energia⁽³⁴⁾.

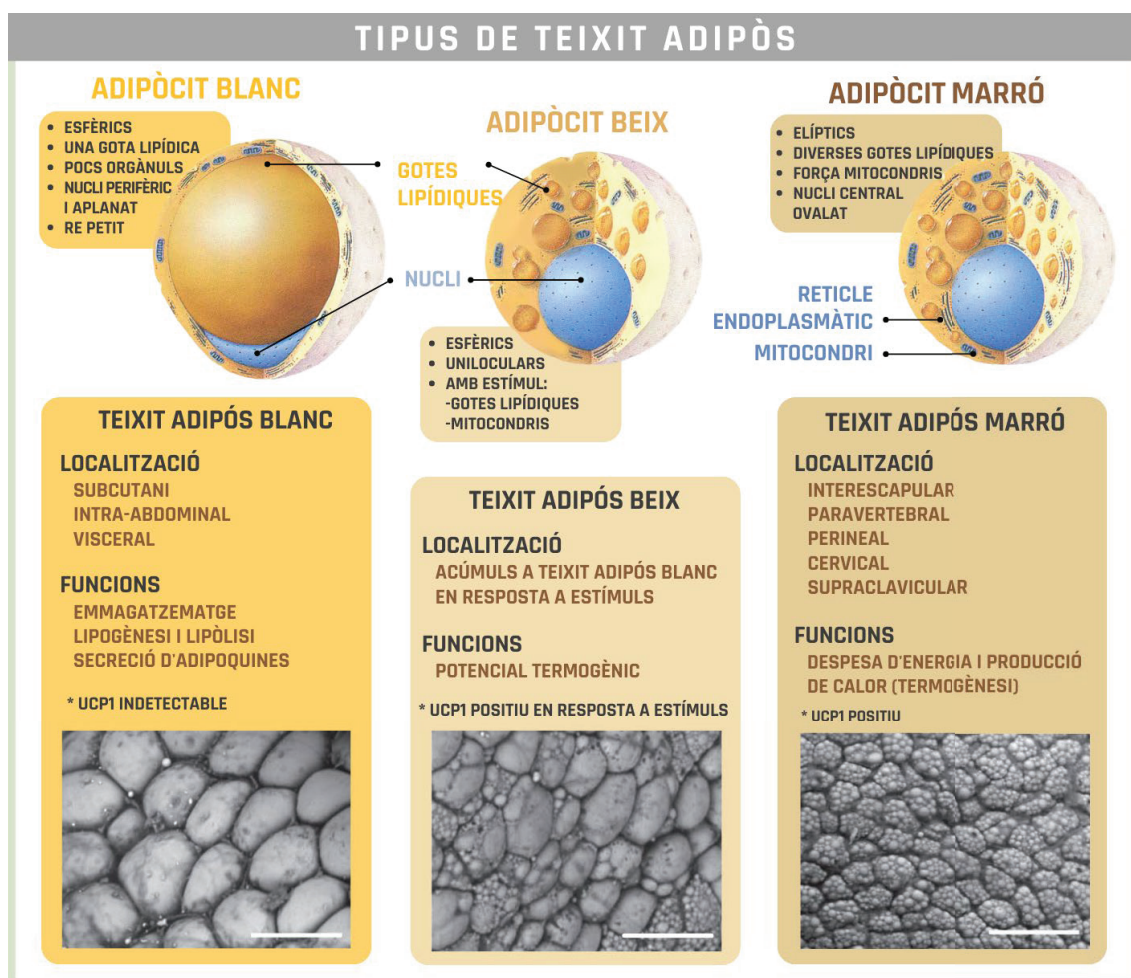


Figura 5: Tipus, morfologia i característiques del teixit adipós. Abreviatures: UCP1, proteïna desacoblant 1; RE, reticle endoplasmàtic. Línies d'escala 50 µm. FONTS: Il·lustracions dels adipòcits (a dalt) adaptades de la fototeca de l'enciclopèdia catalana⁽³⁵⁾. Imatges de microscòpia de Bartelt, A.⁽³³⁾.

El teixit adipós blanc

Els adipòcits blancs tenen una sola gota lipídica al seu citoplasma, el seu nucli es troba desplaçat a la perifèria i tenen molt pocs mitocondris. A més, els adipòcits de l'AT blanc contenen nombrosos receptors per al reconeixement de patògens, lípids, insulina, citoquines i hormones entre d'altres⁽²⁸⁾.

Com que els adipòcits regulen l'emmagatzematge d'energia, la gota lipídica està coberta per diferents proteïnes que a més de donar estabilitat, permeten la sortida o entrada d'àcids grassos. Així, l'AT manté un equilibri entre diversos processos metabòlics: la captació de lípids des del torrent sanguini, la síntesi *de novo* i la mobilització lipídica o lipòlisi.

Durant períodes d'ingesta energètica, els adipòcits emmagatzemen energia en forma de TAG. Els TAG procedents de lipoproteïnes, (explicades amb detall a l'apartat 1.1.5) són hidrolitzats extracel·lularment fins a àcids grassos no esterificats (NEFA) i monoacilglicerol per la lipoproteïna lipasa (LPL), que es troba ancorada a l'endoteli dels capil·lars del teixit subjacent, en aquest cas l'AT. Els NEFA són captats pels adipòcits i un cop dins la cèl·lula són reesterificats per formar TAG. Els àcids grassos plasmàtics que circulen units a l'albumina també poden ser captats pels adipòcits i reesterificats a TAG⁽³⁶⁾.

El terme lipogènesi *de novo* designa específicament la formació d'àcids grassos a partir d'algun precursor de l'Acetil-CoA, per exemple la glucosa.

El greix pot ser posteriorment alliberat en períodes de restricció calòrica mitjançant la lipòlisi. Durant la lipòlisi, els TAG emmagatzemats a l'AT s'hidrolitzen fins a NEFA i glicerol. El pas limitant de la lipòlisi està controlat per la lipasa sensible a hormones (HSL), que catalitza la hidròlisi dels TAG.

Entre els estímuls que afecten la captació de NEFA hi ha per exemple la insulina (que l'estimula) i la leptina (que la inhibeix). Pel que fa a la lipòlisi, les catecolamines l'afavoreixen i la insulina és antilipolítica^(36,37).

L'AT blanc conforma prop del 20% del pes corporal en homes i el 25% en dones. És el més abundant dels tres, està distribuït per tot l'organisme i té diferents àrees de dipòsit:

- Subcutani, que correspon al 80% del total, representant el principal dipòsit adipós, es troba principalment a la zona proximal de les extremitats inferiors i a l'abdomen.

- Perivascular, que proporciona protecció i suport estructural i influeix en la contractilitat i homeòstasi de la paret vascular.

- Visceral, que es divideix en omental i mesentèric. Ocupa els espais entre els òrgans abdominals i els manté al seu lloc; té nòduls limfàtics i major quantitat de vasos sanguinis i receptors adrenèrgics que la resta de l'AT blanc.

Els individus en bon estat nutricional tenen un desenvolupament molt limitat dels teixits adiposos que envolten les vísceres, no obstant, en condicions d'excés nutricional, el dipòsit de TAG té lloc tant a nivell subcutani com visceral⁽³⁸⁾.

El teixit adipós beix

Les cèl·lules d'aquest AT tenen una mida intermèdia entre les integrants de l'AT blanc i les del marró (Figura 5). Només en resposta a estímuls com ara el fred i algunes citoquines, els adipòcits de l'AT beix expressen els components termogènics característics de l'AT marró com és la proteïna desacoblant 1 (UCP1). A més, poden passar de tenir només una gota lipídica (uniloculars) a tenir-ne varies. L'AT beix es troba immers en els AT blanc i marró i el seu fenotip flexible permet que emmagatzemi o elimini energia d'acord amb les condicions ambientals o fisiològiques⁽³⁴⁾.

El teixit adipós marró

Els adipòcits marrons són de mida menor als de l'AT blanc i contenen múltiples gotes lipídiques. El color reflexa els citocroms presents als seus nombrosos mitocondris. Aquests orgànuls posseeixen crestes abundants i activitat deguda a la funció de la UCP1, que modifica la fosforilació oxidativa. Aquesta modificació permet disminuir la producció d'ATP i augmentar la quantitat d'energia que es dissipa com a calor, és per això que l'AT marró és considerat termogènic^(39,40).

Així, les funcions principals de l'AT marró són, per una banda, la termogènesi adaptativa, que regula la temperatura corporal i l'homeòstasi metabòlica mitjançant la disminució dels TAG circulants i de l'emmagatzematge de glucosa. Per altra banda l'AT marró duu a terme la secreció de prostaglandines, d'òxid nítric i de citoquines⁽⁴¹⁾. Als adults, aquest tipus d'AT s'ha detectat al coll, dispers en l'AT blanc i en les regions intraescapular i supraclavicular. En persones amb obesitat, en canvi, és gairebé inexistent⁽⁴¹⁾.

1.1.5. Comorbiditats associades

L'obesitat no només és objecte d'atenció a causa de la seva alta prevalença, sinó també perquè s'associa a un major risc de morbiditat i mortalitat i és considerada un factor de risc per a moltes malalties, especialment cardiovasculars, metabòliques, osteoarticulars i psicològiques⁽⁴²⁻⁴⁴⁾; a la Figura 6 se'n pot observar un resum.

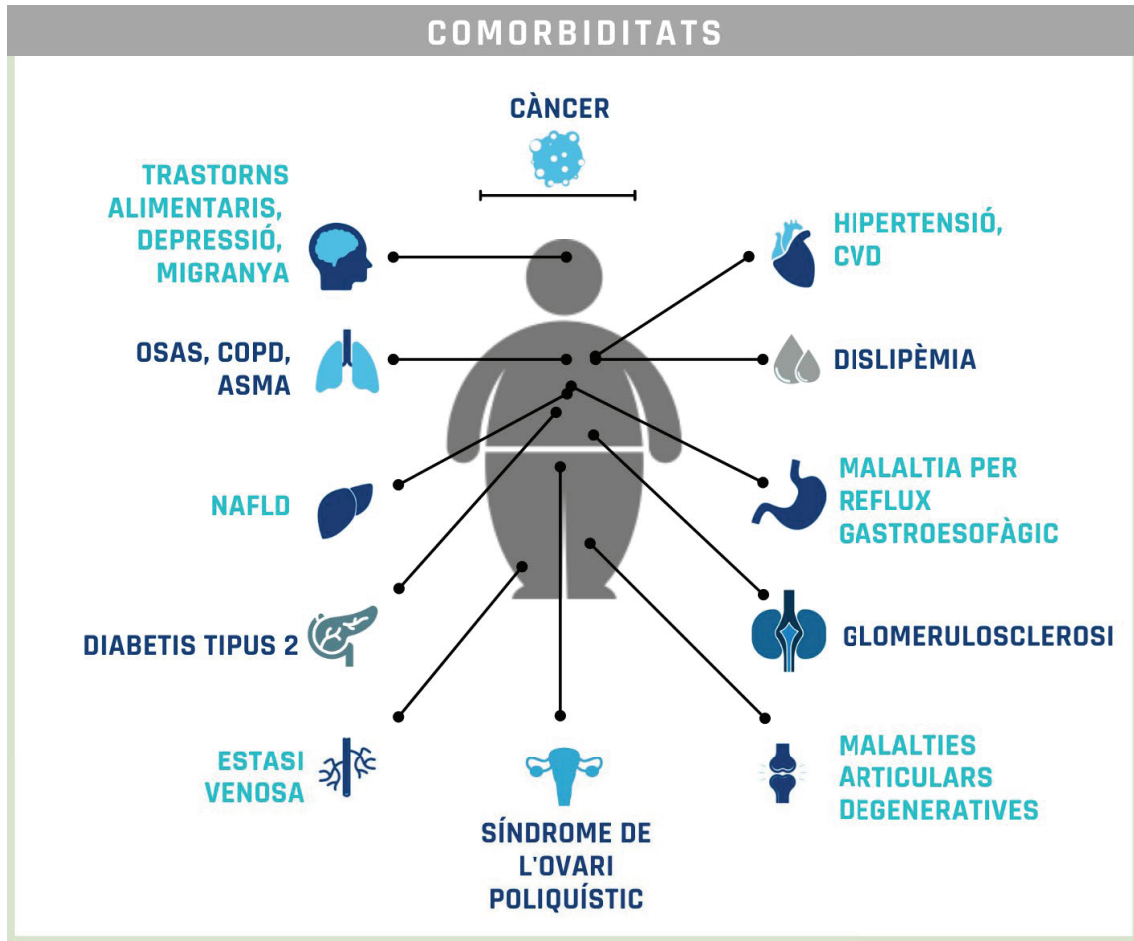


Figura 6: Comorbiditats associades a l'obesitat severa. Abreviatures: COPD, malaltia pulmonar obstructiva crònica; CVD, malalties cardiovasculars; NAFLD, fetge gras no alcohòlic; OSAS, síndrome de l'apnea obstructiva del son.

A nivell endocrí, la malaltia més freqüent associada a l'obesitat és la T2DM, seguida de la DLP⁽⁴⁵⁾. En relació a les afectacions de l'aparell circulatori, l'obesitat severa s'associa a l'HTA i a l'ateroesclerosi^(46,47).

A continuació es descriuen les principals característiques d'aquestes patologies tret de l'ateroesclerosi, que s'estudiarà amb més profunditat i s'explicarà de manera més extensa i detallada en la següent secció.

Hipertensió arterial

L'HTA, una de les malalties més prevalents, està considerada com a factor de risc cardiovascular i és una causa freqüent d'insuficiència cardíaca, malalties renals, cerebrals i oculars⁽⁴⁸⁾. Al 2019, 1.28 mil milions d'adults al món tenien HTA, i es calcula que el nombre està en augment⁽⁴⁹⁾. L'HTA en l'obesitat sovint provoca un augment del volum plasmàtic i de la despesa cardíaca⁽⁵⁰⁾.

La pressió sistòlica (PAS) normal en adults és de 120 mmHg i la diastòlica (PAD) de 80 mmHg. Es diagnostica HTA quan les xifres mitjanes de PAS i les de PAD són de forma mantinguda iguals o superiors a 140/90 mmHg, respectivament^(51,52). L'obesitat, la T2DM i la DLP, poden empitjorar-ne les conseqüències i augmentar les probabilitats de patir malalties cardiovasculars^(51,53).

L'HTA és de fàcil detecció i es tracta implementant canvis en l'estil de vida (com per exemple una dieta saludable baixa en sal o mantenint el pes ideal), combinats si s'escau amb fàrmacs antihipertensius⁽⁵²⁾.

Dislipèmia

La DLP es defineix com una alteració de la quantitat de lípids en sang⁽⁵⁴⁾. Segons el perfil lipídic pot classificar-se com a hipercolesterolèmia, hipertrigliceridèmia, hiperlipèmia mixta o hipoalfalipoproteïnèmia (disminució del colesterol en les lipoproteïnes de baixa densitat (cHDL))⁽⁵¹⁾. Es calcula que al 2017, el 34% de població a escala global tenia hiperlipèmia, mentre que a Europa, el percentatge ascendia fins al 54%⁽⁵⁵⁾.

El metabolisme lipídic es pot alterar a causa de factors genètics, d'una dieta rica en greixos saturats i colesterol, de l'excés de pes o de la manca d'exercici físic; donant lloc a DLP i incrementant així el risc cardiovascular. Uns nivells d'insulina elevats durant molt de temps també poden conduir a DLP⁽⁵⁶⁾.

Normalment, la DLP en l'obesitat es caracteritza per un augment del colesterol total i/o del colesterol en les lipoproteïnes de baixa densitat (cLDL), per la reducció del cHDL i per la hipertrigliceridèmia (Taula 3)⁽⁵⁷⁾. Aquest perfil lipídic és aterogènic i, per tant, un factor de risc destacat de malaltia cardiovascular ateroscleròtica⁽⁵⁶⁾.

Taula 3: Valors de referència per al diagnòstic de DLP. Abreviatures: cLDL, colesterol en les lipoproteïnes de baixa densitat; cHDL, colesterol en les lipoproteïnes d'alta densitat; TAG, triacilglicèrids. FONT: Guia de la Societat Europea de cardiologia i de la Societat Europea de l'Aterosclerosi⁽⁵⁸⁾.

Lípids	Valors (mg/dl)	Nivell
Colesterol total	< 200	Ideal
	200-239	Límit
	≥ 240	Alt
cLDL	< 100	Ideal
	100-129	Desitjable
	130-159	Límit
	≥ 190	Molt alt
cHDL	< 40	Baix
	> 60	Alt
TAG	< 150	Ideal
	150 – 200	Límit
	201 – 499	Alt
	≥ 500	Molt alt

A més de ser considerada com un dels principals factors de risc cardiovasculars, quan la DLP coexisteix amb l'HTA o la T2DM, el risc es multiplica⁽⁵⁷⁾.

Per entendre les mesures habituals que es fan servir en clínica per a l'avaluació lipoproteica, per conèixer la base molecular de la dislipèmia i per poder establir el risc cardiovascular, és necessari conèixer l'estructura, el metabolisme i la funció de les lipoproteïnes.

Les lipoproteïnes són complexos macromoleulars de lípids i apolipoproteïnes (Apo), necessaris per al transport de lípids, ja que aquests són insolubles en medis aquosos com la sang. Els principals lípids transportats per

les lipoproteïnes inclouen com a elements majoritaris els TAG, el colesterol no esterificat, el colesterol esterificat i els fosfolípids. Els TAG contenen els àcids grassos, constituents principals de l'AT i de la reserva energètica⁽⁵⁹⁾. El colesterol i els fosfolípids són constituents essencials de les membranes cel·lulars i són necessaris per al manteniment de la funcionalitat i supervivència de les cèl·lules i, a més, el colesterol és la base de la síntesi de les hormones esteroidees. Les fonts de colesterol poden ser exògenes (dieta); o endògenes (síntesi cel·lular).

Les lipoproteïnes són esfèriques, hidrosolubles i la seva estructura es pot diferenciar en dues parts: un nucli lipídic on es troben els lípids més hidròfobs (colesterol esterificat i TAG), i una capa externa formada pels fosfolípids, el colesterol no esterificat i les Apo (Figura 7).

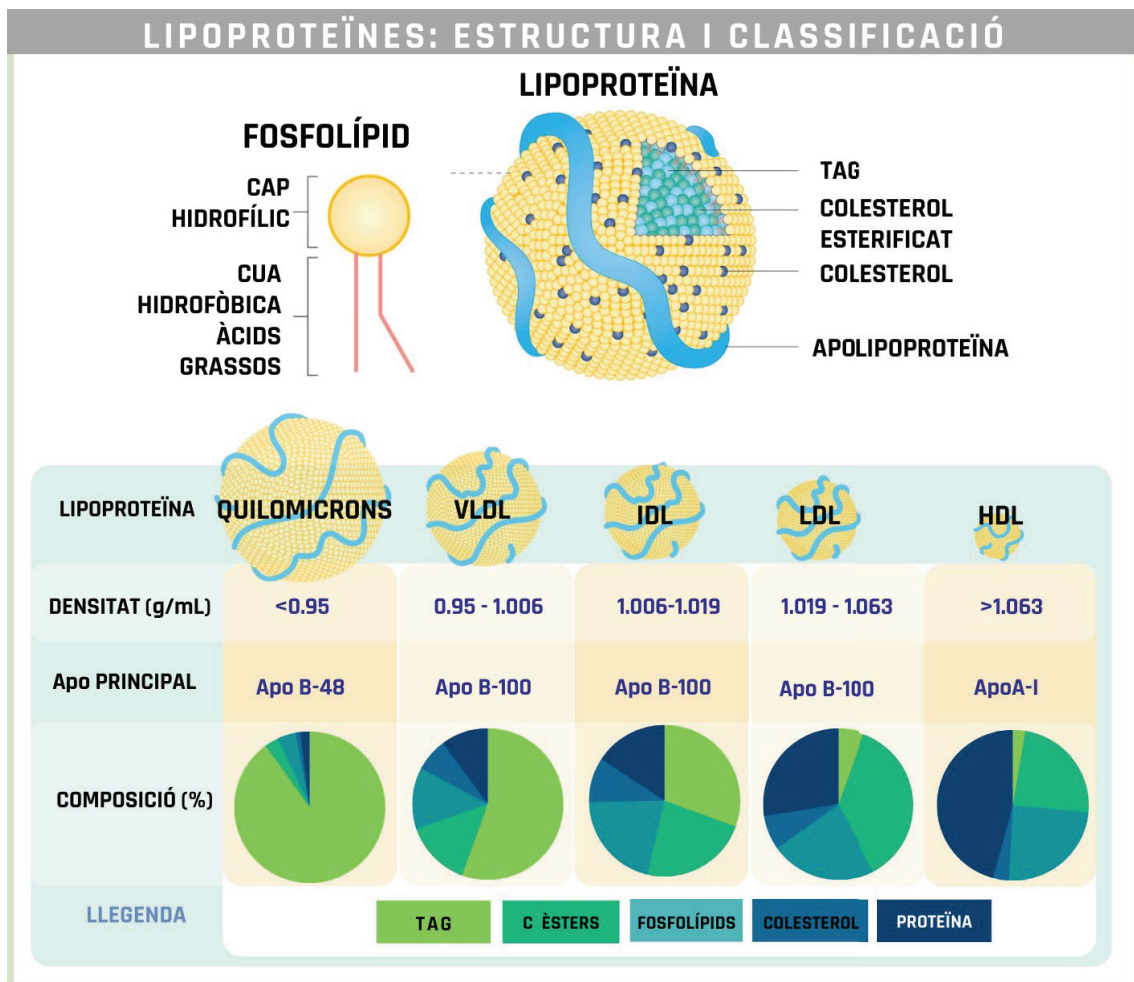


Figura 7: Estructura i classificació de les lipoproteïnes. Abreviatures: Apo, apolipoproteïna; C èsters, èsters de colesterol; HDL, lipoproteïnes d'alta densitat; ILD, lipoproteïnes de densitat intermèdia; LDL, lipoproteïnes de baixa densitat; TAG, triacilglicèrids; VLDL, lipoproteïnes de molt baixa densitat. FONT: adaptat de Heidi Noels et al.⁽⁶⁰⁾.

Les lipoproteïnes es poden classificar segons la seva densitat creixent en: quilomicrons (QM), lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL), lipoproteïnes de densitat intermitja (IDL), lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) i lipoproteïnes d'alta densitat (HDL)^(54,58).

Els **QM** són les lipoproteïnes més grans, amb un diàmetre que supera els 100 nm. Gran part del seu contingut són TAG provinents de la dieta, la resta són colesterol i fosfolípids. El seu component proteic consisteix principalment en Apo B-48⁽⁶¹⁾. Els QM se sintetitzen a l'intestí i la seva funció principal és el transport dels lípids provinents de la dieta. Aquests TAG s'hidrolitzen a la llum intestinal, són absorbits com a àcids grassos i reesterificats en forma de TAG per ser empaquetats a l'enteròcit com a QM. Els QM se secreten a la limfa per arribar finalment al torrent sanguini. Posteriorment l'LPL, que es troba ancorada als capil·lars dels teixits extrahepàtics, hidrolitza els TAG dels QM circulants alliberant NEFA (Figura 8). Com a resultat d'aquest procés, es redueix la mida dels QM i passen a ser denominats QM romanents, que són captats ràpidament per receptors hepàtics⁽⁶²⁾. De la reducció de la mida dels QM també se'n desprenen vesícules discoïdals que constituïran un dels orígens de les HDL. Els NEFA resultants de la lipòlisi es distribueixen als teixits per al seu ús (teixit muscular) o emmagatzematge (AT).

Les **VLDL** són partícules grans que tenen un diàmetre d'entre 30 i 100 nm i són molt riques en TAG. El component proteic de les VLDL consta d'una molècula d'Apo B-100^(58,63), proteïna estructural també de les lipoproteïnes que resulten del catabolisme de les VLDL, com són les IDL, les LDL i l'Lp(a) (lipoproteïna (a)). Les VLDL són sintetitzades i secretades principalment pel fetge i la seva funció és el transport dels TAG per subministrar àcids grassos als teixits muscular i adipós. Igual que en el cas dels QM, en aquests teixits l'LPL hidrolitza els TAG⁽⁵⁹⁾. Com a resultat, la mida de les VLDL disminueix, la relació entre colesterol i TAG s'igualava i s'obtenen les IDL. El catabolisme de les VLDL és una altra de les vies de síntesi d'HDL, de manera semblant al que passa amb els QM.

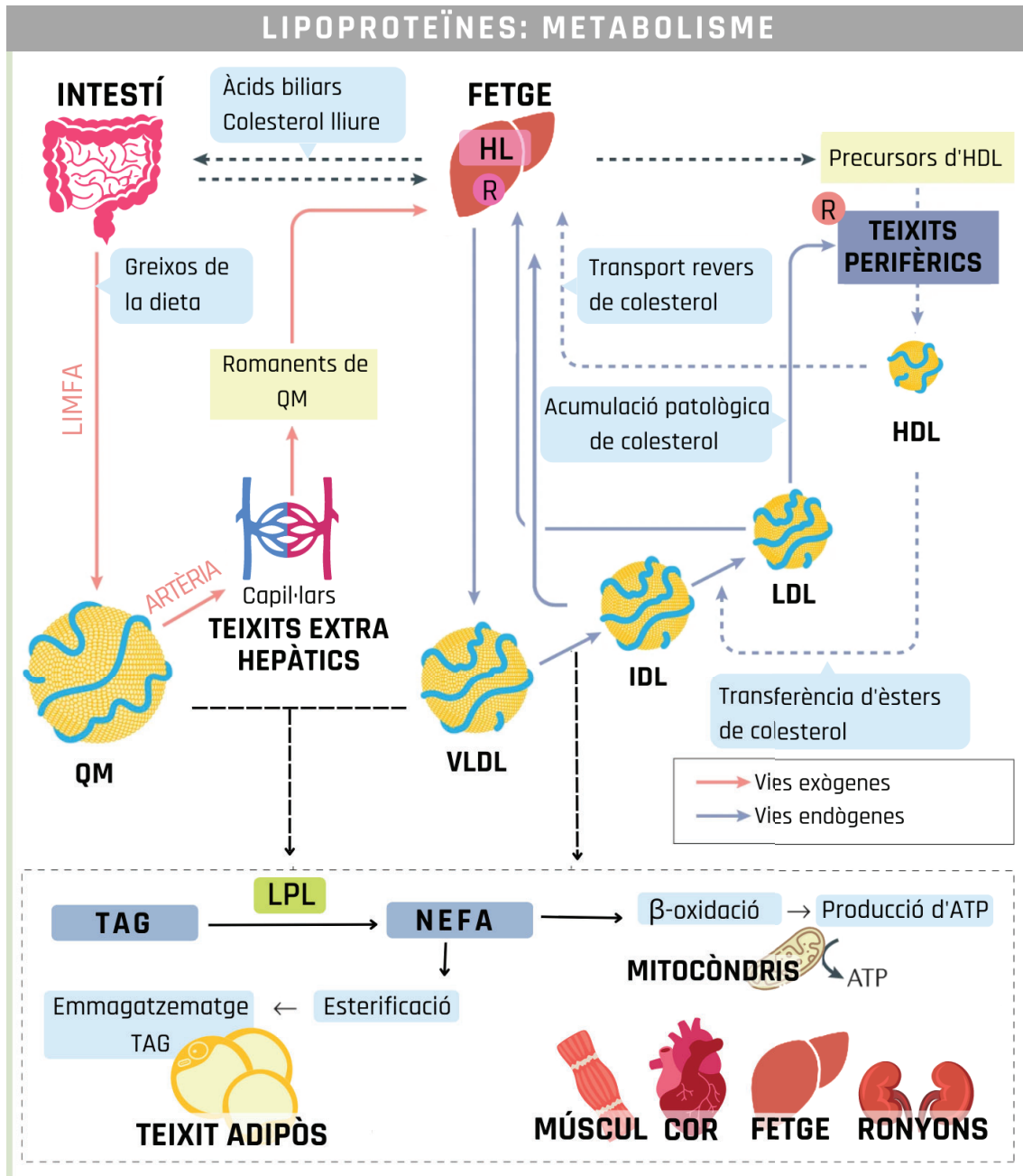


Figura 8: Metabolisme de les lipoproteïnes. En rosa s'observa la via exògena del metabolisme lipídic i en blau la via endògena. Abreviatures: HDL, lipoproteïnes d'alta densitat; HL, lipasa hepàtica; ILD, lipoproteïnes de densitat intermèdia; LDL, lipoproteïnes de baixa densitat; LPL, lipoproteïna lipasa; NEFA, àcids grassos no esterificats; QM, quilomicrons; R, receptors específics; TAG, triacilglicèrids; VLDL, lipoproteïnes de molt baixa densitat. FONT: adaptat de Heidi Noels et al.⁽⁶⁰⁾.

Per tant, les **IDL** són més petites (de 25 a 30 nm) i denses que les seves precursors, i tenen aproximadament la mateixa proporció de colesterol que de TAG. Com s'ha mencionat, la composició apolipoprotèica és similar a la de les VLDL. Es pensa que la meitat de les partícules d'IDL es converteixen en LDL

durant un complex procés que requereix l'acció de la lipasa hepàtica (HL). L'altra meitat es capturen al fetge per receptors que en reconeixen l'ApoE⁽⁶⁴⁾.

Les **LDL** originades són més petites (uns 20 nm de diàmetre) i molt riques en colesterol esterificat. Són el principal transportador de colesterol a la sang, i el distribueixen a les cèl·lules dels teixits perifèrics. A més, en condicions normals, condueixen part de l'excés de colesterol de tornada al fetge. Aquestes lipoproteïnes també regulen la biosíntesi del colesterol a través de la seva unió a receptors específics en teixits extrahepàtics⁽⁶⁴⁾.

Les **HDL** tenen un diàmetre de 8 a 12 nm. Estan formades majoritàriament per ApoA-I, i el seu contingut lipídic és gairebé tot colesterol i fosfolípids. La síntesi d'HDL depèn del catabolisme de les lipoproteïnes riques en TAG i de la síntesi d'ApoA-I no associada a lípids per part del fetge i de l'intestí.

La seva funció principal és vehiculitzar l'excés de colesterol des dels teixits perifèrics fins al fetge per al seu reciclatge o excreció en forma d'àcids biliars; aquest procés s'anomena transport revers del colesterol⁽⁶⁵⁾. El colesterol HDL obtingut serà esterificat per l'enzim lecitina-colesterol-acil-transferasa (LCAT), que requereix també la presència de l'ApoA-I com a cofactor. La mida de les HDL anirà creixent amb l'augment de colesterol esterificat al seu nucli. Finalment, el contingut en èsters de colesterol de les HDL s'allibera als hepatòcits^(62,66). Cal mencionar que entre diferents tipus de lipoproteïnes es produeix una transferència no específica de colesterol, procés catalitzat per la proteïna transferidora d'esters de colesterol (CETP).

Diabetis mellitus tipus 2

La T2DM és una malaltia crònica causada per alteracions metabòliques de múltiples etiologies. Es caracteritza per una hiperglucèmia crònica i trastorns en el metabolisme dels hidrats de carboni, els greixos i les proteïnes, com a resultat de defectes en la secreció d'insulina, en la seva acció o en ambdues. Amb el temps, la hiperglucèmia pot danyar greument molts òrgans i sistemes, especialment el vascular⁽⁶⁷⁾. La T2DM es diagnostica en base als valors plasmàtics de glucosa o d'hemoglobina glicada (HbA1c). Els valors normals de glucosa oscil·len entre 70 i 100 mg/dL. Si el resultat de l'anàlisi es correspon a una de les següents situacions (Taula 4), indica que la persona pateix T2DM.

Taula 4: Valors per al diagnòstic de T2DM. Abreviatures: HbA1c, hemoglobina glicada. FONT: OMS⁽⁶⁸⁾

Mesura	Valor de tall per al diagnòstic
En dejú en dues determinacions, glucosa en plasma	≥ 126 mg/dL
En qualsevol moment del dia, glucosa en plasma	≥ 200 mg/dL i acompanyats de símptomes característics
2 hores després de la ingesta d'un preparat de glucosa (75 g). Glucosa en plasma (vena)	≥ 200 mg/dL
2 hores després de la ingesta d'un preparat de glucosa (75 g). Glucosa en plasma (capil·lar)	≥ 220 mg/dL
HbA1c, correspon al valor mitjà de sucre en sang durant els darrers 2-3 mesos	≥ 6.5 %

Al 2016, 422 milions de persones tenien T2DM⁽⁶⁹⁾ i el sobrepès i l'obesitat eren la causa d'aproximadament el 44% dels casos⁽⁷⁰⁾. Es considera que l'aparició de la T2DM en l'obesitat té lloc arran de dos processos: per una banda, augmenta la resistència a la insulina (IR) de les cèl·lules del teixits muscular, adipós i/o hepàtic. El metabolisme de la glucosa i la senyalització de la insulina es veuen afectats per l'acumulació de greix (sobretot visceral i ectòpic), la lipotoxicitat i les molècules proinflamàtores que deriven de l'AT^(67,71). Per altra banda, les cèl·lules beta pancreàtiques intenten compensar la IR dels teixits augmentant la secreció d'insulina. La sobreproducció d'insulina per mantenir els nivells de glucosa en sang dins del rang de normalitat provoca fatiga al pàncrees i la conseqüent reducció de la capacitat de producció d'insulina⁽⁷²⁾. Al seu torn, els alts nivells circulants d'insulina en T2DM contribueixen a un estat proinflamatori⁽⁷³⁾.

1.2. Malalties cardiovasculars: ateroesclosi

L'ateroesclosi és la forma més freqüent de l'arterioesclosi, un terme general que inclou diversos trastorns responsables de danyar les artèries. L'ateroesclosi n'és també la forma més greu i clínicament rellevant, ja que pot donar lloc a manifestacions cardiovasculars agudes⁽⁷⁴⁾.

L'ateroesclosi és una malaltia inflamatòria crònica com l'obesitat. Es caracteritza per l'engruiximent, l'enduriment i la pèrdua d'elasticitat dels vasos a causa del dipòsit d'ateromes que n'envaeixen la llum. Les plaques ateromatoses o ateromes són les lesions bàsiques a les artèries definides com una lesió focal formada principalment per lípids, teixit fibrós i cèl·lules inflamatòries que passa per diferents fases o estadis⁽⁷⁵⁾. Els ateromes van reduint la llum vascular i en debiliten les parets. Generalment, l'ateroesclosi es complica quan hi ha una fissura, una erosió o el trencament de la placa que causa un trombe en la superfície. Depenent de les artèries afectades, es poden desenvolupar diferents malalties, com la malaltia arterial coronària, l'accident cerebrovascular, la malaltia arterial perifèrica i la malaltia renal crònica⁽⁷⁴⁾. Així, l'ateroesclosi no és només una malaltia en sí mateixa sinó que a més és un element clau en el desenvolupament de la patogènia dels infarts de miocardi i cerebral.

L'ateroesclosi es desenvolupa de manera lenta, complexa, progressiva i sovint intermitent, amb períodes d'inactivitat i altres de ràpida evolució. S'inicia amb la formació de la placa, un llarg període silent i asimptomàtic; aquesta condició és l'anomenada ateroesclosi subclínica, i és altament prevalent en la població adulta. En general, pot romandre clínicament indetectable al llarg de la vida però quan l'ateroma esdevé inestable pot donar lloc a esdeveniments aguts greus, i associar-se a una major mortalitat cardiovascular⁽⁷⁶⁾.

1.2.1. Epidemiologia de les malalties cardiovasculars

Les malalties cardiovasculars engloben totes aquelles malalties que afecten el cor o els vasos sanguinis, l'ateroesclosi és de les més freqüents, per això la seva epidemiologia sovint hi va lligada.

Durant les últimes dècades s'ha documentat un augment important en les malalties cardiovasculars. Aquest canvi epidemiològic s'ha associat en part a variacions en l'estil de vida i en la dieta⁽⁷⁷⁾ i a un augment dels factors de risc⁽⁷⁸⁾.

A escala global, la prevalença de malalties cardiovasculars per càpita més alta es troba als països d'Europa de l'est i l'Àsia central (Figura 9).

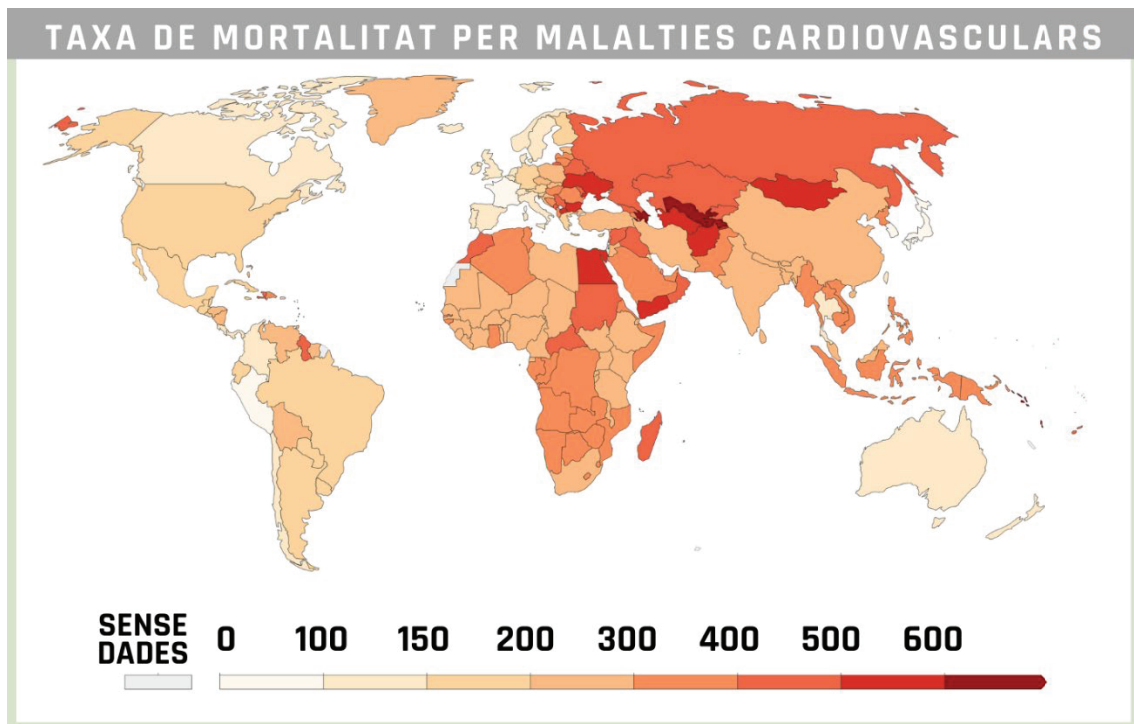


Figura 9: Mapa sobre la taxa de mortalitat per malaltia cardiovascular al món al 2019, estandarditzat per edat. Nombre de morts anuals per cada 100,000 persones
FONT: adaptat de *Global Burden of Disease Collaborative Network*⁽⁷⁹⁾

Les malalties cardiovasculars són la principal causa de mort al món i ho han estat durant els últims 15 anys. Al 2019 van ocasionar 17.9 milions de defuncions, que representen el 32% de morts al món⁽⁸⁰⁾. En concret, la malaltia ateroscleròtica inclou dues condicions majors: la cardiopatia isquèmica i la malaltia cerebrovascular (majoritàriament infart isquèmic). Aquestes són la primera i la tercera causa de mort al món, representant el 84.5% de les morts cardiovasculars i el 28.2% de morts en general⁽⁸¹⁾.

1.2.2. Tractament de l'ateroesclerosi

Els canvis en l'estil de vida, com ara una dieta saludable i fer exercici físic, són el primer pas en el tractament de l'ateroesclerosi i permeten aconseguir millores i/o beneficis clínics. Per tant, si es detecta a temps, l'ateroesclerosi és un procés tractable i la progressió de lesions es pot estabilitzar⁽⁸²⁾. No obstant, sovint és necessari introduir fàrmacs per reduir o revertir els efectes de l'ateroesclerosi. A la Taula 5 es resumeixen els més rellevants:

Taula 5: Fàrmacs per al tractament de l'ateroesclerosi.

Tipus	Acció
Anticoagulants	Interfereixen en les proteïnes implicades en el procés de coagulació. Redueixen el risc d'acumulació de plaquetes a les artèries estretes, eviten que es formin coàguls i la formació de futures obstruccions. En són exemples la warfarina i l'heparina ⁽⁸³⁾ .
Antiagregants	Es tracta de medicaments per evitar que es formin coàguls, però en aquest cas interfereixen en la unió de les plaquetes. L'aspirina, el clopidogrel o la ticlopidina en són exemples ⁽⁸⁴⁾ .
Hipolipemians	Estatines: disminueixen els nivells de cLDL en sang i la producció de colesterol al fetge ^(85,86) .
	Resines d'unió a àcid biliar: disminueixen el cLDL. Absorbeixen l'àcid biliar a l'intestí, el que acaba induint l'expressió del receptor d'LDL per millorar la captació del colesterol ⁽⁸⁷⁾ .
	Inhibidors de l'absorció intestinal del colesterol provinent de la dieta i el biliar, com l'ezetimibe. El fetge respon sobreexpressant els receptors d'LDL per disminuir-ne la quantitat en sang ⁽⁸⁸⁾ .
	Inhibidors de la proteïna convertasa subtilisina/kexina tipus 9 (PCSK9): PCSK9 se secreta als hepatòcits i s'uneix als receptors d'LDL, promovent la seva internalització i degradació. Així, la seva inhibició dona lloc a una major expressió dels receptors i, per tant, millora l'eliminació del cLDL del plasma ⁽⁸⁷⁾ .
Antihipertensius	Fibrats: alteren el metabolisme lipídic activant el <i>peroxisome proliferator-activated receptor-alpha</i> (PPAR α). Redueixen els TAG en plasma i incrementen el cHDL promovent la síntesi d'ApoA. Són fibrats el clofibrat (Atromid-S) o el gemfibrozil ^(87,89) .
	Consisteixen en un grup de diferents fàrmacs: diürètics, bloquejadors adrenèrgics alfa, bloquejadors dels canals de calci, inhibidors de l'enzim convertidor d'angiotensina, i bloquejadors dels receptors de l'angiotensina II. En general disminueixen la contracció dels vasos i redueixen la quantitat de calci retinguda als ronyons ⁽⁹⁰⁾ .

1.2.3. Factors de risc cardiovascular

Es defineix com a factor de risc cardiovascular qualsevol condició biològica, estil de vida o hàbit adquirit que es troba amb més freqüència en individus que presenten o han presentat alguna cardiopatia respecte a la resta de població⁽⁷⁴⁾. Per tant, la seva presència implica un augment de la probabilitat de patir malalties cardiovasculars. Com que molts són observables o identificables abans que es produeixi la manifestació aguda, el coneixement i el control d'aquests factors són indispensables per a la prevenció primària⁽⁹¹⁾.

Els factors de risc cardiovascular són l'edat, el sexe, els antecedents d'accident cardiovascular a l'història familiar, el tabaquisme, l'obesitat, les DLP, l'HTA, la T2DM i el sedentarisme. Nombrosos estudis epidemiològics descriuen el seu paper en les malalties cardiovasculars i es disposa de dades abundants que donen suport al seu paper en l'ateroesclerosi. Tot i que els mecanismes d'acció concrets no estan sempre clars, està establert que multipliquen el risc causant o predisposant a la malaltia ateroscleròtica i en són predictius. En molts casos els factors de risc actuen amb independència els uns dels altres i els seus efectes són sumatoris⁽⁹²⁾.

La identificació dels factors de risc sorgeix de la combinació d'estudis experimentals amb les dades extretes d'estudis epidemiològics realitzats a la població general. Els més importants en l'àmbit del risc cardiovascular han estat l'estudi Framingham⁽⁹³⁾ i el projecte SCORE⁽⁹⁴⁾. A continuació es destaquen alguns dels factors de risc més rellevants:

Edat

Tot i que l'edat no té una relació directa amb les malalties cardiovasculars, s'associa a un augment notable de la prevalença⁽⁷⁷⁾. Amb l'envelliment, la regulació de l'homeòstasi de l'organisme va perdent eficàcia: els teixits perden elasticitat i els sistemes immunitari i antioxidant es tornen disfuncionals^(95,96).

Sexe

La prevalença de l'ateroesclerosi és major en homes, sobre tot en la població més jove: els homes menors de 50 anys tenen una major incidència d'esdeveniments cardiovasculars que les dones de la mateixa edat⁽⁹⁷⁾. Aquest fet l'explica l'efecte protector dels estrògens als vasos sanguinis i al sistema cardiovascular en general⁽⁹⁸⁾.

Hipertensió

L'HTA és un factor de risc de malalties cardiovasculars independent de l'edat o del sexe. Té un paper important tant en el desenvolupament de l'ateroesclerosi com en la seva progressió⁽⁹⁹⁻¹⁰¹⁾. S'estima que, de mitjana, cada 20 mmHg per sobre de la pressió sistòlica normal i cada 10 mmHg més de pressió diastòlica, s'associen al doble de risc vascular en tot el rang de pressions⁽¹⁰²⁾.

L'augment de la rigidesa arterial limita l'elasticitat de la paret, amb la qual cosa incrementa també la velocitat del flux sanguini. Per tant, la velocitat del flux expulsat pel cor a cada batec és directament proporcional al grau de rigidesa arterial i invers al grau d'elasticitat⁽¹⁰³⁾. Així, quan la tensió és alta de manera sostinguda pot incrementar l'activitat del cor i donar lloc a hipertròfia del ventricle esquerre. Com a conseqüència, tant el cor com les artèries són més propensos a patir una lesió cardiovascular^(104,105). A més, la pressió alta pot danyar l'endoteli vascular i augmentar-ne la permeabilitat, estimular la proliferació de cèl·lules musculars llises o induir al trencament d'una placa d'ateroma vulnerable⁽¹⁰⁶⁾. No obstant, reduccions de 5 mmHg en la pressió arterial diastòlica poden reduir un 23% la mortalitat cardiovascular en 5 anys⁽⁹⁹⁾.

Diabetis mellitus tipus 2

La relació entre la T2DM i el procés aterogènic és directa i causal, però també molt complexa. De manera independent, la T2DM multiplica el risc de patir malalties cardiovasculars entre dues i quatre vegades respecte a individus normoglicèmics⁽¹⁰¹⁾. Quan l'obesitat i la T2DM coexisteixen, la malaltia cardiovascular assoleix una prevalença del 19.2%^(107,108) i augmenta la mortalitat per infart significativament en comparació amb individus sense T2DM⁽¹⁰⁹⁾. En les persones amb diabetis, l'ateroesclerosi sol ser més precoç, distal i difusa, amb una evolució més agressiva i amb menys possibilitats terapèutiques⁽¹¹⁰⁾. A més, el risc cardiovascular en la T2DM ve determinat per la presència d'altres factors de risc com l'HTA o la DLP. Tanmateix, la diabetis en sí mateixa s'associa amb dany, disfunció i/o fallada de diferents òrgans o sistemes, especialment ronyons, cor i vasos sanguinis⁽¹¹¹⁾.

Els processos patogènics principals en la T2DM són la hiperglucèmia, la IR i la hiperinsulinèmia. Tots tres estan relacionats amb alteracions hemodinàmiques i de la coagulació, així com amb anormalitats lipídiques^(112,113). En concret, poden alterar la funció plaquetària i la seva interacció amb la fibrina, afavorint així un estat procoagulant que predisposa a la formació de trombes^(74,112). Els nivells d'HbA1c s'associen de manera positiva amb el risc cardiovascular^(114,115). Els processos patològics associats a la T2DM també poden augmentar el risc cardiovascular causant un increment dels TAG plasmàtics i de les VLDL, o una disminució del cHDL⁽¹¹⁴⁾.

Dislipèmia

S'ha demostrat que la DLP té un paper important en l'ateroesclerosi, ja que afavoreix el dipòsit de lípids a les parets arterials i per tant l'aparició de les plaques d'ateroma⁽⁹⁹⁾. La DLP causa la majoria de morts degudes a malalties de l'aparell circulatori⁽¹¹⁶⁾, pel que el tractament de la DLP pot reduir el risc cardiovascular fins a un 30% en 5 anys⁽¹¹⁷⁾.

La combinació d'alts nivells d'LDL petites i denses, de concentracions baixes de cHDL i de nivells alts de TAG s'anomena DLP aterogènica i és més prevalent en persones amb obesitat⁽¹¹⁷⁾. En concret, les LDL s'han establert com a principals causants de la malaltia cardiovascular d'origen ateroescleròtic^(118,119). Els mecanismes aterogènics de les partícules LDL es concreten a la secció 1.2.6⁽¹²⁰⁾⁽¹²¹⁾. Tant la reducció dels nivells de colesterol total com de cLDL disminueixen el risc cardiovascular i directament la incidència i mortalitat per malaltia cardiovascular⁽¹¹⁷⁾.

Recentment les VLDL també s'han proposat com a partícules aterogèniques i com a dianes potencials del tractament hipolipemiant⁽¹²²⁾. El colesterol present en aquestes partícules, juntament amb el de romanents, el cIDL i el cLDL, rep el nom de colesterol no-HDL.

Al contrari, el transport revers del colesterol dut a terme per les HDL és crucial en la prevenció de l'ateroesclerosi i un dels mecanismes ne els que radiquen les propietats antiaterogèniques de les HDL. Així, les HDL estan implicades en la prevenció de l'oxidació de les LDL, tenen activitat antiinflamatòria i participen en la reparació endotelial⁽⁹⁹⁾.

El cHDL baix, sovint característic de la DLP i associat a l'obesitat severa, és un predictor i un factor de risc cardiovascular. S'ha descrit que els nivells de cHDL correlacionen de manera independent i inversa amb la presència de malaltia cardiovascular, confirmant que les lipoproteïnes d'alta densitat constitueixen un factor protector antiaterogènic⁽¹²³⁾.

Així mateix, l'elevació dels TAG plasmàtics està associada a un augment de la morbimortalitat cardiovascular, per la qual cosa es considera també un factor de risc. La hipertriglicèridèmia sol estar associada a alteracions qualitatives de les LDL, especialment quan són petites i denses, i a la disminució d'HDL. També s'associa a estats d'IR, durant els quals té lloc un augment de l'alliberament de NEFA des dels adipòcits, el que indueix la síntesi hepàtica de TAG i estimula la producció d'Apo B⁽¹²⁴⁾. Els TAG elevats estan involucrats en altres processos considerats proaterogènics com ara el dipòsit lipídic a l'íntima arterial, la disfunció endotelial, l'estimulació de molècules proinflamatòries, l'increment de factors de coagulació o el deteriorament de la fibrinòlisi per augment de l'inhibidor de l'activador del plasminogen 1 (PAI-1)⁽¹²⁵⁾.

Obesitat

L'obesitat presenta efectes adversos a nivell cardiovascular i la seva associació amb la malaltia coronària és complexa. Com s'ha esmentat, l'excés de pes està relacionat amb altres problemes de salut, com ara la T2DM, la DLP o l'HTA, que al seu torn augmenten també el risc cardiovascular. Els individus amb obesitat són més propensos a desenvolupar HTA, tenen més risc d'hipertrofia ventricular i tenen els nivells de glucosa i lípids plasmàtics alterats negativament (per exemple els TAG augmentats i/o les HDL baixes)⁽¹²⁶⁾. A més, l'obesitat és en sí mateixa un factor de risc, s'ha descrit que un increment en el BMI correspon a un augment del risc relatiu de mort per accident cardiovascular tant en individus adults⁽¹²⁷⁾.

1.2.4. El sistema cardiovascular: vasos sanguinis i endoteli vascular

L'obesitat severa pot causar afectacions greus al sistema cardiovascular. El sistema cardiovascular està format pel cor i els vasos sanguinis: artèries, venes i capil·lars. En general, té la funció de transportar nutrients, metabòlits i oxigen i de rebre substàncies nocives per a transportar-les als òrgans excretors⁽¹²⁸⁾. Les artèries duen la sang des del cor fins als teixits de tot l'organisme, el diàmetre de la seva llum oscil·la d'1 mm a 3 cm i són els vasos amb la paret més gruixuda. La sang retorna al cor a través de les venes, que són més fines (sobretot la capa muscular), ja que no necessiten suportar tanta pressió⁽¹²⁸⁾.

L'estructura dels vasos sanguinis és molt important per possibilitar les seves funcions. La paret dels vasos és tubular, flexible i adaptable a certes condicions fisiològiques. Tant les venes com les artèries estan formades per tres capes concèntriques (Figura 10):

- La capa externa de la paret dels vasos és la túnica adventícia. Està formada per teixit connectiu, integrat per fibres de col·lagen longitudinals, fibres elàstiques i fibroblasts⁽¹²⁹⁾. L'adventícia està involucrada en la resposta immunitària i inflamatòria, en el desenvolupament i la remodelació vascular, en la senyalització cel·lular i en la regulació del to vascular. Aquesta capa conté també els *vasa vasorum* (VV), que conformen la xarxa de petits vasos sanguinis fisiològics que irriguen les parets dels vasos de gran calibre. La funció principal dels VV és aportar nutrients i oxigen a les capes que no poden rebre'ls a través de la llum⁽¹³⁰⁾.
- La túnica mitja és la capa central. Constitueix la part més gruixuda de les artèries i està formada per cèl·lules musculars llises vasculares (VSMC) i teixit elàstic. La capa de teixit elàstic es troba a les dues bandes de la paret muscular: la lamina elàstica interna i l'externa, que separa la túnica mitja de l'adventícia⁽¹²⁹⁾⁽¹³¹⁾.

- Finalment, la capa interna, en contacte amb la sang, s'anomena túnica íntima. D'exterior a interior, la conformen una capa molt fina de teixit connectiu laxe amb alguna fibra muscular llisa, la membrana basal i a sobre una capa de cèl·lules endotelials⁽¹²⁹⁾. La membrana basal està formada per col·lagen, laminines, proteoglicans, fibronectina i el factor von Willebrand (glicoproteïna implicada en l'adhesió de les plaquetes)⁽¹³²⁾.

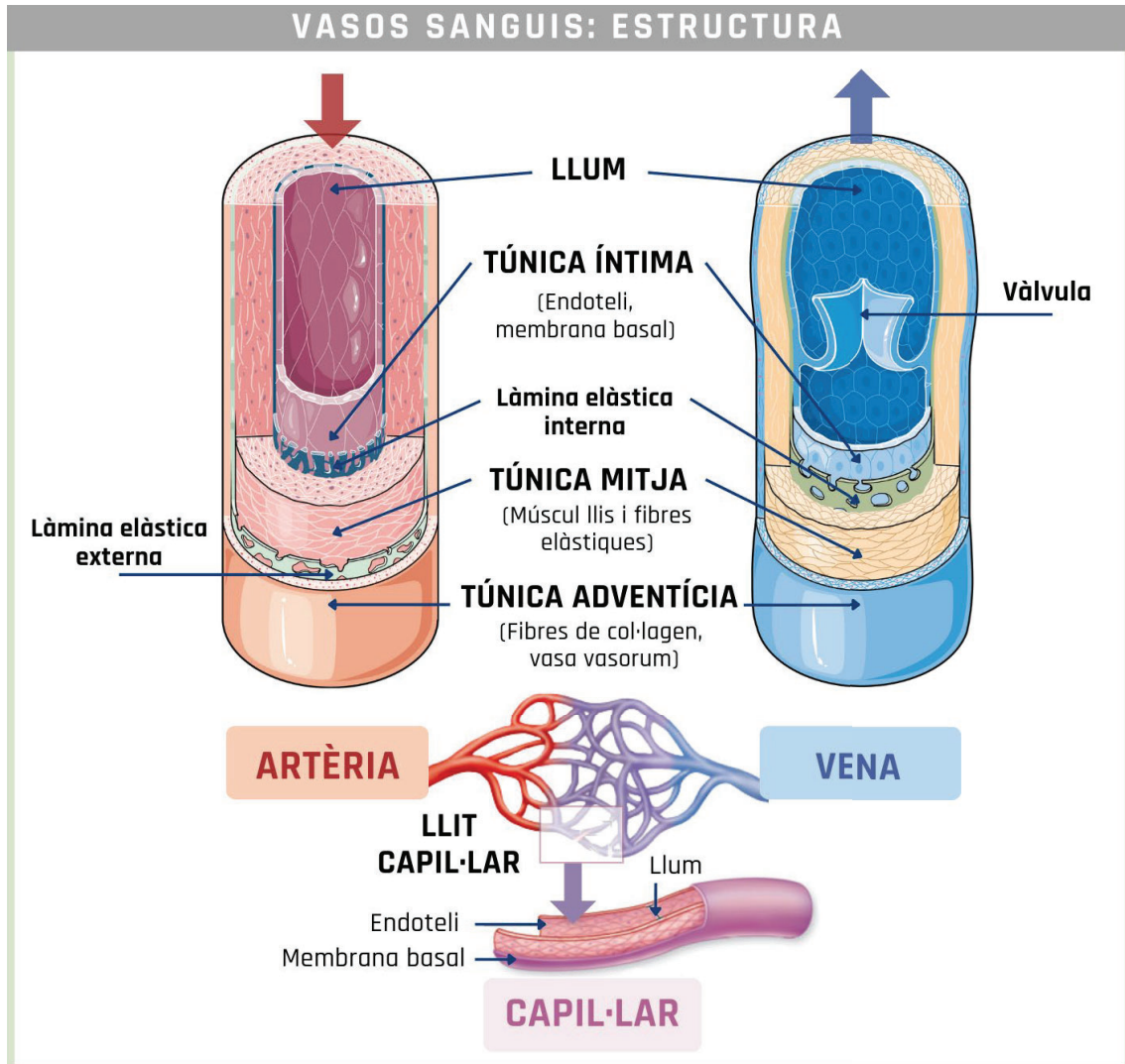


Figura 10: Estructura dels vasos sanguinis. FONT: Dibuixos de: Servier - Drawing Layers of artery - no labels a AnatomyTOOL.org per Servier Medical Art, llicència: Creative Commons Attribution CC BY 4.0⁽¹³³⁾.

L'endoteli vascular forma part de la capa íntima i conforma una barrera semipermeable amb unions intercel·lulars que regula el pas de molècules per la paret vascular. La seva funció principal és mantenir l'homeòstasi vascular, el que implica preservar un balanç altament regulat entre un estat vasodilatador (freqüentment associat amb un estat antioxidant i antiinflamatori), i un estat vasoconstrictor (sovint relacionat amb un estat prooxidant, proinflamatori i procoagulant)⁽¹³¹⁾. A més, entre les activitats més importants de l'endoteli es troben la preservació d'un estat antitrombòtic, la participació en la resposta immunitària i inflamatòria i la regulació de la permeabilitat vascular (Figura 11).

Les cèl·lules endotelials alliberen una gran varietat de substàncies, incloent les que regulen l'angiogènesi, el procés fisiològic consistent en la formació de nous vasos a partir dels vasos sanguinis existents. Els principals factors proangiogènics són el **VEGF** (factor de creixement de l'endoteli vascular) i l'angiopoietina (Ang) 1, mentre que l'**angiostatina** inhibeix l'angiogènesi. El VEGF és una proteïna senyalitzadora implicada en la vasodilatació i permeabilitat vasculars⁽¹³⁴⁾. Les **Ang1** i **2** formen un sistema de senyalització involucrat en el manteniment, el creixement i l'estabilització dels vasos sanguinis. A més, són moduladors de la permeabilitat vascular i la funció barrera⁽¹³⁵⁾. El factor neurotròfic derivat del cervell (**BDNF**), una proteïna de la família de les neurotrofines^(136,137), també indueix l'angiogènesi a teixits isquèmics, a les artèries centrals, al múscul esquelètic cardíac, a la pell i a la vasculatura perifèrica⁽¹³⁸⁾. Per contra, l'angiostatina és un inhibidor endogen de l'angiogènesi, el seu mecanisme d'acció implica la inhibició de la migració de cèl·lules endotelials i de la proliferació, així com la inducció de l'apoptosi⁽¹³⁹⁾.

Per regular i mantenir el to vascular, la pressió sanguínia i el flux sanguini local són necessàries substàncies vasodilatadores com la trombomodulina (TM) i l'òxid nítric (NO), entre altres⁽¹⁴⁰⁾. La **TM** és una glicoproteïna expressada a la superfície cel·lular i sintetitzada principalment per les cèl·lules de l'endoteli vascular. És un cofactor crític per a l'activació de la proteïna C (a través de la trombina), que té propietats anticoagulants i antiinflamatòries⁽¹⁴¹⁾. L'**NO**, sintetitzat per l'òxid nítric sintasa endotelial (eNOS) a partir de l'L-arginina, té un paper important en la regulació local del to vascular ja que a més de ser vasodilatador té propietats antiproliferatives, antioxidants i antiinflamatòries⁽¹⁴²⁾. L'estat vasoconstrictor és mediat per la producció de molècules com l'endotelina

1 (ET1), l'angiotensina II i el tromboxà A2. L'ET1 és un dels vasoconstrictors endògens més potents. Principalment el produeixen les cèl·lules endotelials, tot i que també ho fan en menor part les VSMC, els leucòcits i els macròfags⁽¹⁴³⁾.

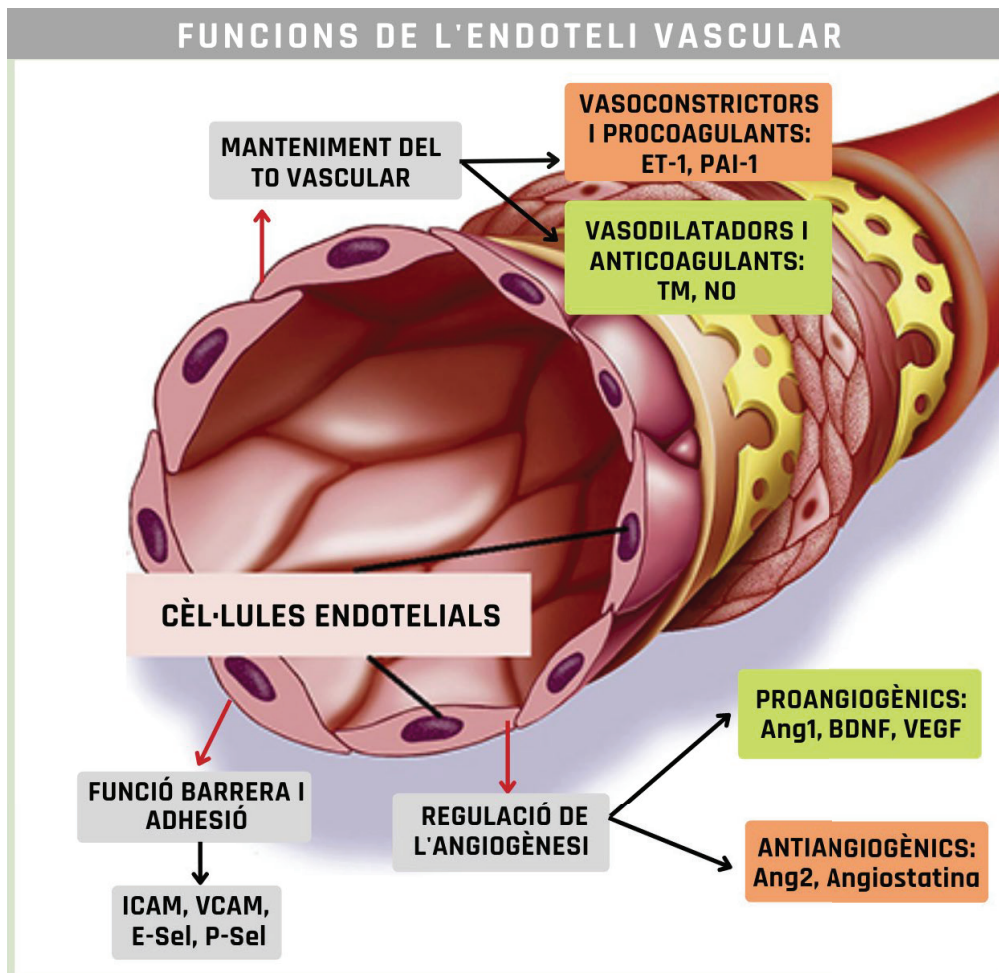


Figura 11: Funcions de l'endoteli vascular. Abreviatures: Ang1, angiopoietina 1; Ang2, angiopoietina 2; BDNF, factor neurotròfic derivat del cervell; E-sel, selectina endotelial; ET1, endotelina 1; ICAM, molècules d'adhesió intracel·lular; NO, òxid nítric; P-sel, selectina present a les plaquetes; TM, trombomodulina; VCAM, molècules d'adhesió de cèl·lules vasculars; VEGF, factor de creixement de l'endoteli vascular.

A més, l'endoteli sa és antiadherent i actua com a barrera selectiva per a fluids i soluts. Aquesta funció ve donada per la integritat de l'estructura endotelial, que passa per canvis constants al citoesquelet, als complexos d'unió entre cèl·lules i a les unions de les cèl·lules a la matriu cel·lular i a la membrana basal. La regulació apropiada d'aquests esdeveniments manté una permeabilitat baixa

i selectiva sota condicions fisiològiques normals⁽¹⁴⁴⁾. El glicocàlix és una part important de la barrera vascular. Consisteix en una estructura sense forma definida que cobreix la capa luminal de les cèl·lules endotelials formada per glicoproteïnes, glicosaminoglicans i proteoglicans. Entre les seves funcions es troben la regulació de la permeabilitat vascular i la transducció de les forces mecàniques de tensió i les cascades de fibrinòlisi i coagulació vascular⁽¹⁴⁵⁾. No obstant, en presència de citoquines proinflamàtòries, s'expressen un conjunt de receptors anomenats molècules d'adhesió, que intervindran en el reclutament i l'extravasació de leucòcits a l'endoteli⁽¹⁴⁶⁾.

1.2.5. Patogènesi de l'ateroesclerosi

L'ateroesclerosi involucra múltiples processos fisiopatològics, tant a nivell cel·lular com molecular. Principalment hi participen les cèl·lules endotelials, els leucòcits i les VSMC⁽⁷⁴⁾. Els factors de risc cardiovascular i la genètica contribueixen també al procés ateroscleròtic, sobre tot en la seva fase inicial.

Disfunció endotelial com a etapa inicial de l'aterogènesi

La disfunció endotelial és una de les primeres etapes de la formació de la placa d'ateroma i implica la pèrdua de la capacitat reguladora de les cèl·lules endotelials davant una agressió crònica que provoca que s'activin. L'activació d'aquestes cèl·lules es tradueix en la pèrdua del fenotip quiescent i involucra la resposta de mecanismes de defensa, resultant en l'expressió de quimioquines, citoquines i molècules d'adhesió que interactuen amb leucòcits i plaquetes⁽¹⁴⁷⁾. En conjunt, l'endoteli disfuncional s'acompanya de característiques proinflamàtòries, prooxidants, proliferatives, procoagulants, vasoconstrictores i d'adhesió vascular.

En general, aquesta resposta inflamatòria promou la generació d'espècies reactives de l'oxigen (ROS), que al seu torn estimulen la infiltració de cèl·lules immunitàries a l'espai intersticial, on continua la generació de ROS. Seguidament s'estimula al fetge l'alliberament de proteïnes de fase aguda.

És durant aquestes etapes que l'endoteli perd la seva funció reguladora i pot aparèixer necrosi, apoptosi i desdiferenciació de les cèl·lules epitelials, el que estimula l'angiogènesi⁽¹⁴⁸⁾.

L'alteració del balanç dinàmic entre processos d'angiogènesi i de regressió vascular pot afectar la densitat microvascular i comportar un decreixement del subministrament de sang al miocardi, la disminució de la capacitat d'adaptació a la hipòxia i dany tissular isquèmic. A més, l'angiogènesi alterada també pot afectar la recuperació posterior al dany tissular, el que probablement contribueix a una pitjor evolució de la malaltia cardiovascular, ja sigui abans o després de l'esdeveniment agut^(149,150).

Una condició patològica molt important de la disfunció endotelial és l'afectació del to vascular, que resulta del desequilibri entre els estats trombòtics i fibrinolítics; i entre els vasodilatadors i vasoconstrictors. Aquest desequilibri dona lloc a alteracions en la fluïdesa de la sang i facilita la formació de l'ateroma⁽¹⁵¹⁾.

Quan les cèl·lules endotelials s'activen en resposta a la inflamació, la propietat antiadherent de l'endoteli també es veu compromesa. Aquestes cèl·lules promouen l'expressió de receptors de quimioquines i de molècules d'adhesió cel·lular (CAM)⁽¹⁴⁸⁾, que s'han proposat com a marcadors d'activació endotelial. Les molècules d'adhesió intracel·lular (**ICAM**), i les molècules d'adhesió de cèl·lules vasculares (**VCAM**) participen en l'activació i migració dels leucòcits als teixits. Les **integrines** també tenen un paper important en l'adhesió. Aquestes participen en les interaccions entre cèl·lules i entre cèl·lules i matriu. Pertanyen a aquest grup la glicoproteïna IIb-IIIa (receptor del fibrinogen), el receptor de vitronectina, el receptor de fibronectina i el receptor de col·lagen⁽¹⁵²⁾. Finalment, les selectines són molècules d'adhesió i glicoproteïnes integrals de membrana que s'exposen a la superfície cel·lular, on interaccionen amb leucòcits o lectines i intervenen en el *rolling* dels leucòcits⁽¹⁵³⁾. Es poden diferenciar l'**E-sel** (selectina endotelial), la **P-sel** (selectina present a les plaquetes i cèl·lules endotelials) i l'**L-sel** (selectina leucocitària)⁽¹⁵⁴⁾.

Tant la disfunció dels processos exposats fins aquí com la presència de factors de risc cardiovasculars poden conduir a l'aparició de dany físic vascular i a la disfunció mecànica de l'endoteli. El dany endotelial es pot iniciar en etapes tan primerenques com la infància, quan no hi ha malaltia clínica però sí canvis

histopatològics, i culminar en irreversible resultant en malaltia vascular perifèrica, coronària o cerebral. Les lesions comencen a l'interior de l'íntima, normalment en llocs de bifurcació o en zones amb canvis sobtats de velocitat i de direcció del flux sanguini (flux turbulent)⁽¹⁵⁵⁾. Sol ser en aquests sectors dels vasos on, prèviament a la formació de la placa d'ateroma, té lloc un engruiximent de les capes íntima i mitjana. Aquest augment del gruix íntima-mitjana carotidi o **clMT**, s'associa al risc cardiovascular i ha estat proposat com a paràmetre marcador⁽¹⁵⁶⁾. Per monitoritzar de manera repetida l'estat de les caròtides, l'àrea més reproducible és la paret distal de la caròtida comú, 1 cm per sota de la bifurcació que dona lloc a les caròtides dreta i esquerra⁽¹⁵⁷⁾.

A més de l'engruiximent de les artèries, els **VV** originats *de novo* des de la capa adventícia també tenen un paper important en la iniciació i progressió del procés ateroescleròtic⁽¹⁵⁷⁾. El desequilibri en l'angiogènesi, la glucèmia i la inflamació de baix grau associada a l'obesitat, sumats a altres factors de risc, afecta especialment a aquests petits vasos, fins al punt que en poden aparèixer d'immadurs i fràgils. Així, els VV perden la seva funció de provisió d'oxigen i nutrients⁽¹⁵⁸⁾.

Un altre factor de dany vascular físic que pot acompanyar la formació de la placa és la rigidesa arterial, que es determina mitjançant paràmetres com l'índex d'augmentació (AI) o l'Índex d'Hiperèmia Reactiva (RHI)⁽¹⁵⁹⁾. La mesura de l'ona de pressió arterial a nivell central permet determinar l'**AI** (Figura 12). Aquesta està formada per una ona incident, provinent de l'ejecció sistòlica, i una ona reflexa, que s'origina en múltiples reflexions perifèriques del sistema arterial. Per tant, després del primer augment de pressió originat del volum d'ejecció cardíac, es produeix un segon ascens, producte del reflex de l'ona de pols. En individus sans, amb artèries elàstiques, aquesta segona ona té lloc en diàstole, amb la qual cosa no influeix en la pressió sistòlica màxima. En canvi, quan els grans vasos tenen més rigidesa, l'ona reflexa es transmet abans a l'aorta (en sístole) de manera que augmenta el pic màxim de pressió sistòlica. La proporció d'aquest augment respecte a la pressió total és el que es coneix com a AI. Així, aquest índex es defineix com la relació entre el segon i el primer pic sistòlics i s'expressa com a percentatge del pols, on els valors alts indiquen més rigidesa⁽¹⁶⁰⁾.

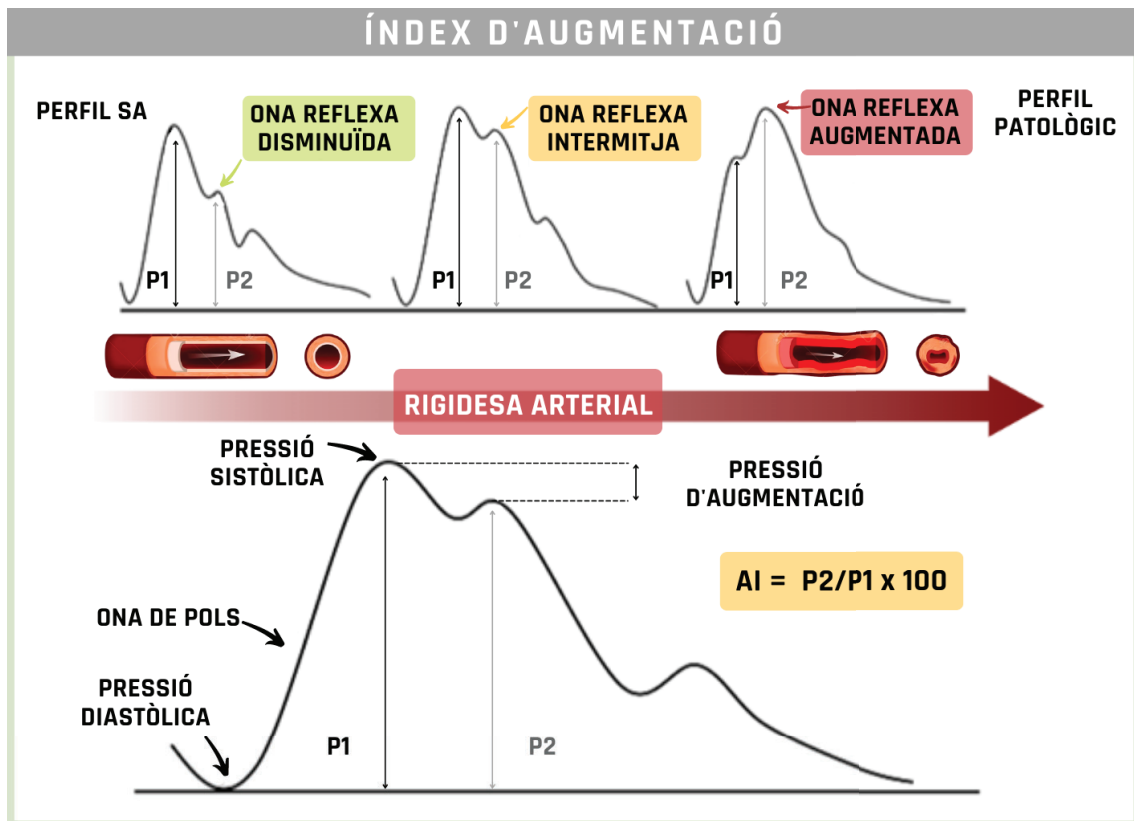


Figura 12: Esquema representatiu de les variables que determinen l'índex d'augmentació. P1 representa l'ona sistòlica mentre P2 representa l'ona reflexa. Abreviatures: AI, índex d'augmentació. FONT: adaptat de Hughes A. et al.⁽¹⁶¹⁾.

Adicionalment, l'RHI mesura el to arterial perifèric, en concret l'augment del volum de sang en una regió quan el flux sanguini ha estat temporalment obstruït per oclusió (Figura 13). El dispositiu EndoPAT detecta canvis en la pressió que indiquen alteracions en el volum sanguini arterial. L'RHI es calcula com la ràtio entre els valors post i pre oclusió. En individus amb disfunció vascular, l'RHI es veuria atenuat, ja que tindrien una pitjor resposta després de l'oclusió. Es consideren valors normals o indicadors de funció endotelial conservada aquells per sobre d'1.67 UA (unitats arbitràries), i patològics quan són inferiors o iguals a l'esmentat valor^(159,162). L'RHI s'ha descrit com a predictor de morbiditat i mortalitat cardiovascular⁽¹⁶³⁾.

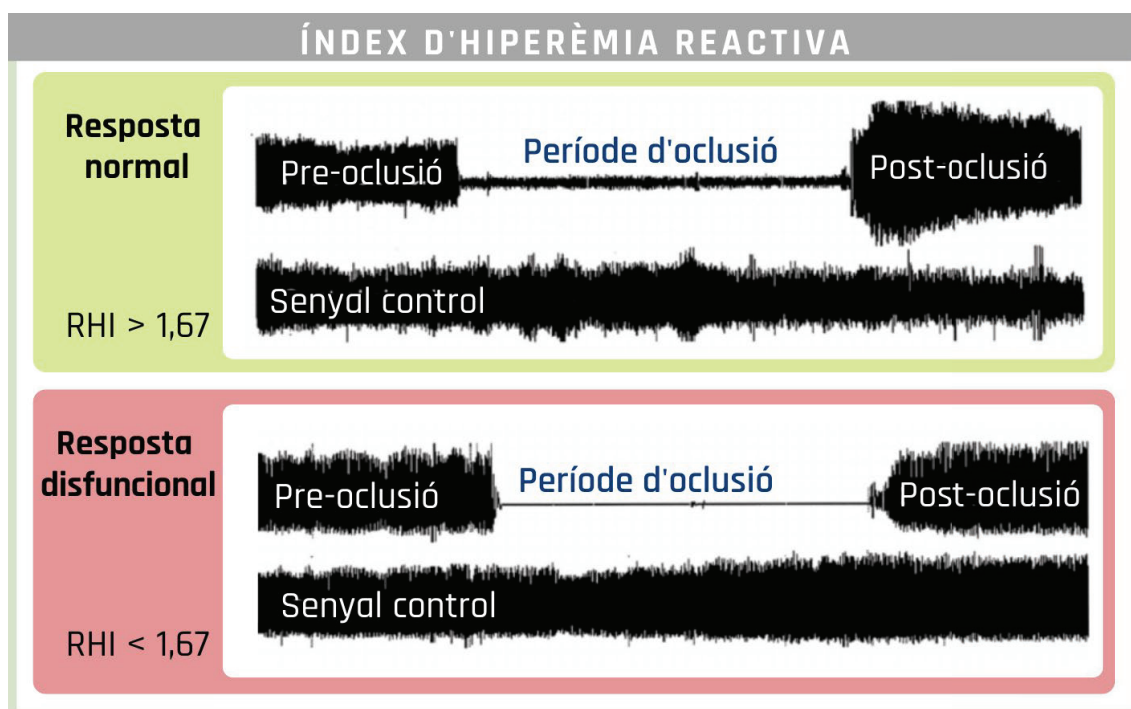


Figura 13: Exemple de mesures d'RHI amb resposta a la hiperèmia reactiva normal i disfuncional. Abreviatures: RHI, índex d'hiperèmia reactiva. FONT: Adaptat de Piero O.Bonetti et al.⁽¹⁶⁴⁾.

Procés de formació de la placa

L'ateroesclerosi s'inicia com a resposta a la disfunció i la inflamació de l'endoteli vascular i dona lloc a l'acumulació de lípids a la llum vascular (Figura 14). De manera resumida, els elements centrals de l'aterogènesi són els següents:

En primer lloc, el dany crònic de l'endoteli vascular, que sovint té lloc de manera subtil i progressiva, causa una pèrdua de les seves funcions habituals. La disfuncionalitat de les cèl·lules endotelials genera un augment en la permeabilitat i en l'adhesió de leucòcits circulants⁽¹⁶⁵⁾.

A la paret del vas sanguini afectat (generalment a l'íntima) s'hi acumulen LDL riques en colesterol. Les LDL acumulades pateixen un procés d'oxidació transformant-se en LDL oxidades (**oxLDL**). Aquesta oxidació desencadena inflamació local: els monòcits i leucòcits s'adhereixen a l'endoteli i migren cap a l'íntima. Els monòcits es transformen en macròfags, fagociten les molècules oxLDL i es converteixen en el que s'anomenen cèl·lules escumoses.

La incorporació dels lípids oxidats i la transformació dels macròfags en cèl·lules carregades de lípids produeixen les lesions ateroscleròtiques primerenques, denominades estries de greix^(166,167).

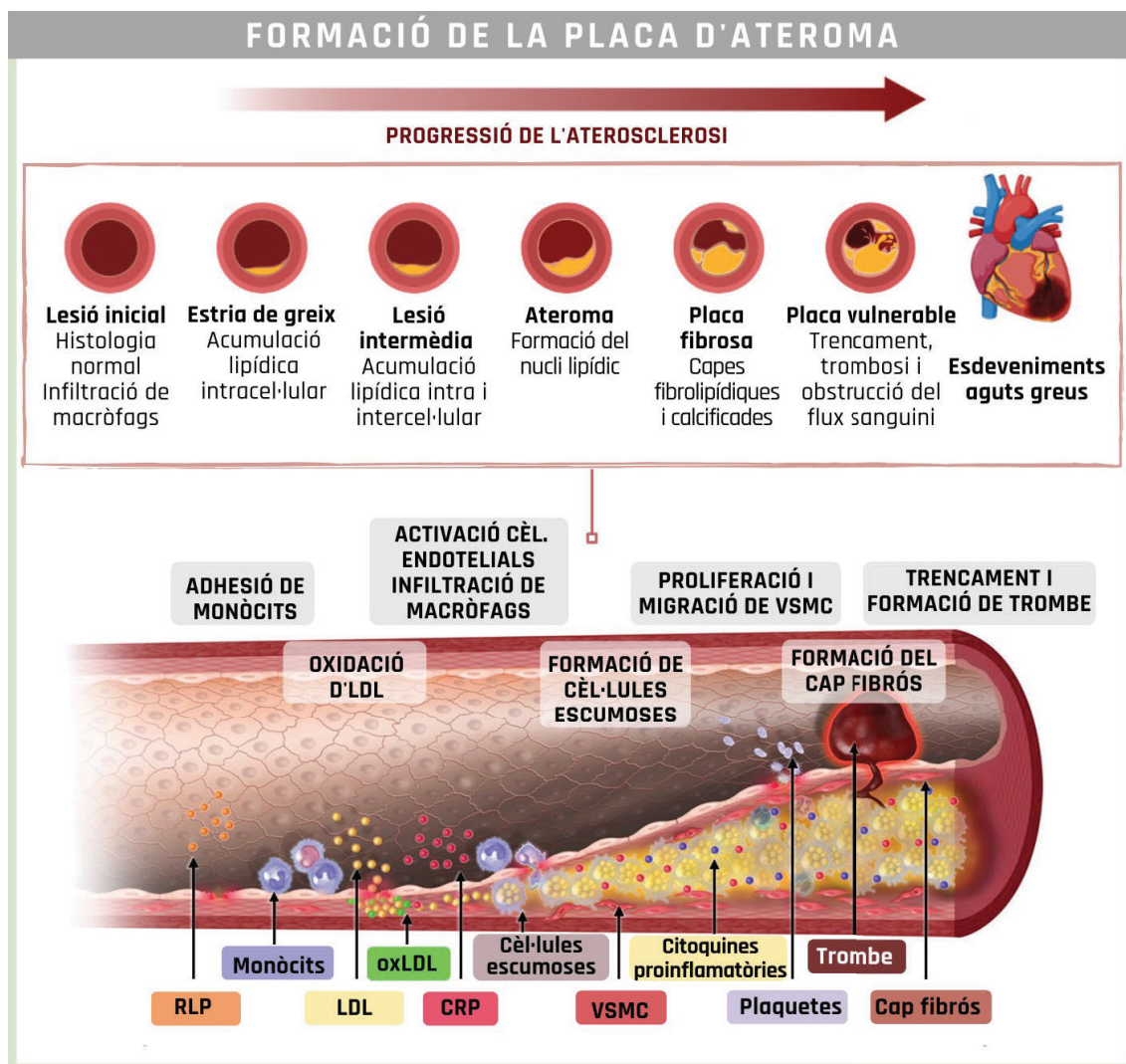


Figura 14: Progressió de l'ateroesclerosi. Abreviatures: CRP, proteïna c-reactiva; LDL, lipoproteïnes de baixa densitat; oxLDL, lipoproteïnes de baixa densitat oxidades; RLP, colesterol romanent; VSMC, cèl·lules de la musculatura llisa vascular. FONT: Il·lustració del tall de l'artèria de J.R.Nelson et al.⁽¹⁶⁸⁾.

Posteriorment les plaquetes activades, els macròfags o les cèl·lules endotelials alliberen factors inflamatoris que causen la migració de les VSMC des de la capa mitja de l'artèria cap a la capa íntima. Aquestes cèl·lules, estimulades pels macròfags i els limfòcits T, proliferen i s'acumulen a la matriu extracel·lular, es modifiquen i elaboren components com col·lagen i proteoglicans que s'acumulen a l'íntima. D'aquesta manera es genera la coberta fibrosa de la placa

d'ateroma al voltant del nucli ateromatós lipídic. El nucli queda format principalment per colesterol i èsters de colesterol, TAG, detritus cel·lulars, cèl·lules escumoses i fibrina⁽¹⁶⁹⁾.

L'acumulació de lípids augmenta tant intracel·lularment (als macròfags i VSMC) com extracel·lular. En resposta a l'increment d'LDL, la membrana elàstica externa intenta expandir-se cap a fora per a mantenir el flux arterial. Finalment, el vas no pot compensar aquest fenomen i la placa sobresurt cap al lumen, augmentant la rigidesa arterial i la resistència al flux sanguini⁽¹⁶⁸⁾.

Les plaques d'ateroma amb una densa capa fibrosa i un component inflamatori i lipídic poc important poden romandre estables i generalment, no causen una lesió aguda. En canvi, algunes plaques ateroescleròtiques poden patir canvis aguts sobtats que agreugen la malaltia. Els ateromes amb tendència a la ruptura, anomenats vulnerables o inestables, són els més protrombòtics. Són plaques riques en lípids i amb una capa fibrosa fina. L'increment del dipòsit de lípids i de cèl·lules inflamatòries està relacionat amb l'acumulació de fosfat de calci a l'íntima. Aquest procés s'anomena calcificació i contribueix a la complicació de la placa. Val la pena destacar que hi ha certs factors que en faciliten la ruptura, com ara la presència d'inflamació i l'estrès oxidatiu (OS), i els macròfags, que alliberen substàncies tòxiques i/o proteolítiques⁽¹⁷⁰⁻¹⁷²⁾.

L'hemorràgia al nucli de les plaques causa l'expansió del seu volum, de manera que empitjora l'oclusió luminal i disminueix la llum del vas. La perfusió es redueix de forma progressiva i l'hemorràgia pot acabar causant la ruptura de l'ateroma. La ruptura de la capa fibrosa, la fissura o la ulceració de les plaques desencadena el procés trombòtic, ja que queden exposats els components trombògens de la placa (com els fosfolípids, els factors tissulars i les molècules d'adhesió). L'evolució d'aquestes lesions pot desencadenar l'aparició de manifestacions clíniques greus⁽¹⁷³⁾.

1.2.6. Biologia molecular de l'ateroesclerosi: processos implicats i possibles marcadors

La disfunció endotelial involucra processos biològics sinèrgics com l'OS i la inflamació, relacionats tant amb l'obesitat severa com amb les comorbiditats associades, i que poden participar també en la formació de la placa. Així, els efectors implicats en l'OS i la inflamació podrien esdevenir nous factors de risc i explicar perquè alguns individus sense factors de risc clínics presenten malaltia cardiovascular. A més, podrien permetre aprofundir en el coneixement de la malaltia ateroscleròtica i en la detecció del risc cardiovascular, fins i tot en les primeres etapes de la malaltia.

Estrès oxidatiu

L'OS es deu a un desequilibri entre les molècules prooxidants i les antioxidants. L'obesitat en sí genera OS sistèmic, i al seu torn, l'OS està associat a una producció irregular d'adipoquines, el que contribueix al desenvolupament de comorbiditats. Durant l'obesitat, les ROS poden formar-se a partir de diferents mecanismes com: 1) l'excés d'AT en sí, ja que els adipòcits són font de citoquines proinflamatòries, estimuladores de la formació de ROS; 2) l'oxidació dels àcids grassos; 3) el sobre-consum d'oxigen degut a l'increment de la càrrega mecànica i el metabolisme del miocardi; 4) l'acumulació de dany cel·lular, també a causa de l'excés de greix; 5) el tipus de dieta i 6) la disfunció dels mitocondris^(174,175).

Tot i que l'oxigen té una funció important com a acceptor d'electrons, també constitueix el punt de partida del dany cel·lular causat per l'OS. Encara que la majoria de l'oxigen consumit és reduït completament a H₂O durant la respiració mitocondrial, un petit percentatge pot convertir-se a espècies semirreductores, conegudes com a ROS (Figura 15). Alguns dels enzims que poden formar ROS són, per exemple, la NADPH oxidasa de membrana (sobretot en processos inflamatoris i de fagocitosi); la ciclooxigenasa a la cascada de l'àcid araquidònic; la xantina oxidasa al metabolisme de l'àcid úric; les òxid nítric sintases i la monoamino oxidasa. Així, les ROS es formen quan l'oxigen es redueix fins a la generació de peròxid d'hidrogen (H₂O₂) o de l'anió superòxid (O₂⁻).

També es generen de manera endògena el peroxinitrit (OONO^-), l'àcid hipoclorós (HOCl), el radical hidroxil (OH^\cdot), els aldehids, els peròxids i radicals lipídics i els òxids de nitrogen⁽¹⁷⁶⁾.

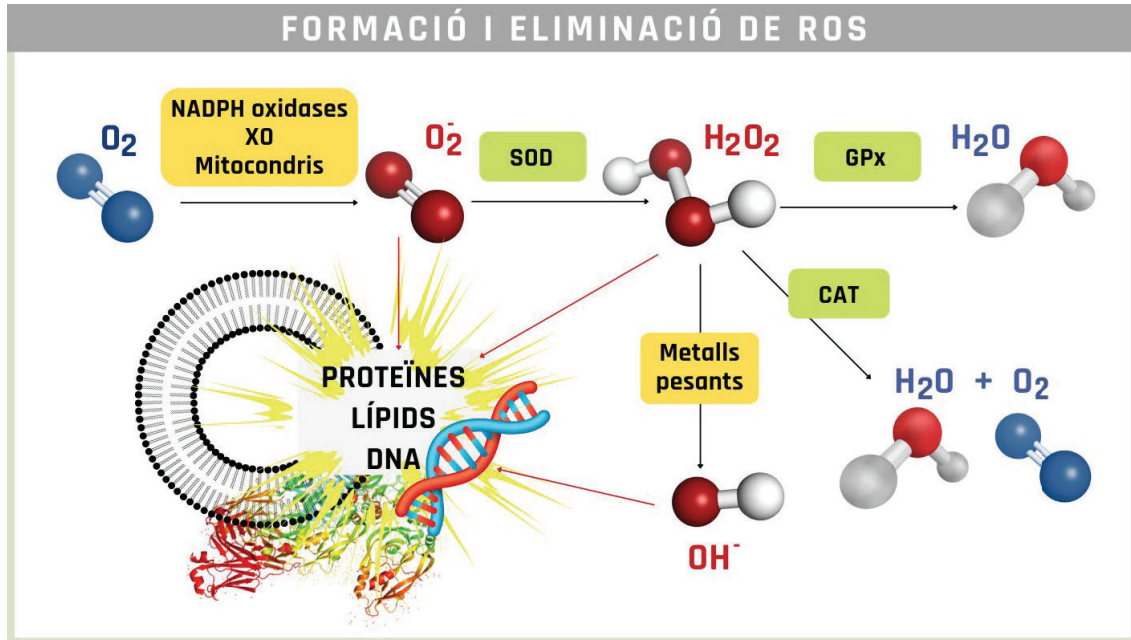


Figura 15: Vies de formació i eliminació de les espècies reactives de l'oxigen. En vermell les ROS, en verd els enzims antioxidants. Abreviatures: CAT, catalasa; GPx, glutatió peroxidasa; H_2O , aigua; H_2O_2 , peròxid d'hidrogen; NADPH, nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat; O_2 , oxigen; O_2^\cdot , radical superòxid; OH^\cdot , radical hidroxil; SOD, superòxid dismutasa; XO, Xantina oxidasa.

Les ROS són de naturalesa altament reactiva, tan és així que tenen la propietat d'iniciar reaccions en cadena per a adquirir un electró. Les molècules que han estat oxidades es converteixen al seu torn en radicals lliures i poden reaccionar també amb altres biomolècules com lípids, proteïnes i àcids nucleics; causant així canvis en les seves estructures i funcions⁽¹⁷⁷⁾.

A l'endoteli, l'OS pot resultar en disfunció i dany, activar-hi vies proinflamatòries i incrementar l'apoptosi a les cèl·lules endotelials⁽¹⁷⁸⁾. Així, l'endoteli vascular és generador de ROS i alhora en pateix els efectes perjudicials. En un estat d'OS l'augment de colesterol i d'LDL pot suposar un risc cardiovascular important. Les **oxLDL** i les ROS reaccionen amb els components de la membrana cel·lular, els lípids presents s'oxiden a peròxids i aquests es descomponen en aldehids com el malondialdehid (**MDA**)⁽¹⁷⁶⁾. D'aquesta manera,

els constituents lipídics de les membranes cel·lulars es degraden i perden l'estructura i s'altera la permeabilitat i la funció dels seus receptors⁽¹⁷⁹⁾.

La capacitat d'un sistema biològic de detoxificar les ROS i els radicals lliures i de reparar els danys produïts ve donada per les molècules antioxidants. Entre els enzims antioxidants que actuen com a primera resposta hi ha la superòxid dismutasa (SOD) i la catalasa (CAT). La **SOD** és el primer enzim detoxificant i catalitza la dismutació de dues molècules d' O_2^- a H_2O_2 i O_2 , reduint d'aquesta manera el potencial perjudicial de l' O_2^- . Per poder dur a terme la seva funció, la SOD requereix un metall com a cofactor⁽¹⁸⁰⁾. Normalment els ions que s'hi uneixen són el ferro (Fe^{2+}), el zinc (Zn^{2+}), el coure (Cu^{2+}) i el manganès (Mn^{2+}). La Fe-SOD o SOD1 es troba en procariotes i cloroplasts; la Mn-SOD o SOD2 està tant en procariotes com a les cèl·lules eucariotes; i la Cu/Zn-SOD o SOD3 predomina en eucariotes i es troba bàsicament localitzada al citosol⁽¹⁸¹⁾.

La **CAT** és un enzim antioxidant peroxisomal present en gairebé tots els teixits que fan servir oxigen. Aquest enzim s'acompanya o bé de Fe^{2+} o bé de Mn^{2+} com a cofactors per catalitzar la reducció de l' H_2O_2 a O_2 i aigua, completant així el procés de detoxificació iniciat per les SOD. La CAT té la capacitat de trencar milions de molècules d' H_2O_2 en un segon, fet que la fa altament eficient⁽¹⁸²⁾.

Igual que la CAT, l'enzim intracel·lular glutatió peroxidasa (**GPx**) trenca l' H_2O_2 a aigua; i els peròxids lipídics als seus corresponents alcohols. Duu a terme la seva acció principalment al mitocondri però també al citosol. La seva activitat depèn del micronutrient seleni com a cofactor. Aquest enzim desenvolupa un paper fonamental inhibint el procés de peroxidació lipídica⁽¹⁸⁰⁾.

Als mecanismes antioxidants exposats s'hi suma la paraoxonasa 1 (PON1), un enzim amb un ampli nombre de substrats i diferents activitats catalítiques: activitat paraoxonasa, arilesterasa i lactonasa. Se sintetitza principalment al fetge i està unida a l'Apo A1 de les HDL; de manera que l'HDL la transfereix del fetge a altres teixits⁽¹⁸³⁾. És precisament la **PON1** qui confereix gran part de l'activitat antioxidant a l'HDL, ja que té la capacitat de protegir contra la peroxidació lipídica. En concret, la PON1 és la principal responsable de la descomposició dels peròxids lipídics abans que s'acumulin i causin l'oxidació de les LDL⁽¹⁸⁴⁾.

Inflamació

La inflamació també té un paper important en l'inici i la progressió de l'ateroesclerosi, ja que contribueix a la disfunció de l'endoteli i, per tant, en la patogènesi de les malalties cardiovasculars⁽¹⁸⁵⁾.

La proliferació de macròfags a la paret vascular és un procés biològic clau en la progressió inicial de les lesions. Resumint, els macròfags adherits a la paret vascular propicien la generació de ROS, donant lloc així a l'oxidació de proteïnes i al dany endotelial. A més d'aquest rol en l'aterogènesi, la inflamació també està implicada en les manifestacions clíniques posteriors de l'ateroesclerosi. Dades histològiques demostren que en els llocs de trencament de les plaques hi ha macròfags activats i VSMC, subratllant el procés inflamatori en curs⁽¹⁸⁶⁾.

Durant el desenvolupament de la placa també poden tenir lloc canvis en factors descrits com a protectors. En aquest sentit, l'**adiponectina** ha estat considerada com a adipoquina antiinflamatòria i sovint presenta nivells baixos en persones amb obesitat severa⁽¹⁸⁷⁾. La seva principal funció és regular el metabolisme energètic de l'organisme i estimular l'oxidació d'àcids grassos, reduint els TAG plasmàtics i millorant el metabolisme de la glucosa mitjançant un augment de la sensibilitat a la insulina⁽¹⁸⁸⁾. S'ha proposat que l'adiponectina inhibeix les fases inicials de l'ateroesclerosi reduint la transformació dels macròfags en cèl·lules escumoses així com l'expressió de TNF α i la proliferació del teixit muscular llis⁽¹⁸⁹⁾.

Al seu torn, el factor de creixement de fibroblasts 21 (FGF21), s'ha considerat com a molècula amb efectes antiinflamatoris en situació d'obesitat. L'**FGF21** és una hormona peptídica que regula l'homeòstasi de la glucosa i dels lípids. Se secreta al fetge i l'AT, tot i que també s'expressa a l'aorta. S'ha proposat que podria tenir efectes antiateroescleròtics a través de la seva capacitat de reduir la inflamació, el lípids, l'OS i l'apoptosi^(190,191).

En el context de l'obesitat severa, l'AT allibera mediadors proinflamatoris que poden promoure disfunció endotelial, IR i ateroesclosi⁽¹⁸⁹⁾. En base a la fisiopatologia de l'ateroesclerosi, s'ha iniciat la recerca de substàncies implicades en la inflamació detectables en sang i que podrien esdevenir biomarcadors d'ateroesclerosi en les etapes inicials. A continuació es presenten les més destacades:

La interleuquina 6 (**IL6**) es produeix als monòcits activats, als fibroblasts, a les cèl·lules endotelials i als adipòcits. S'allibera en resposta a infeccions agudes, a estats d'inflamació crònica com l'obesitat o a l'estrès fisiològic. Aquesta interleuquina indueix el creixement dels limfòcits T i la diferenciació a un fenotip citotòxic. A més, regula la síntesi hepàtica de proteïnes de fase aguda, propagant la resposta inflamatòria i activant així les cèl·lules endotelials⁽¹⁹²⁾. Alts nivells d'IL6 s'han relacionat amb patologies que impliquen inflamació crònica, incloent l'ateroesclerosi⁽¹⁹³⁾.

Durant la fase aguda d'un procés inflamatori, la IL6 indueix la transcripció de la proteïna C reactiva (**CRP**), que és sintetitzada al fetge. La seva funció fisiològica és la unió a la fosfocolina, expressada a la superfície de les cèl·lules mortes i alguns tipus de bacteris. Com a resposta a aquesta unió s'activa el sistema del complement, el que acaba potenciant la resposta inflamatòria, facilitant la fagocitosi, i dirigint la lisi de cèl·lules incloent l'apoptosi. Tot i que la CRP és un paràmetre general d'inflamació i infecció, i per tant no és una proteïna específica, nivells alts s'han relacionat amb un augment del risc cardiovascular⁽¹⁹⁴⁾.

El factor de necrosi tumoral α (**TNF α**) és una adipoquina proinflamatòria sintetitzada també als monòcits, als macròfags i als limfòcits⁽¹⁹⁵⁾. A més de ser un inductor important dels efectes sistèmics de la inflamació, nivells elevats de TNF α s'han relacionat amb patologies com l'obesitat, la T2DM i les malalties cardiovasculars⁽¹⁹⁶⁾. El seu efecte biològic en l'ateroesclerosi està lligat al seu paper en la inducció de gens involucrats en la inflamació i la quimio-atracció i, per tant, en la disfunció endotelial. A més, l'augment de l'expressió d'aquesta citoquina pot induir la formació de ROS i disminuir la biodisponibilitat de NO⁽¹⁹⁷⁾. El TNF α també activa la transcripció del factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules β activades (NF-k β), la qual cosa pot accelerar l'aterogènesi activant les cèl·lules endotelials⁽¹⁹²⁾.

La **leptina** és una hormona específica dels adipòcits que té funció anorexigènica. Els nivells de leptina decreixen ràpidament durant el dejuni, i incrementen amb la insulina, el TNF α i els glucocorticoides⁽¹⁹⁸⁾. Dades recents proposen un efecte proinflamatori de la leptina i, conseqüentment, una relació entre la leptina, l'ateroesclerosi i el risc cardiovascular^(199,200). S'ha descrit que la leptina actua sobre els macròfags augmentant la seva activitat fagocítica i la producció de citoquines proinflamatòries⁽²⁰¹⁾. A més, s'ha proposat que la leptina promou l'acumulació de ROS⁽¹⁸⁹⁾.

L'**Lp(a)** és una lipoproteïna plasmàtica de composició semblant a l'LDL. Conté a més una molècula d'Apo A unida a l'Apo B100 per un pont disulfur. L'augment d'Lp(a) podria augmentar el risc cardiovascular ja que nivells elevats d'aquesta lipoproteïna s'han associat a inflamació, i és susceptible de ser oxidada, contribuint a l'inici de l'ateroesclerosi⁽²⁰²⁾. A més, l'Lp(a) té efectes protrombòtics i antifibrinolítics i l'acumulació a l'íntima accelera l'aterogènesi⁽²⁰³⁾.

La **lipocalina 2** és una glicoproteïna involucrada en la immunitat innata. S'expressa principalment en neutròfils, tot i que també es pot trobar als ronyons, a la pròstata o als epitelis del tracte respiratori i digestiu. Té un paper com a mediador antiinflamatori, ja que és capaç de formar un complex amb la metal·loproteïnasa de matriu 9 (MMP-9) i evitar la degradació de la matriu extracel·lular dels ateromes per part d'MMP-9, afavorint l'estabilitat de la placa^(204,205). És per això que s'ha suggerit que la deficiència de lipocalina 2 podria servir com a biomarcador per a detectar plaques d'ateroma vulnerables⁽²⁰⁵⁾.

També poden tenir un paper important com a mediadors proinflammatoris els **NEFA**. Els àcids grassos són el component majoritari dels TAG emmagatzemats al TA, que hidrolitzats per l'HSL alliberen NEFA i glicerol⁽²⁰⁶⁾. En l'obesitat, l'endarreriment en la captació de NEFA a l'AT i l'increment de la lipòlisi intracel·lular pot donar lloc a un augment dels NEFA plasmàtics. Si aquesta situació es cronifica, els àcids grassos es poden acabar dipositant de manera ectòpica a teixits com el fetge o el múscul, afavorint així la IR i la inflamació⁽²⁰⁷⁾.

Les **glicoproteïnes** plasmàtiques són proteïnes directament relacionades amb malalties inflamatòries. La glicosilació és una modificació postraduccional que consisteix en l'addició d'un o més grups de carbohidrats (glicans) a una proteïna. Les glicoproteïnes participen en diferents processos biològics clau que inclouen: adhesió cel·lular, transport molecular, transducció de senyals, modulació del sistema immunitari, control de l'homeòstasi cel·lular i inflamació. La glicosilació és la modificació química més freqüent de les proteïnes plasmàtiques, però en un estat inflamatori en pot canviar tant la quantitat com el patró de glicosilació, podent alterar les seves funcions⁽²⁰⁸⁾. Així, durant el procés inflamatori, la concentració de proteïnes glicosilades augmenta, i la seva estructura es modifica incrementant les ramificacions i el nombre de residus monosacàrids. El perfil de glicoproteïnes provinents de modificacions posttraduccional pot indicar inflamació sistèmica en diferents condicions patològiques com ara l'obesitat⁽²⁰⁹⁾.

Aquest perfil de glicoproteïnes es pot mesurar mitjançant la ressonància magnètica nuclear de protó (¹HNMR). La regió de l'espectre ¹HNMR on les glicoproteïnes ressonen s'analitza amb diferents funcions: GlycA, GlycB i GlycF (Figura 16). L'àrea de **GlycA** indica les concentracions plasmàtiques dels enllaços entre els glúcids N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina i les proteïnes; l'àrea de **GlycB** correspon a les concentracions plasmàtiques dels enllaços entre proteïnes i l'àcid N-acetilneuramínic. En canvi, l'àrea **GlycF** prové de la concentració dels tres glúcids lliures (no lligats a proteïnes) que tenen un grup amino (N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina i l'N-acetilneuramínic). La ratio *Height-to-Width* de cada pic (**H/W**) s'ha associat a estats inflamatoris; l'alçada està relacionada amb la concentració, i l'amplada es relaciona amb l'estat d'agregació o flexibilitat dels enllaços sucre-proteïna. Quan els pics són alts i prims i per tant la ràtio és molt alta, indiquen més flexibilitat probablement implicant enllaços més accessibles entre els glúcids i les proteïnes glicosilades^(208,210).

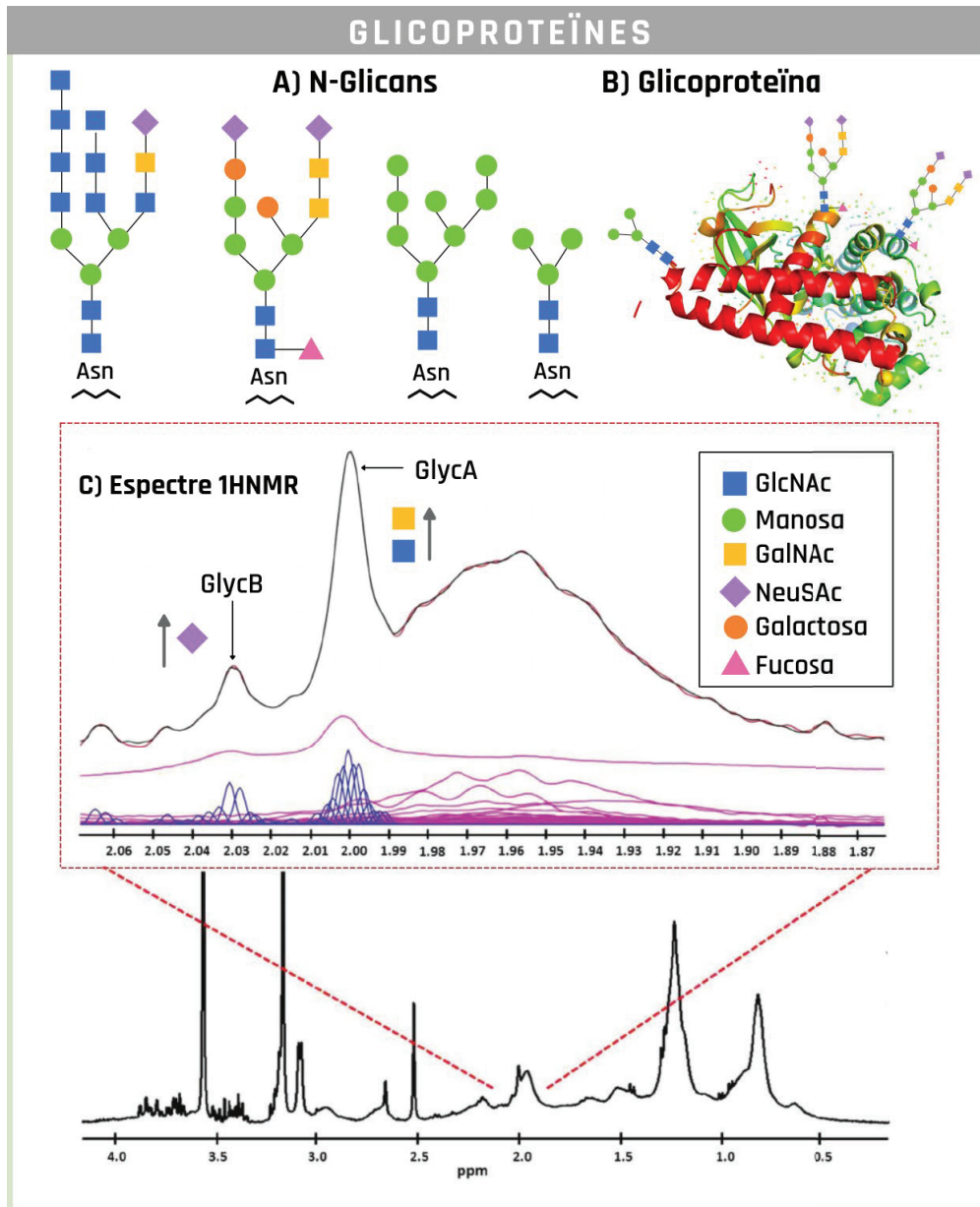


Figura 16: Estructura i anàlisi de glicoproteïnes per ¹HNMR. **A)** Exemples d’N-Glicans amb diferents residus units a la cadena proteica per asparagina (Asn). **B)** Exemple de l’estructura d’una glicoproteïna. **C)** Espectre de glicoproteïnes en mostra de sèrum, mostrant l’expansió del senyal de GlycA. Abreviatures: Glyc, glicoproteïna; Asn, asparagina; GlcNAc, N-acetilglucosamina; GalNAc, N-acetilgalactosamina; NeuSAc, àcid N-acetilneuramínic. FONTS: Adaptat de: ^(211–213)

MicroRNA

Els microRNA (miRNA) són petits fragments d'entre 20 i 25 nucleòtids d'RNA monocatenari no codificants que regulen l'expressió genètica a nivell post-transcripcional. S'expressen de manera específica als teixits però també es troben a la circulació sanguínia. Els miRNA són importants en el desenvolupament, la proliferació i la comunicació cel·lular i en la diferenciació tissular. Els circulants s'han descrit com a valuosos biomarcadors i possibles dianes terapèutiques per a diferents patologies⁽²¹⁴⁾.

La síntesi dels miRNA té lloc dins del nucli cel·lular i la seva maduració finalitza al citoplasma (a la Figura 17 se'n detalla el procés). Un cop sintetitzat, el miRNA madur s'uneix al seu mRNA diana al complex RISC (complex silenciador induït per RNA) i n'evita així l'expressió. Per tant, la funció dels miRNA és regular negativament l'expressió gènica. Es poden donar dues situacions: per una banda, normalment en les plantes, quan les seqüències són perfectament complementàries el complex RISC s'uneix al mRNA i aquest és degradat per Ago2. En la majoria dels casos, les seqüències no es complementen perfectament i el complex RISC inhibeix la traducció del mRNA sense degradar-lo (Figura 17C). En tots dos casos el resultat és la disminució dels nivells de proteïna del gen diana⁽²¹⁵⁾.

Els nucleòtids 2 al 7 de la zona 5' conformen l'anomenada *seed region* i determinen l'especificitat i la funció del miRNA madur. Aquesta regió és sempre complementària del mRNA diana. La resta de nucleòtids no són perfectament complementaris, el que comporta que un sol miRNA pot regular diferents mRNA i cada mRNA pot ser regulat per molts miRNA.

L'estabilitat dels miRNA circulants es veu reforçada gràcies a la seva unió a proteïnes com Ago2, a les HDL o a l'encapsulació en vesícules lipídiques, com exosomes o microvesícules, ja que així queden protegits davant les RNAses⁽²¹⁶⁾.

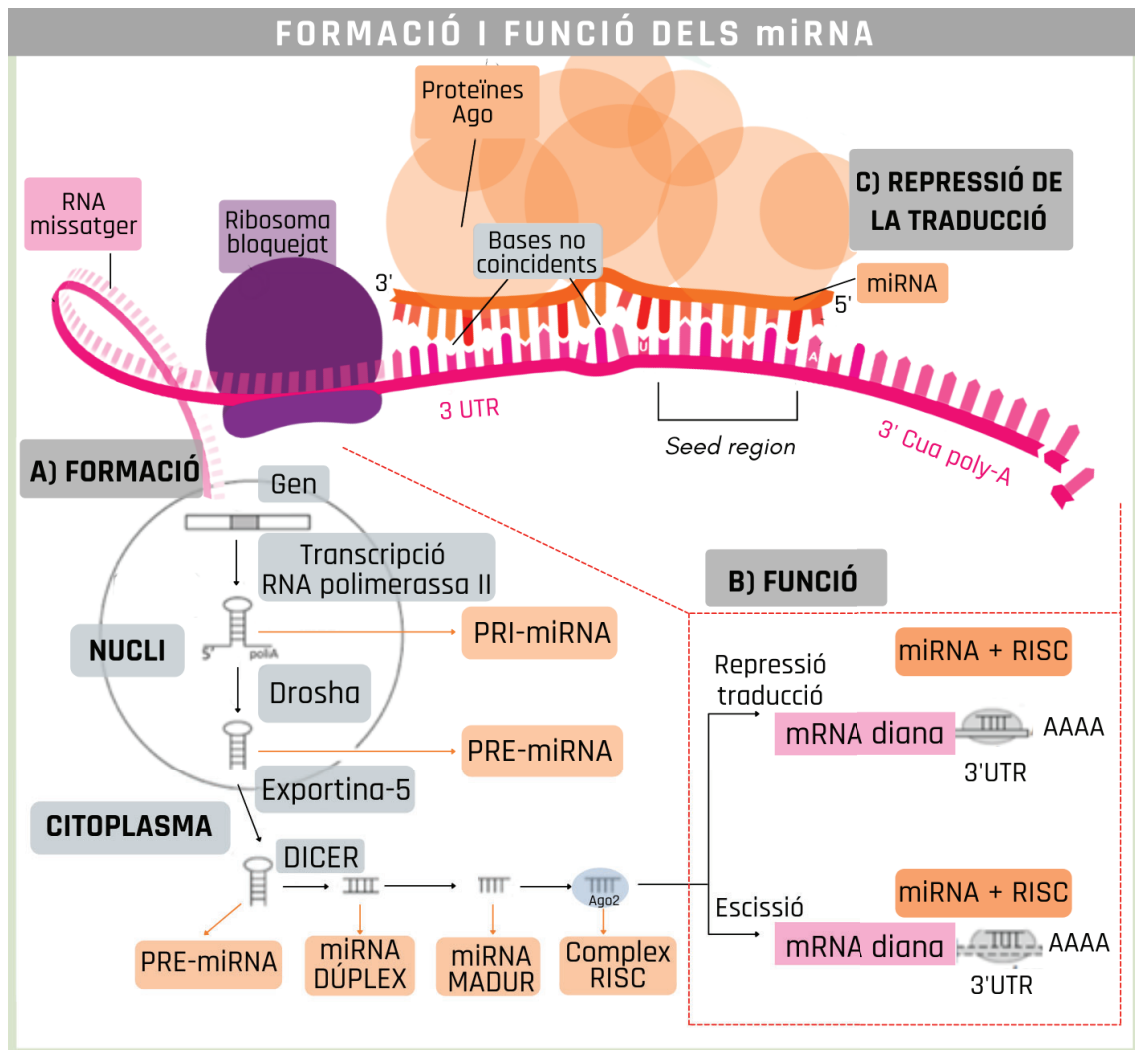


Figura 17: Formació i funció dels miRNA. **A) Formació:** Dins del nucli cel·lular, l'RNA polimerasa II transcriu el gen del miRNA i forma el pri-miRNA, una estructura en bucle amb una cadena poli-A a l'extrem 3' i una caputxa al 5'. Després, l'enzim Drosha el processa, escindeix nucleòtids d'ambdós extrems i forma el pre-miRNA, amb forma de *stem loop*. Aquest es transporta al citoplasma per mitjà de l'Exportina 5. L'enzim Dicer talla el bucle per formar el miRNA dúplex, un miRNA madur de doble cadena. Les cadenes se separen i el miRNA madur és incorporat al complex RISC format en part per la proteïna Ago2. **B) Funció:** Al complex RISC el miRNA s'uneix a la regió 3' del mRNA diana i n'evita així l'expressió. La regulació negativa es pot donar per repressió de la traducció o per escissió del miRNA. **C) Ampliació de la repressió de la traducció.** Abreviatures: Ago2, argonauta; miRNA, microRNA; mRNA, RNA missatger; RISC, *RNA induced silencing complex*. FONT: Il·lustració superior adaptada de⁽²¹⁰⁾.

Tot i que els mecanismes implicats en l'arribada dels miRNA al sèrum i la seva funcionalitat no són encara del tot coneguts, hi ha cada cop més evidències involucrant els miRNA circulants en la patogènesi de l'obesitat, la T2DM i les malalties cardiovasculars^(217–220).

Els miRNA poden presentar un paper compensatori o fisiopatològic⁽²²¹⁾ i s'ha demostrat que alguns patrons d'expressió són específics de processos patològics⁽²²²⁾. Entre els processos relacionats amb l'obesitat regulats per miRNA destaquen la proliferació i la diferenciació dels adipòcits i la regulació d'algunes vies metabòliques. En concret, els miRNA s'han proposat com a importants reguladors del metabolisme dels lípids i de l'homeòstasi vascular, processos íntimament relacionats amb el risc cardiovascular. Hi ha força miRNA que s'han relacionat amb l'obesitat, la inflamació i l'adipogènesi i que estan involucrats en l'expressió de diferents gens: factors de transcripció (PPAR- γ , C/EBP), vies de senyalització (com ara Wnt/catenina, superfamília TGF- β , IGF, i insulina), o de matriu extracel·lular. En són alguns exemples el **miR-21** i el **miR-375**^(220,223–228).

Els miRNA han emergit com a mecanismes epigenètics clau també en el desenvolupament i la funcionalitat del sistema cardiovascular. Poden participar en processos biològics com el remodelat i la fibrosi cardíacs, l'apoptosi, la inflamació, la proliferació, l'angiogènesi i el metabolisme⁽²²⁹⁾. Diferents estudis demostren que les alteracions de miRNA específics són claus en la patologia cardiovascular, com per exemple els **miR-1**, **miR-126**, **miR-133a** o **miR-208**^(217,219,230–232).

Irisina

La irisina és una mioquina i adipoquina descrita per primer cop el 2012⁽²³³⁾. Les mioquines regulen alguns dels efectes beneficiosos que té l'exercici físic sobre el metabolisme i el sistema cardiovascular. La irisina en concret és estimulada per l'exercici i participa en la termogènesi i en la marronització (o *browning*) dels adipòcits. La proteïna de membrana fibronectina tipus III amb 5 dominis (FNDC5) allibera la irisina al torrent sanguini. La irisina activa el consum d'oxigen i la termogènesi en les cèl·lules de l'AT, la biogènesi mitocondrial i l'expressió de la UCP1, la qual cosa duu a la producció de calor al mitocondri i facilita la despesa d'energia quan es realitza exercici físic⁽²³⁴⁾.

Degut al seu rol, la irisina s'ha proposat com a beneficiosa per al metabolisme energètic en l'obesitat i en la T2DM^(235,236). En concret, alguns estudis han mostrat relacions entre la T2DM, la IR i la síndrome metabòlica amb nivells baixos d'irisina⁽²³⁷⁻²³⁹⁾. No obstant, els resultats no són concloents pel que fa a l'obesitat, ja que s'han descrit correlacions de la irisina amb el BMI tant positives com negatives^(235,240-245). Més recentment també s'ha proposat una relació dels nivells circulants d'irisina amb la funció endotelial i el risc cardiovascular⁽²⁴⁶⁾. Tanmateix, el paper de la irisina en la formació de l'ateroma i els mecanismes implicats segueix sent força desconegut.

Perfil lipoproteic

Com ja s'ha comentat a l'apartat 1.2.4, les lipoproteïnes participen de manera important en l'aterogènesi. Tan és així que el perfil complet de lipoproteïnes a partir d'un test avançat basat en Ressonància Magnètica Nuclear pot resultar útil per a l'anàlisi del risc cardiovascular, ja que és possible que persones amb la mateixa concentració de colesterol tinguin distribucions a les lipoproteïnes molt diferents⁽²⁴⁷⁾. Aquest perfil inclou el nombre de partícules de les principals classes i subclasses de lipoproteïnes (Figura 7), així com la seva mida i la composició de colesterol i TAG.

En primer lloc, la mesura del **nombre** de lipoproteïnes pot millorar la valoració del metabolisme lipídic, ja que en situacions en que el nombre de partícules és superior a l'esperat per les concentracions de colesterol, és aquest nombre el que mostra major associació amb el risc⁽²⁴⁸⁾. Per exemple, un nombre elevat de partícules d'HDL s'associa a una major protecció contra el risc ateroescleròtic en comparació amb el cHDL^(249,250). A més, l'increment del nombre de partícules LDL és un dels paràmetres més validats i el seu augment s'ha associat a un augment del risc cardiovascular⁽²⁵¹⁾. En concret, el nombre d'LDL petites està especialment associat amb el risc de malaltia coronària i ictus isquèmic^(251,252).

Per tant, les lipoproteïnes no tenen una **mida** i una composició fixa, sinó que es troben en contínua modificació a causa de l'acció dels transferidors de lípids, presents en plasma, com el CETP. La mida de les lipoproteïnes en condiona també el potencial aterogènic, per tant pot donar informació més extensa de l'estat del metabolisme lipídic. En general, com més petites són les

lipoproteïnes, més probabilitat hi ha que travessin l'endoteli i siguin retingudes a l'íntima arterial⁽²⁵³⁾. Per exemple, d'entre les LDL, són les més petites les que penetren majoritàriament l'endoteli i són retingudes més temps a la paret dels vasos, el que afavoreix la seva acumulació i oxidació^(251,253). En canvi, les HDL de diàmetre petit són les que comporten més risc, ja que s'eliminen ràpidament^(249,254). Així, la mida de les HDL està inversament associada a l'infart de miocardi i a l'ictus isquèmic^(251,252).

Pel que fa a la **composició** de les lipoproteïnes, cal mencionar que la hipercolesterolèmia és un dels requisits per l'aterogènesi. En aquest sentit, les LDL comprenen entre un 60 i un 70% del colesterol total sèric, per la qual cosa són les lipoproteïnes aterogèniques principals⁽⁶⁴⁾. Tot i així el contingut elevat en colesterol de les partícules VLDL i IDL s'associa a també a risc cardiovascular, mentre que el colesterol de les HDL està relacionat amb un menor risc^(51,250).

El contingut en TAG de totes les lipoproteïnes també va lligat a malalties cardiovasculars: per exemple, les HDL riques en TAG poden resultar disfuncionals⁽²⁵¹⁾. L'acumulació de lipoproteïnes riques en TAG com són els QM i les VLDL, així com dels seus romanents, es considera un factor de risc cardiovascular independent^(255,256).

2. OBJECTIUS

OBJECTIUS

La predicció del risc de patir un esdeveniment cardiovascular en les persones amb obesitat severa és imprecisa. A més, els mecanismes que interrelacionen l'obesitat amb l'ateroesclerosi no es coneixen amb suficient profunditat. Es creu que els factors que determinen l'aparició de l'ateroesclerosi subclínica (asimptomàtica) en l'obesitat severa s'estenen més enllà dels factors de risc tradicionals. Per això proposem que algunes molècules plasmàtiques podrien relacionar l'obesitat amb la presència de lesió vascular subclínica i, per tant, permetrien detectar amb antelació aquelles persones amb major risc de desenvolupar esdeveniments cardiovasculars.

Tenint en compte aquest context, es formulen els següents objectius:

1. Estudiar si hi ha paràmetres antropomètrics, bioquímics, genètics o fisiològics diferencials entre individus amb ateroma i sense, que puguin explicar perquè individus amb perfil d'obesitat severa similar, tenen diferent risc cardiovascular.

Per això analitzarem paràmetres relacionats amb la inflamació, l'estrès oxidatiu i la funció endotelial vascular en una cohort d'individus amb obesitat severa agrupats segons la presència o absència de placa.

2. Analitzar l'efecte de la cirurgia bariàtrica sobre l'evolució de l'ateroesclerosi subclínica i el risc cardiovascular.

Per això mesurarem els paràmetres relacionats amb el risc cardiovascular abans mencionats un mes abans de la BS i també al cap de 6 i 12 mesos en la mateixa cohort.

3. Establir si entre els paràmetres que resultin rellevants en el desenvolupament del procés ateromatós hi ha candidats per a l'ús com a biomarcadors amb bona capacitat predictiva per a l'ateroesclerosi subclínica i/o indicadors de l'evolució del risc cardiovascular.

3. INFORME DE LA DIRECTORA DE TESI DEL FACTOR D'IMPACTE DELS ARTICLES PUBLICATS

Informe de la directora de tesi del factor d'impacte dels articles publicats.

La tesi doctoral “ Obesitat severa i aterosclerosi subclínica: biologia molecular, marcadors i efecte de la cirurgia bariàtrica” es basa en els resultats originals obtinguts per la Júlia Carmona Maurici. Aquests resultats s'han publicat o han estat/estaran presentats per a la seva publicació a revistes internacionals amb revisió per parells. Els articles en qüestió són els següents:

1. **Impact of bariatric surgery on subclinical atherosclerosis in patients with morbid obesity.**, publicat al SOARD* el 2020.
2. **Effect of bariatric surgery on inflammation and endothelial dysfunction as processes underlying subclinical atherosclerosis in morbid obesity.**, publicat al SOARD* el 2020.
3. **Effect of bariatric surgery in the evolution of oxidative stress depending on the presence of atheroma in patients with morbid obesity.**, publicat al SOARD* el 2020.

L'índex d'impacte d'aquesta revista és un reflex de la qualitat de la recerca duta a terme en aquest treball de tesi doctoral.

En aquest treball de tesi també es presenten tres articles que estan en diferents estadis del procés d'escriptura, són els següents:

4. **GlycA and GlycB as biomarkers of inflammation-derived cardiovascular risk but not of subclinical atherosclerosis, and their normalization after bariatric surgery**, en procés d'escriptura, pendent d'enviar-se a SOARD*.
5. **MicroRNA signature in human with subclinical atherosclerosis and severe obesity, effect of bariatric surgery**, en procés d'escriptura, pendent d'enviar-se a *Atherosclerosis***.
6. **Irisin as a marker of subclinical atherosclerosis in severe obesity: Association between irisin plasma levels, FNDC5 genetic variability and atheroma presence**, enviat a l'IJO***.

* *Surgery for Obesity Related Diseases* (SOARD) és la revista oficial de la Societat Americana de Metabolisme i Cirurgia Bariàtrica (ASMBS) i de la Societat Brasileira de

Cirurgia Bariàtrica. Els articles que s'hi publiquen documenten els efectes de la pèrdua de pes deguda al tractament quirúrgic en les comorbiditats associades amb l'obesitat a nivell fisiològic, psiquiàtric i social. Als articles que s'hi presenten es fa una revisió per parells i a cegues. Es tracta d'una revista indexada al *Journal Citation Reports (Science Edition)* amb factor d'impacte de 4.734, classificat dins del primer quartil a l'àrea de Cirurgia (posició 30/211).

** *Atherosclerosis* és una revista que integra articles relacionats amb la recerca sobre ateroesclosi, els seus factors de risc (alteracions del metabolisme de lípids i lipoproteïnes, diabetis, hipertensió, trombosi i inflamació) i les manifestacions clíniques. Abasta enfocaments bàsics i transnacionals, clínics i de recerca poblacional. Es tracta d'una revista indexada al *Journal Citation Reports (Science Edition)* amb factor d'impacte de 6.847 (dada del 2021), classificat dins del primer quartil a l'àrea de Sistemes cardíacs i cardiovasculars (posició 35/143).

*** L'*International Journal of Obesity (IJO)* es tracta també d'una revista internacional amb revisió per parells. És un fòrum multidisciplinar de recerca on es descriuen estudis en recerca bàsica, clínica i aplicada sobre la bioquímica, la fisiologia, la genètica, la nutrició, el metabolisme, la psicologia i l'epidemiologia de l'obesitat i els trastorns relacionats. Es tracta d'una revista indexada al *Journal Citation Reports (Science Edition)* amb factor d'impacte de 5.551 (dada del 2021), classificat dins del segon quartil a l'àrea de Nutrició i dietètica (posició 23/90).

En tots els treballs acceptats la Júlia Carmona Maurici és la primera autora. Per altra banda, tant en els treballs ja acceptats com en els que estan en vies de publicació ella és qui ha dut a terme l'anàlisi dels paràmetres bioquímics específics, l'anàlisi de les dades i la redacció del treball.

Per la present confirmo la qualitat dels articles publicats i enviats d'aquest treball de tesi.

Signat per la Dra. Eva Pardina Arrese

Barcelona, 22 de juliol del 2022.

EVA PARDINA Firmado digitalmente
por EVA PARDINA
ARRESE - DNI ARRESE - DNI 46972098A
46972098A Fecha: 2022.07.30
06:54:10 +02'00'

4. PUBLICACIONES

4.1 Article 1: ateroesclosi subclínica i obesitat severa, funció endotelial mecànica.

Títol: *Impact of bariatric surgery on subclinical atherosclerosis in patients with morbid obesity.*

Autors: Júlia Carmona-Maurici^a, Elena Cuello^b, Enric Sánchez^c, Antonio Miñarro^d, Ferran Rius^c, Marta Bueno^c, M Cruz de la Fuente^b, Jorge Juan Olsina Kissler^b, Teresa Vidal^e, Virtudes Maria^e, Àngels Betriu^e, Albert Lecube^{b,f}, Juan Antonio Baena-Fustegueras^b, Julia Peinado-Onsurbe^a, Eva Pardina^a

Afiliacions:

a. Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya.

b. Departament de Cirurgia Gastrointestinal, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, IRB Lleida, Universitat de Lleida, Lleida, Espanya.

c. Departament d'Endocrinologia i Nutrició, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Universitat de Lleida, IRB Lleida, Universitat de Lleida, Lleida, Espanya.

d. Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya.

e. Grup de recerca translacional vascular i renal, IRB Lleida, RedinRen-ISCI, Lleida, Espanya.

f. Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Espanya.

Informació de la revista: Surgery for Obesity and Related Diseases. *Impact Factor* (2020): 4.734, Citescore: 6.1, Percentil: 93% Quartil 1. DOI: 10.1016/j.soard.2020.05.035

Original article

Impact of bariatric surgery on subclinical atherosclerosis in patients with morbid obesity

Júlia Carmona-Maurici^a, Elena Cuello, M.D.^b, Enric Sánchez, M.D.^c,
Antonio Miñarro, Ph.D.^d, Ferran Rius, M.D., Ph.D.^c, Marta Bueno, M.D.^c,
M Cruz de la Fuente, M.D.^b, Jorge Juan Olsina Kissler, M.D., Ph.D.^b, Teresa Vidal, M.D.^e,
Virtudes Maria, M.D.^e, Àngels Betriu, M.D., Ph.D.^e, Albert Lecube, M.D., Ph.D.^{b,f},
Juan Antonio Baena-Fustegueras, M.D.^b, Julia Peinado-Onsurbe, Ph.D.^{a,*},
Eva Pardina, Ph.D.^a

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Biology Faculty, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^bGastrointestinal Surgery Department, Arnau de Vilanova University Hospital, IRB Lleida, University of Lleida, Lleida, Spain

^cEndocrinology and Nutrition Department, Arnau de Vilanova University Hospital, Obesity, Diabetes and Metabolism research group, IRBLleida, University of Lleida, Lleida, Spain

^dDepartment of Genetics, Microbiology and Statistics, Biology Faculty, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^eVascular and Renal Translational Research Group, IRB Lleida, RedinRen-ISCI, Lleida, Spain

^fCentro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Received 17 March 2020; accepted 3 May 2020

Abstract

Background: The main cause of death in obese individuals is cardiovascular disease precipitated by atherosclerosis. Endothelial dysfunction and inflammation are considered early events in the development of the disease.

Objectives: The aim of this study was to identify biomarkers of subclinical atherosclerosis in patients with morbid obesity by comparing clinical, vascular, and biochemical parameters indicative of endothelial dysfunction in patients with and without atheromatous plaque and monitoring changes after bariatric surgery.

Settings: Multicenter collaboration between Biochemistry and Biomedicine Department in Barcelona University and University Hospital Arnau de Vilanova in Lleida.

Methods: Plasma samples from 66 patients with morbid obesity were obtained before bariatric surgery and at 6 and 12 months after. Patients were divided into 2 groups based on the presence of atheromatous plaque. We used contrast-enhanced carotid ultrasound, enzyme-linked immunosorbent assay, Griess, and EndoPAT-2000 methods.

Results: Patients with plaque showed the worst profile of cardiovascular risk factors. Carotid intima-media thickness and plasminogen activator inhibitor-1 were higher in plaque group ($P < .0001$). After bariatric surgery, vasa vasorum, oxidized low-density lipoprotein, and plasminogen activator inhibitor-1 decreased ($P < .0001$ in all cases).

Conclusions: Obesity promotes atherogenesis, leading to vascular endothelial damage. Bariatric surgery reduces cardiovascular risk and the prognosis is better for patients without plaque. The increase in plasminogen activator inhibitor-1, carotid intima-media thickness, and vasa vasorum proliferation might be the first alterations in the atheromatous process in obesity and could serve as

This was supported by “Ministerio de Sanidad y Consumo”, the Institute of Health Carlos III (ISCIII) [grant numbers PI15/00190 to JP–O, PI15/00332 to JAB–F] and the EU FEDER Programme (European Regional Development Fund: “Una manera de hacer Europa”).

*Correspondence: Dra. Julia Peinado-Onsurbe, Phd, Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Biology Faculty, Barcelona University, Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

E-mail address: jpeinado@ub.edu (J. Peinado-Onsurbe).

good biomarkers of subclinical atherosclerosis. (Surg Obes Relat Dis 2020;16:1419–1428.) © 2020 American Society for Bariatric Surgery. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Key words: Subclinical atherosclerosis; Morbid obesity; Atheroma; Bariatric surgery

The main cause of death in individuals with obesity is cardiovascular disease (CVD) precipitated by atherosclerosis [1]. Endothelial dysfunction and inflammation are considered early and potentially reversible events in the development of the disease [2]. Although both obesity by itself and its associated co-morbidities can lead to endothelial injury [3], the factors involved in its development are still unknown.

Researchers maintain that the initial lesion in atherosclerosis is an increase in carotid intima-media thickness (cIMT), which is a validated marker of subclinical atherosclerosis [4]. Hypoxia is the main stimulus of neovascularization of the intima by perpendicular adventitious vessels, and it has been suggested that the proliferation of vasa vasorum (VV) in the adventitia is one of the first alterations in the atheromatous process [5]. The paracrine effects of obesity, together with a large number of inflammatory cells surrounding the adventitia, have also been described as stimulating the proliferation of VV penetrating the arterial wall [6].

Several studies have reported a relationship between inflammatory parameters and obesity, and their improvement after bariatric surgery (BS) [4]. Low-grade inflammation in obesity has been related to enhanced lipid peroxidation and persistent platelet activation, which may have implications for major cardiovascular risk (CVR) [5]. In this respect, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), a well-recognized fibrinolysis regulator implicated in thrombogenic pathways, could predispose to the formation and progression of atheromatous plaque [6].

Taken together, these parameters may lead to the development and progression of endothelial dysfunction and atherosclerosis in patients with morbid obesity.

The aim of this study was to identify biomarkers of subclinical atherosclerosis in patients with morbid obesity by comparing clinical, vascular, and biochemical parameters indicative of endothelial dysfunction in patients with and without atheromatous plaque and monitoring changes after BS.

Methods

Patient selection

Eighty patients with morbid obesity aged from 21- to 65-years old who underwent BS were enrolled in the study and received 1-year follow-up at the Hospital Arnau de Vilanova (Lleida, Spain). Finally, 66 patients were available at each

time point. All measurements were performed at 3 follow-up times, 1 month before surgery and at 6 and 12 months after surgery.

Patients met the following necessary criteria for BS: body mass index (BMI) ≥ 40 or ≥ 35 kg/m² with at least 1 co-morbidity, including blood hypertension (HT), type 2 diabetes (T2D), dyslipidemia (DLP), obstructive sleep apnea, or weight-induced rheumatic disease. The criteria used to diagnose T2D, HT, and metabolic syndrome are detailed in the National Cholesterol Education Program [7]. None of the patients were diagnosed with inflammatory or infectious diseases, and none were receiving antiobesity or antiinflammatory drugs at the time of the study. To avoid bias, we select patients using rigorous criteria to avoid confounding results. Patients were excluded if they had any cardiovascular event, neoplasm, renal, hepatic or active systemic diseases, hypothyroidism, or endocrine diseases other than T2D.

Laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass or sleeve gastrectomy was performed on 35 and 31 patients, respectively, using a 5-trocar technique.

The Hospital Ethics Committee approved the study protocol and all patients provided informed consent to participate. All procedures performed in the study were conducted in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the Declaration of Helsinki or equivalent. This was a purely observational study, so no clinical trial registration was needed.

The presence of atheromatous plaque was determined using a Vivid-I ultrasound machine (General Electric Healthcare, Waukesha, WI, USA) equipped with a 12 L-RS linear array transducer probe (5–13 MHz), employing standardized and validated scanning and reading protocols [8]. Subclinical atherosclerosis was defined as the presence of any plaque (focal intima-media thickness ≥ 1.5 mm protruding into the lumen) [9]. Patients were divided into 2 groups depending on whether they had atheromatous plaque or not. To evaluate if the VV and cIMT were altered in our cohort, and if they normalized with BS, we added a normal weight group (n = 40) free of CVD, using data provided by our collaborators [10].

Plasma samples used to measure biochemical parameters were collected under fasting conditions between 8:00 and 10:00 AM.

Anthropometric measurements

Weight, excess weight, height, and neck and waist circumferences were measured using standard procedures [11], and BMI was then calculated.

Subclinical atherosclerosis detection

Contrast-enhanced carotid ultrasound was used to examine carotid adventitial VV, using a Siemens Sequoia 512 ultrasound system equipped with a 15 L8 W linear array probe and ultrasound contrast software (cadence-contrast pulse sequencing technology). A phospholipid shell containing sulphur hexafluoride served as contrast agent (Sonovue; Bracco Spa, Milan, Italy). The complete procedure has been described previously [12]. VV were measured for the right and left carotid arteries, and the mean signal for both sides is shown. Additionally, all patients underwent a B-mode ultrasound examination of the extracranial carotid arteries to measure the cIMT of the far wall of the common carotid artery, as previously described [8]. The cIMT was measured at 1 cm proximal to the bifurcation, at 1 cm in the bifurcation and in the first cm of the internal carotid [9]. Measurements excluded segments with atheromatous plaques.

Peripheral arterial tonometry

We assessed peripheral arterial tonometry (PAT) using the EndoPAT-2000 system (Itamar Medical Ltd., Cesarea, Israel). Patients had fasted before the test. The digital pulse amplitude was acquired and digitally recorded continuously during the examination. Briefly, the device records endothelium-mediated changes in the PAT signal, measured with plethysmograph probes sited on the index finger of each hand. Changes in the PAT signal were induced by creating hyperemia, using a blood pressure cuff to occlude blood flow in the nondominant arm for 5 minutes. A PAT ratio was created using pre- and postocclusion values. Measurements from the contralateral arm were used as control for changes in vascular tone. The complete protocol has been described previously [13].

Data were analyzed with a computerized algorithm that automatically and operator-independently calculates the reactive hyperemia index (RHI), a simple method to assess peripheral vascular function. $RHI \leq 1.67$ was used as a cut-off value to diagnose endothelial dysfunction and $RHI > 1.67$ as a cut-off value to diagnose normal endothelial function [14].

The augmentation index (AI) was measured by pulse waveform analysis of the PAT signal and calculated from the PAT pulses recorded at baseline. EndoPAT averages multiple pulses, identifies the early systolic peak (P1) and the reflected wave peak (P2) and then incorporates them into the following formula: $(P2 - P1) / P1 \times 100$. Lower AI values (including negative results) reflect better arterial elasticity [15].

Biochemical characteristics

Triacylglyceride (TAG), total cholesterol, cholesterol in low-density lipoprotein, cholesterol in high-density

lipoprotein (cHDL), glucose, and glycated hemoglobin (HbA1C) levels were determined by routine chemistry laboratory procedures at the hospital. Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) and PAI-1 levels were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (Merckodia AD, Uppsala, Sweden and Sekisui Diagnostics GmbH, Pfungstadt, Germany, respectively). Nitric oxide (NO) levels were measured using the Griess method [16] (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

The atherogenic index of plasma (AIP) was calculated using the following formula: $AIP = \log(TAG/cHDL)$ in mg/dL [17]. Patients with an $AIP \leq .21$ were considered to have a low-to-moderate risk of atherosclerosis, whereas patients with an $AIP > .21$ were considered to have a high risk of atherosclerosis [18].

All the experiments performed at the University of Barcelona and described in this article were conducted within the framework of the ISO 9001:2015 Quality Management System, certified by SGS.

Statistical analysis

Data are presented as the mean \pm standard error of the mean. Statistical analyses of age, height, and excess weight were performed using the Mann-Whitney *U* test between obese patients with and without plaque. Normality of the data of all other quantitative parameters was tested using the D'Agostino and Pearson omnibus normality test. Then, statistical analyses were performed using repeated measures 2-way analysis of variance (group and time of follow-up) and the Bonferroni posttest. Contingency tables with 2-sided Fisher's exact test were used for categoric variables. Correlations between independent variables were determined by calculating Spearman's correlation coefficient (ρ). Statistical comparisons were considered significant at $P < .05$.

A predictive model for the presence of plaque was constructed through logistic regression. The initial variables were defined as variables that exhibited significant differences based on *P* values of .05 after adjustment for multiple comparisons using the false-discovery rate method [19]. The model was subjected to a selection of variables using the least absolute shrinkage and selection operator [20], with parameter adjustment by leave-one-out cross validation. For the variables selected by the model, estimates of the model coefficients and their significance are provided, as well as the odds ratio for each variable.

The goodness of the prediction was quantified using a receiver operating characteristic curve and subsequent calculation of the area under curve (AUC) and its confidence interval.

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0 software for Windows (GraphPad Software, San Diego CA, USA) and R version 3.5.0 (R, Vienna, Austria).

Table 1
Clinical characteristics of obese patients with/without plaque before and after bariatric surgery

Variables	With plaque			Without plaque			P value Plaque/time
	OB	6 mo	12 mo	OB	6 mo	12 mo	
n	32			34			-
Sex, women/men	18 (56)/14 (44)			29 (85)/5 (15)*			.0139
Age, yr	51.8 ± 1.8			43.5 ± 1.8 [†]			.0019
Height, cm	165.7 ± 1.6			160.6 ± 1.3 [‡]			.0176
Weight, kg	120.7 ± 4.0	87.9 ± 2.7 [§]	81.5 ± 2.5 [§]	119.1 ± 3.3	86.9 ± 2.7 [§]	79.5 ± 2.9 [§]	ns/<.0001
BMI, kg/m ²	44.0 ± 1.3	32.0 ± .8 [§]	29.8 ± .8 [§]	45.7 ± 1.0	33.8 ± .9	30.2 ± .9 [§]	ns/<.0001
Weight lost, kg	-	33.0 ± 2.1	39.3 ± 2.9	-	32.7 ± 1.5 [§]	40.8 ± 2.0	ns/.0012
Neck, cm	42.5 ± .9	37.9 ± .7 [§]	37.5 ± .7 [§]	40.6 ± 08	35.6 ± .7 [§]	34.2 ± .6 [§]	.0078/<.0001
Waist, cm	130.0 ± 2.6	-	-	126.4 ± 2.1	-	-	ns
Steatosis, yes/no (%)	81/19	-	-	63/27	-	-	-
Steatohepatitis, yes/no (%)	23/77	-	-	13/87	-	-	-
Healthy (no HT, DLP, T2D, yes/no (%)	13/87	50/50 [¶]	56/44 [§]	50/50*	65/35	79/21	-
HT, yes/no (%)	78/22	43/57 [¶]	35/65 [§]	38/62*	29/71 [‡]	15/85*	-
DLP, yes/no (%)	69/31	30/70 [§]	16/84 [§]	28/72*	12/88	6/94 [¶]	-
T2D, yes/no, (%)	66/34	29/71 [§]	19/81 [§]	19/81*	6/94 [‡]	0/100	-
OSAS, yes/no, (%)	66/34	30/70 [¶]	6/94 [§]	47/53	29/71	21/79 [¶]	-

OB = obese; ns = nonsignificant; BMI = body mass index; HT = blood hypertension; DLP = dyslipidemia; T2D = type 2 diabetes; OSAS = obstructive sleep apnea syndrome.

Continuous variables are expressed as mean ± standard error of the mean. Categorical variables are expressed by the number (%) of patients in the group. "Yes/no" indicates whether the patients presented a given pathology or not. Statistics for age, height, and excess weight were computed using the Mann-Whitney *U* test between obese patients with and without plaque. Statistics for weight, BMI, weight loss, and neck were computed using 2-way analysis of variance (group and time of follow-up) and the Bonferroni posttest. Contingency tables with 2-sided Fisher's exact test were used for categorical variables.

* Differences versus with plaque, $P < .001$.

[†] Differences versus with plaque, $P < .01$.

[‡] Differences versus with plaque, $P < .05$.

[§] Differences versus OB, $P < .001$.

[¶] Differences versus OB, $P < .01$.

^{||} Differences versus OB, $P < .05$.

Results

Once the presence of atheromatous plaque had been determined, the initial group of 66 patients with morbid obesity was divided into 32 patients with and 34 patients without atheromatous plaque (Table 1). One year after BS, patients from the plaque group still had atheroma.

Clinical characteristics

Table 1 shows the clinical characteristics of patients with obesity with and without plaque at baseline and at 6 and 12 months after BS.

One year after surgery, patients in both groups lost >40% of weight and BMI had decreased significantly at 12 months after surgery in both groups ($P < .0001$). Patients with plaque were older ($P = .0019$) and presented a higher neck circumference ($P = .0078$).

Co-morbidities improved notably in all patients after surgery. Thus, applying the definition of healthy obesity (free of DLP, HT, and T2D) [21], 13% of patients in the plaque group were defined as healthy obese at baseline, but at 6 months, this value had increased to 50% and at 12 months, it was 56%. Meanwhile, in patients without plaque, 50% initially met this criterion, 65% at 6 months and 79% at 12 months.

Vascular characteristics

As shown in Table 2, heart rate was similar in patients with and without plaque and decreased 12 months after surgery ($P < .0001$) in both groups.

A significant increase in AI was observed at 6 and 12 months after surgery ($P = .0002$) in both groups. There were no differences in RHI between groups or time, but at the beginning of the study, there were significantly more

Table 2
Vascular and biochemical characteristics of obese patients with/without plaque before and after bariatric surgery

Variables	With plaque			Without plaque			P value
	OB	6 mo	12 mo	OB	6 mo	12 mo	
HR, beats/min	73.3 ± 2.7	61.2 ± 2.2*	60.1 ± 1.9*	68.6 ± 1.6	56.6 ± 1.5*	56.9 ± 1.9*	.0426/<.0001
RHI	2.02 ± .12	2.00 ± .14	2.17 ± .12	2.11 ± .09	2.07 ± .10	2.14 ± .12	ns/ns
AI, %	13.1 ± 1.8	25.8 ± 4.2†	26.3 ± 3.1*	15.4 ± 2.1	26.2 ± 4.5‡	23.5 ± 3.2‡	ns/.0002
VV right	.82 ± .04	.75 ± .03	.69 ± .03†	.76 ± .02	.74 ± .03	.68 ± .02	ns/.0018
VV left	.72 ± .03§	.70 ± .03	.62 ± .02†¶	.73 ± .02	.70 ± .03	.60 ± .02*	ns/<.0001
Cholesterol, mg/dL	185.9 ± 8.0	162.02 ± 8.1‡	180.9 ± 7.1	177.2 ± 4.8	152.9 ± 5.5‡	163.3 ± 6.9	ns/<.0001
cHDL, mg/dL	51.9 ± 6.4	49.7 ± 5.0	53.8 ± 1.8	46.8 ± 1.4	46.0 ± 1.7	54.7 ± 2.0†	ns/<.0001
cLDL, mg/dL	107.9 ± 6.9	90.3 ± 6.2	106.8 ± 6.4	107.4 ± 4.6	87.9 ± 4.8†	94.2 ± 6.8	ns/.0009
TAG, mg/dL	164.3 ± 14.6	118.4 ± 9.8‡	98.9 ± 10.9*	124.2 ± 8.0§	94.0 ± 4.8†§	76.6 ± 4.5*	.0082/<.0001
AIP, AU	.51 ± .05	.37 ± .04‡	.23 ± .04*	.40 ± .04	.30 ± .03‡	.13 ± .03*§	.0183/<.0001
oxLDL, mU/mL	102.5 ± 11.1	49.4 ± 4.2*	64.3 ± 7.7*	87.3 ± 5.7	44.8 ± 4.4*	41.5 ± 4.1*§	.0430/<.0001
Glucose, mg/dL	128.3 ± 7.8	90.1 ± 3.4*	99.6 ± 12.1†	99.8 ± 3.7¶	82.1 ± 1.7	82.8 ± 1.7	.0031/<.0001
HbA1C, %	6.61 ± .25	5.57 ± .22†	5.54 ± .15*	5.70 ± .16	5.16 ± .11‡	5.13 ± .07‡	.0049/<.0001
NO, µM	23.0 ± 3.3	20.8 ± 2.2	25.5 ± 2.3	16.7 ± 1.3	16.8 ± 1.4	19.5 ± 1.6	ns/ns

OB = obese; HR = heart rate; ns = nonsignificant; RHI = reactive hyperemia index; AI = augmentation index; VV = vasa vasorum; cHDL = cholesterol in high-density lipoprotein; cLDL = cholesterol in low-density lipoprotein; TAG = triacylglycerides; AIP = atherogenic index of plasma; AU = arbitrary units; oxLDL = oxidized low-density lipoprotein; HbA1C = glycated hemoglobin; NO = nitric oxide.

Data are expressed as mean ± standard error of the mean. Statistics were computed using 2-way analysis of variance (group and time of follow-up) and the Bonferroni posttest.

* Differences versus OB, $P < .001$.

† Differences versus OB, $P < .01$.

‡ Differences versus OB, $P < .05$.

§ Differences versus with plaque, $P < .05$.

¶ Differences versus with plaque, $P < .01$.

|| Differences versus with plaque, $P < .001$.

patients with endothelial dysfunction in the plaque group (42% of patients in the plaque group presented endothelial dysfunction versus only 16% in the group without plaque, $P = .0272$).

Before BS, the VV in both groups were significantly different from that in the normal weight group (VV normal weight: $.57 \pm .02$, $P < .001$) (Fig. 1A) but no differences were observed between the groups with and without plaque. In both groups, BS significantly reduced VV at 12 months ($P < .0001$), reaching normal values.

Significant differences were observed in cIMT between patients with and without plaque ($P < .0001$) throughout the study (Fig. 1B). We found that only patients with plaque had a significantly higher cIMT than the normal weight group ($.633 \pm .097$ mm) [10] at the 3 follow-up times ($P < .001$). There were no differences between patients without plaque and normal weight patients. One year after BS, no significant changes were detected in cIMT.

Biochemical characteristics

As shown in Table 2, cHDL levels were significantly increased in patients without plaque at 12 months after surgery ($P < .0001$). At the beginning of the study, higher TAG levels were observed in patients with plaque than in patients without ($P = .0082$), but these levels decreased in both groups after surgery ($P < .0001$).

In addition, AIP was significantly higher in patients with atheromatous plaque ($P = .0183$). One year after BS, AIP decreased in both groups ($P < .0001$), only remaining $>.21$ in the plaque group. AIP correlated with BMI in both groups ($\rho = .50$, $P < .0001$ in the plaque group and $\rho = .46$, $P < .0001$ in the without plaque group).

In both groups, oxLDL levels decreased by approximately 50% at 6 months after BS ($P < .0001$) (Table 2). However, 12 months after BS, concentration of oxLDL was significantly higher in patients with plaque. There were higher levels of glucose and HbA1C in patients with plaque during the stages studied ($P = .0031$ and $P = .0049$, respectively). These parameters decreased significantly after surgery ($P < .0001$).

Regarding NO levels, no differences were found between groups, and the values after surgery remained the same.

Concentration of PAI-1 decreased significantly 12 months after BS in both groups ($P < .0001$) (Fig. 2). However, levels of PAI-1 were significantly higher in patients with plaque ($P < .0001$) and took longer to decrease. In patients without plaque, we found correlations between PAI-1 and BMI ($\rho = .71$, $P < .0001$), oxLDL ($\rho = .56$, $P < .0001$), and AIP ($\rho = .52$, $P = .0001$). In the plaque group, PAI-1 correlated with oxLDL ($\rho = .30$, $P < .01$) and AIP ($\rho = .24$, $P < .05$) but not with BMI.

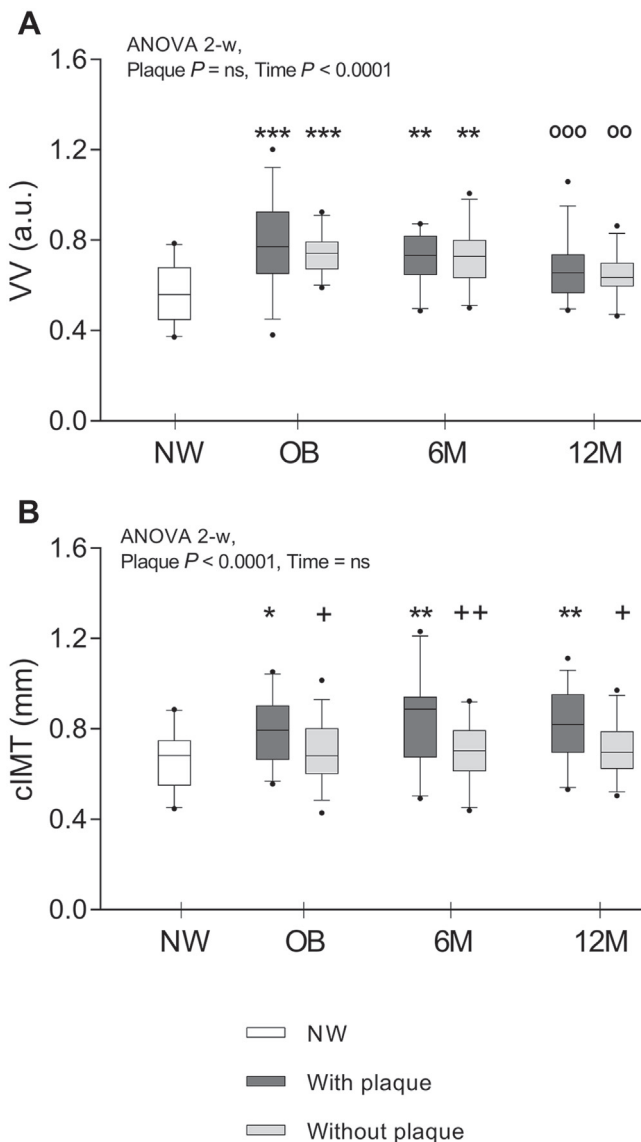


Fig. 1. Vascular characteristics of 66 patients. (A) Vasa vasorum in normal weight and patients with obesity with/without atheromatous plaque before and after bariatric surgery. (B) Carotid intima-media thickness in healthy weight and patients with obesity with/without atheromatous plaque before and after bariatric surgery. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean. Statistics were computed using 2-way analysis of variance (group and time of follow-up) and the Bonferroni posttest. Statistical comparisons were considered significant when $P < .05$. *Differences versus NW, $P < .05$; **Differences versus NW, $P < .01$; ***Differences versus NW, $P < .001$; °Differences versus OB, $P < .05$; °°Differences versus OB, $P < .01$; °°°Differences versus OB, $P < .001$; +Differences versus with plaque, $P < .05$; ++Differences versus with plaque, $P < .01$; +++Differences versus with plaque, $P < .001$. NW = normal weight; ANOVA 2-w = 2-way analysis of variance; ns = nonsignificant; VV = vasa vasorum; a.u. = arbitrary units; OB = obese; M = months; cIMT = carotid intima-media thickness.

Predictive analysis and receiver operating characteristic curves

Variables that remained significant in the model included sex, age, DLP, and T2D (Table 3). Table 4 shows the odds

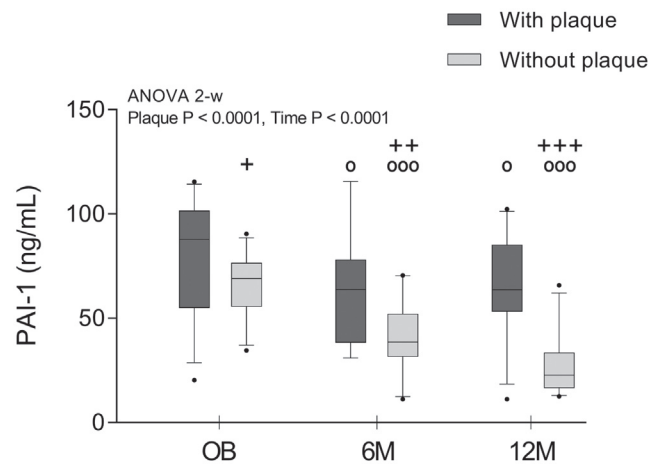


Fig. 2. Plasminogen activator inhibitor 1 concentration in 66 patients with obesity with/without atheromatous plaque before and after bariatric surgery. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean. Statistics were computed using 2-way analysis of variance (group and time of follow-up) and the Bonferroni posttest. Statistical comparisons were considered significant when $P < .05$. +Differences versus with plaque, $P < .05$; ++Differences versus with plaque, $P < .01$; +++Differences versus with plaque, $P < .001$; °Differences versus OB, $P < .05$; °°Differences versus OB, $P < .01$; °°°Differences versus OB, $P < .001$. ANOVA 2-w = 2-way analysis of variance; ns = nonsignificant; PAI-1 = plasminogen activator inhibitor-1; OB = obese; M = months.

ratios. The AUC of the receiver operating characteristic curve was (AUC [95% confidence interval] = .8405 [.7388; .9422]) (Fig. 3).

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to compare the parameters involved in subclinical atherosclerosis and endothelial dysfunction in patients with morbid obesity with and without atheromatous plaque and to monitor changes after BS.

Clinical characteristics

We found that patients with morbid obesity with plaque showed markedly different characteristics to those without, whereby the former were older and exhibited a higher neck circumference. Increasing evidence indicates ageing is also an important risk factor for atherosclerosis, and accelerated vascular ageing induced by obesity could promote CVR. Therefore, both age and the length of time that patients have morbid obesity could be key factors in plaque formation [22]. Nevertheless, the decrease in BMI observed at both 6 and 12 months after surgery confirmed the efficacy of BS for the treatment of morbid obesity.

Several studies have reported that CVD is related to morbid obesity and its co-morbidities [23]. We found the prevalence of DLP, HT, and T2D was significantly higher in the plaque group than in patients without plaque. Therefore, considering the strictest definition of healthy obesity

Table 3
Predictive model for plaque presence: summary of the model, selected variables by lasso adjusted by leave-one-out cross validation

	Point estimation	CI 95% lower	CI 95% upper	P value
Intercept	-.9447	-4.3716	2.4592	.5819
Age	.0417	-.0173	.1037	.1702
Sex, men	1.1615	-.1592	2.5914	.0925
DLP, no	-1.1459	-2.4076	.1046	.0703
T2D, no	-1.4313	-2.7820	-.1467	.0310

DLP = dyslipidaemia, T2D = type 2 diabetes.

Once we select the variables that in the initial model have adjusted P values < .05. Variables selected by the model are: age, sex, DLP, and T2D.

[21], the percentage of “healthy” patients in the plaque group was significantly lower than in the group without plaque. In agreement with other studies [24], we found that HT was one of the most resistant co-morbidities to remission, suggesting the 2 processes share common mechanisms. It is widely accepted that BS results in significant weight loss and remission of diabetes in most patients [25], and we found a complete remission of T2D in patients without plaque. However, although the prevalence of T2D fell to 19% in patients with plaque, not all patients in this group recovered. These results suggest the presence of plaque may determine improvement 12 months after BS.

Vascular characteristics

In the absence of disease, VV nurtures the outer component of the vessel wall, and the intima is fed by oxygen diffusion from the lumen. As obesity progresses, intima thickness and oxygen diffusion are impaired; thus, the VV becomes the major source of nutrients. The molecular mechanisms responsible for neovessel formation are predominantly related to hypoxia [26]. In obesity, the paracrine effects of excess white adipose tissue, together with a high concentration of inflammatory cells surrounding the adventitia, stimulate the proliferation of VV penetrating the arterial wall [27]. This hyperplasia of VV has a role in endothelial permeability, neoangiogenesis and plaque microvascularisation during plaque initiation, progression, and rupture. The development of atheromatous plaque has been associated with abnormal VV of the arterial wall [26]. Thus, the observed increase in VV might reflect a

Table 4
Predictive model for plaque presence: odds ratio

	Odds ratio	CI 95% lower	CI 95% upper
Age	1.0426	.9828	1.1093
Sex, men	3.1948	.8528	13.3478
DLP, no	.3179	.0900	1.1103
T2D, no	.2390	.0619	.8636

DLP = dyslipidaemia; T2D = type 2 diabetes.

Once we select the variables that in the initial model have adjusted P values < .05. Variables selected by the model are: age, sex, DLP, and T2D.

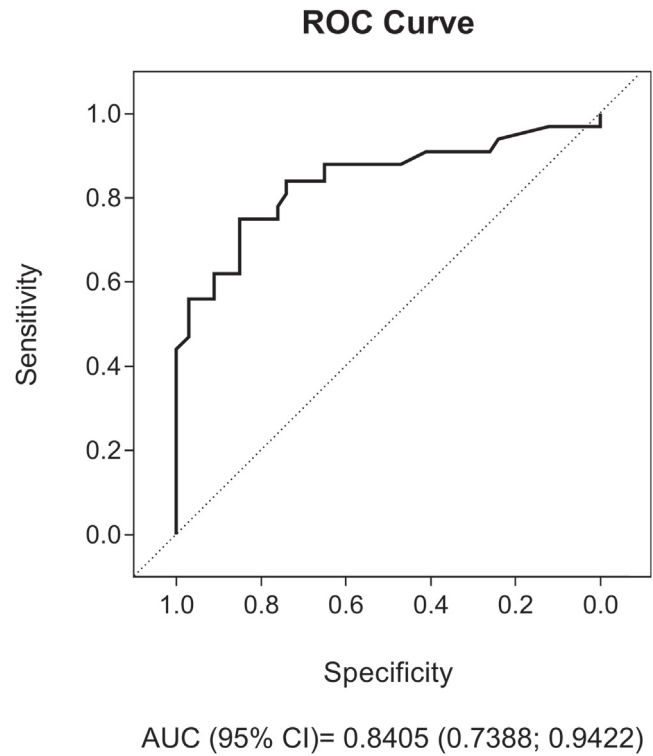


Fig. 3. Goodness of prediction model quantified using the ROC curve. The goodness of prediction was quantified using a ROC curve and subsequent calculation of the AUC and its confidence interval. n = 66 patients. ROC = receiver operating characteristic; AUC = area under curve.

predisposition in population with morbid obesity to develop atheromatous plaque.

Moreover, the hyperplasia of VV observed in patients with morbid obesity could be an important risk factor for CVD, leading to endothelial dysfunction in patients who do not yet have atheromatous plaque, and perhaps contributing to the rupture of atheromatous plaque in patients who already have atheroma. One year after surgery, we observed a normalization in VV [10], suggesting BS may reverse the morphology of early subclinical atherosclerosis.

The cIMT has been shown to predict CVR in multiple large-scale studies [28]. It increases during the slow progression of atherosclerosis over a long subclinical period characterized by endothelial damage and diffuse thickening of the arterial intima [29]. Our plaque group presented the highest cIMT levels, and values remained similar after BS. Although obesity probably promotes the conditions leading to endothelial damage and subclinical atherosclerosis [30], we observed that cIMT only increased in patients who already had plaque, but not in patients with obesity without plaque. Few authors found a decrease in cIMT after BS [31]. But because the plaque was not in remission at 12 months, it seems reasonable that the cIMT did not change after surgery [10]. Therefore, thickening of the intima-media may be an intermediate and irreversible phenotype

of early atherosclerosis, reflecting a morphologic change indicative of subclinical atherosclerosis. Our results support the added value of cIMT as a marker of subclinical atherosclerosis also in patients with morbid obesity.

One of the vascular alterations that could precede atherosclerosis is increased rigidity of the arterial wall. The AI has been proposed as a marker of arterial stiffness but only a few studies have evaluated the effect of morbid obesity, BS, and atheromatosis on arterial stiffness [32]. Lower AI values (including negative results) reflect better arterial elasticity [33]. Surprisingly, AI increased 12 months after surgery in both groups. This may be because AI is considered an independent risk factor for CVD not necessarily correlated with endothelial function, as it is also influenced by HR, height, and left ventricular ejection dynamics [34]. We observed the average RHI was similar between groups, although the percentage of patients with $RHI \leq 1.67$ was higher in the plaque group. In agreement with our findings, some studies have reported a paradoxical preservation of vascular function in patients with morbid obesity [35]. These results suggest further research is required to validate the efficacy of PAT to evaluate endothelial function.

Biochemical characteristics

Bariatric surgery effectively decreased TAG, glucose, and HbA1C levels in patients with and without plaque, as described previously [36].

In agreement with previous studies showing an association between AIP and physical activity or diet [37], we found that AIP correlated positively with BMI. A strong correlation has been reported between AIP and LDL particle size, and AIP has been considered an indicator of atherogenic lipoprotein status. It has been also reported that AIP can be used as an index for assessing CVR [38]. According to AIP, both groups showed an elevated risk of atherosclerosis at baseline, but after BS only the group without plaque reached values indicating a low CVR.

In a previous study, we found that NO levels in patients with morbid obesity were similar to values for nonobese controls [39]. In the present study, NO assessment did not reveal differences between groups or between times. Thus, in our patients, the constitutive capacity of vasodilation did not change.

Circulating LDL levels substantially modulate the physiology of the vascular endothelium and influence its capacity to respond to proatherogenic stimuli, and oxLDL is thought to be a major cause of atherosclerosis [40]. In our study, oxLDL levels decreased significantly after BS and differences were detected between groups. Similarly, other studies have reported that oxLDL is independently associated with a higher incidence of CVD events and atherosclerosis [41]. Thus, we suggest BS might decrease CVR by lowering oxLDL levels.

Increased PAI-1 expression has been reported in human atheromatous plaques [42] and morbid obesity [43,44]. Nevertheless, there is little information on the levels and role of PAI-1 in patients with morbid obesity with atheroma and changes after BS. In our study, the plaque group presented higher concentrations of PAI-1. We suggest that when PAI-1 concentrations in obese patients reach a threshold limit higher levels could favor the formation of atheromatous plaque. Even 1 year after surgery, the group with plaque still presented higher concentrations of PAI-1, which may indicate its involvement in plaque progression and suggest an upregulated expression of PAI-1 in the vasculature. We propose that this increase in PAI-1 levels as obesity progresses is probably due in part to inflammation and endothelial cell injury. This increase may lead to atheromatous disease promoting hypofibrinolysis, allowing fibrin to remain on the surface of the injured vessel and probably contributing to the increase in cIMT. Thus, referring to high PAI-1 levels in patients with obesity, both groups seemed to present early vascular injury at baseline. Nevertheless, as we have seen, after BS some of the parameters promoting endothelial damage decreased in the group without plaque; as a result, PAI-1 diminished and early vascular lesions may be reversed in these patients.

Given the observed differences between groups and time, we suggest that plasma PAI-1 concentration might be associated with the severity of subclinical atherosclerosis in obesity. Therefore, measuring PAI-1 may be an additional tool to identify patients with obesity at more risk of developing atheromatous CVD.

Atheroma plaque formation is a complex process involving a high number of biological mechanisms. The predictive model obtained indicates that age, sex, presence of DLP, and T2D can predict the presence of atheromatous plaque. Although this model is relatively simple, it captures some of the main features of atheroma formation and is in agreement with the hypothesis that atherosclerosis occurrence correlates with these variables [45].

Focusing on the possible clinical relevance of our results, it is worth noting that atherosclerosis, because of its long silent subclinical phase [46], usually it is not diagnosed until an acute event occurs. Furthermore, oxLDL, cIMT, and PAI-1 could be easily monitored. Hence, those patients who show persistent increased levels of these parameters after BS might be considered and followed for further management to prevent any acute cardiovascular event.

One of the limitations of this study was the lost patients during the follow-up and the lack of intermediate values for some parameters. In addition, it would be interesting to include a control group with normal weight and without CVD. Groups presenting different BMIs and ages should also be included to determine whether similar differences would be observed in patients with other degrees of obesity and to further elucidate the relationship between plaque and age.

Conclusion

In conclusion, our findings suggest obesity induces “accelerated atherogenesis” by promoting vascular endothelial damage. After BS, most of the atherogenicity parameters decreased, reducing the likelihood of new plaque formation or a change in existing plaque to a risk status. Therefore, BS reduces CVR even in patients with plaque, although the prognosis is better for patients without plaque.

We suggest an increase in PAI-1 might be one of the first alterations in the atheromatous process in obesity besides the increase in cIMT and VV proliferation, and that all 3 probably represent good biomarkers of subclinical atherosclerosis.

Disclosures

The authors have no commercial associations that might be a conflict of interest in relation to this article.

References

- [1] Megias-Rangil I, Merino J, Ferre R, et al. Subclinical atherosclerosis determinants in morbid obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014;24(9):963–8.
- [2] Yuyun MF, Ng LL, Ng GA. Endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide bioavailability, tetrahydrobiopterin, and 5-methyltetrahydrofolate in cardiovascular disease. Where are we with therapy? *Microvasc Res* 2018;119:7–12.
- [3] Engin A. Endothelial dysfunction in obesity. *Adv Exp Med Biol* 2017;960:345–79.
- [4] Pardina E, Ferrer R, Baena-Fustegueras JA, et al. Only C-reactive protein, but not TNF- α or IL6, reflects the improvement in inflammation after bariatric surgery. *Obes Surg* 2012;22(1):131–9.
- [5] Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 2011;12(5):3117–32.
- [6] Bilgic Gazioglu S, Akan G, Atalar F, Erten G. PAI-1 and TNF- α profiles of adipose tissue in obese cardiovascular disease patients. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(12):15919–25.
- [7] Executive summary of the third report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285(19):2486–97.
- [8] Sabetai MM, Tegos TJ, Nicolaidis AN, Dhanjil S, Pare GJ, Stevens JM. Reproducibility of computer-quantified carotid plaque echogenicity: can we overcome the subjectivity? *Stroke* 2000;31(9):2189–96.
- [9] Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, et al. Mannheim intima-media thickness consensus. *Cerebrovasc Dis* 2004;18(4):346–9.
- [10] Rius F, Sanchez E, Betriu A, et al. Influence of morbid obesity and bariatric surgery impact on the carotid adventitial vasa vasorum signal. *Obes Surg* 2018;28(12):3935–42.
- [11] Bonora E, Micciolo R, Ghiatas AA, et al. Is it possible to derive a reliable estimate of human visceral and subcutaneous abdominal adipose tissue from simple anthropometric measurements? *Metabolism* 1995;44(12):1617–25.
- [12] Arcidiacono MV, Rubinat E, Borrás M, et al. Left carotid adventitial vasa vasorum signal correlates directly with age and with left carotid intima-media thickness in individuals without atheromatous risk factors. *Cardiovasc Ultrasound* 2015;13:20.
- [13] Axtell AL, Gomari FA, Cooke JP. Assessing endothelial vasodilator function with the Endo-PAT 2000. *J Vis Exp* 2010;(44):2167.
- [14] Michelsen MM, Mygind ND, Pena A, et al. Peripheral reactive hyperemia index and coronary microvascular function in women with no obstructive CAD: the iPOWER Study. *JACC Cardiovasc Imaging* 2016;9(4):411–7.
- [15] Kalil GZ, Recober A, Hoang-Tienor A, Bridget Zimmerman M, Haynes WG, Pierce GL. Higher augmentation index is associated with tension-type headache and migraine in middle-aged/older humans with obesity. *Obesity* 2016;24(4):865–70.
- [16] Ricart-Jane D, Llobera M, Lopez-Tejero MD. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxide* 2002;6(2):178–85.
- [17] Shen S, Lu Y, Qi H, et al. Association between ideal cardiovascular health and the atherogenic index of plasma. *Medicine (Baltimore)* 2016;95(24):e3866.
- [18] Holmes DT, Frohlich J, Buhr KA. The concept of precision extended to the atherogenic index of plasma. *Clin Biochem* 2008;41(7–8):631–5.
- [19] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc* 1995;57(1):289–300.
- [20] Tibshirani R. Regression shrinkage and selection via the lasso. *J R Stat Soc Ser B* 1996;58(1):267–88.
- [21] Wildman RP. Healthy obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009;12(4):438–43.
- [22] Niemann B, Chen Y, Teschner M, Li L, Silber R-E, Rohrbach S. Obesity induces signs of premature cardiac aging in younger patients: the role of mitochondria. *J Am Coll Cardiol* 2011;57(5):577–85.
- [23] Abdelaal M, le Roux C, Docherty N. Morbidity and mortality associated with obesity. *Ann Transl Med* 2017;5(7):107.
- [24] Schiavon CA, Bersch-Ferreira AC, Santucci EV, et al. Effects of bariatric surgery in obese patients with hypertension: the GATEWAY randomized trial (Gastric Bypass to Treat Obese Patients With Steady Hypertension). *Circulation* 2018;137(11):1132–42.
- [25] Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA* 2003;289(1):76–9.
- [26] Moreno PR, Purushothaman KR, Zias E, Sanz J, Fuster V. Neovascularization in human atherosclerosis. *Curr Mol Med* 2006;6(5):457–77.
- [27] Raggi P. Epicardial adipose tissue and progression of coronary artery calcium: cause and effect or simple association? *JACC Cardiovasc Imaging* 2014;7(9):917–9.
- [28] Bots ML. Carotid intima-media thickness as a surrogate marker for cardiovascular disease in intervention studies. *Curr Med Res Opin* 2006;22(11):2181–90.
- [29] Mateo I, Morillas P, Quiles J, et al. What measure of carotid wall thickening is the best atherosclerotic loading score in the hypertensive patient: maximum or mean value [in Spanish]? *Rev Esp Cardiol* 2011;64(5):417–20.
- [30] Yan RT, Yan AT, Anderson TJ, Buithieu J, Charbonneau F, Title L, et al. The differential association between various anthropometric indices of obesity and subclinical atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009;207(1):232–8.
- [31] García G, Bunout D, Mella J, et al. Bariatric surgery decreases carotid intima-media thickness in obese subjects. *Nutr Hosp* 2013;28(4):1102–8.
- [32] Nordstrand N, Gjevestad E, Dinh KN, et al. The relationship between various measures of obesity and arterial stiffness in morbidly obese patients. *BMC Cardiovasc Disord* 2011;11:1471–2261.
- [33] Galkine A, Dzenkeviciute V, Sapoka V, et al. Effects of body weight reduction on arterial stiffness and endothelial function after bariatric surgery in morbidly obese patients: a 4-year clinical study. *Acta Endocrinol* 2018;14(4):491–7.
- [34] Anderson TJ. Arterial stiffness or endothelial dysfunction as a surrogate marker of vascular risk. *Can J Cardiol* 2006;22(Suppl B):72–80.

- [35] Biasucci LM, Graziani F, Rizzello V, et al. Paradoxical preservation of vascular function in severe obesity. *Am J Med* 2010;123(8):727–34.
- [36] Kang JH, Le QA. Effectiveness of bariatric surgical procedures: a systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)* 2017;96(46):e8632.
- [37] Niroumand S, Khajedaluae M, Khadem-Rezaiyan M, et al. Atherogenic index of plasma (AIP): a marker of cardiovascular disease. *Med J Islam Repub Iran* 2015;29:240.
- [38] Dobiasova M. AIP, atherogenic index of plasma as a significant predictor of cardiovascular risk: from research to practice [article in Czech]. *Vnitr Lek* 2006;52(1):64–71.
- [39] Pardina E, Ferrer R, Baena-Fustegueras JA, et al. The relationships between IGF-1 and CRP, NO, leptin, and adiponectin during weight loss in the morbidly obese. *Obes Surg* 2010;20(5):623–32.
- [40] Rafeian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med* 2014;5(8):927–46.
- [41] Gomez M, Vila J, Elosua R, et al. Relationship of lipid oxidation with subclinical atherosclerosis and 10-year coronary events in general population. *Atherosclerosis* 2014;232(1):134–40.
- [42] Lupu F, Heim Dominik A, Bachmann F, Hurni M, Kakkar VV, Kruihof Egbert KO. Plasminogen activator expression in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(9):1444–55.
- [43] Askarpour M, Alizadeh S, Hadi A, et al. Effect of bariatric surgery on the circulating level of adiponectin, chemerin, plasminogen activator inhibitor-1, leptin, resistin, and visfatin: a systematic review and meta-analysis. *Horm Metab Res* 2020;52(4):207–15.
- [44] Solá E, Vayá A, España F, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 levels in severe and morbid obesity. Effect of weight loss and influence of 4 G/5 G polymorphism. *Thromb Res* 2008;122(3):320–7.
- [45] Katakami N. Mechanism of development of atherosclerosis and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb* 2018;25(1):27–39.
- [46] Toth PP. Subclinical atherosclerosis: what it is, what it means and what we can do about it. *Int J Clin Pract* 2008;62(8):1246–54.

4.2 Article 2: inflamació i funció endotelial

Títol: *Effect of bariatric surgery on inflammation and endothelial dysfunction as processes underlying subclinical atherosclerosis in morbid obesity.*

Autors: Júlia Carmona-Maurici^a, Elena Cuello^b, David Ricart-Jané^a, Antonio Miñarro^c, Juan Antonio Baena-Fustegueras^b, Julia Peinado-Onsurbe^a, Eva Pardina^a.

Afiliacions:

a. Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya.

b. Departament de Cirurgia Gastrointestinal, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, IRB Lleida, Universitat de Lleida, Lleida, Espanya

c. Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya.

Informació de la revista: *Surgery for Obesity and Related Diseases. Impact Factor* (2020): 4.734, Citescore: 6.1, Percentil: 93% Quartil 1. DOI: 10.1016/j.soard.2020.07.036



ELSEVIER



Surgery for Obesity and Related Diseases 16 (2020) 1961–1970

SURGERY FOR OBESITY
AND RELATED DISEASES

Original article

Effect of bariatric surgery on inflammation and endothelial dysfunction as processes underlying subclinical atherosclerosis in morbid obesity

Júlia Carmona-Maurici, M.Sc.^a, Elena Cuello, M.D.^b, David Ricart-Jané, Ph.D.^a, Antonio Miñarro, Ph.D.^c, Juan Antonio Baena-Fustegueras, M.D.^b, Julia Peinado-Onsurbe, Ph.D.^{a,*}, Eva Pardina, Ph.D.^a

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^bGastrointestinal Surgery Department, Arnau de Vilanova University Hospital, IRB Lleida, University of Lleida, Lleida, Spain

^cDepartment of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Received 30 June 2020; accepted 27 July 2020

Abstract

Background: Inflammation and endothelial dysfunction are associated with morbid obesity (MO) and atherosclerosis.

Objective: To evaluate inflammation and endothelial function as the initial mechanisms underlying subclinical atherosclerosis in patients with MO, with and without atheromas, and their evolution after bariatric surgery (BS).

Setting: Arnau de Vilanova University Hospital and University of Barcelona.

Methods: Plasma samples from 66 patients with MO were obtained before BS and 6 and 12 months after BS. Patients were divided into 2 groups based on the presence of atheromatous plaques (detected by ultrasound imaging).

Results: Inflammation was increased as demonstrated by changes in the levels of fibroblast growth factor 21, adiponectin, leptin, interleukin 6, tumor growth factor α , nonesterified free fatty acids, lipoprotein(a) and C-reactive protein (CRP). Endothelial dysfunction was characterized by impaired angiogenesis (measured through angiopoietin 1 and 2 and brain-derived neurotrophic factor), vascular function (changes in endothelin 1 and thrombomodulin levels), and diapedesis (changes in intercellular and vascular cell adhesion molecules, and E- and P-selectins). Both mechanisms occurred regardless of the presence of atheromas. BS ameliorated both processes even in patients who already had subclinical atherosclerosis. However, CRP, thrombomodulin, and P-selectin levels were higher in patients with atheromas.

Conclusions: Endothelial dysfunction and inflammation were detected before the appearance of structural changes in vessel walls on ultrasonography images. BS might prevent or slow atherogenesis in the early stages by breaking the vicious circle between inflammation and endothelial dysfunction. CRP, thrombomodulin, and P-selectin may have a critical role in plaque development and, together with the study of endothelial dysfunction, might be useful in assessing early atherosclerosis and its evolution after BS. (Surg Obes Relat Dis 2020;16:1961–1970.) © 2020 American Society for Bariatric Surgery. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords:

Morbid obesity; Bariatric surgery; Inflammation; Endothelial dysfunction; Atheromatous plaque

Funding: This study was supported by the “Ministerio de Sanidad y Consumo,” Carlos III Institute of Health (ISCIII) (grant nos. PI15/00190 to JP–O and PI15/00332 to JAB–F) and the EU FEDER Programme (European Regional Development Fund: “Una manera de hacer Europa”).

*Correspondence: Julia Peinado-Onsurbe, Ph.D., Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Faculty of Biology, University of Barcelona, Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain.

E-mail address: jpeinado@ub.edu (J. Peinado-Onsurbe).

<https://doi.org/10.1016/j.soard.2020.07.036>

1550-7289/© 2020 American Society for Bariatric Surgery. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Currently, 13.1% of the adult population worldwide has obesity [1]. This multifactorial chronic disease is characterized by an accumulation of fat, which increases predisposition to co-morbidities such as type 2 diabetes mellitus (T2D), dyslipidemia (DLP), and hypertension (HT) [2]. Obesity is also a risk factor for several of the world's leading causes of death, including cardiovascular diseases [1]. Bariatric surgery (BS) is the most effective treatment for morbid obesity (MO) [3].

Atherosclerosis is a chronic progressive disease with a long asymptomatic phase (subclinical) during which an atheromatous plaque or atheroma forms. A vulnerable atheroma [4] can suddenly turn from a silent coronary lesion into an obstructive and symptomatic one, liable to rupture [5]. When a plaque ruptures, a cross-linked network is produced that allows a thrombus to form, resulting in acute cardiovascular complications [6].

A plethora of mechanisms, including inflammation and endothelial dysfunction, have been proposed to underlie the relationship between obesity and atherosclerosis [7].

Inflammation, in particular, is being increasingly recognized in the pathogenesis of atherosclerosis [7]. Obesity is characterized by the secretion of numerous inflammatory mediators, usually from adipose tissue, such as tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), leptin, lipocalin 2, C-reactive protein (CRP), and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) [8]. Some of these mediators, such as CRP and lipoprotein(a), cause thrombosis and have proatherosclerotic functions [9]. An increasing amount of evidence suggests that an imbalance between proinflammatory and anti-inflammatory adipokines or antithrombotic parameters (such as adiponectin and fibroblast growth factor 21 [FGF-21]) might be responsible for the development of endothelial dysfunction in MO, as well as atherosclerosis in the long-term [10].

Endothelial dysfunction is a key step in the initiation and maintenance of atherosclerosis. It is an early pathogenic event in vascular injury and represents a maladapted endothelial phenotype consisting of impaired angiogenesis, vasodilation, and diapedesis, alongside elevated levels of proinflammatory and prothrombotic factors [11].

Angiogenesis, partly mediated by angiopoietins (Ang1 and Ang2) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), is the physiologic process by which new blood vessels form from preexisting ones to supply cells with oxygen and nutrients [12]. An imbalance in the molecules involved in vasodilation, such as endothelin 1 (ET-1) and thrombomodulin (TM), could affect vessel dilation and permeability, thereby altering diapedesis and causing abnormal immune cell extravasation [11]. The adhesion of immune cells to the endothelium of vessel walls is one of the most important steps in inflammation [13]. Adhesion molecules such as intercellular adhesion molecule (ICAM), vascular cell adhesion molecule, P-selectin (P-sel), and E-selectin (E-sel) are the key mediators of endothelial-leukocyte interactions [14].

Inflammation and endothelial dysfunction may have an important role linking MO to subclinical atherosclerosis and, consequently, atherosclerotic disease. In this prospective observational study, 66 patients with MO were followed from 1 month before BS to 1 year after. The aim of this study was to evaluate inflammation and endothelial function as the initial mechanisms underlying subclinical atherosclerosis in MO in patients with and without atheromas and their evolution after BS.

Methods

Study population

This prospective observational study initially included 80 patients with MO enrolled at the Arnau de Vilanova University Hospital (Lleida, Spain). From this cohort, 14 patients were lost to follow-up (either by missing data, $n = 8$, or by the impossibility of obtaining echography images, so determining group, $n = 6$). The final study population was $n = 66$ for all the analyzed parameters. All patients were aged between 20 and 65 years, had a body mass index (BMI) of ≥ 40 kg/m² or 35 kg/m² with at least 1 comorbidity (including HT, T2D, DLP, obstructive sleep apnea, or weight-induced rheumatic disease) and presented a clinical history of MO for at least 5 years. The criteria used to diagnose T2D, HT, and DLP are detailed in the National Cholesterol Education Program [15]. All patients underwent a laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass ($n = 35$) or sleeve gastrectomy ($n = 31$) according to the surgeon's criteria and completed a 1-year follow-up.

The Hospital's Ethics Committee approved the study protocol and all patients provided informed consent to participate. All procedures performed in the study were conducted in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committees and with the Declaration of Helsinki or equivalent.

The 66 individuals were distributed into 2 groups based on the presence of atheromas, which were detected using a Vivid I ultrasound machine (General Electric Healthcare; Waukesha, WI) and standardized and validated scanning and reading protocols [16]. There were 32 patients in the group with atheromatous plaques and 34 in the group without plaques.

All measurements were obtained at 3 time points: 1 month before and 6 and 12 months after surgery. Plasma samples were collected under fasting conditions between 08:00 and 10:00.

None of the patients were diagnosed as having inflammatory or infectious diseases, and none were receiving antiobesity or anti-inflammatory drugs at the time of the study. Patients were excluded if they had any previous cardiovascular events, hypothyroidism, or endocrine diseases other than T2D or any neoplastic, renal, hepatic, or active systemic diseases.

Clinical measurements

Weight, height, and neck and waist circumferences were measured using standard procedures [17] to calculate the BMI.

Triacylglyceride (TAG), total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (cHDL), glucose, and glycosylated hemoglobin (HbA1c) levels were determined by routine laboratory procedures at the hospital. The Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) was calculated using the formula: $\text{HOMA-IR} = (\text{fasting insulin level in mUI/L}) \times (\text{fasting glucose level in mg/dL})/405$ [18]. The atherogenic index of plasma (AIP) was also calculated: $\text{AIP} = \log(-\text{TAG}/\text{cHDL})$ in mg/dL [19]. Patients with an AIP ≤ 2.1 were considered to have a low to moderate risk of presenting atherosclerosis, whereas patients with an AIP > 2.1 were considered to have a high risk of presenting atherosclerosis [20].

Biochemical analysis

The following plasma parameters were measured by enzyme-linked immunosorbent assay: leptin, adiponectin and E-sel (using kits from BioVendor; Brno, Czech Republic), IL-6, TNF- α , lipocalin 2, BDNF, Ang1, Ang2, ICAM, vascular cell adhesion molecule, P-sel, TM, ET-1 (using kits from R&D Systems; Minneapolis, MN), and lipoprotein(a) (using kits from Mercodia; Uppsala, Sweden). CRPs and nonesterified free fatty acids (NEFAs) were analyzed by turbidimetric and colorimetric methods, respectively, using reagents from RAL (Sant Joan Despí, Spain).

All the biochemical parameters were assessed under the quality management system of ISO 9001.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM in tables or as median and interquartile range in graphs. Statistical analyses for age and sex were performed using *t* test comparing patients with and without plaques. Statistical analyses of all the other quantitative variables were performed using 2-way analysis of variance (ANOVA) for paired samples and the Bonferroni post hoc test. We analyzed the distribution of the ANOVA residuals by performing the Kolmogorov-Smirnov test. Contingency tables with 2-sided Fisher exact test were used for categorical variables. Correlations between independent variables were determined by calculating Pearson correlation coefficient (*r*). Statistical differences were considered significant at $P < .05$. Analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software; San Diego, CA).

Results

After BS, all patients remained in the same group. There were no differences in the measured parameters between

types of surgery. Those with preexisting atheromas did not remit, while patients without plaques did not develop any new atheromas.

Anthropometric and clinical assessments

The anthropometric and clinical measurements of the patients during the course of the study are shown in Table 1. Patients with plaques were older than those without atheromas. There were also more men in the group with plaques. Patients with and without plaques were similar in terms of their BMI, total cholesterol, cHDL, and low-density lipoprotein cholesterol levels. However, the patients with plaques had higher levels of TAG, glucose, HbA1c, and HOMA-IR during the course of the study. We found that the AIP was also higher in the patients with plaques. After BS, the BMI as well as TAG, glucose, HbA1c, and HOMA-IR levels all decreased, while the cHDL level increased significantly in both groups. The prevalence of co-morbidities was higher in the patients with plaques, decreasing after BS in both groups (Table 1).

Inflammation and thrombosis

Before BS, there were no differences in the parameters associated with inflammation and thrombosis between the groups except for CRP, which was higher in the plaque group (Table 2). All the proinflammatory parameters measured except lipocalin 2 were reduced significantly after BS. However, CRP levels were still higher in the patients with atheromas during the course of the studied period.

Regarding the anti-inflammatory and antithrombotic parameters, we observed an increase in adiponectin levels but a significant decrease in FGF-21 levels that were similar in both groups after BS (Table 2).

Angiogenesis and vascular remodeling

No differences were observed between the patients with and without plaques in Ang1, Ang2, and BDNF expression during the study period (Fig. 1). After BS, Ang1 levels decreased significantly (Fig. 1A; about 19% and 32% in the groups without and with plaques, respectively), but there were no changes in Ang2 or BDNF levels (Fig. 1B and 1C). BDNF levels strongly correlated with Ang1 levels ($r = .645$, $P < .0001$). Moreover, correlations were found with inflammatory parameters, including between Ang2 and CRP ($r = .241$, $P = .004$) and also TNF- α ($r = .194$, $P < .020$).

Vasodilation and vasoconstriction

At the beginning of the study, the ET-1 level was the same between the groups (Fig. 2A), but the TM level was significantly higher in the patients with plaques (Fig. 2B). After BS, ET-1 levels decreased equally in both groups. However, TM levels decreased 6 months after BS in the patients without plaques and 12 months after BS in the patients

Table 1
Clinical characteristics of obese patients with/without plaque before and after bariatric surgery

Variables	Without plaque			With plaque			P value Plaque/time/interaction
	OB	6 mo	12 mo	OB	6 mo	12 mo	
Anthropometry							
n	34	-	-	32	-	-	-
Sex, women/men	29/5*	-	-	18/14	-	-	.0139
Age, yr	43.5 ± 1.8 [†]	-	-	51.8 ± 1.8	-	-	.0019
Weight, kg	119.1 ± 3.3	86.9 ± 2.7 [‡]	79.5 ± 2.9 [‡]	120.7 ± 4.0	87.9 ± 2.7 [‡]	81.5 ± 2.5 [‡]	NS/<.0001/NS
BMI, kg/m ²	45.7 ± 1.0	33.8 ± .9 [‡]	30.2 ± .9 [‡]	44.0 ± 1.3	32.0 ± .8 [‡]	29.8 ± .8 [‡]	NS/<.0001/NS
Neck, cm	40.6 ± .8	35.6 ± .7 [‡]	34.2 ± .6 ^{†,‡}	42.5 ± .9	37.9 ± .7 [‡]	37.5 ± .7 [‡]	.0078/<.0001/NS
Clinical test							
HR, beats/min	68.6 ± 1.6	56.6 ± 1.5 [‡]	56.9 ± 1.9 [‡]	73.3 ± 2.7	61.2 ± 2.2 [§]	60.1 ± 1.9 [‡]	.0426/<.0001/NS
Cholesterol, mg/dL	177.2 ± 4.8	152.9 ± 5.5 [‡]	163.3 ± 6.9	185.9 ± 8.0	162.02 ± 8.1 [¶]	180.9 ± 7.1	NS/<.0001/NS
cHDL, mg/dL	46.8 ± 1.4	46.0 ± 1.7	54.7 ± 2.0 [‡]	51.9 ± 6.4	49.7 ± 5.0	53.8 ± 1.8 [§]	NS/<.0001/NS
cLDL, mg/dL	107.4 ± 4.6	87.9 ± 4.8 [‡]	94.2 ± 6.8	107.9 ± 6.9	90.3 ± 6.2	106.8 ± 6.4	NS/.0009/NS
TAG, mg/dL	124.2 ± 8.0	94.0 ± 4.8 [‡]	76.6 ± 4.5 [‡]	164.3 ± 14.6	118.4 ± 9.8 [§]	98.9 ± 10.9 [§]	.0082/<.0001/NS
Glucose, mg/dL	99.8 ± 3.7 [†]	82.1 ± 1.7 [‡]	82.8 ± 1.7 [‡]	128.3 ± 7.8	90.1 ± 3.4 [‡]	99.6 ± 12.1	.0031/<.0001/NS
HbA1c, %	5.70 ± .16 [†]	5.16 ± .11 [‡]	5.13 ± .07 [‡]	6.61 ± .25	5.57 ± .22 [§]	5.54 ± .15 [‡]	.0049/<.0001/NS
HOMA-IR	1.96 ± .42	.66 ± .06	.53 ± .04 [¶]	5.17 ± .97	1.22 ± .41 [¶]	1.31 ± .43 [¶]	.0003/.0001/.0092
Co-morbidities							
Healthy (no HT, DLP and T2D), yes/no. %	50/50*	65/35	79/21 [¶]	13/87	50/50 [§]	56/44 [‡]	-
HT, yes/no. %	38/62*	29/71	15/85*, [¶]	78/22	43/57 [§]	35/65 [‡]	-
DLP, yes/no. %	28/72*	12/88 ^{†,¶}	6/94 ^{§,}	69/31	30/70 [‡]	16/84 [‡]	-
T2D, yes/no. %	19/81*	6/94	0/100 ^{¶,}	66/34	29/71 [‡]	19/81 [‡]	-

OB = obese; BMI = body mass index; NS = not significant; HR = heart rate; cHDL = cholesterol in high-density lipoprotein; cLDL = cholesterol in low-density lipoprotein; TAG = triacylglycerides; HbA1c = glycated hemoglobin; HOMA-IR = Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance; HT = blood hypertension; DLP = dyslipidemia; T2D = type 2 diabetes; ANOVA = analysis of variance.

Quantitative variables are expressed as mean ± SEM. Categorical variables are expressed by yes/no to indicate whether the patients presented a given pathology or not, and the result is expressed in percentage. Statistics for age and sex were computed using the Mann-Whitney test between obese patients with and without plaque. Statistics for the rest of quantitative variables were computed using 2-way ANOVA (group and time of follow-up) and the Bonferroni posttest. Contingency tables with 2-sided Fisher exact test were used for categorical variables.

* Differences versus with plaque, $P < .001$.

[†] Differences versus with plaque, $P < .01$.

[‡] Differences versus OB, $P < .001$.

[§] Differences versus OB, $P < .01$.

[¶] Differences versus OB, $P < .05$.

^{||} Differences versus with plaque, $P < .05$.

with plaques. One year after BS, TM levels were still higher in the patients with plaques. Furthermore, there was a positive correlation between ET-1 and the BMI ($r = .300$, $P < .001$) and leptin ($r = .193$, $P < .05$). TM levels correlated positively with the AIP ($r = .227$, $P = .006$).

Diapedesis

The adhesion molecules measured showed a similar response to BS (Fig. 3), with all 4 decreasing significantly. Interestingly, only P-sel levels (Fig. 3C) were different between the groups, being higher in those with plaques.

There were some correlations between the adhesion molecules. P-sel strongly correlated with E-sel ($r = .294$, $P < .0001$) and ICAM ($r = .213$, $P = .009$). Furthermore, P-sel correlated positively with some of the proinflammatory variables such as leptin ($r = .242$, $P = .003$), IL-6 ($r = .186$, $P = .025$), TNF- α ($r = .175$, $P = .036$), and CRP ($r = .225$, $P = .007$). E-sel also correlated with some of the proinflammatory and prothrombotic parameters such as the AIP

($r = .436$, $P < .0001$), leptin ($r = .176$, $P = .037$), IL-6 ($r = .224$, $P = .008$), and CRP ($r = .291$, $P < .0001$).

Finally, ICAM also showed correlations with the AIP ($r = .288$, $P < .0001$), leptin ($r = .287$, $P < .0001$), and TNF- α ($r = .338$, $P < .0001$).

Discussion

To our knowledge, there are no other cohort studies investigating the relationship between endothelial dysfunction and inflammation in humans with MO and subclinical atherosclerosis. The present study not only provides an entire analysis of the evolution of inflammation and endothelial dysfunction at different time points after BS, but it also establishes differences between patients with and without atheromas.

Impaired inflammation and thrombosis

In accordance with other studies, we found higher levels of proinflammatory parameters in MO [21], reflecting the

Table 2
Inflammatory parameters of obese patients with/without plaque before and after bariatric surgery

Variables	Without plaque			With plaque			P value
	OB	6 mo	12 mo	OB	6 mo	12 mo	
n	34	-	-	32	-	-	-
Anti-inflammatory							
FGF-21, pg/mL	330.48 ± 36.12	294.95 ± 34.87	189.91 ± 17.45*	383.13 ± 60.66	299.28 ± 48.24	209.22 ± 29.47†	NS/<.0001/NS
Adiponectin, ng/mL	8.89 ± .81	14.27 ± 1.37*	14.10 ± 1.19*	6.33 ± .44	10.18 ± .96*	13.91 ± 1.09*	NS/<.0001/NS
Proinflammatory							
Leptin, ng/mL	42.67 ± 3.53	12.78 ± 1.71*	10.85 ± 1.71*	31.52 ± 3.02	6.72 ± 1.27*	9.03 ± 1.39*	NS/<.0001/.0164
IL-6, pg/mL	4.05 ± .42	2.72 ± .44†	1.84 ± .33*	4.35 ± .35	3.39 ± .42†	2.30 ± .23*	NS/<.0001/NS
TNF-α, pg/mL	1.06 ± .05	.93 ± .06	.80 ± .04*	1.10 ± .06	.88 ± .04‡	.83 ± .04*	NS/<.0001/NS
NEFA, mmol/L	.52 ± .04	.42 ± .03	.41 ± .03†	.49 ± .04	.37 ± .04	.37 ± .04	NS/.0008/NS
Lp(a), U/L	258.17 ± 64.82	173.09 ± 41.62	181.38 ± 38.45‡	420.77 ± 81.77	305.76 ± 75.52	300.25 ± 54.85†	NS/.0146/NS
CRP, mg/L	8.80 ± 1.31	4.88 ± 1.28†	3.37 ± 1.20*	11.68 ± 1.46	8.43 ± 2.21†	4.87 ± .98*	.0239/<.0001/NS

OB = obesity; FGF-21 = fibroblast growth factor 21; NS = not significant; IL-6 = interleukin 6; TNF-α, tumor necrosis factor α; NEFA = nonesterified fatty acids; Lp(a) = lipoprotein(a); CRP = C-reactive protein; ANOVA = analysis of variance.

Variables are expressed as mean ± SEM. Statistics were computed using 2-way ANOVA (group and time of follow-up) and the Bonferroni posttest.

* Differences vs versus OB, *P* < .001.

† Differences vs versus OB, *P* < .05.

‡ Differences vs versus OB, *P* < .01.

low-grade inflammatory state characteristic of obesity. BS ameliorated the inflammatory and thrombotic profile in patients with and without plaques. These results could be explained by the enlargement of adipose tissue in patients with MO, which leads to a proinflammatory phenotype that is associated with increased reactive oxygen species production, as reported previously by our group [22,23].

In agreement with other studies, we also found reduced levels of anti-inflammatory and cardiometabolically protective adipokines such as adiponectin and FGF-21 [24]. In line with our results, there is strong evidence indicating that high circulating levels of FGF-21 are associated with higher cardiovascular risk (CVR) [25]. Hence, the increased levels in MO are probably a compensatory response to induce cardiac protection.

MO is also associated with an excessive release of NEFAs and an abnormal profile of adipokine levels, such as the elevated circulating levels of leptin and proinflammatory cytokines such as IL-6, which can increase the synthesis of TNF-α and PAI-1 [26].

CRPs have also been described to be prothrombotic, and the levels were higher in the patients with plaques. This seems reasonable given that CRP may act as a mediator of atheroma formation, thus contributing to an increased CVR [27]. Interestingly, CRP also induces atheroma instability by, based on its correlations, increasing endothelial cell adhesion molecule expression to promote monocyte recruitment to the atheromatous plaque [28]. Consistent with the higher levels of PAI-1 in MO found in previous studies [29], CRP can also promote PAI-1 production, thus contributing to thrombosis [28] and further facilitating the formation of atheromas and increasing the risk of cardiovascular events [30]. Hence, CRP and PAI-1 are not only inflammatory and CVR markers, they may also mediate

atherosclerosis through their roles in the formation of the initial lesions and the rupture of plaques.

Therefore, all together, inflammatory mechanisms could negatively affect endothelial function [31,32].

Impaired angiogenesis

By measuring the parameters associated with angiogenesis, we could assess vascular remodeling in patients with MO, with or without atheromas. In accordance with our study, other investigations have described that adipose tissue regression is associated with decreased Ang1 levels and stable Ang2 levels [33]. Their different evolution could be explained by their different roles. For example, Ang1 promotes vessel maturation and reduces permeability [33], whereas Ang2 can act as an antagonist to favor the remodeling of immature vessels [34]. In MO, the size or number of adipocytes [35] could lead to local hypoxia, which can further increase the expression of several angiogenic factors such as Ang1 and leptin [36], whose levels were also high in our population.

Recent studies have demonstrated that BDNF and its receptors stimulate angiogenesis and maintain vascular integrity [37]. Decreased plasma BDNF levels have been reported in patients who are at risk of cardiovascular disease [38]. However, we did not find differences in BDNF levels between the groups at any of the time points.

We did find correlations between inflammatory and prothrombotic parameters, supporting inflammation and angiogenesis as feed-forward mechanisms [39]. Disturbances in physiologic angiogenesis can lead to a growing number of diseases, including atherosclerosis, through the overproliferation of blood vessels [40]. Hence, based on our previous findings of an increased density of small blood vessels supplying the walls of large vessels in MO [29], we suggest that MO may be

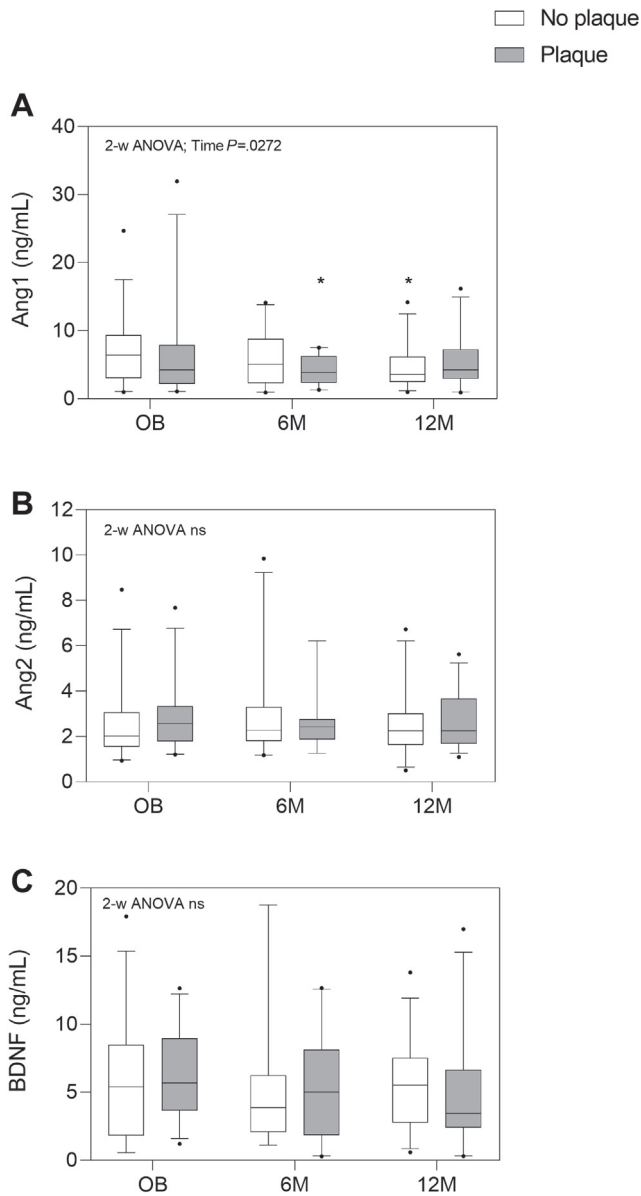


Fig. 1. Parameters associated with angiogenesis in morbidly obese patients with and without plaques before and after bariatric surgery. (A) Concentration of Ang1, blood vessel maturation/stability molecule. (B) Concentration of Ang2, proangiogenesis molecule. (C) Concentration of BDNF, neoangiogenesis molecule. ANOVA = analysis of variance; Ang1 = angiotensin 1; OB = 1 month before bariatric surgery; 6 M = 6 months after bariatric surgery; 12 M = 12 months after bariatric surgery; Ang2 = angiotensin 2; NS = not significant; BDNF = brain-derived neurotrophic factor. Results are expressed as median and interquartile range, with an interval of 95%. Two-way ANOVA (group and time of follow-up) and the Bonferroni post hoc test were performed. n = 66 patients. Differences were considered statistically significant when $P < .05$. * Denotes differences versus OB, same group. † Denotes differences versus patients with plaques, same time. One symbol, $P < .05$; 2 symbols, $P < .01$; 3 symbols, $P < .001$.

associated with an impaired angiogenesis that is characterized by immature and fragile new blood vessels whose pathologic expansion may in turn increase CVR [41].

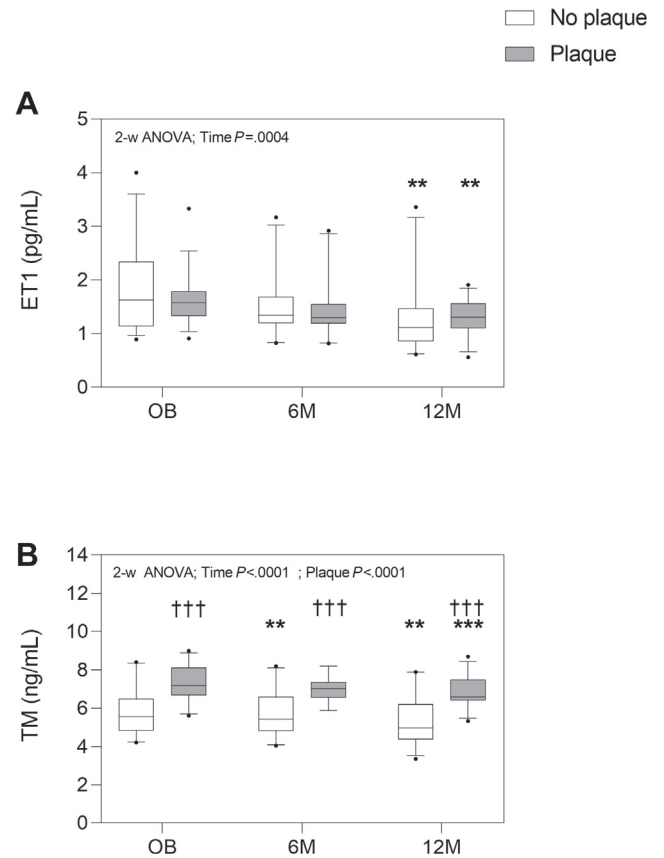


Fig. 2. Parameters associated with vasodilation in morbidly obese patients with and without plaques before and after bariatric surgery. (A) Concentration of the vasoconstrictor ET-1. (B) Concentration of the vasodilator TM. ANOVA = analysis of variance; ET-1 = endothelin 1; OB = 1 month before bariatric surgery; 6 M = 6 months after bariatric surgery; 12 M = 12 months after bariatric surgery; TM = thrombomodulin. Results are expressed as median and interquartile range, with an interval of 95%. Two-way ANOVA (group and time of follow-up) and the Bonferroni post hoc test were performed. n = 66 patients. Differences were considered statistically significant when $P < .05$. * Denotes differences versus OB, same group. † Denotes differences versus patients with plaques, same time. One symbol, $P < .05$; 2 symbols, $P < .01$; 3 symbols, $P < .001$.

Impaired vasodilation

One of the most important characteristics of endothelial dysfunction is its detrimental effect on endothelium-dependent vasodilation [42]. The endothelium is the source of the potent vasoconstrictor ET-1. In agreement with our results, other studies have also found increased ET-1 plasma levels in obese patients [43]. Furthermore, we found a positive correlation between ET-1 levels and BMI. Interestingly, leptin stimulates ET-1 release from endothelial cells [44], which is consistent with the observed correlation between these 2 parameters and the high levels of leptin in MO. ET-1 has been reported to increase the vascular activities of other vasoactive peptides and promote a prothrombotic and proatherogenic phenotype [42].

By contrast, TM exerts anticoagulatory effects through the thrombin-mediated activation of protein C [45]. Our

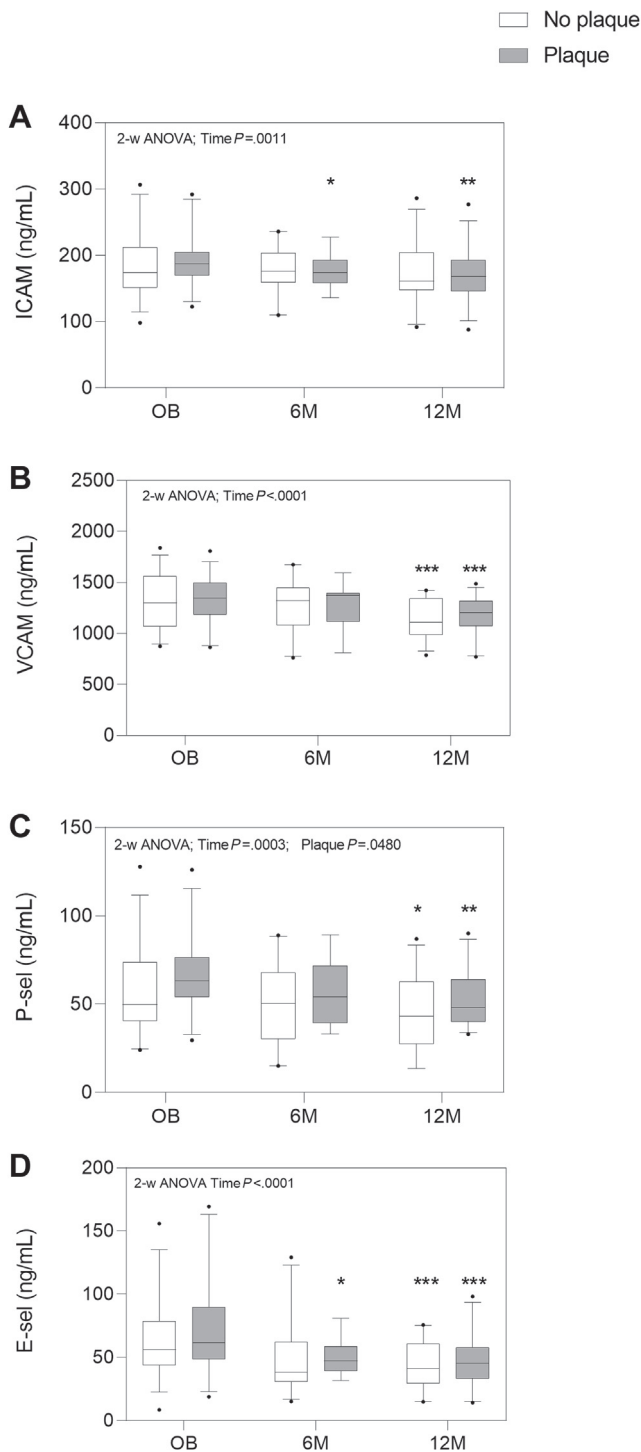


Fig. 3. Parameters associated with diapedesis in morbidly obese patients with and without plaques before and after bariatric surgery. (A) Concentration of ICAM, leukocyte-immobilization molecule. (B) Concentration of VCAM leukocyte-immobilization molecule. (C) Concentration of P-sel, rolling adhesion molecule. (D) Concentration of E-sel rolling adhesion molecule. ANOVA = analysis of variance; ICAM = intercellular adhesion molecule; OB = 1 month before bariatric surgery; 6 M = 6 months after bariatric surgery; 12 M = 12 months after bariatric surgery; VCAM = vascular cell adhesion molecule; P-sel = P-selectin; E-sel = E-selectin. Results are expressed as median and interquartile range, with an interval of 95%.

results provide further evidence that soluble TM levels are an indicator of endothelial damage [46], given that we observed a positive correlation between TM levels and the AIP. Therefore, the increased TM levels in obese patients with atheromas may be a defense mechanism against the proinflammatory and prothrombotic environment. The loss of normal vasodilation, especially in patients with plaques, together with increased ET-1-mediated vasoconstriction [47] could reflect endothelial dysfunction and the inability of arteries to dilate properly in response to increased blood flow, resulting in increased blood pressure and hypertension [48], which could lead to atherosclerosis and thrombosis [49] in MO.

Impaired diapedesis

The adhesion of immune cells to the endothelium of vessel walls is an important step in the migration of leukocytes to sites of inflammation or tissue injury [50]. In concordance with our results, previous studies have suggested that obesity is causally involved in the elevated levels of endothelial cell adhesion molecules [51]. The high concentrations of adhesion molecules observed before BS could be explained by the elevated levels of proinflammatory parameters in MO, which could stimulate the activation of endothelial cells and subsequently the expression of cell adhesion molecules [52]. In addition to cytokines, modified lipoproteins, increased blood pressure, oxidants, high glucose levels, and NEFAs at the concentrations observed in patients with MO could upregulate the expression of adhesion molecules [51,53]. Moreover, the strong correlations between the adhesion molecules and inflammatory parameters also highlight the direct effect of inflammation on endothelial cell activation. This activation results in leukocyte attachment mediated by selectins and CAMs [51].

Independent of the presence of plaques, the levels of all 4 endothelial cell adhesion molecules measured in this study decreased after BS [54,55]. This is in line with the results found for the proinflammatory stimuli.

Adhesion molecules are hypothesized to play an important role in the initiation of atherosclerosis [56]. In line with studies reporting an association between plasma P-sel levels and cardiovascular disease [57], we found significant differences in P-sel levels between the groups, probably because P-sel enhances procoagulant activity [58] and the activation of leukocyte integrins [59]. Because P-sel is a primary adhesion molecule in the initiation of cell activation and adhesion to platelets and endothelial cells [60], its levels

Two-way ANOVA (group and time of follow-up) and the Bonferroni post hoc test were performed. $n = 66$ patients. Differences were considered statistically significant when $P < .05$. * Denotes differences versus OB, same group. † Denotes differences versus patients with plaques, same time. One symbol, $P < .05$; 2 symbols, $P < .01$; 3 symbols, $P < .001$.

may mirror changes in atherogenic inflammation in the vascular bed, which could lead to subclinical atherosclerosis or plaque instability [61].

In summary, inflammation and endothelial dysfunction (characterized by impaired angiogenesis, vascular function, and diapedesis) are feedback mechanisms in MO regardless of the presence of atheromatous plaques. BS ameliorated both processes even in patients who already had subclinical atherosclerosis. However, CRP, TM, and P-sel levels were higher in the patients with atheromas.

These results are encouraging. Although we had a relatively small study population and we did not recruit healthy patients as controls, all the patients completed a thorough follow-up, and multiple clinical, inflammatory, and endothelial variables were analyzed.

Conclusions

In conclusion, endothelial dysfunction and inflammation were detected before the appearance of structural changes in vessel walls on ultrasonography images in patients with MO. BS might prevent or slow atherogenesis in the early stages by breaking the vicious circle between inflammation and endothelial dysfunction. CRP, TM, and P-sel may have a critical role in plaque development and, together with the study of endothelial dysfunction, might be useful in assessing early atherosclerosis and its evolution after BS.

Disclosures

The authors have no commercial associations that might be a conflict of interest in relation to this article.

Acknowledgments

We thank Teresa Vidal, Virtudes Maria, and Angels Betriu from the Vascular and Renal Translational Research Group, IRBLleida, for the detection of the atheromatous plaques. We thank Tasneem Ahmed and Michael Maudsley of the Language Services at the University of Barcelona for the final manuscript editing.

References

- [1] World Health Organization. Fact sheets. Obesity and overweight. Geneva: 2018 [cited 2020 Sep 7]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
- [2] Lovren F, Teoh H, Verma S. Obesity and atherosclerosis: mechanistic insights. *Can J Cardiol* 2015;31(2):177–83. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2014.11.031>.
- [3] Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2004;292(14):1724–37. <https://doi.org/10.1001/jama.292.14.1724>.
- [4] Fishbein MC. The vulnerable and unstable atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Pathol* 2010;19(1):6–11. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2008.08.004>.
- [5] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(10):2054–61. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000178991.71605.18>.
- [6] Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 1992;326(4):242–50. <https://doi.org/10.1056/NEJM199201233260406>.
- [7] Prieto D, Contreras C, Sanchez A. Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance. *Curr Vasc Pharmacol* 2014;12(3):412–26. <https://doi.org/10.2174/1570161112666140423221008>.
- [8] Balistreri CR, Caruso C, Candore G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm* 2010;2010:802078. <https://doi.org/10.1155/2010/802078>.
- [9] Boffa MB, Koschinsky ML. Lipoprotein (a): truly a direct prothrombotic factor in cardiovascular disease? *J Lipid Res* 2016;57(5):745–57. <https://doi.org/10.1194/jlr.R060582>.
- [10] Lau DCW, Dhillon B, Yan H, Szmítko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288(5):H2031–41. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01058.2004>.
- [11] Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EHC, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)* 2009;196(2):193–222. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01964.x>.
- [12] Otróck ZK, Mahfouz RAR, Makarem JA, Shamseddine AI. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis* 2007;39(2):212–20. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2007.04.001>.
- [13] Costa C, Incio J, Soares R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 2007;10(3):149–66. <https://doi.org/10.1007/s10456-007-9074-0>.
- [14] Danese S, Sans M, de la Motte C, et al. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2006;130(7):2060–73. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.03.054>.
- [15] Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285(19):2486–97. <https://doi.org/10.1001/jama.285.19.2486>.
- [16] Sabetai MM, Tegos TJ, Nicolaidis AN, Dhanjil S, Pare GJ, Stevens JM. Reproducibility of computer-quantified carotid plaque echogenicity: can we overcome the subjectivity? *Stroke* 2000;31(9):2189–96. <https://doi.org/10.1161/01.str.31.9.2189>.
- [17] Bonora E, Micciolo R, Ghiatas AA, et al. Is it possible to derive a reliable estimate of human visceral and subcutaneous abdominal adipose tissue from simple anthropometric measurements? *Metabolism* 1995;44(12):1617–25. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(95\)90084-5](https://doi.org/10.1016/0026-0495(95)90084-5).
- [18] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28(7):412–9. <https://doi.org/10.1007/bf00280883>.
- [19] Shen S, Lu Y, Qi H, et al. Association between ideal cardiovascular health and the atherogenic index of plasma. *Medicine (Baltimore)* 2016;95(24):e3866. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003866>.
- [20] Holmes DT, Frohlich J, Buhr KA. The concept of precision extended to the atherogenic index of plasma. *Clin Biochem* 2008;41(7–8):631–5. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.01.023>.
- [21] Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 2011;29:415–45. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101322>.

- [22] Salgado-Somoza A, Teijeira-Fernández E, Fernández AL, González-Juanatey JR, Eiras S. Proteomic analysis of epicardial and subcutaneous adipose tissue reveals differences in proteins involved in oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299(1):H202–9. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00120.2010>.
- [23] Carmona-Maurici J, Cuello E, Ricart-Jané D, Miñarro A, et al. Effect of bariatric surgery in the evolution of oxidative stress depending on the presence of atheroma in patients with morbid obesity. *Surg Obes Relat Dis*. Epub 2020 May 11. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2020.04.040>.
- [24] Payne GA, Kohr MC, Tune JD. Epicardial perivascular adipose tissue as a therapeutic target in obesity-related coronary artery disease. *Br J Pharmacol* 2012;165(3):659–69. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01370.x>.
- [25] Cheng P, Zhang F, Yu L, et al. Physiological and pharmacological roles of FGF21 in cardiovascular diseases. *J Diabetes Res* 2016;2016:1540267. <https://doi.org/10.1155/2016/1540267>.
- [26] Szade A, Grochot-Przeczek A, Florczyk U, Jozkowicz A, Dulak J. Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis. *IUBMB Life* 2015;67(3):145–59. <https://doi.org/10.1002/iub.1358>.
- [27] Badimon L, Peña E, Arderiu G, et al. C-reactive protein in atherothrombosis and angiogenesis. *Front Immunol* 2018;9:430.
- [28] Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation* 2003;107(3):398–404. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000052617.91920.fid>.
- [29] Carmona-Maurici J, Cuello E, Miñarro A, et al. Impact of bariatric surgery on subclinical atherosclerosis in patients with morbid obesity. *Surg Obes Relat Dis*. Epub 2020 Jun 10.
- [30] Bilgic Gazioglu S, Akan G, Atalar F, Erten G. PAI-1 and TNF- α profiles of adipose tissue in obese cardiovascular disease patients. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(12):15919–25.
- [31] Iantorno M, Campia U, Di Daniele N, et al. Obesity, inflammation and endothelial dysfunction. *J Biol Regul Homeost Agents* 2014;28(2):169–76.
- [32] Sartika C, Wijaya A, Lukito W, As'ad Army S. Central obesity, inflammation and angiogenesis in adult men. *Cell Death Ther* 2016;2:7–17. <https://doi.org/10.1515/cdth-2016-0001>.
- [33] Dallabrida SM, Zurakowski D, Shih SC, et al. Adipose tissue growth and regression are regulated by angiopoietin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311(3):563–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.10.007>.
- [34] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277(5322):55–60. <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.55>.
- [35] Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AWJ. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112(11):1796–808. <https://doi.org/10.1172/JCI19246>.
- [36] Haddad JJ, Harb HL. Cytokines and the regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α . *Int Immunopharmacol* 2005;5(3):461–83. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.11.009>.
- [37] Usui T, Naruo A, Okada M, Hayabe Y, Yamawaki H. Brain-derived neurotrophic factor promotes angiogenic tube formation through generation of oxidative stress in human vascular endothelial cells. *Acta Physiol (Oxf)* 2014;211(2):385–94. <https://doi.org/10.1111/apha.12249>.
- [38] Chaldakov GN, Fiore M, Stankulov IS, et al. Neurotrophin presence in human coronary atherosclerosis and metabolic syndrome: a role for NGF and BDNF in cardiovascular disease? *Prog Brain Res* 2004;146:279–89. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(03\)46018-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)46018-4).
- [39] Crewe C, An YA, Scherer PE. The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. *J Clin Invest* 2017;127(1):74–82. <https://doi.org/10.1172/JCI88883>.
- [40] Salehi E, Amjadi FS, Khazaei M. Angiogenesis in health and disease: role of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Isfahan Med Sch* 2011;29(132).
- [41] Subbotin VM. Excessive intimal hyperplasia in human coronary arteries before intimal lipid depositions is the initiation of coronary atherosclerosis and constitutes a therapeutic target. *Drug Discov Today* 2016;21(10):1578–95. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.05.017>.
- [42] Teixeira BC, Lopes AL, Macedo RCO, et al. Inflammatory markers, endothelial function and cardiovascular risk. *J Vasc Bras* 2014;13(2):108–15.
- [43] Parrinello G, Scaglione R, Pinto A, et al. Central obesity and hypertension: the role of plasma endothelin. *Am J Hypertens* 1996;9(12 Pt 1):1186–91. [https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(96\)00259-2](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(96)00259-2).
- [44] Quehenberger P, Exner M, Sunder-Plassmann R, et al. Leptin induces endothelin-1 in endothelial cells in vitro. *Circ Res* 2002;90(6):711–8. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000014226.74709.90>.
- [45] Sadler JE. Thrombomodulin structure and function. *Thromb Haemost* 1997;78(1):392–5.
- [46] Aso Y, Fujiwara Y, Tayama K, Takanashi K, Inukai T, Takemura Y. Relationship between plasma soluble thrombomodulin levels and insulin resistance syndrome in type 2 diabetes: a comparison with von Willebrand factor. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109(4):210–6. <https://doi.org/10.1055/s-2001-15108>.
- [47] Weil BR, Westby CM, Van Guilder GP, Greiner JJ, Stauffer BL, DeSouza CA. Enhanced endothelin-1 system activity with overweight and obesity. *Am J Physiol Circ Physiol* 2011;301(3):H689–95. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00206.2011>.
- [48] Giles TD, Sander GE, Nossaman BD, Kadowitz PJ. Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2012;14(4):198–205. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7176.2012.00606.x>.
- [49] Lin YJ, Juan CC, Kwok CF, et al. Endothelin-1 exacerbates development of hypertension and atherosclerosis in modest insulin resistant syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;460(3):497–503. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.017>.
- [50] Filippi MD. Mechanism of diapedesis: importance of the transcellular route. *Adv Immunol* 2016;129:25–53. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2015.09.001>.
- [51] Schram MT, Stehouwer CDA. Endothelial dysfunction, cellular adhesion molecules and the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 2005;37(Suppl 1):49–55. <https://doi.org/10.1055/s-2005-861363>.
- [52] Szmítko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: part I. *Circulation* 2003;108(16):1917–23. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000089190.95415.9F>.
- [53] Mathew M, Tay E, Cusi K. Elevated plasma free fatty acids increase cardiovascular risk by inducing plasma biomarkers of endothelial activation, myeloperoxidase and PAI-1 in healthy subjects. *Cardiovasc Diabetol* 2010;9:9. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-9-9>.
- [54] Pontiroli AE, Pizzocri P, Koprivec D, et al. Body weight and glucose metabolism have a different effect on circulating levels of ICAM-1, E-selectin, and endothelin-1 in humans. *Eur J Endocrinol* 2004;150(2):195–200.

- [55] Ito H, Ohshima A, Inoue M, et al. Weight reduction decreases soluble cellular adhesion molecules in obese women. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29(5–6):399–404. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2002.03672.x>.
- [56] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115–26. <https://doi.org/10.1056/NEJM199901143400207>.
- [57] Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation* 2001;103(4):491–5. <https://doi.org/10.1161/01.cir.103.4.491>.
- [58] André P, Hartwell D, Hrachovinová I, Saffari-pour S, Wagner DD. Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(25):13835–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.250475997>.
- [59] Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* 1990;75(3):550–4.
- [60] Woollard KJ, Chin-Dusting J. Therapeutic targeting of P-selectin in atherosclerosis. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2007;6(1):69–74. <https://doi.org/10.2174/187152807780077345>.
- [61] Woollard KJ, Lumsden NG, Andrews KL, et al. Raised soluble P-selectin moderately accelerates atherosclerotic plaque progression. *PLoS One* 2014;9(5):e97422. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097422>.

4.3 Article 3: estrès oxidatiu

Títol: *Effect of bariatric surgery in the evolution of oxidative stress depending on the presence of atheroma in patients with morbid obesity.*

Autors: Júlia Carmona-Maurici^a, Elena Cuello^b, David Ricart-Jané^a, Antonio Miñarro^c, Jorge Juan Olsina Kissler^b, Juan Antonio Baena-Fustegueras^b, Julia Peinado-Onsurbe^a, Eva Pardina^a

Afiliacions:

a. Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya.

b. Departament de Cirurgia Gastrointestinal, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, IRB Lleida, Universitat de Lleida, Lleida, Espanya

c. Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya.

Informació de la revista: *Surgery for Obesity and Related Diseases. Impact Factor* (2020): 4.734, Citescore: 6.1, Percentil: 93% Quartil 1. DOI: 10.1016/j.soard.2020.04.040



ELSEVIER



Original article

Effect of bariatric surgery in the evolution of oxidative stress depending on the presence of atheroma in patients with morbid obesity

Júlia Carmona-Maurici, M. Sc.^a, Elena Cuello, M.D.^b, David Ricart-Jané, Ph.D.^a, Antonio Miñarro, Ph.D.^c, Jorge Juan Olsina Kissler, M.D., Ph.D.^b, Juan Antonio Baena-Fustegueras, M.D.^b, Julia Peinado-Onsurbe, Ph.D.^{a,*}, Eva Pardina, Ph.D.^a

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Biology Faculty, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^bGastrointestinal Surgery Department, Arnau de Vilanova University Hospital, IRB Lleida, University of Lleida, Lleida, Spain

^cDepartment of Genetics, Microbiology, and Statistics, Biology Faculty, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Received 26 March 2020; accepted 24 April 2020

Abstract

Background: Morbid obesity is associated with accelerated atherosclerosis, a chronic vascular disease related to oxidative stress (OS) and endothelial dysfunction.

Objectives: We aimed to evaluate the effect of bariatric surgery (BS) on oxidative stress as a cardiovascular risk factor in patients with and without atheromatous plaques.

Setting: Arnau de Vilanova University Hospital and University of Barcelona.

Methods: Plasma samples from 66 patients with morbid obesity were obtained before BS and 6 and 12 months after. Patients were divided into 2 groups based on the presence of atheromatous plaques (detected by ultrasonography). OS parameters were measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: Patients with morbid obesity had OS independently of the presence of an atheroma, but oxidized low-density lipoprotein levels were higher in patients with plaques throughout the study ($P = .0430$). After surgery, oxidized low-density lipoprotein and malondialdehyde levels decreased significantly ($P < .0001$ in both cases). At the beginning of the study, antioxidant enzyme levels were the same between the groups. After surgery, paraoxonase 1 levels were increased ($P < .0001$) in the group without plaque, being significantly higher ($P = .0147$). Superoxide dismutase 2 levels were only decreased in patients without plaque ($P < .0010$), while catalase activity was higher in patients with plaque.

Conclusions: Morbid obesity may lead to chronic OS, which increases predisposition to atherogenesis. BS improves the antioxidant profile and reduces OS and co-morbidities in both groups. However, the benefits are greater for patients without plaque. Therefore, BS may prevent atheroma formation and also could prevent plaque rupture by decreasing OS. (Surg Obes Relat Dis 2020;16:1258–1265.) © 2020 American Society for Bariatric Surgery. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords:

Morbid obesity; Bariatric surgery; Oxidative stress; Atheromatous plaque

Supported by Ministerio de Sanidad y Consumo, the Institute of Health Carlos III (ISCIII) (grant nos. PI15/00190 to JP–O and PI15/00332 to JAB–F) and the EU FEDER Programme (European Regional Development Fund: Una manera de hacer Europa).

*Correspondence: Dr. Julia Peinado Onsurbe, Ph.D., Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Biology Faculty, University of Barcelona, Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain.

E-mail address: jpeinado@ub.edu (J. Peinado-Onsurbe).

<https://doi.org/10.1016/j.soard.2020.04.040>

1550-7289/© 2020 American Society for Bariatric Surgery. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Obesity is a multifactorial chronic disease that increases predisposition to cardiovascular diseases (CVDs) [1]. Both diseases are significant causes of morbidity and mortality worldwide [2,3].

Atherosclerosis is a complex process that involves different mechanisms, such as endothelial dysfunction, neovascularization, vascular proliferation, apoptosis, matrix degradation, oxidative stress (OS), inflammation, and thrombosis [4]. It is a chronic, progressive disease with a long asymptomatic phase (subclinical). Endothelial dysfunction is an early event in the disturbance of vascular homeostasis. It stimulates the production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules, which promote monocyte and T-cell adhesion to the vascular endothelium that results in the formation of neointima lesions. Proinflammatory cytokines also promote the recruitment of macrophages into the subendothelial space, where they internalize oxidized low-density lipoproteins (oxLDLs) to become foam cells, thereby contributing to fatty streak formation. This subsequently leads to the activation of matrix metalloproteinases, collagen degradation, and the migration and proliferation of vascular smooth muscle cells and endothelial cells, which all contribute to atheromatous plaque formation [5]. An atheromatous plaque is described as vulnerable or unstable when it suddenly changes from a silent coronary lesion into an obstructive symptomatic one that is liable to rupture [6]. Vulnerable plaques are generally characterized by a thin inflamed fibrous cap over a very large lipid core [7]. When a plaque ruptures, a cross-linked network is created that allows a thrombus to form, resulting in acute cardiovascular complications [8].

Obesity is characterized by an excess of adipose tissue and increases the risk of a number of co-morbidities, including impaired glucose tolerance and type 2 diabetes (T2D), hypertension (HT), dyslipidemia (DLP), obstructive sleep apnea [9], and atherosclerosis [10]. Obesity is also characterized by a chronic low-grade inflammation [11], with growing evidence indicating that it leads to an excess of reactive oxygen species (ROS) [12].

The primary sources of ROS are the mitochondria, plasma membrane, endoplasmic reticulum, and peroxisomes [13]. At physiologic concentrations, ROS act as signaling molecules that play an important role in regulating vascular tone, cell growth and proliferation, oxygen sensing, apoptosis, and inflammatory responses [14]. Furthermore, increased ROS production leads to an imbalance between oxidant and antioxidant factors, eliciting OS and oxidative modifications that can cause cell injury by directly oxidizing cellular proteins, lipids, and DNA or activating cell death signaling pathways [15]. Lipid oxidation is measured by determining concentrations of malondialdehyde (MDA) and oxLDL, which both play a critical role in cardiovascular diseases and contribute to atherogenesis [16].

To counteract OS, the vasculature is protected by antioxidant enzymes that detoxify ROS, including paraoxonases (PONs), superoxide dismutases (SODs), and catalases (CATs) [17].

Bariatric surgery (BS) is the most effective treatment for morbid obesity [6]. Previous studies have demonstrated that BS leads to a remission in obesity-associated co-morbidities and OS [12,18]. However, the effects of BS on the progression of subclinical atherosclerosis in patients with morbid obesity are still unknown.

This study included a cohort of 66 patients with morbid obesity who had undergone a thorough follow-up from 1 month before BS to 1 year after. Furthermore, given that plaque development and rupture are hallmarks of atherosclerotic disease [19], for the first time we divided the cohort into patients with or without atheromatous plaque.

The aim of this study was to evaluate the effect of bariatric surgery on oxidative stress as a cardiovascular risk factor in patients with and without atheromatous plaque.

Methods

Study population

This was a prospective observational cohort study carried out at the Hospital Universitari Arnau de Vilanova (Lleida, Spain). The Hospital's Ethics Committee approved the study protocol, and all patients provided informed consent to participate. All procedures performed in the study were conducted in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committees and with the Declaration of Helsinki or equivalent.

A total of 66 individuals with morbid obesity aged from 21 to 65 years were distributed into 2 groups: patients with atheromatous plaque ($n = 32$) and patients without atheromatous plaque ($n = 34$). The presence of carotid atheromatous plaques was determined using a Vivid-I ultrasound machine (General Electric Healthcare, Waukesha, WI) equipped with a 12 L-RS linear array transducer probe (5–13 MHz), using standardized and validated scanning and reading protocols [20].

All patients underwent BS and were followed up over 1 year. Laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass or sleeve gastrectomy was performed using a 5-trocar technique on 35 and 31 patients, respectively, according to surgeon criteria.

All measurements were taken at 3 time points: 1 month before and 6 and 12 months after surgery. Plasma samples for measuring biochemical parameters were collected under fasting conditions between 8:00 AM and 10:00 AM.

The inclusion criteria for surgery were a body mass index (BMI) ≥ 40 or ≥ 35 kg/m² and at least one co-morbidity (including HT, T2D, DLP, obstructive sleep apnea, or weight-induced rheumatic disease). The criteria used to diagnose T2D, HT, and DLP are detailed in the

National Cholesterol Education Program [21]. None of the patients were diagnosed as having inflammatory or infectious diseases, and none were receiving antiobesity or anti-inflammatory drugs at the time of the study. Patients were excluded if they had any previous cardiovascular events, hypothyroidism or endocrine diseases other than T2D, or neoplastic, renal, hepatic, or active systemic diseases.

Clinical measurements

Weight, height, and neck and waist circumferences were measured using standard procedures [22], and the BMI was then calculated.

Analysis of triacylglyceride (TAG), total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol (cLDL), high-density lipoprotein cholesterol (cHDL), glucose and glycosylated hemoglobin (HbA1C) levels were determined by routine laboratory procedures at the hospital.

Oxidative stress markers and antioxidant enzymes

Lipid peroxidation was estimated by measuring MDA in plasma samples (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure levels of oxLDL (Mercodia AD, Uppsala, Sweden), PON1 (Finetest, Wuhan, China), and SOD2 (AbFrontier, Seoul, Korea). CAT activity was measured by colorimetric assays (Cayman Chemical).

All the experiments performed at the University of Barcelona described in this article were conducted within the framework of the ISO 9001 Quality Management System, certified by SGS (inspection, verification, testing, and certification company).

Statistical analysis

Data are presented as the mean \pm SEM. Statistical analyses of age and sex were performed using the Mann-Whitney *U* test between obese patients with and without plaque. Statistical analyses of all other continuous variables were performed using 2-way paired measures analysis of variance (ANOVA) and the Bonferroni post hoc test. We analyzed the normality of the ANOVA residuals by performing the Kolmogorov-Smirnov test. Contingency tables with 2-sided Fisher exact test were used for categorical variables. Correlations between independent variables were determined by calculating Pearson correlation coefficient (*r*). Statistical differences were considered significant at $P < .05$.

Analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

Results

One year after BS, all patients from the plaque group still had an atheroma, while those in the group without plaques

did not develop any. The results of all the measured parameters were the same regardless of the type of BS.

Clinical measurements

The mean age of the patients with and without plaque was 51.8 ± 1.8 years and 43.5 ± 1.8 years, respectively ($P = .0019$).

Although there were more women in both groups, there were more men in the plaque group than in the group without plaques ($P = .0139$) (Table 1). Table 1 also shows the results of the clinical measurements taken before and 6 and 12 months after BS. There were no significant differences in BMI between the groups. After BS, it decreased by about 33% in both groups. Despite a significant decrease in weight in both groups after surgery, patients with atheromatous plaque had a higher heart rate (HR) throughout the study period ($P = .0426$).

Although there were significant improvements in the lipid profile following BS, TAG levels were higher in those with atheroma throughout the study ($P = .0082$), with their concentration decreasing in both groups ($P < .0001$). There were no differences in cHDL or cLDL levels between the groups. One year after BS, cHDL levels increased ($P < .0001$) and cLDL amounts decreased ($P = .0009$) significantly in both groups.

At the beginning of the study, glucose and HbA1C plasma levels were higher in the plaque group ($P = .0031$ and $P = .0049$, respectively). At 12 months after BS, they decreased significantly in both groups ($P < .0001$ in both cases) but were still higher in patients with plaque.

Table 2 shows the incidences of co-morbidities in both groups throughout the study. Patients with morbid obesity and an atheroma had more incidences of HT, DLP, and T2D.

Oxidative stress markers

Lipid peroxidation measured through oxLDL and MDA levels decreased in both groups ($P < .0001$) (Fig. 1A and 1B, respectively), with patients in the plaque group showing higher oxLDL levels ($P = .043$). Thus, plasma levels of OS markers decreased after BS.

Antioxidant enzymes

At the beginning of the study, PON1 and SOD2 levels and CAT activity were the same between the groups. After BS, PON1 levels increased in the group without plaque ($P < .0001$), but there were no changes among time in the plaque group (Fig. 2A). Interestingly, SOD2 levels decreased significantly after BS (Fig. 2B) in both groups. CAT activity increased after BS, becoming significantly higher in patients without plaque (Fig. 2C).

Table 1
Clinical characteristics of obese patients with/without plaque before and after bariatric surgery

Variables	With plaque			Without plaque			P value Plaque/time/interaction
	OB	6 mo	12 mo	OB	6 mo	12 mo	
n	32	-	-	34	-	-	-
Sex (women/men)	18/14	-	-	29/5*	-	-	.0139
Age (yr)	51.8 ± 1.8	-	-	43.5 ± 1.8 [†]	-	-	.0019
Weight (kg)	120.7 ± 4.0	87.9 ± 2.7 [‡]	81.5 ± 2.5 [‡]	119.1 ± 3.3	86.9 ± 2.7 [‡]	79.5 ± 2.9 [‡]	NS/<.0001/NS
BMI (kg/m ²)	44.0 ± 1.3	32.0 ± .8 [‡]	29.8 ± .8 [‡]	45.7 ± 1.0	33.8 ± .9 [‡]	30.2 ± .9 [‡]	NS/<.0001/NS
Excess weight (kg)	66.8 ± 3.7	26.2 ± 2.5 [‡]	19.7 ± 2.2 [‡]	68.7 ± 2.9	28.9 ± 2.4 [‡]	20.2 ± 2.2 [‡]	NS/<.0001/NS
Weight loss (kg)	-	33.0 ± 2.1	39.3 ± 2.9	-	32.7 ± 1.5	40.8 ± 2.0	NS/.0012/NS
Neck (cm)	42.5 ± .9	37.9 ± .7 [‡]	37.5 ± .7 [‡]	40.6 ± .08	35.6 ± .7 [‡]	34.2 ± .6 ^{‡,‡}	.0078/<.0001/NS
HR (beats/min)	73.3 ± 2.7	61.2 ± 2.2 [§]	60.1 ± 1.9 [‡]	68.6 ± 1.6	56.6 ± 1.5 [‡]	56.9 ± 1.9 [‡]	.0426/<.0001/NS
Cholesterol (mg/dL)	185.9 ± 8.0	162.02 ± 8.1 [¶]	180.9 ± 7.1	177.2 ± 4.8	152.9 ± 5.5 [‡]	163.3 ± 6.9	NS/<.0001/NS
cHDL (mg/dL)	51.9 ± 6.4	49.7 ± 5.0	53.8 ± 1.8 [§]	46.8 ± 1.4	46.0 ± 1.7	54.7 ± 2.0 [‡]	NS/<.0001/NS
cLDL (mg/dL)	107.9 ± 6.9	90.3 ± 6.2	106.8 ± 6.4	107.4 ± 4.6	87.9 ± 4.8 [‡]	94.2 ± 6.8	NS/.0009/NS
TAG (mg/dL)	164.3 ± 14.6	118.4 ± 9.8 [§]	98.9 ± 10.9 [§]	124.2 ± 8.0	94.0 ± 4.8 [‡]	76.6 ± 4.5 [‡]	.0082/<.0001/NS
Glucose (mg/dL)	128.3 ± 7.8	90.1 ± 3.4 [‡]	99.6 ± 12.1	99.8 ± 3.7 [‡]	82.1 ± 1.7 [‡]	82.8 ± 1.7 [‡]	.0031/<.0001/NS
HbA1C (%)	6.61 ± .25	5.57 ± .22 [‡]	5.54 ± .15 [‡]	5.70 ± .16 [‡]	5.16 ± .11 [‡]	5.13 ± .07 [‡]	.0049/<.0001/NS

OB = obese; NS, not significant; BMI = body mass index; HR = heart rate; cHDL = cholesterol in high-density lipoprotein; cLDL = cholesterol in low-density lipoprotein; TAG = triacylglyceride; HbA1C = glycated hemoglobin; ANOVA = analysis of variance.

Continuous variables are expressed as mean ± SEM. Statistics for age and sex were computed using the Mann-Whitney test between obese patients with and without plaque. Statistics for the rest of parameters were computed using 2-way ANOVA (group and time of follow-up) and the Bonferroni post test.

* Difference versus with plaque, *P* < .001.

[†] Difference versus with plaque, *P* < .01.

[‡] Difference versus OB, *P* < .001.

[§] Difference versus OB, *P* < .01.

[¶] Difference versus OB, *P* < .05.

Discussion

The early molecular mechanisms relating morbid obesity, OS, and subclinical atherosclerosis are not fully understood. Moreover, the evolution of subclinical atherosclerosis after BS-induced weight loss is not yet clear. To our knowledge, there have been no studies measuring the main mediators of

the oxidant response in obese patients with and without atheromatous plaques.

Clinical characteristics

We found that patients with morbid obesity as well as plaque showed different clinical characteristics to those

Table 2
Co-morbidities of patients with/without plaque before and after bariatric surgery

Variables	With plaque			Without plaque		
	OB	6 mo	12 mo	OB	6 mo	12 mo
n	32	-	-	34	-	-
Steatosis, yes/no (%)	81/19	-	-	63/27	-	-
Steatohepatitis, yes/no (%)	23/77	-	-	13/87	-	-
Healthy (no HT, DLP, and T2D), yes/no (%)	13/87	50/50*	56/44 [†]	50/50 [‡]	65/35	79/21 [§]
HT, yes/no (%)	78/22	43/57*	35/65 [†]	38/62 [‡]	29/71 [¶]	15/85 ^{‡,§}
DLP, yes/no (%)	69/31	30/70 [†]	16/84 [†]	28/72 [‡]	12/88 ^{§,}	6/94 ^{*,¶}
T2D, yes/no (%)	66/34	29/71 [†]	19/81 [†]	19/81 [‡]	6/94 [¶]	0/100 ^{§,¶}
OSAS, yes / no (%)	66/34	30/70*	6/94 [†]	47/53	29/71	21/79 ^{*,¶}

OB = obese; HT = blood hypertension; DLP = dyslipidemia; T2D = type 2 diabetes; OSAS = obstructive sleep apnea syndrome.

Variables are expressed by “yes/no” to indicate whether the patients presented a given pathology or not, expressed in percentage. Contingency tables with 2-sided Fisher exact test were used.

* Difference versus OB, *P* < .01.

[†] Difference versus OB, *P* < .001.

[‡] Difference versus with plaque, *P* < .001.

[§] Difference versus OB, *P* < .05.

[¶] Difference versus with plaque, *P* < .05.

^{||} Difference versus with plaque, *P* < .01.

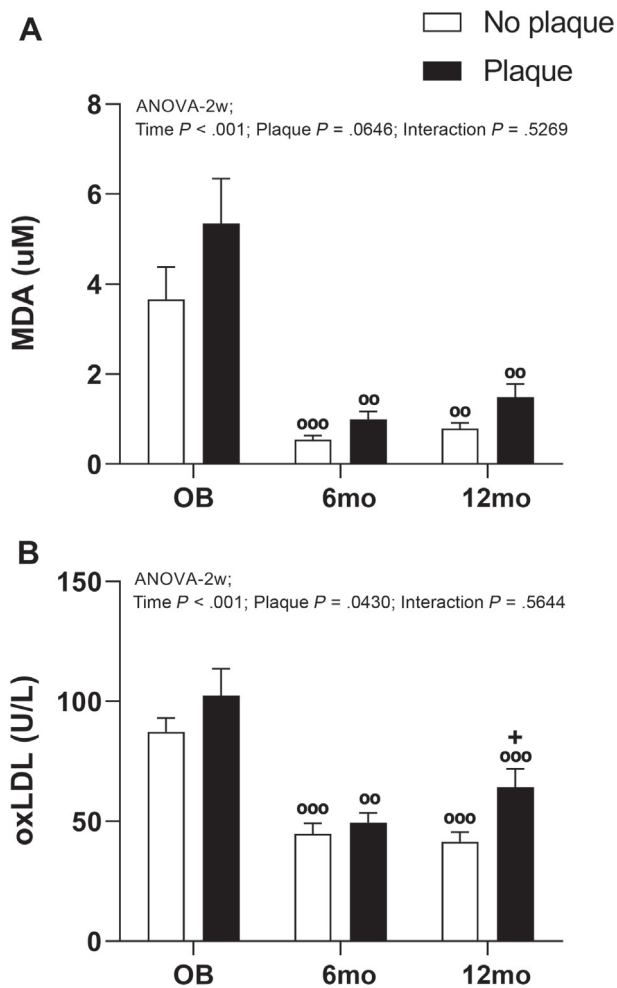


Fig. 1. Oxidative stress biomarkers. (A) Concentration of oxLDLs in patients with obesity and with/without atheromatous plaques before and after bariatric surgery. (B) Concentration of malondialdehyde in patients with/without atheromatous plaques before and after bariatric surgery. ANOVA = analysis of variance; NS, not significant; MDA = malondialdehyde; OB = obese; oxLDL = oxidized low-density lipoprotein. Results are expressed as mean \pm SEM. Two-way ANOVA (group and time of follow-up) and the Bonferroni post hoc test were performed. $n = 66$ patients. Statistical differences were considered significant when $P < .05$. * Differences versus OB, same group; † Differences versus with plaque, same time; ‡ $P < .05$; § $P < .01$; ¶ $P < .001$.

without. Patients with plaque were older and had higher levels of TAG, glucose, and HbA1C. Our results confirmed that obesity increases fasting plasma TAG concentrations as well as blood glucose levels [23], probably increasing the risk of CVD.

Interestingly, it has been proposed that a higher HR could increase the twisting of arteries during systole as well as the number of times per minute that forces are applied to the vascular wall, causing fatigue and endothelial damage [24]. HR has also been described as a good predictor of cardiovascular events, being associated with an increased progression of atherosclerosis and with an elevated risk of

plaque rupture in patients with atherosclerosis [25]. We observed a decrease in the HR after BS in both groups, indicating that it might be one of the mechanisms underlying the BS-mediated decrease in endothelial damage.

Oxidative stress

An imbalance in redox homeostasis leads to OS. Because of their double-bonded molecular structure, lipids are targets for oxidation [26]. To compare the OS state between patients with and without plaques, we measured 2 well-established OS biomarkers: MDA and oxLDL [27].

MDA is an end product of the oxidative decomposition of polyunsaturated fatty acids caused by free radicals. Its levels at the beginning of the study were higher than that after BS. This is in agreement with previous studies reporting increased MDA levels in patients with obesity compared with controls, as well as obesity being linked to a state of chronic OS [28]. Although the presence of atheroma does not affect its levels, MDA has been postulated to impair the interaction between oxLDLs and macrophages, thereby promoting atherosclerosis [29].

Oxidized LDL plays a central role in atherosclerosis, being proatherogenic and proinflammatory [30]. Generation of oxLDLs occurs generally in the vascular wall, where they are taken up by macrophages via scavenger receptor pathways to become foam cells. The accumulation of oxLDL within the vascular wall stimulates endothelial cells to produce proinflammatory cytokines, including adhesion molecules [31]. As LDLs become modified (by either aggregation, acetylation, and/or oxidation), their high concentrations are a well-established risk factor for CVDs [32] and have been associated with atherosclerosis development [29]. In this study, we found higher oxLDL concentrations in patients with plaque. This result is in agreement with previous studies that have indicated modified LDL as one of the main mediators inducing vascular damage and atherosclerotic disease development [33].

Clinical studies have demonstrated that oxLDL levels are associated with the severity of coronary artery disease and coronary plaque vulnerability [33,34]. Although we observed that patients with plaque had higher oxLDL concentrations, as reported previously, the levels of both OS markers decreased after BS [35]. Moreover, weight loss may be associated with decreased ROS generation.

Our data indicated that BS lowered lipid oxidation in both groups, which may have a potential role in slowing CVD progression.

Antioxidant enzymes

To counteract OS, there are enzymes that reduce the ROS burden and act as antioxidant defense systems, such as PON1, SOD2, and CAT.

PON1 is mainly synthesized by the liver and associates with high-density lipoprotein (HDL) particles. Many of

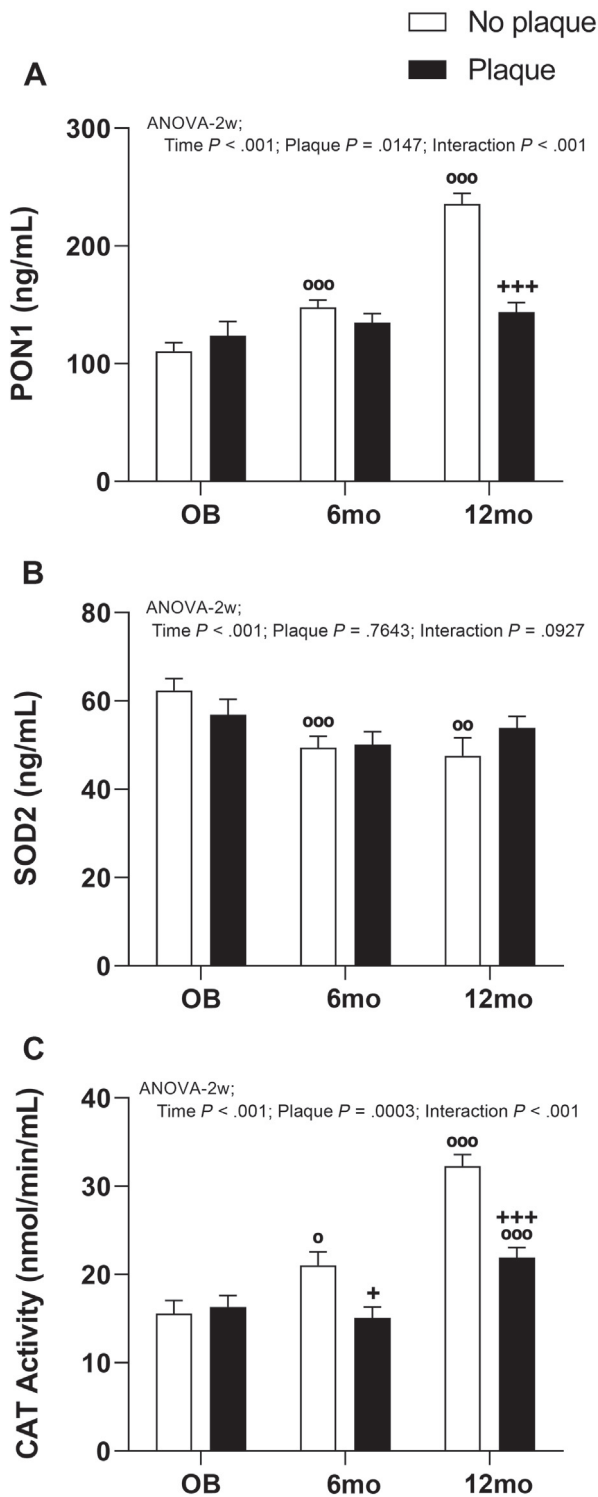


Fig. 2. Antioxidant profile of patients with morbid obesity with/without atheromatous plaque before and after bariatric surgery. (A) Paraoxonase 1 concentrations in patients with obesity with/without atheromatous plaque before and after bariatric surgery. (B) Superoxide dismutase 2 concentrations in patients with obesity with/without atheromatous plaque before and after bariatric surgery. (C) Catalase activity in patients with obesity with/without atheromatous plaque before and after bariatric surgery. ANOVA = analysis of variance; PON1 = paraoxonase 1; OB = obese;

the antiatherosclerotic properties of HDL are partly attributed to this enzyme [36]. HDL-associated PON1 inhibits the formation of oxidized phospholipids. Accordingly, we found a positive correlation between PON1 and HDL ($r = .36, P = .002$) and a negative correlation between oxLDL and PON1 ($r = -.28, P = .01$) in patients without plaque. One year after BS, we found higher levels of PON1 in the group without plaque. Considering the antioxidant function of PON1 and given that LDL oxidation is believed to be central to the initiation and progression of atherosclerosis, PON1 may have an atheroprotective effect.

It seems that the antioxidant capacity recovers in patients after BS. However, in the plaque group, PON1 levels did not change after surgery, probably because patients with atheroma were in a more advanced stage of the disease. Therefore, although PON1 could protect against atherosclerosis, its levels seem to decrease during disease progression. Indeed, some studies have shown that the decrease in PON1 levels closely correlates with the development of atherosclerosis [37]. Therefore, after BS, PON1 could be linked to the presence of plaques. Thus, it might be useful to evaluate the evolution of the risk of CVD after surgery. By increasing PON1 levels, BS could be beneficial by improving HDL function, lowering LDL peroxidation, and normalizing the redox microenvironment of the vascular wall to prevent the formation of a new atheromatous plaque.

SODs represent the primary cellular defense against superoxide radicals. They catalyze the conversion of superoxide into hydrogen peroxide (H_2O_2), which is then converted into water by other antioxidants [38]. Regarding changes in antioxidant levels after BS, we observed differences between the behavior of SOD2 and the other parameters measured. A possible explanation could be that at the beginning, obesity and inflammation stimulate antioxidant enzymes, but over a period of time, the stores of antioxidant enzymes become depleted and cannot cope with the increasing OS [39]. SOD2 levels could have increased in patients with morbid obesity to counteract the elevated oxidative damage associated with obesity. However, the increased levels of MDA and oxLDL suggest that despite SOD2 levels increasing in obese patients, this antioxidant might not have been able to defend cellular structures against OS. Other studies have also reported that the rise in SOD2 concentrations alone cannot cope with cellular ROS production [40].

CAT is a common antioxidant enzyme that uses either iron or manganese as a cofactor and catalyzes the reduction of H_2O_2 into water and molecular oxygen, thus completing the detoxification process initiated by SOD2 [41]. CAT is

NS = not significant; SOD2 = superoxide dismutase 2; CAT = catalase. Results are expressed as mean \pm SEM. Two-way ANOVA (group and time of follow-up) and the Bonferroni post hoc test were performed. $n = 66$ patients. Statistical differences were considered significant when $P < .05$; * Differences versus OB, same group; † Differences versus with plaque, same time; ‡ $P < .05$; § $P < .01$; ¶ $P < .001$.

highly efficient and can break down millions of H₂O₂ molecules in 1 second [42]. We noted an increase in CAT activity 12 months after surgery, being significantly higher in the group without plaque. Other studies have shown that arteriosclerosis is less prevalent in mice overexpressing CAT [43]. Furthermore, it has been reported that CAT protects against cardiovascular dysfunction and injuries [44], while humans with low CAT levels are more predisposed to T2D and can be affected more easily by atherosclerosis [45]. Moreover, obesity increases the expression of the SOD2 protein [46] but not CAT activity. The dysregulation of the signaling pathways involving these enzymes could lead to H₂O₂ accumulation, endothelial dysfunction, altered vascular tone, vascular inflammation, vascular remodeling, enhanced vascular permeability, and increased platelet aggregation, which can all impair angiogenesis and contribute to various vascular diseases such as atherosclerosis [47]. Interestingly, our results showed significant differences between the groups following surgery. Thus, CAT activity could be a useful parameter to evaluate the evolution of cardiovascular risk after BS. Furthermore, the improvement in antioxidant capacity after surgery may be the cause of the observed decreases in oxLDL and MDA levels.

Following on from our previous studies on obesity [48], we can add that the incidence of co-morbidities as well as OS were higher in patients with morbid obesity and atheromatous plaques. These results are in accordance with those of other studies [49]. Our data support the idea that OS could be an early event and/or a candidate with a central role in the pathology of obesity [50] and hence a risk factor for atheromatosis. Therefore, by favorably modifying lipids, decreasing blood pressure, reducing glycemia, and causing weight loss, BS may prevent the progression of atherosclerosis in high-risk obese populations. In this light, changes of OS variables after BS could be closely and easily monitored, and patients with persistent OS might be considered and followed for further management to prevent acute cardiovascular events.

The study was limited by the fact that no control groups were used. Nevertheless, because of the effective follow-up, we can compare each patient with himself or herself over time. Furthermore, we did not measure PON1 and SOD2 activities, but we took into account their regulation and measured their levels.

In general, in the context of morbid obesity, there were no differences in the oxidative profile between the groups. Patients with morbid obesity had OS independent of the presence of atheromatous plaques. Thus, we suggest that unless patients with morbid obesity undergo BS, the majority of them might develop subclinical atherosclerosis over time.

Conclusions

In conclusion, morbid obesity may lead to a chronic state of OS and induce long-term disruption in antioxidant mechanisms, causing endothelial damage and increasing the risk

of atherogenesis. Atheromatous plaques did not regress after surgery. Although the benefits are greater for patients without plaque, BS improves the antioxidant profile, reduces OS, and decreases the risk of co-morbidities and classical cardiovascular risk factors in patients with and without plaque. Therefore, BS could prevent atheroma formation in patients with morbid obesity and also slow down atherosclerosis progression in patients with plaque who already are in the subclinical phase by decreasing OS and preventing plaque rupture.

Disclosures

The authors have no commercial associations that might be a conflict of interest in relation to this article.

Acknowledgments

We thank Teresa Vidal, Virtudes Maria, and Angels Betriu from the Vascular and Renal Translational Research Group, IRBLleida, for the detection of the atheromatous plaques.

References

- [1] Lovren F, Teoh H, Verma S. Obesity and atherosclerosis: mechanistic insights. *Can J Cardiol* 2015;31(2):177–83.
- [2] NCD Risk Factor Collaboration. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet* 2017;390(10113):2627–42.
- [3] Hafiane A. Vulnerable plaque, characteristics, detection, and potential therapies. *J Cardiovasc Dev Dis* 2019;6(3):26.
- [4] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352(16):1685–95.
- [5] Ross R. Atherosclerosis — an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115–26.
- [6] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(10):2054–61.
- [7] Fishbein M. The vulnerable and unstable atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Pathol* 2008;19(1):6–11.
- [8] Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 1992;326(4):242–50.
- [9] Aronne LJ, Segal KR. Adiposity and fat distribution outcome measures: assessment and clinical implications. *Obes Res* 2002;10(1):184.
- [10] Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO. Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. *J Am Coll Cardiol* 2009;53(21):1925–32.
- [11] Pardina E, Ferrer R, Baena-Fustegueras JA, et al. Only C-reactive protein, but not TNF- α or IL6, reflects the improvement in inflammation after bariatric surgery. *Obes Surg* 2012;22(1):131–9.
- [12] Schmatz R, Bitencourt MR, Patias LD, et al. Evaluation of the biochemical, inflammatory and oxidative profile of obese patients given clinical treatment and bariatric surgery. *Clin Chim Acta* 2017;465:72–9.
- [13] Lismont C, Nordgren M, Van Veldhoven PP, Fransen M. Redox interplay between mitochondria and peroxisomes. *Front Cell Dev Biol* 2015;3:35.

- [14] Zhang DX, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292(5):19.
- [15] Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol* 2013;87(7):1157–80.
- [16] Stocker R, Keaney Jr JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84(4):1381–478.
- [17] Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 2012;5(1):9–19.
- [18] Pardina E, Ferrer R, Catalán R, et al. Metabolic changes in morbidly obese patients after bariatric surgery. In *A multidisciplinary approach to bariatric surgery*, New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2013; 130–43.
- [19] Insull Jr W. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med* 2009;122(1):S3–14.
- [20] Sabetai MM, Teges TJ, Nicolaides AN, Dhanjil S, Pare GJ, Stevens JM. Reproducibility of computer-quantified carotid plaque echogenicity: can we overcome the subjectivity? *Stroke* 2000;31(9):2189–96.
- [21] Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285(19):2486–97.
- [22] Bonora E, Micciolo R, Ghiatas AA, et al. Is it possible to derive a reliable estimate of human visceral and subcutaneous abdominal adipose tissue from simple anthropometric measurements? *Metabolism* 1995;44(12):1617–25.
- [23] Klop B, Elte JWF, Cabezas MC. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients* 2013;5(4):1218–40.
- [24] Tardif JC. Heart rate and atherosclerosis. *Eur Heart J Suppl* 2009;11(Suppl D):D8–12.
- [25] Heidland UE, Strauer BE. Left ventricular muscle mass and elevated heart rate are associated with coronary plaque disruption. *Circulation* 2001;104(13):1477–82.
- [26] Porter NA, Caldwell SE, Mills KA. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 1995;30(4):277–90.
- [27] Ho E, Karimi Galougahi K, Liu CC, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol* 2013;1(1):483–91.
- [28] Joao Cabrera E, Valezi AC, Delfino VD, Lavado EL, Barbosa DS. Reduction in plasma levels of inflammatory and oxidative stress indicators after Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg* 2010;20(1):42–9.
- [29] Parthasarathy S, Steinberg D, Witztum JL. The role of oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Annu Rev Med* 1992;43:219–25.
- [30] Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD. Targeting early atherosclerosis: a focus on oxidative stress and inflammation. *Oxid Med Cell Longev* 2019;2019: 8563845.
- [31] Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *Faseb J* 2001;15(12):2073–84.
- [32] Downs JR, Clearfield M, Weis S, et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas coronary atherosclerosis prevention study. *JAMA* 1998;279(20):1615–22.
- [33] Amaki T, Suzuki T, Nakamura F, et al. Circulating malondialdehyde modified LDL is a biochemical risk marker for coronary artery disease. *Heart* 2004;90(10):1211–3. <https://doi.org/10.1136/hrt.2003.018226>.
- [34] Silvestre-Roig C, Winther MPD, Weber C, Daemen MJ, Lutgens E, Soehnlein O. Atherosclerotic plaque destabilization. *Circ Res* 2014;114(1):214–26.
- [35] Melissas J, Malliaraki N, Papadakis JA, Taflampas P, Kampa M, Castanas E. Plasma antioxidant capacity in morbidly obese patients before and after weight loss. *Obes Surg* 2006;16(3):314–20.
- [36] Mackness M, Mackness B. Targeting paraoxonase-1 in atherosclerosis. *Expert Opin Ther Targets* 2013;17(7):829–37.
- [37] Zhou C, Cao J, Shang L, et al. Reduced paraoxonase 1 activity as a marker for severe coronary artery disease. *Dis Markers* 2013;35(2):7.
- [38] Liu Y, Qi W, Richardson A, Van Remmen H, Ikeno Y, Salmon AB. Oxidative damage associated with obesity is prevented by overexpression of CuZn- or Mn-superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;438(1):78–83.
- [39] Sabitha K, Venugopal B, Rafi M, Ramana KV. Role of antioxidant enzymes in glucose and lipid metabolism in association with obesity and type 2 diabetes. *Am J Med Sci Med* 2014;2(1):21–4.
- [40] Szuchman-Sapir A, Etzman M, Tamir S. Human atherosclerotic plaque lipid extract impairs the antioxidant defense capacity of monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;423(4):884–8.
- [41] Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J* 2016;15(1):71.
- [42] Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(2):192–208.
- [43] Yang H, Roberts LJ, Shi MJ, et al. Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circ Res* 2004;95(11):1075–81.
- [44] Lei XG, Zhu JH, Cheng W-H, Bao Y, et al. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications. *Physiol Rev* 2016;96(1):307–64.
- [45] Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med* 2018;54(4):287–93.
- [46] Skrzycki M, Majewska M, Podsiad M, Czeczot H. Expression and activity of superoxide dismutase isoenzymes in colorectal cancer. *Acta Biochim Pol* 2009;56(4):663–70.
- [47] Fukui T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 2011;15(6):1583–606.
- [48] Pardina E, Ferrer R, Rossell J, et al. Diabetic and dyslipidaemic morbidly obese exhibit more liver alterations compared with healthy morbidly obese. *BBA Clin* 2016;5:54–65.
- [49] Hopps E, Noto D, Caimi G, Averna MR. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010;20(1):72–7.
- [50] Paoletti R, Bolego C, Poli A, Cignarella A. Metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. *Vasc Health Risk Manag* 2006;2(2):145–52.

4.4 Article 4: glicoproteïnes (preparat per enviar)

Títol: *GlycA and GlycB as biomarkers of inflammation-derived cardiovascular risk but not of subclinical atherosclerosis, and their normalization after bariatric surgery.*

Autors: Júlia Carmona-Maurici^a, Núria Amigó^b, Elena Cuello^c, Marcelino Bermúdez^d, Juan Antonio Baena-Fustegueras^c, Julia Peinado-Onsurbe^a, Eva Pardina^a

Afiliacions:

a. Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain;

b. Biosfer Teslab SL; DEEEA, Metabolomics platform, Universitat Rovira i Virgili, IISPV; CIBERDEM;

c. Department of Gastrointestinal Surgery, Arnau de Vilanova University Hospital, IRB Lleida, University of Lleida, Lleida, Spain;

d. Vascular & Renal Translational Research Group, Experimental Medicine Department, IRB Lleida, Lleida, Spainb. Departament de Cirurgia Gastrointestinal, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, IRB Lleida, Universitat de Lleida, Lleida, Espanya

Subclinical atherosclerosis and severe obesity: role of GlycA and B in inflammation and bariatric surgery effect.

Authors: Júlia Carmona¹, Núria Amigó², Elena Cuello³, Marcelino Bermúdez⁴, Juan Antonio Baena-Fustegueras³, Julia Peinado-Onsurbe¹, Eva Pardina¹

Author institutions: 1 Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain; 2 Biosfer Teslab SL; DEEEA, Metabolomics platform, Universitat Rovira i Virgili, IISPV; CIBERDEM; 3 Department of Gastrointestinal Surgery, Arnau de Vilanova University Hospital, IRB Lleida, University of Lleida, Lleida, Spain; 4 Vascular & Renal Translational Research Group, Experimental Medicine Department, IRB Lleida, Lleida, Spain.

Keywords: severe obesity, bariatric surgery, atherosclerotic plaque, 1H-NMR, inflammation, glycoprotein, biomarkers.

ABSTRACT

Background: Severe obesity (SE) and atherosclerosis are chronic inflammatory diseases. Glycosylation plays an important role in the inflammatory response. We aim to first, compare the glycoprotein profile between control subjects and individuals with MO, and second, between the group with atheromatous plaques and the one without. Finally, to study the impact of bariatric surgery (BS) on glycoprotein levels in relation to the presence of atheromas and in comparison with those of inflammatory parameters.

Subjects and methods: Forty control individuals and 37 subjects with SE with or without atheromatous plaques were included in the study. We used 1H-NMR spectroscopy to characterize plasma glycoprotein signals, including GlycA, GlycB and GlycF. We evaluated the effect of BS and its interaction with atheromatous plaques in 24 subjects who underwent BS follow-up.

Results: Subjects with SE presented significantly higher GlycA and GlycB concentrations and height-to-width ratios than control individuals did ($p < 0.0001$),

independently of the presence of atheromas. BS normalized the glycoprotein profile, which strongly correlated with the inflammatory parameters.

Conclusion: NMR glycoprotein profiles may be useful in assessing the inflammatory state associated with SE independently of the presence of atheromas. Glycoprotein variables are not markers of subclinical atherosclerosis, but could be associated with cardiovascular risk through inflammation.

Funding: Study supported by the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) [PI15/00190 to JP–O and PI15/00332 to JAB–F] and FEDER Funds of the EU (Fondo Europeo de Desarrollo Regional: “Una manera de hacer Europa”).

INTRODUCTION

Severe obesity (SE) is caused by a positive caloric balance and is characterized by an excess of pathological adipose tissue with anatomical and functional disturbances that result in adverse endocrine and immune responses (1). It is associated with an increased risk of several diseases such as atherosclerosis, hypertension (HT), hyperlipidemia, and type II diabetes (T2D) (2).

Atherosclerosis is a chronic, slow, progressive disease with a long asymptomatic or subclinical phase during which an atheroma forms. An atheroma or atheromatous plaque consists of an accumulation of cells or cellular debris containing lipids, calcium, and fibrous connective tissue found between the endothelium lining and the smooth muscle cell-rich medial layer of arterial walls. Vulnerable plaques are those with a thin fibrous cap that are susceptible to rupture, which can cause thrombosis (3).

MO and atherosclerosis are chronic inflammatory diseases that share some similar pathophysiological pathways such as lipid accumulation, inflammatory cell infiltration, cytokine production, and cell death, which contribute to both conditions, their interplay, and their complications (4). In atherosclerosis particularly, inflammation plays a central role in driving endothelial dysfunction, plaque development, and, ultimately, plaque vulnerability and rupture (5).

In MO, the excessive adipose tissue can elicit a pro-inflammatory state by releasing cytokines such as the C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL6), and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) (6), which are all associated with atherosclerosis (7).

Glycosylation also plays an important role in the inflammatory response and has potential for diagnostic and prognostic uses either in combination with current diagnostic markers or on their own (8). Human plasma glycoproteins belong to a large family of acute-phase proteins whose concentrations increase or decrease in inflammatory disorders. Changes in the glycosylation of these proteins indicate cellular changes in a large number of diseases, which is why they can be regarded as diagnostic markers (9).

Glycosylation is the most diverse post-translational protein modification that can modulate protein function through numerous elaborate ways. During glycosylation, oligosaccharides are covalently bound to proteins through the nitrogen atoms of asparagine or the oxygen atoms of serine or threonine side chains to form N- and O-linked glycoproteins, respectively (10).

During inflammation, there are changes in the number of glycosylated branches that are rich in N-acetylglucosamine (GlcNAc), N-acetylgalactosamine (GalNAc), N-acetylneuraminic acid (or sialic acid), and fucose residues (8).

Proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$) spectroscopy allows the study of glycoproteins by profiling the five glycoprotein variables arising from GlcNAc-protein and GalNAc-protein NMR signals (GlycA), N-acetylneuraminic acid-protein NMR signals (GlycB), and free GlcNAc, GalNAc and N-acetylneuraminic acid NMR signals (GlycF). It also provides the height-to-width (H/W) ratio, which is associated with the sugar-protein bond aggregation state, of GlycA and GlycB. H/W ratios not only provide information on glycoprotein levels, but also on their thermodynamic and kinetic features. Changes in the conformational flexibility of proteins modify their functional roles (11).

Recently, some studies have reported GlycA as a marker of inflammation associated with cardiometabolic disease and mortality (12). Furthermore, an association between GlycA levels and severe obesity and their decrease after bariatric surgery (BS) have also been reported (13). BS is the most effective therapy for the management of SE and generally improves the comorbidities associated with it (14).

The precise nature of the association between obesity, inflammation, atherosclerosis, and protein glycosylation is not clearly understood. In atherosclerosis, plaque development and rupture are key issues (15). Therefore, we divided our cohort of subjects with SE into two groups depending on the presence of atheromatous plaques. We hypothesized that the glycoprotein profile might be associated with disturbances in inflammatory adipokine levels and atherogenesis in the group with MO. Based on this hypothesis, we aimed to first compare the glycoprotein profile (GlycA, GlycB and GlycF concentrations and aggregation states) of normal-weight subjects with that of individuals with MO. Second, we aimed to compare glycoprotein profiles in subjects with MO, with or without atheromatous plaques. Finally, the third aim of the study was to assess the impact of BS on glycoprotein profiles in relation to the presence of atheromas and compare the changes in glycoprotein levels with those of inflammatory parameters.

SUBJECTS AND METHODS

Study population

This observational prospective cohort study included participants with SE recruited at the Hospital Arnau de Vilanova (Lleida, Spain). Thirty-seven subjects with SE (26 women and 11 men, aged from 21 to 65 years) were enrolled and presented for pre-operative anthropometric and clinical measurements as well as blood sampling. They were divided into two groups based on the presence of atheromatous plaques, as determined by ultrasound. At the end of the study, only 24 out of the 37 subjects completed the 12-month follow-up period (7 with plaque and 17 without).

We also analyzed the clinical and glycoprotein data of 40 control subjects without obesity, with a body mass index (BMI) < 30 kg/m² and without T2D or dyslipidemia (DLP). These control subjects were matched with the ones with SE for sex and age.

The ethics committee of the hospital approved the study protocol and all subjects provided informed consent to participate. All procedures were conducted in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the Declaration of Helsinki.

Subjects with SE met the necessary criteria for BS: BMI ≥ 40 or ≥ 35 kg/m² with at least one comorbidity such as HT, T2D, DLP, obstructive sleep apnea or weight-induced rheumatic disease. The criteria used to diagnose T2D, HT, and DLP are detailed in the National Cholesterol Education Program (NCEP)⁽¹⁴⁾. None of the subjects were diagnosed with inflammatory or infectious diseases, and none were receiving anti-obesity or anti-inflammatory drugs at the time of the study. Subjects were excluded if they had experienced any cardiovascular event or presented renal or active systemic diseases, hypothyroidism or endocrine diseases other than T2D.

Plasma samples were collected under fasting conditions between 08:00 and 10:00h am. One sample was collected from control subjects without obesity and two from participants with SE: before surgery and 12 months after (referred in the figures and tables as control, OB and 12M, respectively).

Anthropometric and clinical measurements

Body weight and neck circumference were measured according to standardized procedures⁽¹⁵⁾. Plasma glucose, glycated hemoglobin (HbA1c), insulin, total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (cLDL), high-density lipoprotein cholesterol (cHDL) and triacylglyceride (TG) levels were determined using commercial kits that are routinely used in the laboratory of the hospital. The Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) was calculated using the following formula: HOMA-IR = (fasting insulin level) x (fasting glucose level) / 405 in mUI/L and mg/dL, respectively⁽¹⁶⁾. We also calculated the atherogenic index of plasma (AIP), using $AIP = \log(TG/cHDL)$, in mg/dL⁽¹⁷⁾.

Biochemical analysis

Plasmatic CRP levels were measured with turbidimetric assays (RAL, Barcelona, Spain). We used enzyme-linked immunosorbent assay to measure leptin and adiponectin (Merckodia, Uppsala, Sweden), IL6, TNF-α (R&D Systems, Minneapolis, USA) and PAI-1 (Sekisui Diagnostics, Burlington, USA) levels.

Glycoprotein profiling

Plasma samples were analyzed as described previously⁽⁷⁾. Briefly, ¹H-NMR spectroscopy was performed in the region between 2.15 and 1.90 ppm of the chemical shift. This enabled us to determine the following: Area GlycA, associated with the concentration of N-acetylglucosamine-protein and N-acetylgalactosamine-protein bonds; Area GlycB, associated with the concentration of N-acetylneuraminic acid-protein bonds; Area GlycF, associated with the concentrations of free N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine and N-acetylneuraminic acid; and the H/W (height/width) ratio of GlycA and GlycB, associated with the flexibility of the protein-sugar bonds generating the signals.

Statistical analysis

The parameters were expressed as mean (\pm SD) or median (interquartile range). Normally distributed quantitative variables were assessed by the Shapiro-Wilk test. Statistical significance of the differences between patients with SE and the control group as well as between patients with and without atheromas before surgery was assessed using unpaired Student's *t*-test.

To analyze the changes after BS, statistical significance of the differences between obese patients with and without plaques in age and waist circumference was assessed using the *t*-test. The rest of the parameters were analyzed using two-way repeated measures ANOVA and the Bonferroni post-hoc test.

Correlations were assessed by considering all the values (OB and 12M) for each variable and were determined with the multiple Pearson's correlation coefficient.

All graph and statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Statistical comparisons were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Before bariatric surgery

Table 1 shows the comparison between subjects with SE and the control group. Subjects with SE had higher TG levels and AIP, and lower cHDL levels than control subjects had. It should be noted that the group with SE in our study were not especially hyperlipidemic or hypercholesterolemic according to NCEP criteria (16).

TABLE 1. Clinical characteristics of control group and subjects with severe obesity. Categorical variables are expressed as the number of subjects, with statistical significance assessed using Fisher's exact test. Quantitative variables are expressed as the mean \pm SD, with the statistical significance of the difference between subjects with SE and control subjects assessed using unpaired Student's *t*-Test.

	Control (40)	MO (37)	<i>p</i> value
Age (years)	43.0 \pm 11.3	43.7 \pm 10.7	ns
DLP+ (n)	0	14	<0.0001
T2D+ (n)	0	7	0.0043
BMI (kg/m²)	\leq 25	47.5 \pm 5.9	-
TC (mg/dL)	178.0 \pm 12.49	185.0 \pm 33.72	ns
cLDL (mg/dL)	106.1 \pm 12.5	113.8 \pm 29.2	ns
cHDL (mg/dL)	54.6 \pm 10.7	46.0 \pm 9.7	0.0004
TG (mg/dL)	78.4 \pm 21.51	141.1 \pm 71.2	<0.0001
AIP (a.u.)	0.151 \pm 0.17	0.424 \pm 0.26	<0.0001

Abbreviations: MO, severe obesity; DLP, dyslipidemia; T2D, type II diabetes mellitus; BMI, body mass index; TC, total cholesterol; cLDL, low-density lipoprotein cholesterol; cHDL, high-density lipoprotein cholesterol; TG, triacylglyceride; AIP, atherogenic index of plasma. ns, non-significant.

Regarding the glycoprotein profile, the concentrations of sugar-protein bonds of GlycA and GlycB were significantly higher in the SE group ($p < 0.0001$) (Figure 1A). The flexibility of the sugar-protein bonds, expressed as the H/W ratio, was also significantly higher in the SE group than in the control group for both GlycA and GlycB ($p < 0.0001$) (Figure 1B).

The anthropometric and biochemical data from the 24 subjects with SE who completed the study are presented in Table 2 in the OB columns. TC levels, cLDL concentrations and the HOMA-IR were higher in subjects with plaques before BS (Table 2, "before surgery" data). No differences were observed for the glycoprotein variables before BS (Figure 2, OB boxes) in the group without plaques.

Figure 1. NMR glycoprotein profile of subjects with severe obesity and control subjects. Parameters are expressed as the median and interquartile range. Statistical significance was assessed with Student's t-test. Abbreviations: OB, subjects with severe obesity (SE). Symbol (°) denotes differences vs OB. Three symbols, $p < 0.001$. $n = 40$ control subjects and 37 subjects with SE.

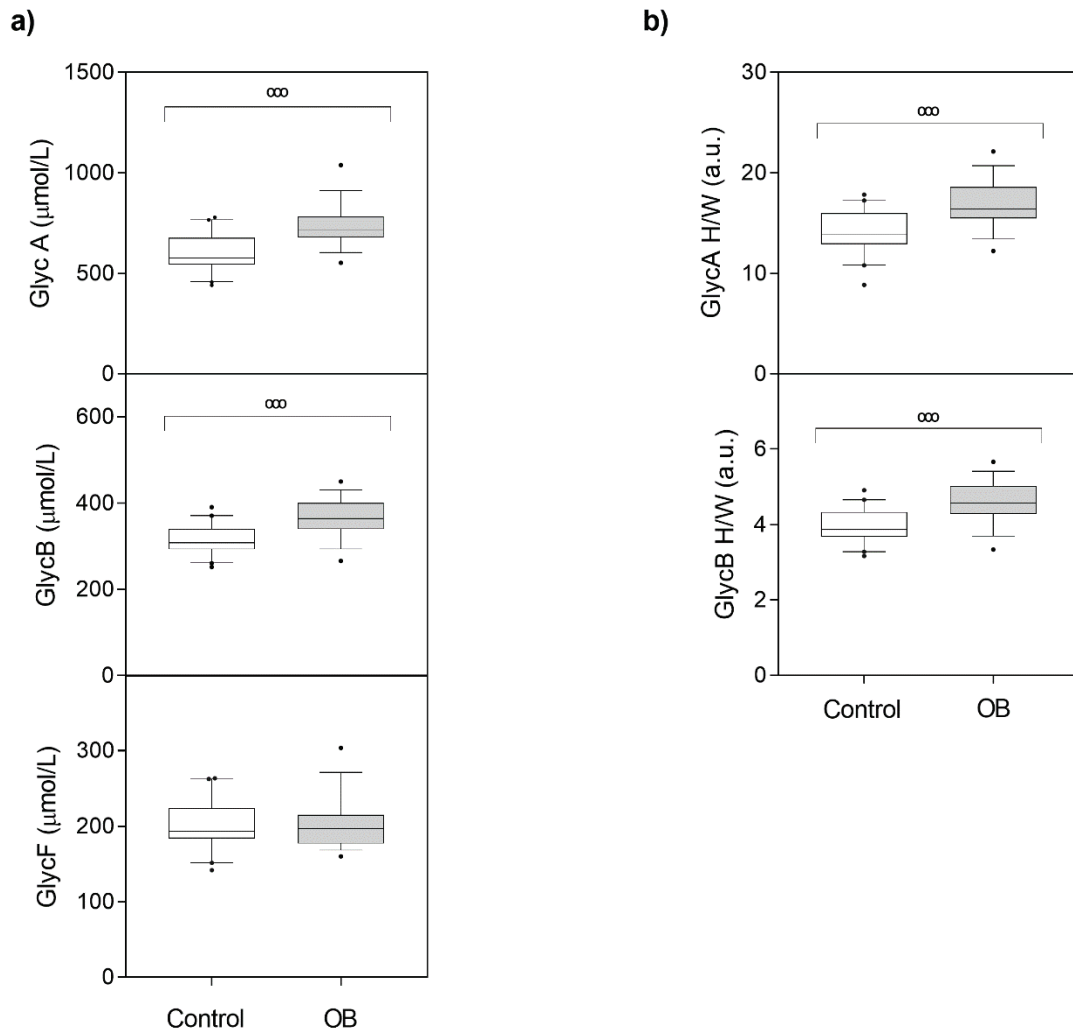
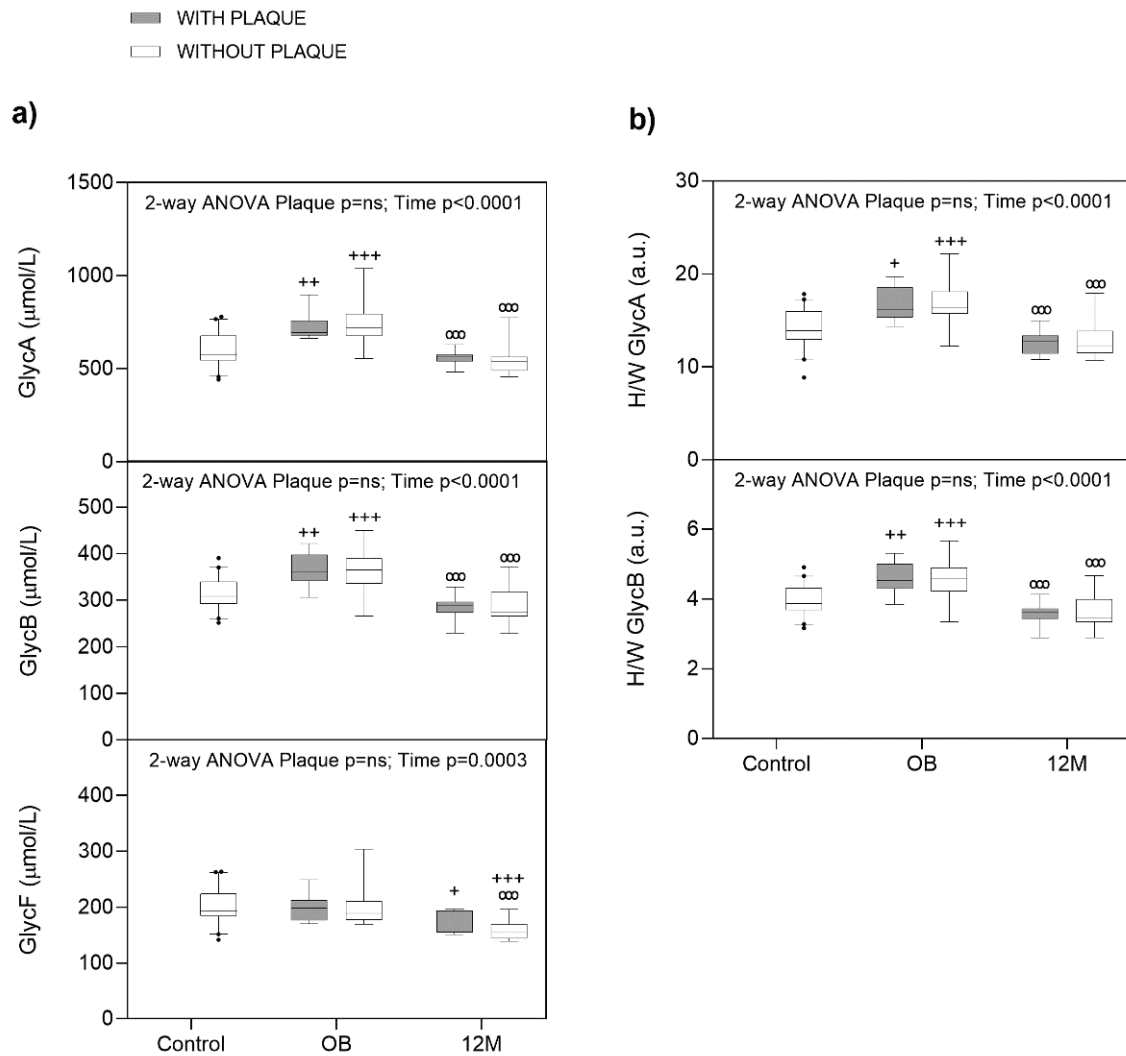


Figure 2. NMR glycoprotein profile of subjects with severe obesity with and without atheromas before and after bariatric surgery. Parameters are expressed as the median and interquartile range. Statistical significance was assessed using two-way repeated measures ANOVA (with/without plaque and time of follow-up) and the Bonferroni post-hoc test. Abbreviations: OB, subjects with severe obesity (SE) before bariatric surgery (BS); 12M, 12 months after BS. Symbol (°) denotes differences vs OB in each group; symbol + denotes differences vs control. One symbol, $p < 0.05$; two symbols, $p < 0.01$; three symbols, $p < 0.001$; ns, non-significant. $n = 40$ control subjects, 7 subjects with plaques, and 17 subjects without plaques



After bariatric surgery

Twelve months after BS, subjects with plaques still had atheromas, while those without plaques did not develop any. Changes in the general characteristics of the 24 subjects with SE who had completed the one-year follow up (7 with and 17 without plaques) are shown in Table 2. As expected, the effect of surgery on with a body mass index (BMI) was noticeable in both groups ($p < 0.0001$). The lipid and glyceimic profiles improved after surgery, while the AIP decreased in both groups ($p < 0.0001$). The HOMA-IR also decreased after BS, but remained higher in subjects with plaques.

The levels of the parameters measured to assess inflammation (PAI-1, TNF- α , IL6, and CRP) decreased significantly ($p < 0.01$) after BS in both groups (Table 2), with PAI-1 the only one whose concentrations were different between subjects with plaques and those without ($p = 0.0198$). Furthermore, leptin levels decreased significantly in both groups (about 4 times), whereas adiponectin concentrations increased in both groups. The ratio between these two parameters also decreased in both groups to a lesser extent (Table 2).

As observed at the beginning of the study, there were no differences in the glycoprotein profile between subjects with and without plaques one year after BS. However, GlycA and GlycB levels and the H/W ratio decreased after BS, reaching the same values as those of the control group, independently of the presence of plaques (Figure 2). By contrast, there were no differences in GlycF levels between the control group and subjects with SE before BS. However, 12 months after BS, GlycF levels decreased and were significantly lower in both SE groups: the one with and the one without plaques, compared to the control group.

The correlations between glycoprotein variables, anthropometrical measurements, biochemical parameters and inflammation were also studied. Since no differences were found between the group with and the one without plaques, we grouped all these subjects together (Table 3). The measured glycoprotein variables strongly correlated with one another.

TABLE 2. Clinical and biochemical characteristics of subjects with and without plaques before and after bariatric surgery. Statistical significance of the differences between subjects with SE and with and without plaques before BS was assessed using unpaired *t*-test. Statistical significance of the differences after BS was assessed using two-way repeated measures ANOVA (with/without plaque and time of follow-up, in brackets, interaction) and the Bonferroni post-hoc test. Values are expressed as the mean \pm SD. Symbols (°) and (*) denote differences in the Bonferroni post-hoc test. Specifically, symbol (°) denotes differences vs OB in each group, while the symbol (*) denotes differences between those with plaques and those without. One symbol, $p < 0.05$; two symbols, $p < 0.01$; three symbols, $p < 0.001$; ns, non-significant.

Parameters	With plaque		Without plaque		Before BS p-value t-test	12M follow-up p- value 2-w ANOVA
	OB	12M	OB	12M		
n	7	7	17	17	-	-
Sex (women / men)	4 / 3	-	14/3	-	-	-
Age (years)	46.0 (37.0, 57.0)	-	39.0 (37.0, 49.0)	-	ns	-
BMI (kg/m ²)	45.1 \pm 6.3	29.1 \pm 5.1 ^{ooo}	49.0 \pm 6.6	28.9 \pm 5.1 ^{ooo}	ns	ns / <0.0001 (0.0465)
Neck (cm)	41.4 \pm 4.9	37.5 \pm 5.2	39.9 \pm 3.9	34.4 \pm 3.6 ^{ooo}	ns	ns / 0.0002
TC (mg/dL)	204.4 \pm 39.1	169.9 \pm 24.1 ^o	172.8 \pm 27.5	159.0 \pm 30.6	0.0334	ns / 0.0028
cLDL (mg/dL)	130.4 \pm 32.1	98.4 \pm 18.5 ^o	101.6 \pm 28.6	93.1 \pm 30.9	0.0417	ns / 0.0067
cHDL (mg/dL)	45.1 \pm 7.8	54.1 \pm 11.2	45.2 \pm 7.3	52.4 \pm 11.1 ^o	ns	ns / 0.0027
TG (mg/dL)	143.1 \pm 46.0	83.7 \pm 17.3 ^{ooo}	130.8 \pm 40.5	79.9 \pm 23.9 ^{ooo}	ns	ns / <0.0001
AIP (a. u.)	0.42 \pm 0.29	0.19 \pm 0.14 ^o	0.45 \pm 0.14	0.17 \pm 0.16 ^{ooo}	ns	ns / <0.0001
Glucose (mg/dL)	109.7 \pm 27.2	79.4 \pm 7.3 ^{ooo}	92.9 \pm 19.2	82.1 \pm 12.1 ^o	ns	ns / <0.0001 (0.0083)
HbA1c (%)	5.9 \pm 1.0	5.2 \pm 0.2 ^o	5.4 \pm 0.5	5.1 \pm 0.4	ns	ns / 0.0060
HOMA IR	4.3 \pm 2.8	0.8 \pm 0.2 ^{ooo}	1.8 \pm 0.7 ^{***}	0.5 \pm 0.2 ^o	0.0056	0.0026 / <0.0001 (0.0099)
PAI-1 (ng/mL)	67.5 \pm 29.8	58.0 \pm 19.5 ^o	69.2 \pm 14.4	22.6 \pm 10.1 ^{ooo***}	ns	0.0198 / <0.0001 (0.0004)
TNF- α (pg/mL)	1.0 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2 ^o	1.2 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2 ^{ooo}	ns	ns / <0.0001
IL6 (pg/mL)	3.9 \pm 1.4	2.1 \pm 0.9	4.4 \pm 2.4	1.9 \pm 1.8 ^{ooo}	ns	ns / 0.0020
CRP (\square g/mL)	7.9 \pm 6.2	3.8 \pm 5.9	9.1 \pm 7.7	2.0 \pm 2.8 ^{ooo}	ns	ns / 0.0003
Leptin (ng/mL)	35.0 \pm 15.6	8.0 \pm 5.7 ^{ooo}	43.7 \pm 18.6	11.2 \pm 10.2 ^{ooo}	ns	ns / <0.0001
Adiponectin (ng/mL)	8.3 \pm 2.8	16.8 \pm 7.9 ^{oo}	9.3 \pm 4.8	13.9 \pm 6.5 ^{oo}	ns	ns / <0.0001
Leptin/adiponectin	4.9 \pm 3.3	0.7 \pm 0.7 ^{oo}	5.5 \pm 3.3	1.1 \pm 1.2 ^{ooo}	ns	ns / <0.0001

Abbreviations: OB, patients with severe obesity before bariatric surgery; 12M, 12 months; n, number of patients; BMI, body mass index; TC, total cholesterol; cLDL, low-density lipoprotein cholesterol; cHDL, high-density lipoprotein cholesterol; TG, triacylglyceride; AIP, atherogenic index of plasma; HbA1c, glycated hemoglobin A1c; HOMA-IR, Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; IL6, interleukin-6; CRP, C-reactive protein.

Table 3. Correlations of the glycoprotein parameters. Correlations were assessed by considering all the values (OB and 12M) for each variable and were determined using the multiple Pearson's correlation coefficient. One symbol (*), $p < 0.05$; two symbols (**), $p < 0.01$; three symbols (***), $p < 0.001$.

n=37	Area GlycA	Area GlycB	Area GlycF	H/W GlycA	H/W GlycB
Area GlycA	-	-	-	-	-
Area GlycB	0.864 ***	-	-	-	-
Area GlycF	0.861 ***	0.581 ***	-	-	-
H/W GlycA	0.935 ***	0.964 ***	0.677 ***	-	-
H/W GlycB	0.864 ***	1.000 ***	0.581 ***	0.964 ***	-
Neck	0.446 ***	0.276 *	0.474 ***	0.317 *	0.277 *
Weight	0.632 ***	0.548 ***	0.558 ***	0.569 ***	0.549 ***
BMI	0.650 ***	0.619 ***	0.524 ***	0.632 ***	0.619 ***
TC	0.450 ***	0.361 **	0.383 **	0.403 **	0.361 **
Chdl	-0.311 *	-	-0.348 **	-	-
Clldl	0.421 ***	0.374 **	0.342 **	0.403 **	0.374 **
TG	0.525 ***	-	0.649 ***	0.305 *	-
AIP	0.462 ***	-	0.568 ***	-	-
Glucose	-	-	-	-	-
HbA1c	-	-	-	-	-
HOMA-IR	0.280 *	0.263 *	-	-	0.265 *
Adiponectin	-0.374 **	-0.338 *	-0.336 *	-0.316 *	-0.338 *
Leptin	0.546 ***	0.484 ***	0.484 ***	0.502 ***	0.483 ***
Leptin/adipon	0.488 ***	0.391 **	0.513 ***	0.451 ***	0.391 **
PAI-1	0.532 ***	0.443 ***	0.470 ***	0.457 ***	0.443 ***
TNF-a	0.515 ***	0.400 **	0.448 ***	0.460 ***	0.400 **
IL6	0.542 ***	0.651 ***	0.295 *	0.617 ***	0.652 ***
CRP	0.358 **	0.439 ***	-	0.468 ***	0.438 ***

Abbreviations: n, number of patients; H/W, height-to-width ratio; BMI, body mass index; TC, total cholesterol; cLDL, low-density lipoprotein cholesterol; cHDL, high-density lipoprotein cholesterol; TG, triacylglyceride; AIP, atherogenic index of plasma; HbA1c, glycated hemoglobin A1c; HOMA-IR, Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; IL6, interleukin-6; CRP, C-reactive protein.

All the glycoprotein parameters correlated positively with neck circumference, weight, and strongly with BMI. Regarding the lipid profile, TC and cLDL levels correlated positively with all the glycoprotein parameters. However, TG levels correlated with all the glycoprotein values except for GlycB and the H/W ratio for GlycB. cHDL levels correlated negatively with GlycA and GlycF, while the AIP correlated positively with GlycA and GlycF. Interestingly, when including the control group, we still found correlations between the AIP and GlycA ($\rho = 0.573$; $p < 0.0001$), GlycB ($\rho = 0.299$; $p = 0.0003$), GlycF ($\rho = 0.429$; $p < 0.0001$), the H/W ratio for GlycA ($\rho = 0.373$; $p < 0.0001$) and the H/W ratio for GlycB ($\rho = 0.302$; $p = 0.002$).

Surprisingly, neither glucose nor HbA1c correlated with the glycoprotein parameters measured. However, the HOMA-IR correlated with GlycA, GlycB and the H/W ratio for GlycA.

Adiponectin levels negatively correlated with all the glycoprotein parameters. By contrast, leptin levels and the leptin/adiponectin ratio showed the opposite trend. Interestingly, regarding the inflammatory parameters in general, we found positive correlations with all the glycoprotein measures, except between CRP and GlycF.

DISCUSSION

It is well known that SE is associated with inflammation and atherosclerosis. However, conclusive data on the relationship between glycoproteins and subclinical atherosclerosis are still lacking in the literature. It is therefore of interest to determine an association between glycoprotein and inflammatory profiles and their evolution after BS in relation to the presence of atheromas.

To the best of our knowledge, our study is the first to describe the effect of BS on the potential inflammatory markers GlycA, GlycB, GlycF and the H/W ratios in a cohort of subjects with SE undergoing BS who also have atheromatous plaques. Moreover, we compared the glycoprotein profile with inflammatory parameters in the same cohort.

Before bariatric surgery

One way to establish whether glycoproteins are associated with poorer health in individuals with SE is to study differences between individuals with severe obesity and control subjects without obesity. Thus, we obtained data from 37 subjects with SE and 40 healthy control subjects. We observed higher concentrations and greater flexibility of the protein-sugar bonds of glycosylated proteins in the group with SE compared to control subjects. The glycoprotein values and ratios we obtained for people with SE are in accordance with those reported by other studies (17). Specifically, we observed higher values in subjects with SE than in control subjects for GlycA and GlycB. However, in

contrast to other studies, we also measured GlycF and did not find differences between the groups (13). Recent studies have demonstrated the importance of glycosylation in several key biological processes, including inflammation (18). Moreover, many diseases are associated with changes in the glycoprotein profile (19). SE is characterized by the hypertrophy and hyperplasia of adipose tissue (20), which is associated with low-grade inflammation. Our results indicated a pro-inflammatory state before BS. Hence, the increased glycoprotein levels and ratios observed might be due to this biological response of the expanded adipose tissue.

Focusing on cardiovascular risk (CVR), for the purposes of this study, subjects with an AIP ≤ 0.21 were considered to have a low to moderate risk of atherosclerosis, whereas individuals with an AIP > 0.21 were considered to have a high risk of atherosclerosis (21). Although TC, cLDL and TG levels were not extremely high, the AIP values obtained indicated that people with SE had a higher risk of atherosclerosis than those in the control group.

To the best of our knowledge, there are no other studies comparing the glycoprotein profile in subjects with SE with or without atheromas. At the beginning of the study, there were differences in TC levels, cLDL concentrations, and the HOMA-IR in the SE group between subjects with and without atheromas, while the other parameters measured (anthropometric, biochemical and glycoprotein variables) were similar between the groups.

Our findings are in accordance with those of studies indicating that GlycA and GlycB concentrations are high in the group with SE (13), independently of the presence of atheromas. Therefore, our results indicated that the glycoprotein profiles were indistinguishable between individuals with SE with or without subclinical atherosclerosis. This is very surprising given that GlycA and GlycB have been recently described to be predictors of CVR and indicators of coronary artery disease (22–24).

After bariatric surgery

Since BS is the most effective treatment for SE (25), we examined its effects on participants with and without atheromas and on the inflammatory factors involved in atherosclerosis. As described before, BS led to the desired weight loss and improved the metabolic profile (25) similarly in both groups. Furthermore, the low-grade inflammation observed in subjects with SE decreased equally in both groups. The role of PAI-1 in inflammation and thrombosis (26) could explain the decrease in PAI-1 levels after BS and the lower values in the group without plaques.

The values of the measured glycoprotein variables normalized after BS in both groups. In the case of GlycF, its concentration was lower than that of the control group. Thus,

although BS did not accomplish atheroma remission, it improved the glycoprotein profiles. Interestingly, changes in endothelial cell glycosylation patterns regulate the functions of adhesion molecules at sites of early atherosclerotic plaque development (27). Therefore, given that inflammation and glycosylation are closely associated with atherogenesis, their normalization might partly diminish the risk of new cardiovascular events.

Pearson correlation testing revealed a positive correlation between BMI and glycoprotein concentrations and ratios. Since it is a well-known fact that BS is associated with weight loss (25), this correlation confirms that obesity is associated with higher glycosylation of proteins.

In accordance with other studies on subjects with obesity (28), all the glycoprotein variables correlated with TC concentrations, while some correlated with TG and cLDL levels. This seems reasonable given that glycosylation is triggered by inflammation and cholesterol is known to mediate inflammatory responses following an initial endothelial cell injury (29). Despite limited data on the relationships between glycoproteins and other CVR factors, we can now add that there is a positive correlation between GlycA, GlycF and the AIP, which is also a marker associated with dyslipidemia (DLP) (21). Moreover, the correlations between the glycoprotein parameters and the AIP remained and even showed increased statistical significance when including control subjects. This suggests a role for these parameters in assessing DLP and associated diseases (30), even in the absence of SE.

As the study of Dullaart et al. showed (31), we observed that the glycoprotein variables did not correlate with plasma glucose or HbA1c, but did correlate with the HOMA-IR, probably highlighting the association between glycosylation and the pathogenesis of reduced insulin activity linked to adipose tissue dysfunction (32). Furthermore, given that an altered glycoprotein profile has been described for diseases such as T2D (33), our glycoprotein results and their correlation with the HOMA-IR may be associated with an improvement in this comorbidity after BS in study participants with and without plaques. In the case of HbA1c, it should be noted that the enzymatic process of protein glycosylation has to be distinguished from intracellular protein glycation, which is a non-enzymatic process that is accelerated under hyperglycemic conditions.

Our results agree with those of other studies reporting a correlation between GlycA and GlycB (34). Indeed, we observed strong positive correlations between all the measured glycoprotein variables.

Regarding inflammation in participants with SE, we found higher leptin concentrations and decreased adiponectin levels. Adiponectin and the leptin/adiponectin ratio are markers of adiposity and inflammation (35). Adiponectin levels correlated negatively not

only with GlycA (31), but also with all the glycoprotein variables measured in this study. By contrast, the leptin/adiponectin ratio correlated negatively with the glycoprotein variables, supporting an association between the glycoprotein profile and the adipose tissue production of pro-inflammatory cytokines in SE (36).

The effects of BS were very consistent in the results obtained for the inflammatory parameters and strongly correlated with those obtained for the glycoproteins. Our study showed that while inflammation decreased due to the BS-induced reduction in adiposity, the concentrations and aggregation states of GlycA and GlycB and the levels of GlycF were modified. Furthermore, there was a high correlation between glycoproteins and acute-phase proteins, confirming that the glycan profile is distinct in low-grade inflammatory diseases. It should be noted that the areas of the glycoproteins studied corresponded to the overall concentration of glycosylated plasma proteins, mainly α 1-acid glycoprotein, α 1-antotrypsin, haptoglobin, transferrin, and immunoglobins (37). Therefore, the correlation found between the glycoprotein variables and IL6 and CRP may not be due to their contribution to the total glycosylated proteins, but to the association between inflammation and glycosylation. Increased secretion and glycosylation of acute-phase proteins characterize inflammatory processes (38) in particular, with pro-inflammatory cytokines shown to induce distinct changes in N-glycan processing mechanisms (39,40). Several studies have demonstrated that serum glycan signals are associated with some inflammatory diseases such as atherosclerosis (23,41).

Glycosylation might also contribute to inflammatory vascular diseases such as subclinical atherosclerosis because pro-inflammatory cytokines can also induce changes in the cell-surface N-glycosylation of endothelial cells (39,42). Some of the measured inflammatory parameters are also associated with atherosclerosis. For example, CRP is an accepted marker of CVR (43) and increases levels of PAI-1 (44), a well-recognized fibrinolysis regulator implicated in thrombogenic pathways that can lead to the formation and progression of atheromatous plaques (26). Despite no differences in the glycoprotein variables between subjects with atheromas and those without, the fact that the glycoprotein variables correlated with PAI-1 levels might indicate some association with atherogenesis. Furthermore, in accordance with other studies (26), we observed a positive correlation between the glycoprotein variables and CRP, suggesting that glycoproteins may indicate CVR, at least partly through inflammation.

This study was limited by the number of participants involved. However, our results are significant enough and the variability small enough for the findings to be consistent. Despite the limitations, it is worth noting the robustness of $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy and the relatively small intra-individual fluctuations and inter-individual variabilities observed

in the glycoprotein parameters (45). Furthermore, all the biochemical measurements were performed under the ISO 9001 quality certification, reducing methodological bias. In general, we propose that the inflammatory process associated with the expansion of adipose tissue in SE elicits pronounced changes in glycan-processing mechanisms. Our results demonstrate that glycoprotein variables are not markers of subclinical atherosclerosis. However, given the role of inflammation in endothelial cell damage, it seems reasonable to suggest that high glycoprotein levels could be associated with CVR, but only through inflammation. Bariatric surgery normalizes the glycoprotein variables and improves the inflammatory profile, even in subjects with atheromas, suggesting that the glycoprotein profile might be useful in assessing the inflammatory state associated with SE independently of the presence of plaques.

ACKNOWLEDGMENTS: We thank Teresa Vidal, Virtudes Maria, and Angels Betriu from the Vascular and Renal Translational Research Group, IRBLleida, for carrying out the detection of atheromatous plaques. We thank Michael Maudsley of the Language Service of the University of Barcelona for grammatical revision of the final text. The English grammar and language of the manuscript was corrected by the Language Services of the University of Barcelona.

Disclosures: N.A. is a shareholder in Biosfer Teslab, a company that commercializes the glycoprotein profiling described in the manuscript. The other authors have declared no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Bays HE. Adiposopathy is “sick fat” a cardiovascular disease? *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(25):2461-2473. doi:10.1016/j.jacc.2011.02.038
2. Pi-Sunyer X. The medical risks of obesity. *Postgrad Med.* 2009;121(6):21-33. doi:10.3810/pgm.2009.11.2074
3. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med.* 2014;5(8):927-946.
4. Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2009;6(6):399-409. doi:10.1038/nrcardio.2009.55
5. Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Pecoraro R, Arnao V, Pinto A, Licata G. Atherosclerosis as an inflammatory disease. *Curr Pharm Des.* 2012;18(28):4266-4288. doi:10.2174/138161212802481237
6. Vachharajani V, Granger DN. Adipose tissue: a motor for the inflammation associated

with obesity. *IUBMB Life*. 2009;61(4):424-430. doi:10.1002/iub.169

7. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003;107(3):499-511. doi:10.1161/01.cir.0000052939.59093.45

8. Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers*. 2008;25(4-5):267-278. doi:10.1155/2008/493289

9. Fuertes-Martín R, Taverner D, Vallvé JC, et al. Characterization of (1)H NMR Plasma Glycoproteins as a New Strategy To Identify Inflammatory Patterns in Rheumatoid Arthritis. *J Proteome Res*. 2018;17(11):3730-3739. doi:10.1021/acs.jproteome.8b00411

10. Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*. 2006;126(5):855-867. doi:10.1016/j.cell.2006.08.019

11. Sarkar A, Wintrode PL. Effects of glycosylation on the stability and flexibility of a metastable protein: the human serpin $\alpha(1)$ -antitrypsin. *Int J Mass Spectrom*. 2011;302(1-3):69-75. doi:10.1016/j.ijms.2010.08.003

12. Gruppen EG, Kunutsor SK, Kieneker LM, et al. GlycA, a novel pro-inflammatory glycoprotein biomarker is associated with mortality: results from the PREVEND study and meta-analysis. *J Intern Med*. 2019;286(5):596-609. doi:10.1111/joim.12953

13. Manmadhan A, Lin BX, Zhong J, et al. Elevated GlycA in severe obesity is normalized by bariatric surgery. *Diabetes Obes Metab*. 2019;21(1):178-182. doi:10.1111/dom.13481

14. Pardina E, Ferrer R, Baena-Fustegueras JA, et al. The relationships between IGF-1 and CRP, NO, leptin, and adiponectin during weight loss in the morbidly obese. *Obes Surg*. 2010;20(5):623-632. doi:10.1007/s11695-010-0103-5

15. Insull WJ. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med*. 2009;122(1 Suppl):S3-S14. doi:10.1016/j.amjmed.2008.10.013

16. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285(19):2486-2497. doi:10.1001/jama.285.19.2486

17. Fuertes-Martín R, Moncayo S, Insenser M, et al. Glycoprotein A and B Height-to-Width Ratios as Obesity-Independent Novel Biomarkers of Low-Grade Chronic Inflammation in Women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *J Proteome Res*. 2019;18(11):4038-4045. doi:10.1021/acs.jproteome.9b00528

18. van Kooyk Y, Rabinovich GA. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2008;9(6):593-601. doi:10.1038/ni.f.203

19. Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*. 2002;12(4):43R-56R. doi:10.1093/glycob/12.4.43r

20. Muir LA, Neeley CK, Meyer KA, et al. Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2016;24(3):597-605. doi:10.1002/oby.21377
21. Holmes DT, Frohlich J, Buhr KA. The concept of precision extended to the atherogenic index of plasma. *Clin Biochem*. 2008;41(7-8):631-635. doi:10.1016/j.clinbiochem.2008.01.023
22. Gruppen EG, Riphagen IJ, Connelly MA, Otvos JD, Bakker SJL, Dullaart RPF. GlycA, a Pro-Inflammatory Glycoprotein Biomarker, and Incident Cardiovascular Disease: Relationship with C-Reactive Protein and Renal Function. *PLoS One*. 2015;10(9):e0139057. doi:10.1371/journal.pone.0139057
23. Akinkuolie AO, Buring JE, Ridker PM, Mora S. A novel protein glycan biomarker and future cardiovascular disease events. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(5):e001221. doi:10.1161/JAHA.114.001221
24. McGarrah RW, Kelly JP, Craig DM, et al. A Novel Protein Glycan-Derived Inflammation Biomarker Independently Predicts Cardiovascular Disease and Modifies the Association of HDL Subclasses with Mortality. *Clin Chem*. 2017;63(1):288-296. doi:10.1373/clinchem.2016.261636
25. Kang JH, Le QA. Effectiveness of bariatric surgical procedures: A systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(46):e8632. doi:10.1097/MD.00000000000008632
26. Bilgic Gazioglu S, Akan G, Atalar F, Erten G. PAI-1 and TNF- α profiles of adipose tissue in obese cardiovascular disease patients. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(12):15919-15925.
27. Scott D, Patel R. Endothelial heterogeneity and adhesion molecules N-glycosylation: Implications in leukocyte trafficking in inflammation. *Glycobiology*. 2013;23. doi:10.1093/glycob/cwt014
28. Bogl LH, Kaye SM, Rämö JT, et al. Abdominal obesity and circulating metabolites: A twin study approach. *Metabolism*. 2016;65(3):111-121. doi:10.1016/j.metabol.2015.10.027
29. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-126. doi:10.1056/NEJM199901143400207
30. Yang SH, Du Y, Li XL, et al. Triglyceride to High-Density Lipoprotein Cholesterol Ratio and Cardiovascular Events in Diabetics With Coronary Artery Disease. *Am J Med Sci*. 2017;354(2):117-124. doi:10.1016/j.amjms.2017.03.032
31. Dullaart RPF, Gruppen EG, Connelly MA, Otvos JD, Lefrandt JD. GlycA, a biomarker of inflammatory glycoproteins, is more closely related to the leptin/adiponectin ratio than to glucose tolerance status. *Clin Biochem*. 2015;48(12):811-814. doi:10.1016/j.clinbiochem.2015.05.001
32. Finucane FM, Luan J, Wareham NJ, et al. Correlation of the leptin:adiponectin ratio with measures of insulin resistance in non-diabetic individuals. *Diabetologia*. 2009;52(11):2345-2349. doi:10.1007/s00125-009-1508-3

33. Akinkuolie AO, Pradhan AD, Buring JE, Ridker PM, Mora S. Novel protein glycan side-chain biomarker and risk of incident type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(6):1544-1550. doi:10.1161/ATVBAHA.115.305635
34. Lorenzo C, Festa A, Hanley AJ, Rewers MJ, Escalante A, Haffner SM. Novel Protein Glycan-Derived Markers of Systemic Inflammation and C-Reactive Protein in Relation to Glycemia, Insulin Resistance, and Insulin Secretion. *Diabetes Care.* 2017;40(3):375-382. doi:10.2337/dc16-1569
35. Blüher M, Mantzoros CS. From leptin to other adipokines in health and disease: facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism.* 2015;64(1):131-145. doi:10.1016/j.metabol.2014.10.016
36. Mazur-Bialy AI. Superiority of the Non-Glycosylated Form Over the Glycosylated Form of Irisin in the Attenuation of Adipocytic Meta-Inflammation: A Potential Factor in the Fight Against Insulin Resistance. *Biomolecules.* 2019;9(9). doi:10.3390/biom9090394
37. Bell JD, Brown JC, Nicholson JK, Sadler PJ. Assignment of resonances for “acute-phase” glycoproteins in high resolution proton NMR spectra of human blood plasma. *FEBS Lett.* 1987;215(2):311-315. doi:10.1016/0014-5793(87)80168-0
38. Arnold JN, Saldova R, Hamid UMA, Rudd PM. Evaluation of the serum N-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation. *Proteomics.* 2008;8(16):3284-3293. doi:10.1002/pmic.200800163
39. Chacko BK, Scott DW, Chandler RT, Patel RP. Endothelial surface N-glycans mediate monocyte adhesion and are targets for anti-inflammatory effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands. *J Biol Chem.* 2011;286(44):38738-38747. doi:10.1074/jbc.M111.247981
40. García-Vallejo JJ, Van Dijk W, Van Het Hof B, et al. Activation of human endothelial cells by tumor necrosis factor-alpha results in profound changes in the expression of glycosylation-related genes. *J Cell Physiol.* 2006;206(1):203-210. doi:10.1002/jcp.20458
41. Kuller L, Arnold A, Tracy R, et al. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of lipoproteins and risk of coronary heart disease in the cardiovascular health study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(7):1175-1180. doi:10.1161/01.atv.0000022015.97341.3a
42. Scott DW, Vallejo MO, Patel RP. Heterogenic endothelial responses to inflammation: role for differential N-glycosylation and vascular bed of origin. *J Am Heart Assoc.* 2013;2(4):e000263. doi:10.1161/JAHA.113.000263
43. Salazar J, Martínez MS, Chávez M, et al. C-reactive protein: clinical and epidemiological perspectives. *Cardiol Res Pract.* 2014;2014:605810. doi:10.1155/2014/605810
44. Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation.* 2003;107(3):398-404. doi:10.1161/01.cir.0000052617.91920.fd

45. Fuertes-Martín R, Correig X, Vallvé JC, Amigó N. Title: Human Serum/Plasma Glycoprotein Analysis by (1)H-NMR, an Emerging Method of Inflammatory Assessment. *J Clin Med*. 2020;9(2). doi:10.3390/jcm9020354
46. Lohman TG, Roche AF, Martorell R. *Anthropometric Standardization Reference Manual*. Human Kinetics Books; 1988.
47. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-419. doi:10.1007/bf00280883
48. Shen S, Lu Y, Qi H, et al. Association between ideal cardiovascular health and the atherogenic index of plasma. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(24):e3866. doi:10.1097/MD.0000000000003866

4. 5 Article 5: microRNA (preparat per enviar)

Títol: *MicroRNA signature in human with subclinical atherosclerosis and severe obesity, effect of bariatric surgery.*

Autors: Júlia Carmona-Maurici^a, David Ricart-Jané^a, Antonio Miñarro^a, Jorge Juan Olzina Kissler^c, Juan Antonio Baena-Fustegueras^c, Julia Peinado-Onsurbe^a, Eva Pardina^a

Afiliacions:

a. Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain;

b. Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

c. Gastrointestinal Surgery Department, Arnau de Vilanova University Hospital, IRB Lleida, University of Lleida, Lleida, Spain

MicroRNA signature in human with subclinical atherosclerosis and severe obesity, effect of bariatric surgery.

Authors: Júlia Carmona-Maurici^A, David Ricart-Jané^A, Antonio Miñarro^B, Jorge Juan Olzina Kissler^C, Juan Antonio Baena-Fustegueras^C, Julia Peinado-Onsurbe^A, Eva Pardina^{A*}

Affiliation: ^ADepartment of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ^BDepartment of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ^CGastrointestinal Surgery Department, Arnau de Vilanova University Hospital, IRB Lleida, University of Lleida, Lleida, Spain

Funding: This study was supported by the “Ministerio de Sanidad y Consumo”, Carlos III Institute of Health (ISCIII) [grant numbers PI15/00190 to JP–O and PI15/00332 to JAB–F] and the EU FEDER Programme (European Regional Development Fund: “Una manera de hacer Europa”).

Acknowledgments: We thank Teresa Vidal, Virtudes Maria and Angels Betriu from the Vascular and Renal Translational Research Group, IRBLleida, for the detection of the atheromatous plaques. This work was supported by IRBLleida Biobank (B.0000682) and PLATAFORMA BIOBANCOS PT17/0015/0027/

ABSTRACT

Background: circulating microRNAs (miRNAs) could be an essential part of the regulation of various pathological mechanisms of atheroma development in severe obesity (SE). We aim to find a distinctive miRNA signature to predict early atherosclerosis in SE, as well as to evaluate its changes after BS.

Methods: We obtained plasma samples from 66 subjects with SE (32 with atheroma and 34 free of plaques) one month before bariatric surgery (BS) and at 6 (6M) and 12 month (12M) of follow-up. At the initial screening phase, the levels

of 188 miRNAs were analyzed using a TaqMan Low Density Array (TLDA) in 24 pooled samples from 12 participants grouped depending on the plaque presence and the comorbidities, before and 12 months after BS. 24 markedly changing miRNAs between the groups were subsequently validated individually by quantitative reverse-transcription PCR in the same samples used for TLDA and further confirmed in the large cohort consisting of 66 subjects.

Results: Five of the miRNAs showed significant differences along the study: miR-145-5p, miR-144-5p, miR-20a-3p and miR-21-3p exhibited increased expression levels in patients before BS *versus* after, whereas only miR-375 increased after BS in both groups. Moreover, the expression of three miRNA was different between patients with and without atheroma: miR-126 was higher in patients without plaque, by contrary, miR-21-3p and miR-133a-3p were higher in the group with atheroma. The seven miRNAs were significantly correlated with biochemical parameters.

Conclusion: Our results provide a better understanding of the role of circulating miRNAs, in predicting the CVR at early stages of subclinical atherosclerosis in SE. The three miRNAs identified in our study hold potential as auxiliary biomarkers for subclinical atherosclerosis and in concrete, mir-133a-3p has relatively high discriminatory ability for the plaque presence before BS.

INTRODUCTION

Obesity is a worldwide health problem, it is usually accompanied by hypertension (HTA), dyslipidemia (DLP), fatty liver disease, insulin resistance (IR), type 2 diabetes (T2DM), and is a recognized risk factor for atherosclerosis [1]. Bariatric surgery (BS) is a procedure designed to treat severe obesity (SE) and is the most durable and effective technique to lose a significant amount of weight and to improve obesity-related comorbidities [2].

Atherosclerosis is a complex multifactorial disease and the major cause of mortality from cardiovascular diseases (CVD) [3]. It is characterized by having slow development and has a long asymptomatic period named subclinical atherosclerosis [4]. Therefore, in many cases, the first manifestations of atherosclerosis appear when an unstable plaque rupture causes thrombus formation and leads to acute events with severe consequences [5].

Hence, it is important to find new approaches to establish reliable diagnostic biomarkers for early atherosclerosis. In that regard, circulating microRNAs (miRNAs) could be an essential part of the regulation of various pathological mechanisms of atheroma development [6].

MiRNAs are single-stranded non-coding RNAs of 19–22 nucleotides [7]. Their main function is to negatively regulate gene expression at post-transcriptional level by binding to complementary sequences on messenger inhibiting translation into protein or promoting its degradation [8–10]. miRNAs have an important role as regulators of many biological processes, including cell growth, proliferation, differentiation, migration, senescence, apoptosis, and angiogenesis [11,12]. Moreover, aberrant expression and dysregulation of miRNA function are closely linked to some human pathologies as cancer, obesity, and CVD [13–19].

Because common molecular mechanisms occur in obesity and atherosclerosis, our goal was to find a distinctive miRNA signature to predict early atherosclerosis in SE, as well as to evaluate its changes after BS intervention [27].

METHODS

Study cohort and sample collection

Initially, 80 subjects aged between 21 and 65 years with SE (BMI > 40 kg/m²) or BMI > 35 kg/m² and at least one comorbidity (diagnosed as detailed in the National Cholesterol Education Program [7]) were enrolled at the Arnau de Vilanova University Hospital of Lleida. Subjects were divided into two groups according to the presence of atheroma determined by ultrasound as described before [20]. From those 80, 8 were lost to follow-

up and 6 were excluded because it was not possible to assign a group. The final cohort was of 66 individuals (32 with and 34 without plaque).

Exclusion criteria were any previous cardiovascular event, neoplasm, renal, hepatic or active systemic diseases, hypothyroidism, or endocrine diseases other than T2DM. All recruited subjects signed an informed consent form, and the ethics committee of the Hospital approved the study.

Venous fasting blood samples were obtained from each person one month before BS (labeled in Figures and Tables as SE) and at 6 (6M) and 12 month (12M) of follow-up. Body weight, height, and waist circumferences were measured using standard procedures and BMI was calculated [21]. Daily clinical parameters were determined by routine laboratory procedures at the hospital.

miRNA assays

In general, samples were evaluated in a 2-step procedure (Figure 1). First, a screening study for miRNA profiling experiments was performed, in which samples from 12 patients with SE before and one year after BS were pooled into four groups according the plaque and comorbidities presence. Later, a validation study measuring the expression of the miRNAs of interest in samples from all the 66 individuals in the tree time points was carried out.

RNA extraction.

Total RNA was extracted from 300 uL of all plasma samples using a commercial system combining organic and solid-phase extraction following the manufacturer's instructions (mirVana PARIS kit from Applied Biosystems, Foster City, USA). The extracted RNA was stored at -80°C. Given that plasma samples have total RNA yields that are too low to quantify accurately, non-human *Caenorhabditis elegans* miR-39 (cel-miR-39-3p (Applied Biosystems, Foster City, USA)) was spiked into the sample as exogenous control with a final concentration of 5 pM. The recovery of the spiked-in synthetic miRNA oligonucleotide was used as quality control and RNA isolation efficiency was examined after qPCR quantification of cel-miR-39-3p.

Pre-amplification and retrotranscription

2 µl of RNA eluate were pre-amplified and reverse transcribed using the Advanced miRNA cDNA Synthesis kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) and the MiniAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Screening study: Circulating miRNA profiling with TaqMan low-density arrays.

To identify plasma miRNA profiles that could help to understand or diagnose subclinical atherosclerosis, we analyzed 188 circulating miRNAs. From the subjects who has the

same comorbidities before and after BS, we randomly chose 12. We evaluated their 24 plasma samples (from before and 12M after BS) classified in 4 different groups depending on atheroma presence (yes/no) and comorbidities (yes/no).

cDNA was diluted 10X in nuclease-free water and samples from 3 patients in each group were pooled. MiRNA profiling was performed by using the TaqMan Low Density Arrays (TLDA) TaqMan Advanced miRNA Human Serum/Plasma Card (Applied Biosystems). All amplifications were performed in a 7500HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems Inc.) in 384 well plates.

Data were processed with the Applied SDS 2.4 software with a 0.1 threshold. Amplification curves were analyzed for the determination of Cq and profiling results were normalized using the exogenous control and ΔCq . We considered that quantification cycles (Cq) > 35-40 are weak reactions indicative of minimal amounts of target nucleic acid. Differential expression was calculated by the $\Delta\Delta Cq$ method, and miRNAs were considered for validation by RT-PCR according to the changes between groups and their function.

Validation Study

The most reliable and consistent candidates for validation were identified in TLDA according to the Cq change and their described roles: Those miRNA with $\Delta\Delta Cq > 2$ in any group were considered for the validation study. In addition, we performed a systematic literature review to select miRNAs with potential roles in plaque development related processes as comorbidities, inflammation or oxidative stress (Detailed data at the Results section).

The 24 selected miRNAs were analyzed in the whole 66 patient cohort grouped according to the plaque presence. Furthermore, we evaluated the changes in miRNA expression 6 and 12 months after BS.

Multiple real-time PCRs (qPCRs) were performed using the Custom TaqMan Array MicroRNA Cards (Life Technologies, Foster City, CA, USA) to assess the presence in plasma of the chosen individual miRNAs by duplicate. Gene expression levels were again quantified using the 7500HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) in 384-well plates. The spike-in control (cel-miR-39-3p) and the endogenous control (hsa-miR-16-5p) were included on each card as reference genes. Normalization of results remove variation across samples not related to subclinical atherosclerosis or SE. We used the global mean method for normalization, which combined the spiked-in control approach with the 'endogenous' normalizer approaches. To note, this method was found more stable normalizer than a range of miRNAs that had been proposed as endogenous controls.

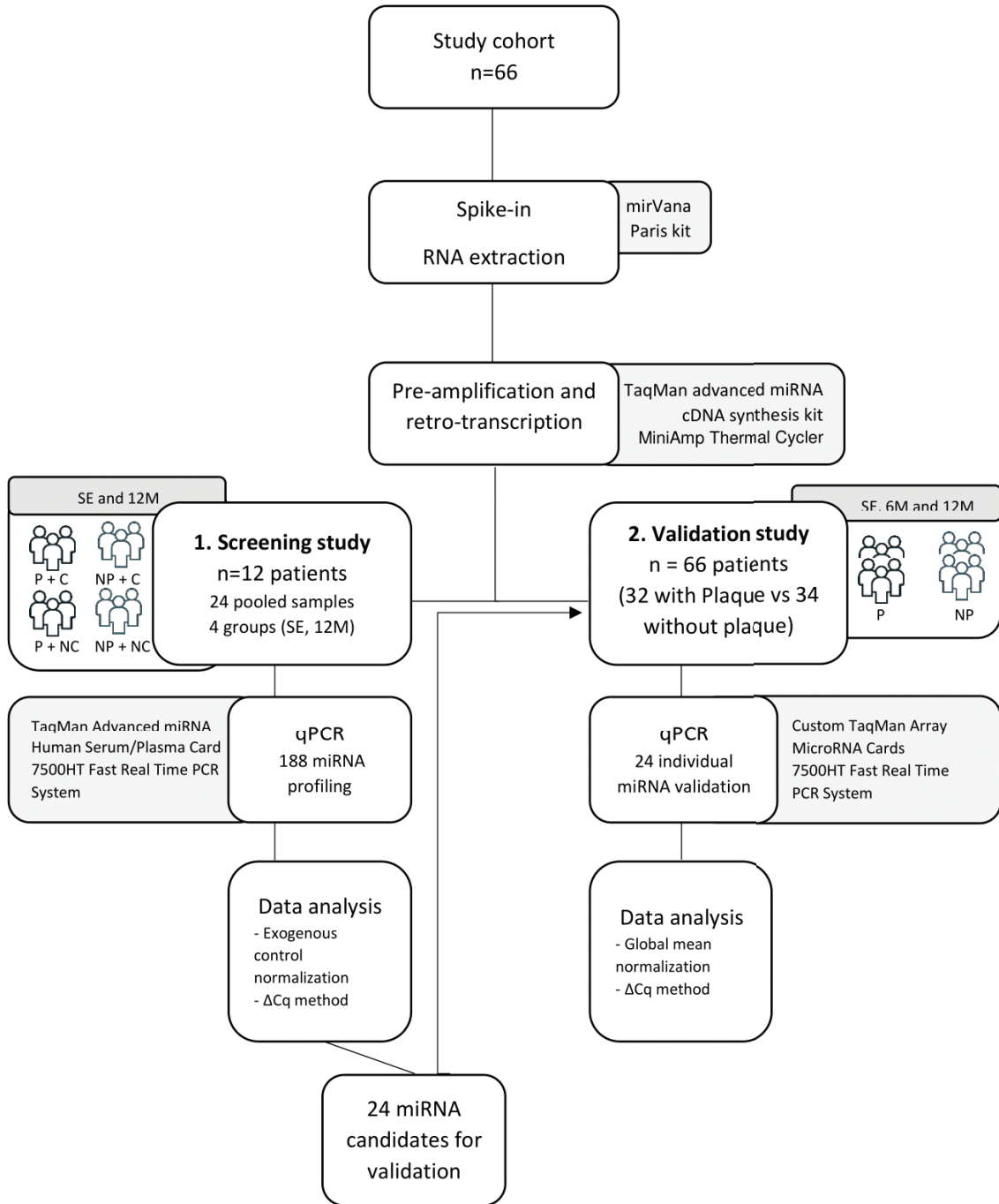


Figure 1. Flowchart of the study.

Samples from 12 subjects before and 12 months after bariatric surgery were included to perform a general screening of 188 miRNAs. 24 differentially expressed miRNAs were validated in the whole cohort divided according plaque presence. Abbreviations: SE, one month before surgery; 6M, 6 months after surgery; 12M, 12 months after bariatric surgery; P, with plaque; NP, without plaque; C, with comorbidities; NC, without comorbidities.

Statistical analysis:

MiRNAs were considered to be of minimal amounts if their Cq values were > 35. MiRNA data are represented as the means \pm SEM. The χ^2 was used to compare the categorical differences between the number of patients expressing or not each miRNA among the groups and time.

The two-way ANOVA test was used to compare the quantitative differences between the miRNA among the groups and time and the Bonferroni post-test was performed. A p-value < 0.05 was considered to be statistically significant. Spearman rank correlation test was used to calculate the associations between miRNAs and biochemical parameters. To describe the discrimination accuracy of those miRNA with a different expression between groups, the receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed.

RESULTS

Cohort characteristics

Anthropometric and metabolic characteristics of individuals involved are shown in Table 1. BMI, total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol (cLDL), triacylglyceride (TAG) levels, glucose, and the prevalence of comorbidities decreased after BS (Table 1). On contrary, high-density lipoprotein cholesterol (cHDL) increased.

Significant differences were identified between plaque and no-plaque groups: patients with plaque had significantly higher heart rate, TAG and glucose levels, but their plasma cholesterol levels were not significantly different.

Screening study: Identification of circulating miRNAs relevant to obesity and subclinical atherosclerosis.

The miRNA profiles were used to identify miRNAs related to obesity and subclinical atherosclerosis in the screening cohort (population grouped according comorbidities, plaque and time of study). From the 188 analyzed, 182 miRNAs were detected (Cq < 35). There were 79 miRNAs that exhibited a $\Delta\Delta Cq > 2$ between at least two groups. After the analysis, 24 miRNAs were selected as candidates for further study based on the fold change, expression abundance, and previously described functionality (Table 2).

TABLE 1. Clinical characteristics of subjects with SE with or without plaques before and after bariatric surgery. Quantitative variables are expressed as the mean ± SEM. Categorical variables are expressed as “yes/no” to indicate whether the patients presented a given pathology or not, with the results expressed as percentages. Statistical analyses for age and sex between groups with and without plaques were performed using Mann-Whitney U test. Statistical analyses for the remaining quantitative variables were performed using two-way ANOVA (group and time of follow-up) and the Bonferroni post-hoc test. Contingency tables with two-sided Fisher’s exact test were used for categorical variables. Symbol (°) denotes differences vs OB; symbol (+) denotes differences vs patients with plaques. One symbol, p < 0.05; two symbols, p < 0.01; three symbols, p < 0.001; ns, non-significant.

Parameters	With plaque			Without plaque			P value
	OB	6M	12M	OB	6M	12M	Plaque / Time / Interaction
N	32	-	-	34	-	-	-
Sex (women / men)	18 / 14	-	-	29 / 5 +++	-	-	0.0139
Age (years)	51.8 ± 1.8	-	-	43.5 ± 1.8 ++	-	-	0.0019
Weight (kg)	120.7 ± 4.0	87.9 ± 2.7 °°°	81.5 ± 2.5 °°°	119.1 ± 3.3	86.9 ± 2.7 °°°	79.5 ± 2.9 °°°	ns / <0.0001 / ns
BMI (kg/m ²)	44.0 ± 1.3	32.0 ± 0.8 °°°	29.8 ± 0.8 °°°	45.7 ± 1.0	33.8 ± 0.9 °°°	30.2 ± 0.9 °°°	ns / <0.0001 / ns
HR (bpm)	73.3 ± 2.7	61.2 ± 2.2 °°	60.1 ± 1.9 °°°	68.6 ± 1.6	56.6 ± 1.5 °°°	56.9 ± 1.9 °°°	0.0426 / <0.0001 / ns
Cholesterol (mg/dL)	185.9 ± 8.0	162.02 ± 8.1 °	180.9 ± 7.1	177.2 ± 4.8	152.9 ± 5.5 °°°	163.3 ± 6.9	ns / <0.0001 / ns
cHDL (mg/dL)	51.9 ± 6.4	49.7 ± 5.0	53.8 ± 1.8 °°	46.8 ± 1.4	46.0 ± 1.7	54.7 ± 2.0 °°°	ns / <0.0001 / ns
cLDL (mg/dL)	107.9 ± 6.9	90.3 ± 6.2	106.8 ± 6.4	107.4 ± 4.6	87.9 ± 4.8 °°°	94.2 ± 6.8	ns / 0.0009 / ns
TAG (mg/dL)	164.3 ± 14.6	118.4 ± 9.8 °°	98.9 ± 10.9 °°	124.2 ± 8.0	94.0 ± 4.8 °°°	76.6 ± 4.5 °°°	0.0082 / <0.0001 / ns
Glucose (mg/dL)	128.3 ± 7.8	90.1 ± 3.4 °°°	99.6 ± 12.1	99.8 ± 3.7 ++	82.1 ± 1.7 °°°	82.8 ± 1.7 °°°	0.0031 / <0.0001 / ns
Hba1C (%)	6.61 ± 0.25	5.57 ± 0.22 °°	5.54 ± 0.15 °°°	5.70 ± 0.16 ++	5.16 ± 0.11 °°°	5.13 ± 0.07 °°°	0.0049 / <0.0001 / ns
HOMA-IR	5.17 ± 0.97	1.22 ± 0.41 °	1.31 ± 0.43 °	1.96 ± 0.42 +	0.66 ± 0.06	0.53 ± 0.04 °	0.0003 / 0.0001 / 0.0092
Healthy (no HT, DLP and DM2). yes / no (%)	13 / 87	50 / 50 °°	56 / 44 °°°	50 / 50 +++	65 / 45	79 / 21 °	-
HT. yes / no (%)	78 / 22	43 / 57 °°	35 / 65 °°°	38 / 62 +++	29 / 71 +	15 / 85 +++ , °	-
DLP. yes / no (%)	69 / 31	30 / 70 °°°	16 / 84 °°°	28 / 72 +++	12 / 88 ++ , °	6 / 94 + , °°	-
T2DM. yes / no (%)	66 / 34	29 / 71 °°°	19 / 81 °°°	19 / 81 +++	6 / 94 +	0 / 100 + , °	-

Abbreviations: OB, one month before bariatric surgery; 6M, 6 months after bariatric surgery; 12M, 12 months after bariatric surgery; n, number of patients; BMI, body mass index; HR, heart rate; cHDL, high-density lipoprotein cholesterol; cLDL, low-density lipoprotein cholesterol; TAG, triacylglyceride; Hba1cC, glycated hemoglobin; HOMA-IR, Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance; HT, hypertension; DLP, dyslipidemia; T2DM, type 2 diabetes mellitus

Validation study: qPCR quantification

The 24 miRNAs had acceptable and consistent signals. Only miR-375 was different in the categorical analysis for the variable time. In the group with plaque, it was expressed in the 51% of the subjects at the beginning of the study vs the 60% at 12M after BS ($p < 0.05$). In the group without atheroma, 32% of the individuals had signal before surgery vs the 62,5% one year after ($p < 0.05$).

Five of the miRNAs showed significant differences along the study: miR-145-5p, miR-144-5p, miR-20a-3p and miR-21-3p exhibited increased expression levels in patients before BS versus after (Figure 2 B to E), whereas only miR-375 (Figure 2A) increased after BS in both groups. Interestingly, the expression of three miRNA was different between patients with and without atheroma: miR-126 was higher in patients without plaque (Figure 2 G), by contrary, miR-21-3p and miR-133a-3p were higher in the group with atheroma (Figure 2 E and F).

Figure 2

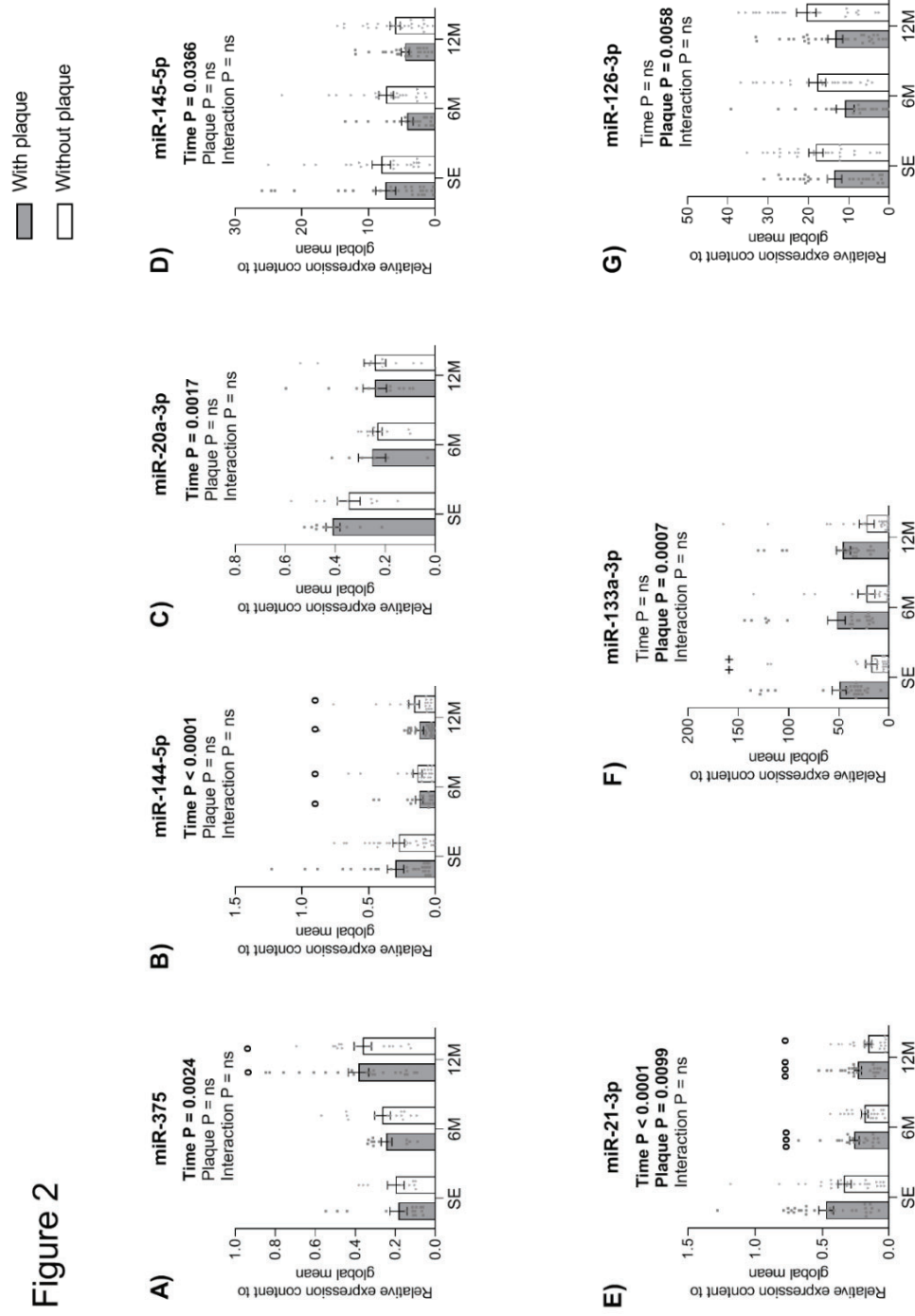


Figure 2. Relative levels of the seven identified circulating miRNAs in the groups with and without plaque in the entire cohort before and after BS. Cq values were converted to relative concentrations normalized to exogenous control values included in the global mean, and were calculated using the comparative Cq method ($2^{-\Delta\Delta Cq}$). Each point represents the mean of duplicate samples. Symbol ° represents differences with basal SE point, same group. Symbol + represents differences with the plaque group, same time. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

Association of serum miRNA levels with clinical and biochemical parameters.

We subsequently wondered if serum miRNA expression levels were correlated with other metabolic and cardiovascular risk variables. Table 3 shows correlations between miRNAs and some parameters related to obesity and metabolic syndrome, oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction (detailed data published before [20,22,23]).

Table 3: Correlation analysis of significant miRNA and obesity, inflammation and oxidative stress related parameters. Spearman correlation coefficient (rho) is shown. One symbol (*) p < 0.05; two symbols (**) p < 0.01; three symbols (***) p < 0.001.

Pathologic processes	Variables	miR-375	miR-144-5p	miR-20a-3p	miR-145-5p	miR-21-3p	miR-133a-3p	miR-126-3p
Obesity and metabolic syndrome	Weight (kg)	-0,394 ***	0,233 **	0,346 **	-0,070	0,328 ***	-0,121	-0,005
	BMI (Kg/m ²)	-0,388 ***	0,235 **	0,380 **	0,049	0,368 ***	-0,115	0,072
	TC (mg/dl)	0,047	-0,106	-0,159	0,088	0,117	-0,057	0,003
	cHDL (mg/dl)	0,251 *	-0,079	-0,170	0,157	-0,110	-0,080	0,051
	cLDL (mg/dl)	-0,013	-0,126	-0,184	0,065	0,096	-0,026	-0,042
	TAG (mg/dl)	-0,099	-0,062	0,184	0,030	0,254 ***	0,031	-0,061
	Glucose (mg/dl)	-0,187	0,107	0,419 **	0,066	0,400 ***	0,243 **	0,040
	Insulin (pmol/L)	-0,260 *	-0,085	0,435 **	0,061	0,171	0,116	-0,103
	HOMA-IR	-0,262 *	-0,062	0,501 ***	0,104	0,246 **	0,115	-0,052
	Hba1c (%)	-0,043	0,215 *	0,335 *	0,138	0,256 **	0,235 **	0,001
	AIP (AU)	-0,186	-0,034	0,172	-0,002	0,232 **	0,047	-0,053
	HR (bpm)	-0,043	0,091	0,385 **	0,115	0,303 ***	0,156	0,088
	cIMT	0,039	-0,077	0,030	-0,048	0,090	0,215 *	-0,192 *
Irisin (ng/ml)	-0,071	0,041	0,020	0,183 *	0,177 *	-0,109	0,343 ***	
BDNF (pg/ml)	-0,397 ***	0,055	0,013	0,301 ***	0,321 ***	0,036	0,479 ***	
oxidative stress	SOD2 (ng/ml)	-0,022	-0,104	0,175	0,051	0,246 **	0,005	0,15
	CAT (nmol/min/ml)	0,212	-0,036	-0,152	-0,023	-0,245 **	-0,203 *	0,09
	PON1 (ng/ml)	0,315 **	-0,085	-0,033	0,138	-0,189 *	-0,071	0,218 *
	MDA (uM)	-0,172	0,269 *	0,406 **	0,075	0,304 ***	0,217 *	0,07
	oxLDL (U/L)	-0,052	0,133	0,334 *	0,132	0,378 ***	0,035	0,139
inflammation	IL6 (pg/ml)	-0,371 **	0,129	0,205	-0,063	0,214 *	0,083	-0,104
	TNFa (pg/ml)	-0,146	0,245 *	0,265 *	0,045	0,170 *	0,007	0,027
	CRP (mg/L)	-0,264 *	0,174 *	0,297 *	0,069	0,333 ***	-0,035	0,107
	PAI-1 (ng/ml)	-0,226 *	0,077	0,293 *	0,153	0,409 ***	0,269 **	0,089
	Leptin (ng/ml)	-0,206	0,186 *	0,183	0,130	0,201 *	-0,095	0,122
Adiponectin (ng/ml)	0,161	-0,094	-0,256	-0,061	-0,308 ***	-0,184 *	-0,013	
endothelial dysfunction	Ang1 (pg/ml)	-0,428 ***	0,154	-0,061	0,194 *	0,217 **	-0,054	0,357 ***
	ICAM (ng/ml)	0,034	0,005	0,167	0,131	0,134	0,073	0,070
	VCAM (ng/mL)	0,050	0,119	0,329 *	0,158	0,091	0,091	-0,333 *
	E-Sel (ng/ml)	-0,127	-0,057	0,252	0,035	0,288 **	-0,093	0,152
	P-Sel (ng/ml)	-0,325 **	-0,016	0,113	0,174 *	0,438 ***	0,170	0,306 *

Abreviations: BMI, body mass index; TC, total cholesterol; cHDL, cholesterol in high density lipoproteins; cLDL, cholesterol in low density lipoproteins; TAG, triacylglycerides; Hba1c, glycated hemoglobin A1c; AIP, atherosclerotic index of plasma; HR, heart rate; cIMT, carotid intima media thickness; BDNF; brain derived growth factor; SOD2; superoxide dismutase 2; CAT, catalase; MDA, malondialdehyde; PON1 paraoxonase 1; oxLDL, oxidized LDL; IL6, interleukin 6; TNFα, tumor necrosis factor α; CRP, C-reactive protein; PAI-1, plasminogen activator inhibitor 1; Ang1, angiotensin 1; ICAM, intercellular adhesion molecule; VCAM, vascular adhesion molecule; E-Sel, e-selectin; P-Sel, P-selectin.

ROC curve analysis.

The ROC curve was constructed to evaluate the discriminative ability between the plaque and no plaque group of the miRNA-133a-3p (Figure 3), since it is the only one different between groups before BS, False Discovery Rate (FDR) adjusted $p < 0.0001$. We found yielded area under ROC curve (AUC) of 0.8981 (95% CI = (0.8057 ; 0.9906), indicating that the miR-133a-3p has a relatively high diagnostic value for subclinical atherosclerosis in subjects with SE before BS.

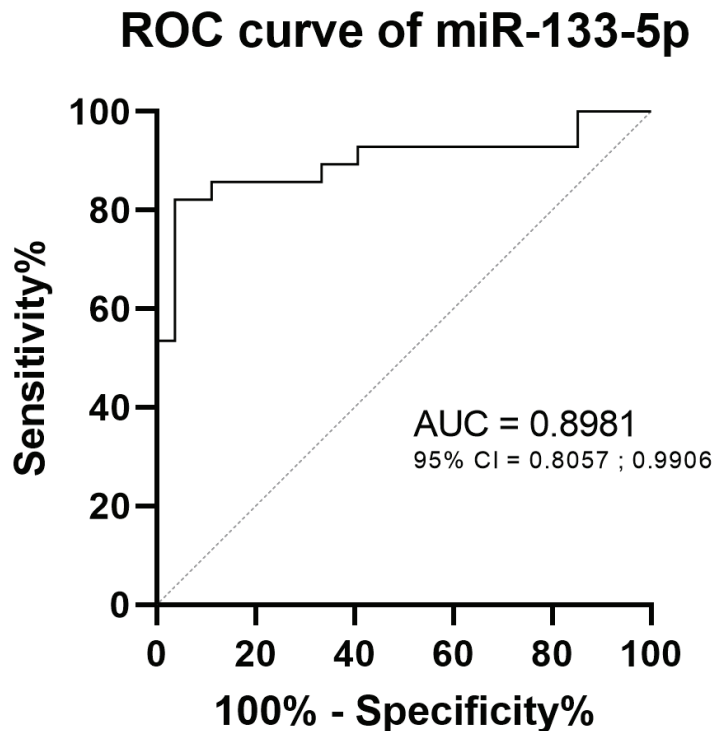


Figure 3. ROC plot of the miR-133a-3p

DISCUSSION

In the present study we determined the circulating miRNA expression profile in subjects with SE with and without subclinical atherosclerosis, followed by RT-qPCR confirmation in individual samples, and successfully found changes in five miRNAs related with weight loss associated to BS. To note, we also identified three miRNAs whose expression was different in subjects suffering pre-clinical atherosclerosis. Statistics analysis indicated that some of the identified miRNAs may be closely associated to comorbidities, OS and inflammation. We propose a panel of miRNAs with possible roles in the regulation of atherogenic and adipogenic processes, including endothelial and adipocyte dysfunction

and angiogenesis, adhesion and infiltration of inflammatory cells, hypoxia and oxidative stress, and apoptosis [22,23].

The detection of circulating miRNAs levels in the subclinical stage of atherosclerosis has allowed for the determination of one potential biomarker (miR-133a-3p), with relatively high discriminatory ability for the plaque presence before BS.

Circulating miRNAs changes with BS

In SE, oxidative stress and inflammation impair adipocyte function, resulting in defective insulin action and adipocytokine signaling [24]. As we found previously, BS ameliorates the aforementioned alterations, which raises questions regarding what molecules are probably common regulators of these pathogenic processes and the recovery after BS. Epigenetic regulation could mediate the beneficial effect of BS on body weight and the metabolic disturbances associated, and BS seemed to be able to reprogram or reverse some of the epigenetic profile associated to SE [25].

miR-375

The increase of miR-375 after BS could be explained due to its contribution in glucose metabolism through its role in regulating pathways in insulin signaling and lipid metabolism [26]. It is highly expressed in pancreatic β -cells and is important in their maintenance and expansion [27–29]. In agreement with the obtained results and to the negative correlations found with HOMA-IR and insulin, but not with glucose, this miRNA seems to regulate insulin secretion independently of changes in plasma glucose levels [30,31] (by directly targeting 3'-phosphoinositide- dependent protein kinase-1 (PDK1)) [32]. Therefore, its increased expression may be related to the regression of T2DM in most subjects after BS.

miR-144-5p

In this same line, we found that miR-144-5p decreased after BS. It has been shown to inhibit the insulin receptor substrate 1 (IRS1), which participate in insulin signaling by transmitting signals from the insulin and insulin-like growth factor-1 receptors to intracellular pathways. In accordance with the positive correlation found between this miRNA and Hba1c, studies focusing on T2DM showed overexpressed levels of circulating miR144-5p associated to this disease [33,34].

Interestingly, we also found positive correlations of miR-144 with leptin, TNF α , CRP and MDA, findings supporting the described enhanced expression of inflammatory factors by miR-144 mimics [35]. To note, SE is associated with high levels of leptin [23]. Leptin was described to regulate the activation of mechanisms involved in inflammation-induced insulin resistance [36][37], so it is a pro-inflammatory mediator that could link the immune

system with obesity-related insulin resistance. Therefore, miR-144 might have a role in inflammation, also amplifying the process of insulin resistance through the pro-inflammatory cytokines.

miR-20a

miR-20a targets the signal-regulatory protein α (SIRP α) gene. SIRP α is an essential negative regulator of leukocyte inflammatory responses. We also found correlations with the inflammatory parameters TNF, CRP and PAI-1. Then, we suggest that the decrease in miR-20a after BS, which leads to SIRP α increase and macrophage inactivation [38], might regulate the amelioration of inflammatory responses in SE after BS.

On the other hand, miR-20a has been shown to affect ULK1 complex, and a recent study has uncovered the protective role of ULK1 in obesity-induced cardiac damage [39]. This miRNA also inhibits endothelial cell migration and impairs angiogenesis, important processes for endothelial function [40]. Therefore, miRNA might also participate in restoring endothelial function after BS.

miR-145-5p

The role of miR-145 in obesity is not clear; nevertheless, we found a decrease in its expression after BS. In agreement to our results, other authors also found that obesity increased the expression of the miR-145 [41–44]. To date, miR-145 has described roles in: regulation of the quiescent versus proliferative phenotype of vascular smooth muscle cells; differentiation, proliferation and apoptosis [45]; and the development of certain CVD [46]. Furthermore, under hypoxic conditions in SE, miR-145-5p and ROS production seems to be upregulated [47]. Interestingly, we found a positive correlation between this miRNA and brain derived neurotrophic factor (BDNF) which, promotes endothelial cell survival and induces neoangiogenesis in ischemic tissues [48].

Mirna profile in subclinical atherosclerosis

The common pathological mechanisms that occur in obesity and atherosclerosis, and the difficulty to detect atheromas in patients with EO make it crucial to find markers for subclinical atherosclerosis in order to prevent severe acute cardiovascular events. The biological processes in all stages of atherosclerosis progression (from early endothelium dysfunction to erosion and rupture of an unstable atherosclerotic plaque) could be associated with microRNA.

miR-21

The results showed that miR-21 not only decreased in subjects after BS, but also it was significantly different between subjects with and without plaque. It was described to play a crucial role in a plethora of biological functions and diseases including cardiovascular

diseases and inflammation [49]. The current identified target genes for miR-21 that are involved in cardiovascular effects are programmed cell death 4, phosphatase and tensin homology deleted from chromosome 10, sprouty1, and sprouty2 [50,51]. The revealed deregulated expression in subjects with plaque suggest that miR-21 mediates the effect of these genes in vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis, cardiac cell growth and death, and cardiac fibroblast functions, hence promoting atherogenesis [50,52–54]. Furthermore, miR-21 has been shown to increase with shear stress [55], so it could be one of the reasons for the increased miR-21 in subjects before BS and in the group with plaque.

We previously shown that increased oxidative stress occur in SE [22,47], in the context of obesity-induced endothelial dysfunction there is a potential crosstalk between ROS and miRNAs. Elevated levels of miR-21 are associated with increased abundance of ROS, and ROS-induced NF- κ B upregulates miR-21 [56]. Accordingly, we found negative correlations with CAT and PON1, important proteins in the antioxidant mechanisms. To note, miR-21 also correlates positively with the two markers of OS (MDA and oxLDL). During SE, dysfunctional adipocytes exhibit an inflammatory phenotype. In this line, miR-21 inhibits the TGF- β signaling pathway, which in turn inhibits adipogenesis and stimulates inflammation [56,57]. Of interest, miR-21 is also induced by IL-6 [58], which is in agreement with the correlation we found between the proinflammatory parameters and this miRNA, confirming its importance in the inflammatory process.

miR-21 is important in health, development, and disease, but it might not be considered a specific biomarker for subclinical atherosclerosis because of its multiple roles. Nevertheless, together with other miRNA, it may conform a specific signature of miRNA in subclinical atherosclerosis.

miR-133a

The performed tests revealed higher miR-133a expression in patients with plaque than in those without atheroma. According to our results, other authors found miR-133a altered in cardiovascular diseases [59]. Target genes of this miRNA (Nox1, MMP9, CD40) play a role in enhancing vascular calcification [60], which is thought to cause plaque rupture. Interestingly, we found a positive correlation with the intima-media thickness, which reflect the state of the arterial walls and has been proposed as a CVR marker [61]. Thus, this miRNA could have an important role in regulating atherosclerotic plaque toward unstable phenotypes and rupture [62]. Some authors found direct effect of miR-133 on endothelial cells and revealed that, when overexpressed, it has angiogenic factor receptors as putative targets [62], suggesting a potential role of this miRNA in the control of the vascular angiogenesis. Nevertheless, we were not able to

found any correlations between this miRNA and the measured angiogenesis related parameters.

These results further support the idea of miR-133a as cardiac-specific miRNA. It was upregulated in patients with subclinical atherosclerosis and SE who had not experienced acute cardiovascular events so, taking into account the AUC of the ROC curve, it may be a useful biomarker.

miR-126

The regulation of named miRNAs can exacerbate an atheroma formation, but there are also miRNAs that affect the progression of atherosclerosis by decreasing it, these seems to include miR-126. We found reduced levels of circulating miR-126 in patients with atheroma, observation in concordance with previous studies which showed diminished expression in patients with coronary artery disease [63]. miR-126 signals for endothelial repair and may prevent inflammation and the initial trigger for the atheroma formation [64]. Regarding angiogenesis, we found a positive correlation with angiopoietin 1 (Ang-1). Therefore, reduced miR-126 levels might participate in the impaired angiogenic signaling in patients with plaque.

The anti-inflammatory effects of miR-126 in the vascular endothelium are through promoting angiogenesis and repressing three target genes: SPRED1, PIK3R2 and VCAM1 [65]. According to the observed correlation, this miRNA has been shown to inhibit the expression of VCAM-1, which will subsequently reduce leukocyte adherence to endothelial cells [66]. This data support the role of miR-126 as an important regulator of the adhesion molecule expression and may provide additional control of vascular inflammation and function in human diseases [64].

One of the weaknesses of the present study is the use of pooled samples in miRNAs screening phase, because results might yield some inaccurate information due to individual difference; to tackle this issue, the final validation step was done individually.

CONCLUSION

From the above data, we can conclude that miRNA are deregulated in both obesity and atherosclerosis.

Identification of circulating miRNAs associated with SE and subclinical atherosclerosis may offer novel approaches of assessing early variations in atherosclerosis and provide evidence about the molecular mechanisms connected to early changes in comorbidities and CVR.

Our results provide a better understanding of the role of circulating miRNAs, in predicting the CVR at early stages of subclinical atherosclerosis in SE. The three miRNAs identified

in our study hold potential as auxiliary biomarkers for subclinical atherosclerosis and in concrete, mir-133a-3p has relatively high discriminatory ability for the plaque presence before BS.

Conflict of interests: The authors declare that they have no conflict of interests.

Ethical Approval: All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent: Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

REFERENCES

1. Endalifer ML, Diress G. Epidemiology, Predisposing Factors, Biomarkers, and Prevention Mechanism of Obesity: A Systematic Review. Stocker C, editor. *J Obes* [Internet]. Hindawi; 2020;2020:6134362. Available from: <https://doi.org/10.1155/2020/6134362>
2. Rogers AM. Current State of Bariatric Surgery: Procedures, Data, and Patient Management. *Tech Vasc Interv Radiol*. United States; 2020;23:100654.
3. Orekhov AN, Ivanova EA. Introduction of the special issue “Atherosclerosis and Related Diseases.” *Vessel Plus* [Internet]. 2017;1:163–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.20517/2574-1209.2017.33>
4. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2019;5:56. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>
5. Kranjec I. Atherosclerotic burden in coronary and peripheral arteries in patients with first clinical manifestation of coronary artery disease. *J. Cardiovasc. Med. (Hagerstown)*. United States; 2011. p. 297–9.
6. Churov A, Summerhill V, Grechko A, Orekhova V, Orekhov A. MicroRNAs as Potential Biomarkers in Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* [Internet]. MDPI; 2019;20:5547. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31703274>
7. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* [Internet]. Elsevier; 2009;136:642–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
8. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet*. England; 2015;16:421–33.

9. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. England; 2019;20:5–20.
10. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2011;8:467–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21647195>
11. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2019;20:21–37. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7>
12. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. England; 2004;431:350–5.
13. Santovito D, Mezzetti A, Cipollone F. MicroRNAs and atherosclerosis: new actors for an old movie. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. Netherlands; 2012;22:937–43.
14. Tang X, Tang G, Özcan S. Role of microRNAs in diabetes. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* [Internet]. 2008;1779:697–701. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874939908001454>
15. Cui M, Wang H, Yao X, Zhang D, Xie Y, Cui R, et al. Circulating MicroRNAs in Cancer: Potential and Challenge [Internet]. *Front. Genet.*. 2019. p. 626. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2019.00626>
16. Forterre A, Komuro H, Aminova S, Harada M. A Comprehensive Review of Cancer MicroRNA Therapeutic Delivery Strategies. *Cancers (Basel)* [Internet]. MDPI; 2020;12:1852. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32660045>
17. Iacomino G, Siani A. Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. *Genes Nutr* [Internet]. BioMed Central; 2017;12:23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28974990>
18. Iacomino G, Russo P, Stillitano I, Lauria F, Marena P, Ahrens W, et al. Circulating microRNAs are deregulated in overweight/obese children: preliminary results of the I.Family study. *Genes Nutr*. 2016;11:7.
19. Pescador N, Pérez-Barba M, Ibarra JM, Corbatón A, Martínez-Larrad MT, Serrano-Ríos M. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers. *PLoS One*. 2013;8:e77251.
20. Carmona-Maurici J, Cuello E, Miñarro A, Rius F, Bueno M, de la Fuente MC, et al. Impact of bariatric surgery on subclinical atherosclerosis in patients with morbid obesity. *Surg Obes Relat Dis*. :Accepted, ahead of print.
21. Bonora E, Micciolo R, Ghiatas AA, Lancaster JL, Alyassin A, Muggeo M, et al. Is it possible to derive a reliable estimate of human visceral and subcutaneous abdominal adipose tissue from simple anthropometric measurements? *Metabolism*. United States; 1995;44:1617–25.
22. Carmona-Maurici J, Cuello E, Ricart-Jané D, Miñarro A, Olsina Kissler JJ, Baena-Fustegueras JA, et al. Effect of bariatric surgery in the evolution of oxidative stress depending on the presence of atheroma in patients with morbid obesity. *Surg Obes Relat Dis* [Internet]. 2020; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550728920302458>

23. Carmona-Maurici J, Cuello E, Ricart-Jané D, Miñarro A, Baena-Fustegueras JA, Peinado-Onsurbe J, et al. Effect of bariatric surgery on inflammation and endothelial dysfunction as processes underlying subclinical atherosclerosis in morbid obesity. *Surg Obes Relat Dis Off J Am Soc Bariatr Surg*. United States; 2020;
24. Hulsmans M, Holvoet P. The vicious circle between oxidative stress and inflammation in atherosclerosis. *J Cell Mol Med*. 2010;14:70–8.
25. Arterburn DE, Courcoulas AP. Bariatric surgery for obesity and metabolic conditions in adults. *BMJ [Internet]*. 2014;349:g3961. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25164369>
26. Kumar A, Ren Y, Sundaram K, Mu J, Sriwastva MK, Dryden GW, et al. miR-375 prevents high-fat diet-induced insulin resistance and obesity by targeting the aryl hydrocarbon receptor and bacterial tryptophanase (tnaA) gene. *Theranostics [Internet]*. Ivyspring International Publisher; 2021;11:4061–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33754048>
27. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, MacDonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature [Internet]*. 2004;432:226–30. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature03076>
28. Poy MN, Hausser J, Trajkovski M, Braun M, Collins S, Rorsman P, et al. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:5813–8.
29. Tattikota SG, Rathjen T, McAnulty SJ, Wessels H-H, Akerman I, van de Bunt M, et al. Argonaute2 mediates compensatory expansion of the pancreatic β cell. *Cell Metab*. 2014;19:122–34.
30. Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta Diabetol. Germany*; 2011;48:61–9.
31. Higuchi C, Nakatsuka A, Eguchi J, Teshigawara S, Kanzaki M, Katayama A, et al. Identification of circulating miR-101, miR-375 and miR-802 as biomarkers for type 2 diabetes. *Metabolism*. United States; 2015;64:489–97.
32. El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, van Obberghen E. miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2008;57:2708–17.
33. Karolina DS, Armugam A, Tavintharan S, Wong MTK, Lim SC, Sum CF, et al. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One [Internet]*. 2011/08/01. Public Library of Science; 2011;6:e22839–e22839. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21829658>
34. Kim M, Zhang X. The Profiling and Role of miRNAs in Diabetes Mellitus. *J diabetes Clin Res [Internet]*. 2019;1:5–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32432227>

35. Hu Y-W, Hu Y-R, Zhao J-Y, Li S-F, Ma X, Wu S-G, et al. An Agomir of miR-144-3p Accelerates Plaque Formation through Impairing Reverse Cholesterol Transport and Promoting Pro-Inflammatory Cytokine Production. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2014;9:e94997. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094997>
36. Frühbeck G, Catalán V, Rodríguez A, Ramírez B, Becerril S, Salvador J, et al. Involvement of the leptin-adiponectin axis in inflammation and oxidative stress in the metabolic syndrome. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7:6619. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06997-0>
37. Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Vilariño-García T, Sánchez-Margalet V. Role of Leptin in Inflammation and Vice Versa. *Int J Mol Sci* [Internet]. MDPI; 2020;21:5887. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32824322>
38. Zhu D, Pan C, Li L, Bian Z, Lv Z, Shi L, et al. MicroRNA-17/20a/106a modulate macrophage inflammatory responses through targeting signal-regulatory protein α . *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:426-36.e8.
39. An M, Ryu D-R, Won Park J, Ha Choi J, Park E-M, Eun Lee K, et al. ULK1 prevents cardiac dysfunction in obesity through autophagy-mediated regulation of lipid metabolism. *Cardiovasc Res*. England; 2017;113:1137–47.
40. Ait-Aissa K, Nguyen QM, Gabani M, Kassan A, Kumar S, Choi S-K, et al. MicroRNAs and obesity-induced endothelial dysfunction: key paradigms in molecular therapy. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. BioMed Central; 2020;19:136. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32907629>
41. Heneghan HM, Miller N, McAnena OJ, O'Brien T, Kerin MJ. Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2011;96:E846–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21367929>
42. Lin Y-Y, Chou C-F, Giovarelli M, Briata P, Gherzi R, Chen C-Y. KSRP and MicroRNA 145 are negative regulators of lipolysis in white adipose tissue. *Mol Cell Biol*. 2014;34:2339–49.
43. Wen F, Yang Y, Jin D, Sun J, Yu X, Yang Z. MiRNA-145 is involved in the development of resistin-induced insulin resistance in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. United States; 2014;445:517–23.
44. Lorente-Cebrián S, Mejhert N, Kulyté A, Laurencikiene J, Åström G, Hedén P, et al. MicroRNAs regulate human adipocyte lipolysis: effects of miR-145 are linked to TNF- α . *PLoS One*. 2014;9:e86800.
45. Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*. 2009;460:705–10.
46. Santovito D, Mandolini C, Marcantonio P, De Nardis V, Bucci M, Paganelli C, et al. Overexpression of microRNA-145 in atherosclerotic plaques from hypertensive patients. *Expert Opin Ther Targets*. England; 2013;17:217–23.

47. Carbonell T, Gomes A V. MicroRNAs in the regulation of cellular redox status and its implications in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Redox Biol* [Internet]. 2020;36:101607. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231720308120>
48. Kermani P, Hempstead B. Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* [Internet]. 2007;17:140–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17482097>
49. Jenike AE, Halushka MK. miR-21: a non-specific biomarker of all maladies. *Biomark Res* [Internet]. 2021;9:18. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40364-021-00272-1>
50. Lin Y, Liu X, Cheng Y, Yang J, Huo Y, Zhang C. Involvement of MicroRNAs in hydrogen peroxide-mediated gene regulation and cellular injury response in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2009;284:7903–13.
51. Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res*. United States; 2007;100:1579–88.
52. Oudit GY, Sun H, Kerfant B-G, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol*. England; 2004;37:449–71.
53. Lankat-Buttgereit B, Göke R. The tumour suppressor Pcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation. *Biol cell*. England; 2009;101:309–17.
54. Krzywińska O, Bracha M, Jeanniere C, Recchia E, Kędziora Kornatowska K, Kozakiewicz M. Meta-Analysis of the Potential Role of miRNA-21 in Cardiovascular System Function Monitoring. Thamilselvan S, editor. *Biomed Res Int* [Internet]. Hindawi; 2020;2020:4525410. Available from: <https://doi.org/10.1155/2020/4525410>
55. Weber M, Baker MB, Moore JP, Searles CD. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2010/02/12. 2010;393:643–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20153722>
56. Kim YJ, Hwang SJ, Bae YC, Jung JS. miR-21 Regulates Adipogenic Differentiation Through the Modulation of TGF-beta Signaling in Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue. *Stem Cells* [Internet]. 2009; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19816956>
57. Keophiphath M, Achard V, Henegar C, Rouault C, Clement K, Lacasa D. Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. *MolEndocrinol* [Internet]. 2009;23:11–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18945811>
58. Löffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, Stocsits C, Hackermüller J, Kretzschmar AK, et al. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood*. United States; 2007;110:1330–3.

59. Peters LJF, Biessen EAL, Hohl M, Weber C, van der Vorst EPC, Santovito D. Small Things Matter: Relevance of MicroRNAs in Cardiovascular Disease [Internet]. *Front. Physiol.* . 2020. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2020.00793>
60. Goettsch C, Hutcheson JD, Aikawa E. MicroRNA in cardiovascular calcification: focus on targets and extracellular vesicle delivery mechanisms. *Circ Res.* 2013;112:1073–84.
61. Ravani A, Werba JP, Frigerio B, Sansaro D, Amato M, Tremoli E, et al. Assessment and relevance of carotid intima-media thickness (C-IMT) in primary and secondary cardiovascular prevention. *Curr Pharm Des [Internet]*. Bentham Science Publishers; 2015;21:1164–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25312737>
62. Cipollone F, Felicioni L, Sarzani R, Uchino S, Spigonardo F, Mandolini C, et al. A unique microRNA signature associated with plaque instability in humans. *Stroke.* United States; 2011;42:2556–63.
63. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res.* United States; 2010;107:677–84.
64. Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal.* United States; 2009;2:ra81.
65. Hu J, Zeng L, Huang J, Wang G, Lu H. miR-126 promotes angiogenesis and attenuates inflammation after contusion spinal cord injury in rats. *Brain Res.* Netherlands; 2015;1608:191–202.
66. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:1516–21.

4.6 Article 6: irisina (en revisió pels editors)

Títol: *Irisin as a marker of subclinical atherosclerosis in severe obesity: Association between irisin plasma levels, FNDC5 genetic variability and atheroma presence.*

Autors: Júlia Carmona-Maurici^a, Araceli Rosa^{b,c,d}, Natalia Azcona-Granada^b, David Ricart-Jané^a, Elionora Peña^b, Antonio Miñarro^e, Jorge Juan Olzina Kissler^f, Juan Antonio Baena-Fustegueras^f, Julia Peinado-Onsurbe^a, Eva Pardina^a

Afiliacions:

a. Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

b. Secció de Zoologia i Antropologia Biològica. Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain.

c. Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain.

d. Centre for Biomedical Research Network on Mental Health (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain.

e. Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

f. Gastrointestinal Surgery Department, Arnau de Vilanova University Hospital, IRB Lleida, University of Lleida, Lleida, Spain.

Informació de la revista: International Journal of Obesity. *Impact Factor* (2021): 5.551.

Irisin as a marker of subclinical atherosclerosis in severe obesity: Association between irisin plasma levels, *FNDC5* genetic variability and atheroma presence

Authors: Júlia Carmona-Maurici^A, Araceli Rosa^{B,C,D}, Natalia Azcona- Granada^B, David Ricart-Jané^A, Elionora Peña^B, Antonio Miñarro^E, Jorge Juan Olzina Kissler^F, Juan Antonio Baena-Fustegueras^F, Julia Peinado-Onsurbe^A, Eva Pardina^{A*}

Affiliations: ^ADepartament de Bioquímica i Biomedicina Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ^B Secció de Zoologia i Antropologia Biològica. Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain. ^CInstitut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain. ^DCentre for Biomedical Research Network on Mental Health (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain. ^EDepartament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ^FGastrointestinal Surgery Department, Arnau de Vilanova University Hospital, IRB Lleida, University of Lleida, Lleida, Spain.

ABSTRACT:

Introduction: Extreme obesity (EO) is a risk factor for atherosclerosis and is associated with different comorbidities. Irisin has an active role in energy metabolism and its levels have been linked to obesity, type 2 diabetes and cardiovascular disease.

Aim: To assess the usefulness of irisin as a marker of subclinical atherosclerosis. We investigated plasma irisin concentrations and irisin gene variation in subjects with EO undergoing bariatric surgery (BS) by dividing the cohort into those with atheromas and those without.

Methods: This prospective observational study included 61 subjects with EO undergoing BS. Individuals were distributed into two groups: patients with (n = 30) and patients without atheromas (n = 31) detected by ultrasound. Plasma samples were obtained 1 month before and 6 and 12 months after BS. Irisin concentrations were measured by ELISA at these three time points. At surgery, samples of subcutaneous adipose tissue were taken to genotype a single nucleotide polymorphism (rs3480) in the *FNDC5* gene encoding irisin.

Results: Irisin levels correlated with body mass index (BMI) ($r = 0.23$, $P = 0.0064$) and were lower in patients with atheromas all throughout the study ($P < 0.0002$). The rs3480 polymorphism of the irisin gene did not correlate with the irisin concentration nor the presence of atheromatous plaques.

Conclusion: Irisin may have a protective role against atherosclerosis and could be useful as a predictive marker. Increasing its levels may also serve as a therapeutic target.

Key points:

- In patients with extreme obesity undergoing bariatric surgery, irisin positively correlated with the BMI.
- Plasma irisin concentrations were lower in patients with atheromatous plaques.
- Irisin could be protective against atherosclerosis.
- Irisin may predict subclinical atherosclerosis in extreme obesity.
- The rs3480 polymorphism of the *FNDC5* gene was not associated with the presence of plaques nor with the plasma irisin concentration.

Key words: irisin, extreme obesity, subclinical atherosclerosis, bariatric surgery, *FNDC5* gene, rs3480.

INTRODUCTION:

Atherosclerosis is a chronic and inflammatory disease that begins with the formation of an atheroma, a subclinical and asymptomatic stage with no prior manifestations [1].

Extreme obesity (EO) is an important risk factor for atherosclerosis, predisposing individuals to numerous cardiac complications and increased mortality rates [2]. Obesity has become a major public health problem and its prevalence has increased in a notable way. Bariatric surgery (BS) is currently the most effective treatment for EO [3].

Although the pathogenesis of EO is extremely complex, one key component is the long-term dysregulation of the energy balance, comprising increased energy intake and/or reduced energy expenditure [4]. Irisin has an active role in energy metabolism and has been proposed to play a potential role in obesity [5]. This exercise-induced myokine and adipokine was first identified in 2012 and is the extracellular cleaved product of fibronectin type III domain-containing protein 5, which is encoded by the *FNDC5* gene. Once it is released into the circulation, irisin is able to stimulate the expression of uncoupling protein-1 (UCP1) and the browning of white adipose tissue, which prompts an increase in energy expenditure through increased thermogenesis [6]. Low irisin levels have not only been linked to obesity, but also to type 2 diabetes mellitus (T2D) [7] and cardiovascular disease (CVD) [8].

The *FNDC5* gene is located on chromosome 1p35.1. The genetic variability of this gene has been associated with obesity and related comorbidities [9–12]. However, only a few studies have investigated the association between *FNDC5* polymorphisms, circulating irisin levels and CVD risk. In this regard, the G allele of the rs3480 polymorphism has been associated with increased insulin resistance and an increased risk of myocardial infarction [10,12].

The effect of BS on irisin levels has previously been studied, but less is known about the role of irisin in the progression of subclinical atherosclerosis in EO. Therefore, the aims of this study were, firstly, to assess the utility of circulating irisin levels as a biomarker of subclinical atherosclerosis in patients with EO undergoing BS and, secondly, to clarify if the *FNDC5* rs3480 (A/G) polymorphism is associated with atherosclerosis or with irisin concentrations in the same cohort.

SUBJECTS AND METHODS:

This was a prospective observational study including 61 subjects with EO recruited at the Arnau de Vilanova University Hospital (Lleida, Spain) after being approved for BS. The subjects had a body mass index (BMI) > 40 kg/m² or > 35 kg/m² and at least one

comorbidity (including hypertension (HT), T2D, dyslipidemia (DLP), obstructive sleep apnea or weight-induced rheumatic disease) [13]. All subjects presented a clinical history of EO for at least 5 years. None of the subjects were diagnosed with inflammatory or infectious diseases, and none were receiving anti-obesity or anti-inflammatory drugs at the time of the study. Patients were excluded if they had any previous neoplastic, renal, hepatic or active systemic diseases, cardiovascular events, hypothyroidism or endocrine diseases other than T2D.

Patients underwent a laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass (n = 31) or sleeve gastrectomy (n = 30), according to the surgeon's criteria. At the beginning of the study, the 61 individuals were distributed into two groups based on the presence of atheromas, detected using a Vivid I ultrasound machine (General Electric Healthcare, Waukesha, WI, USA) [14]. There were 30 patients in the group with atheromas and 31 in the group without atheromatous plaques. Plasma samples were obtained 1 month before and 6 and 12 months after BS, and subcutaneous adipose tissue samples were obtained during BS.

Clinical and biochemical evaluations

Triacylglyceride (TAG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (cLDL), high-density lipoprotein cholesterol (cHDL), glucose and glycated hemoglobin (Hba1c) levels were determined by routine laboratory procedures at the hospital. The Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) was determined [15]. Plasma irisin concentrations were measured by ELISA (Phoenix Europe GmbH, Karlsruhe, Germany) at the Facultat de Biologia.

Single nucleotide polymorphism genotyping

DNA was extracted using the Canvax Extraction kit (Tissue Genomic DNA Purification Kit; Canvax Biotech, S.L., Córdoba, Spain) from subcutaneous adipose tissue samples. The concentration of the extracted DNA was measured using the fluorometer Qubit with two standards (High Sensitivity Qubit Kit; Life Technologies; ThermoFisher Scientifics, Waltham, USA). The single nucleotide polymorphism (SNP) rs3480 was genotyped using the TaqMan 5' exonuclease assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Assays were run in a 384-well plate on QuantStudio 6 and 7 Pro Real-Time PCR Systems, using standard conditions. Genotype data were analyzed using the Design and Analysis 2.5 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism version 8.1. An alpha level of 0.05 was used to determine statistically significant differences. The Shapiro-Wilk test was performed to assess the normal distribution of continuous variables. Variables are reported as the mean \pm standard error of the mean (SEM) or 5-95th percentile. Differences between the groups were evaluated with two-way ANOVA and the Bonferroni post-hoc test. To describe the discrimination accuracy of irisin, the receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used. Differences between genotype frequencies were assessed by the chi-squared test.

RESULTS:

The initial sample included 80 patients with EO. From this cohort, 19 patients were excluded because they were lost to follow-up either through missing data (n = 8), the impossibility to obtain ultrasound images to determine the presence of atheromas (n = 6) or the absence of viable tissue samples (n = 5). Thus, in the final study, 61 patients with data for all the analyzed parameters were included.

General characteristics

Anthropometric and biochemical characteristics of the two studied groups are summarized in Table 1. The BMI values were the same in both groups and decreased significantly after BS. Atheromatous plaques did not remit after BS and the patients without plaques did not develop new ones. TAG, glucose, HOMA-IR, and Hba1c levels also decreased after BS, but were higher in patients with plaques all throughout the study.

TABLE 1. Clinical characteristics of subjects with / without plaque before and after bariatric surgery. Continuous variables are expressed as mean \pm SEM. Statistics for age and sex were computed using the Mann-Whitney test between patients with and without plaque. Statistics for the rest of parameters were computed using two-way ANOVA (group and time of follow-up) and the Bonferroni post-test.

Variables	With plaque			Without plaque			p value
	OB	6M	12M	OB	6M	12M	
N	32	-	-	34	-	-	-
Sex (women / men)	18 / 14	-	-	29 / 5 +++	-	-	0.0139
Age (years)	51.8 \pm 1.8	-	-	43.5 \pm 1.8 ++	-	-	0.0019
Weight (kg)	120.7 \pm 4.0	87.9 \pm 2.7 ⁰⁰⁰	81.5 \pm 2.5 ⁰⁰⁰	119.1 \pm 3.3	86.9 \pm 2.7 ⁰⁰⁰	79.5 \pm 2.9 ⁰⁰⁰	ns / <0.0001 / ns
BMI (kg/m²)	44.0 \pm 1.3	32.0 \pm 0.8 ⁰⁰⁰	29.8 \pm 0.8 ⁰⁰⁰	45.7 \pm 1.0	33.8 \pm 0.9 ⁰⁰⁰	30.2 \pm 0.9 ⁰⁰⁰	ns / <0.0001 / ns
TC (mg/dL)	185.9 \pm 8.0	162.02 \pm 8.1 ^o	180.9 \pm 7.1	177.2 \pm 4.8	152.9 \pm 5.5 ⁰⁰⁰	163.3 \pm 6.9	ns / <0.0001 / ns
cHDL (mg/dL)	51.9 \pm 6.4	49.7 \pm 5.0	53.8 \pm 1.8 ^{oo}	46.8 \pm 1.4	46.0 \pm 1.7	54.7 \pm 2.0 ⁰⁰⁰	ns / <0.0001 / ns
cLDL (mg/dL)	107.9 \pm 6.9	90.3 \pm 6.2	106.8 \pm 6.4	107.4 \pm 4.6	87.9 \pm 4.8 ⁰⁰⁰	94.2 \pm 6.8	ns / 0.0009 / ns
TAG (mg/dL)	164.3 \pm 14.6	118.4 \pm 9.8 ^{oo}	98.9 \pm 10.9 ^{oo}	124.2 \pm 8.0	94.0 \pm 4.8 ⁰⁰⁰	76.6 \pm 4.5 ⁰⁰⁰	0.0082 / <0.0001 / ns
Glucose (mg/dL)	128.3 \pm 7.8	90.1 \pm 3.4 ⁰⁰⁰	99.6 \pm 12.1	99.8 \pm 3.7 ++	82.1 \pm 1.7 ⁰⁰⁰	82.8 \pm 1.7 ⁰⁰⁰	0.0031 / <0.0001 / ns
HOMA-IR	1.96 \pm 0.42 +	0.66 \pm 0.06	0.53 \pm 0.04 ^o	5.17 \pm 0.97	1.22 \pm 0.41 ^o	1.31 \pm 0.43 ^o	0.0003 / 0.0001 / 0.0092
Hba1C (%)	6.61 \pm 0.25	5.57 \pm 0.22 ^{oo}	5.54 \pm 0.15 ⁰⁰⁰	5.70 \pm 0.16 ++	5.16 \pm 0.11 ⁰⁰⁰	5.13 \pm 0.07 ⁰⁰⁰	0.0049 / <0.0001 / ns
Healthy (no HT, DLP and DM2) yes / no (%)	13 / 87	50 / 50 ^{oo}	56 / 44 ⁰⁰⁰	50 / 50 +++	65 / 35	79 / 21 ^o	-
HT. yes / no (%)	78 / 22	43 / 57 ^{oo}	35 / 65 ⁰⁰⁰	38 / 62 +++	29 / 71 +	15 / 85 +++ ^o	-
DLP. yes / no (%)	69 / 31	30 / 70 ⁰⁰⁰	16 / 84 ⁰⁰⁰	28 / 72 +++	12 / 88 +++ ^o	6 / 94 ⁺	-
T2D. yes / no (%)	66 / 34	29 / 71 ⁰⁰⁰	19 / 81 ⁰⁰⁰	19 / 81 +++	6 / 94 +	0 / 100 ⁺	-

Abbreviations: EO, patients with extreme obesity one month before BS; 6M, 6 months; 12M, 12 months; n, number of patients; BMI, body mass index; TC, total cholesterol; cHDL, cholesterol in high density lipoprotein; cLDL, cholesterol in low density lipoprotein; TAG, triacylglycerides; HOMA-IR, Homeostatic model assessment; Hba1C, glycated haemoglobin; HT, blood hypertension; DLP, dyslipidaemia; T2D, type 2 diabetes mellitus. Symbol (°) denotes differences vs EO; Symbol (+) denotes differences vs with plaque; One symbol $p < 0.05$; two symbols $p < 0.01$; three symbols $p < 0.001$; ns, non-significant.

Irisin levels

As shown in Figure 1, irisin levels decreased 6 months after BS and increased again after 12 months in both groups. Interestingly, plasma irisin concentrations were significantly lower in patients with atheromas all throughout the study ($P = 0.0002$). To view the association of irisin levels with the effects of BS on body weight, we determined the correlation of irisin levels with the BMI all throughout the study, finding a positive correlation ($r = 0.226$, $P = 0.0064$). We also found correlations with some biochemical, inflammatory and oxidative stress parameters implicated in atherosclerosis such as leptin ($r = 0.261$, $P = 0.002$), total cholesterol ($r = -0.417$, $P = 0.007$), Hba1c ($r = -0.253$, $P = 0.0057$), thrombomodulin (TM) ($r = -0.202$, $P = 0.0128$) and the carotid intima-media thickness (cIMT) ($r = -0.180$, $P = 0.0250$) levels. Furthermore, to view correlations independently of the response to surgery, we found that irisin levels correlated with Hba1c as well as with glucose ($r = -0.350$, $P = 0.006$) levels in EO. Interestingly, it correlated negatively with the levels of oxidized LDL (oxLDL) ($r = -0.230$, $P = 0.032$), non-esterified fatty acids (NEFA) ($r = -0.312$, $P = 0.018$), plasminogen activator inhibitor 1 (PAI1) ($r = -0.121$, $P = 0.038$) and P-selectin ($r = -0.191$, $P = 0.0216$). For detailed numerical data of these parameters, see our previous publications [16–18].

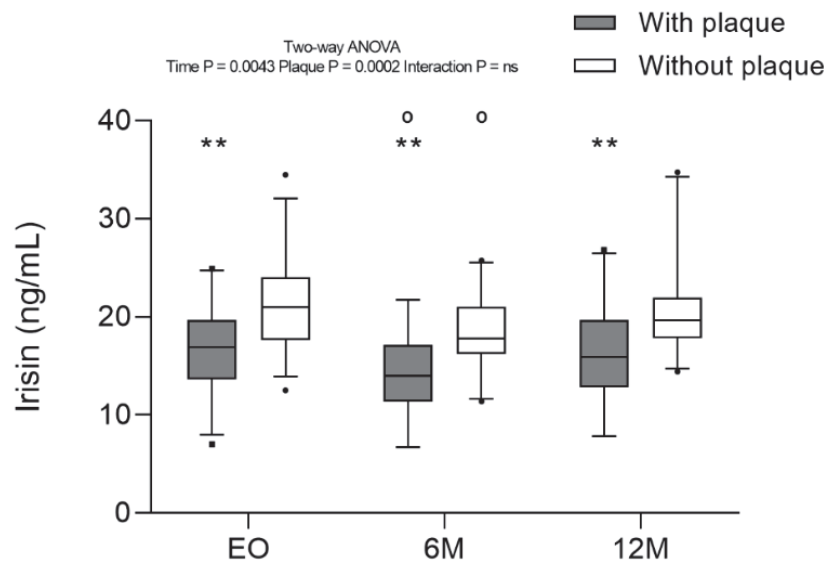


Figure 1. Irisin concentrations in patients with extreme obesity and with/without atheromatous plaques before and after bariatric surgery.

Results are expressed as the mean and the 5-95th percentile is shown. Two-way ANOVA (group and time of follow-up) and the Bonferroni post-hoc test were performed. $n = 61$ patients. Abbreviations: EO, patients with extreme obesity at 1 month before bariatric surgery; 6M, 6 months after surgery; 12M, 12 months after surgery. Statistical differences were considered significant when $P < 0.05$. Symbol (°) denotes differences in the post-test vs EO, same group. Symbol (*) denotes differences in the post-test vs no-plaque group, same time. One symbol, $P < 0.05$; two symbols, $P < 0.01$; ns, non-significant.

To assess the goodness of the prediction, we used ROC curves and the subsequent calculation of the area under the curve (AUC) and its confidence interval. According to our results, the values of irisin in patients without plaques were higher than those found in patients with atheromas in 80.6% of the comparisons (Figure 2).

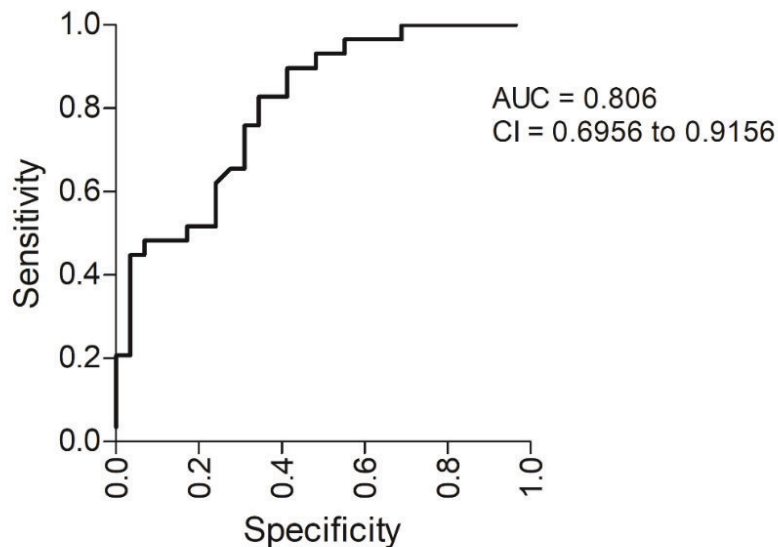


Figure 2. The goodness of prediction of irisin levels. Quantified using a ROC curve and the subsequent calculation of the AUC and its confidence interval. n = 61 patients. ROC, receiver operating characteristic; AUC, area under the curve.

Association between FNDC5 gene polymorphism, irisin levels and atheromatous plaques

The distribution of the genotype frequencies of the *FNDC5* rs3480 polymorphism in the total sample and in the groups of patients with and without plaques are shown in Table 2. The analyzed marker was in the Hardy-Weinberg equilibrium and the allelic frequencies were similar to those found in European populations (G: 0.42 and A: 0.58). The allele and genotype frequencies did not differ statistically between patients with and without plaques ($P = 0.97$ and $P = 0.79$, respectively). When we studied the levels of irisin according to the genotypes, we did not find statistically significant differences, neither in the total sample nor in the groups with and without atheromas (Table 2). Furthermore, the rs3480 genotype did not modulate the irisin concentrations at the different time points assessed after surgery ($P = 0.13$).

TABLE 2. Allele and genotype frequencies of FNDC5 rs3480 (A/G) polymorphism in subjects with and without atheroma. Results are expressed as percentage or proportion. Statistics were computed using the χ^2 test.

Genotype frequency depending on plaque presence			P Value (χ^2)
	With plaque (n = 30)	Without plaque (n = 31)	
AG (%)	36.7	45.2	NS
GG (%)	23.3	19.4	
AA (%)	40.0	35.5	
Allele Frequency A	0.58	0.58	NS
Allele Frequency G	0.42	0.42	
TOTAL Allele frequency			P Value (χ^2)
Allele Frequency A	0.58		NS
Allele Frequency G	0.42		
European Allele Frequency A	0.59		
European Allele Frequency G	0.41		

DISCUSSION

Irisin is a recently described thermogenic adipomyokine mainly related to energy expenditure and the browning of adipose tissue. Low irisin levels have been previously linked to comorbidities associated with obesity, such as T2D, CVD and non-alcoholic fatty liver disease. Despite this, inconsistent results have been found in relation to obesity itself [19–23] and little is known about the irisin levels in subclinical atherosclerosis and their mechanism of modulation.

On that basis, our study first sought to investigate the usefulness of irisin as a biomarker for subclinical atherosclerosis in EO. According to our results, circulating plasma levels of irisin positively correlated with the BMI, which is the most frequently described finding [24]. It has been suggested that adipose tissue may attempt to tackle the deregulated metabolism induced by obesity by oversecreting irisin [16–18], which is in accordance with the observed positive association between the levels of irisin and leptin (an adipokine reflecting dysregulated metabolism) in EO [18,25,26].

When we studied circulating irisin concentrations after surgery, we found that they had significantly decreased 6 months post-BS and recovered one year after the surgery. This is in agreement with other studies reporting a downregulated *FNDC5* expression in muscle after BS [20]. However, it remains to be confirmed whether the decreased circulating irisin levels at 6 months are due to decreasing muscle mass, the surgery itself, or whether the induced weight loss has a direct effect on reducing irisin levels [27]. The recovery of the initial values one year after BS has been described previously [28], which has been suggested to reflect the adaptation of most patients to energy intake and body weight. Longer studies would be necessary to elucidate if irisin levels remain stable long-term after BS.

We analyzed the relationship of irisin levels with subclinical atherosclerosis. To the best of our knowledge, this is the first study to explore the association between EO, BS and subclinical atherosclerosis. Low serum irisin levels have been linked to many adverse conditions such as atherosclerosis [5], although the exact mechanism involving irisin is unclear. According to our results, we found lower irisin levels in patients with atheromas all throughout the study, even after BS.

It is worth mentioning that since it is challenging to detect atheromas in patients with EO, it probably would not be feasible to perform this technique in daily clinical practice. Therefore, to prevent severe acute cardiovascular events, it is important to find markers for subclinical atherosclerosis. In this regard, through ROC curves, we found an AUC indicative of a good overall ability of irisin levels to discriminate between those with and those without plaques with more than 80% of predictive capability. All together, these findings support the initial hypothesis about the anti-atherosclerotic potential of irisin.

Our second aim was to study in our cohort irisin levels in relation to the genetic variability of the *FNDC5* gene and its possible association with the presence of plaques. According to our present results, no significant associations were found with the irisin polymorphism analyzed (rs3480). Previous studies have reported contradictory findings regarding serum irisin levels and the genetic variability of *FNDC5* [29–31]. Although rs3480 is a noncoding polymorphism situated in an intronic region, it is of interest given its association with blood pressure, lipid profiles and myocardial infarction. Additionally, the G allele of the rs3480 polymorphism has been associated with greater *FNDC5* mRNA degradation compared to the A allele [32]. In this regard, new studies on this polymorphism and other variants influencing gene expression are needed. In addition, given the complexity of the studied phenotype, future studies should consider this and other candidate genes as well as their biological interactions.

It is hypothesized that irisin could have had a protective effect against the development of atherosclerosis. As described below, there could be different explanations, including the indirect crosslinks between irisin and obesity comorbidities or the role of irisin in oxidative stress and inflammation [33,34]. Moreover, comorbidities, inflammation and oxidative stress altogether lead to endothelial dysfunction and damage, which also show associations with irisin levels and comprise the first stages of atherosclerosis [34–42].

Both inflammation and oxidative stress play a critical role in endothelial dysfunction and injury, an early marker of atherosclerotic vascular disease [59]. Hence, we suggest that since low irisin levels have been linked to T2D, DLP and inflammation [44,60], they might also be associated with endothelial dysfunction and accelerated atherosclerosis in patients with EO. In this regard, it has been reported that elevated irisin levels prevent endothelial dysfunction and damage [50,61–63]. We previously demonstrated that there was endothelial dysfunction in our population with EO and early atherosclerosis [18]. Here, we report a negative correlation between the levels of irisin and the anti-coagulant TM. We also found a negative correlation with P-selectin before BS. P-selectin is an adhesion molecule that could indicate inflammation in the vascular bed and enhances pro-coagulant activity [56,64].

In concordance with our results indicating lower irisin levels in patients with plaques even after BS, other studies have indicated that lower circulating irisin levels are associated with CVD and an increased risk of vascular atherosclerosis [65]. Importantly, we found that circulating irisin levels negatively correlated with cIMT, a validated measurement for vascular atherosclerosis [66]. Accordingly, several studies have demonstrated that irisin may suppress neointima formation, an endothelial injury in the atherosclerotic vasculature [54,55].

Irisin has been recently linked to different comorbidities associated with EO. Irisin has been reported to upregulate the expression of lipolysis-related genes in adipocytes, contributing to an increased secretion of glycerol and decreased lipid accumulation [43]. *FNDC5* overexpression in muscle has been associated with enhanced lipolysis and reduced hyperlipidemia in obese mice [44]. Furthermore, we found a negative correlation between the levels of irisin and total cholesterol. This reinforces the hypothesis that irisin plays an important role in lipid metabolism. Thus, decreased irisin levels may contribute to hyperlipidemia in EO, a risk factor for CVD [43]. However, the mechanisms underlying the effect of irisin on hyperlipidemia-induced atherosclerosis are still unknown.

Several studies have reported that in patients with prediabetes and T2D, irisin levels are lower than normal [45]. Irisin has been observed to improve insulin resistance and T2D by increasing the sensitization of the insulin receptor in skeletal muscle and the heart. In concordance, we found negative correlations between irisin concentration and the levels of Hba1c and glucose in our cohort.

EO itself is often characterized by increased inflammation and oxidative stress [18,46–49]. Recently, the anti-oxidative and anti-inflammatory properties of irisin have received great interest because these processes are often associated with the initiation, progression and prognosis of atherosclerosis [50–52]. Despite the absence of correlations between the levels of irisin and classical markers of inflammation such as IL6 and TNF α in our cohort, we found a negative correlation with NEFA before BS [18]. It is also worth highlighting the negative correlation between the levels of irisin and PAI-1, which is a described risk factor for thrombosis and atherosclerosis in inflammatory conditions [53–55].

In EO, inflammation is linked to increased oxidative stress (marked by high levels of malondialdehyde and oxLDL) and characterized by impaired antioxidant systems (including the enzymes superoxide dismutase, catalase and paraoxonase 1) [17]. At the beginning of our study, in agreement with other reports demonstrating that irisin reduces the formation of oxLDL [56], irisin concentrations correlated negatively with the levels of oxLDL, which is also a well-established contributor to the formation and progression of atherosclerotic plaques [57]. Moreover, the protective and antioxidative activity of irisin has been demonstrated in vitro [54,58].

The differences in irisin levels between patients with and without atheromas are remarkable results. Despite our reduced number of subjects, the results are consistent. Furthermore, all analyses were performed under the ISO 9001 quality management system.

CONCLUSION

Decreased plasma irisin concentrations are associated with the presence of early atherosclerosis in EO, even after BS. Hence, irisin may have a protective role against atherosclerosis and could be useful in identifying those with atheromas in subjects with EO. Thus, irisin could be used to evaluate pre-clinical atherosclerosis and the risk for CVD in EO.

Despite being described as a functional polymorphism, rs3480 did not correlate with plasma irisin concentrations nor with atheroma formation in our cohort.

The beneficial effects of irisin in preventing plaque formation by reducing comorbidities, inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction indicate that it could be useful as a therapeutic target.

Conflict of interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding: This study was supported by the “Ministerio de Sanidad y Consumo”, Carlos III Institute of Health (ISCIII) [grant numbers PI15/00190 and PI15/00332] and the EU FEDER Programme (European Regional Development Fund: “Una manera de hacer Europa”).

Ethical Approval: All procedures performed in the studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent: Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

REFERENCES:

1. Toth PP. Subclinical atherosclerosis: what it is, what it means and what we can do about it. *Int J Clin Pract.* 2008;62:1246–54.
2. Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI. Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2013;309:71–82.
3. Nguyen NT, Varela JE. Bariatric surgery for obesity and metabolic disorders: state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14:160–9.
4. Hill JO, Wyatt HR, Peters JC. Energy balance and obesity. *Circulation.* 2012;126:126–32.
5. Sanchis-Gomar F, Lippi G, Mayero S, Perez-Quilis C, García-Giménez JL. Irisin: a new potential hormonal target for the treatment of obesity and type 2 diabetes. *J Diabetes. Australia;* 2012;4:196.
6. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature.* 2012;481:463–8.
7. Novelle MG, Contreras C, Romero-Picó A, López M, Diéguez C. Irisin, two years later. *Int J Endocrinol.* 2013;2013:746281.
8. Aronis KN, Moreno M, Polyzos SA, Moreno-Navarrete JM, Ricart W, Delgado E, et al. Circulating irisin levels and coronary heart disease: association with future acute coronary syndrome and major adverse cardiovascular events. *Int J Obes (Lond).*

England; 2015;39:156–61.

9. Cao RY, Zheng H, Redfearn D, Yang J. FNDC5: A novel player in metabolism and metabolic syndrome. *Biochimie*. 2019;158:111–6.

10. Brondani LA, Boelter G, Assmann TS, Leitão CB, Canani LH, Crispim D. Irisin-encoding gene (FNDC5) variant is associated with changes in blood pressure and lipid profile in type 2 diabetic women but not in men. *Metabolism*. United States; 2015;64:952–7.

11. Abdu Allah AM, Hammoudah SA, Abd El Gayed EM, El-Attar LM, Shehab-Eldin WA. Obesity and its Association with Irisin Level Among Individuals with FNDC5/Irisin Gene Variants RS16835198 and RS726344. *Protein Pept Lett*. Netherlands; 2018;25:560–9.

12. Badr EA, Mostafa RG, Awad SM, Marwan H, Abd El-Bary HM, Shehab HE, et al. A pilot study on the relation between irisin single-nucleotide polymorphism and risk of myocardial infarction. *Biochem Biophys reports*. 2020;22:100742.

13. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. United States; 2001;285:2486–97.

14. Sabetai MM, Tegos TJ, Nicolaides AN, Dhanjil S, Pare GJ, Stevens JM. Reproducibility of computer-quantified carotid plaque echogenicity: can we overcome the subjectivity? *Stroke*. United States; 2000;31:2189–96.

15. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. Germany; 1985;28:412–9.

16. Carmona-Maurici J, Cuello E, Miñarro A, Rius F, Bueno M, de la Fuente MC, et al. Impact of bariatric surgery on subclinical atherosclerosis in patients with morbid obesity. *Surg Obes Relat Dis*. :Accepted, ahead of print.

17. Carmona-Maurici J, Cuello E, Ricart-Jané D, Miñarro A, Olsina Kissler JJ, Baena-Fustegueras JA, et al. Effect of bariatric surgery in the evolution of oxidative stress depending on the presence of atheroma in patients with morbid obesity. *Surg Obes Relat Dis*. 2020;

18. Carmona-Maurici J, Cuello E, Ricart-Jané D, Miñarro A, Baena-Fustegueras JA, Peinado-Onsurbe J, et al. Effect of bariatric surgery on inflammation and endothelial dysfunction as processes underlying subclinical atherosclerosis in morbid obesity. *Surg Obes Relat Dis Off J Am Soc Bariatr Surg*. United States; 2020;

19. Jia J, Yu F, Wei W-P, Yang P, Zhang R, Sheng Y, et al. Relationship between circulating irisin levels and overweight/obesity: A meta-analysis. *World J Clin cases*. Baishideng Publishing Group Inc; 2019;7:1444–55.

20. Huh JY, Panagiotou G, Mougios V, Brinkoetter M, Vamvini MT, Schneider BE, et al. FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. *Metabolism*. 2012;61:1725–38.
21. Crujeiras AB, Pardo M, Arturo R-R, Navas-Carretero S, Zulet MA, Martínez JA, et al. Longitudinal variation of circulating irisin after an energy restriction-induced weight loss and following weight regain in obese men and women. *Am J Hum Biol Off J Hum Biol Counc. United States*; 2014;26:198–207.
22. Kurdiova T, Balaz M, Vician M, Maderova D, Vlcek M, Valkovic L, et al. Effects of obesity, diabetes and exercise on Fndc5 gene expression and irisin release in human skeletal muscle and adipose tissue: in vivo and in vitro studies. *J Physiol*. 2014;592:1091–107.
23. Blüher S, Panagiotou G, Petroff D, Markert J, Wagner A, Klemm T, et al. Effects of a 1-year exercise and lifestyle intervention on irisin, adipokines, and inflammatory markers in obese children. *Obesity (Silver Spring). United States*; 2014;22:1701–8.
24. Belviranlı M, Okudan N, Çelik F. Association of Circulating Irisin with Insulin Resistance and Oxidative Stress in Obese Women. *Horm Metab Res = Horm und Stoffwechselforsch = Horm Metab. Germany*; 2016;48:653–7.
25. Roca-Rivada A, Castela C, Senin LL, Landrove MO, Baltar J, Belén Crujeiras A, et al. FNDC5/irisin is not only a myokine but also an adipokine. *PLoS One*. 2013;8:e60563.
26. Chen J, Huang Y, Gusdon AM, Qu S. Irisin: a new molecular marker and target in metabolic disorder. *Lipids Health Dis*. 2015;14:2.
27. Rothwell NJ, Stock MJ. Regulation of energy balance. *Annu Rev Nutr. United States*; 1981;1:235–56.
28. Demirpence M, Yilmaz H, Colak A, Yalcin H, Toprak B, Turkon H, et al. The effect of sleeve gastrectomy on serum irisin levels in patients with morbid obesity. *EndokrynolPol*. 2016;67:481–6.
29. Ebert T, Kralisch S, Wurst U, Scholz M, Stumvoll M, Kovacs P, et al. Association of metabolic parameters and rs726344 in FNDC5 with serum irisin concentrations. *Int J Obes [Internet]*. 2016;40:260–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/ijo2015157>
30. Tanisawa K, Taniguchi H, Sun X, Ito T, Cao Z-B, Sakamoto S, et al. Common single nucleotide polymorphisms in the FNDC5 gene are associated with glucose metabolism but do not affect serum irisin levels in Japanese men with low fitness levels. *Metabolism [Internet]*. 2014;63:574–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049514000183>
31. Onalan Etem E, Dis O, Tektemur A, Korkmaz H, Buran Kavuran I. Common single nucleotide polymorphisms in the FNDC5 gene and serum irisin levels in acute myocardial infarction. *Anatol J Cardiol [Internet]*. 2021;25:528–35. Available from:

<https://anatoljcardiol.com/jvi.aspx?un=AJC-36214&volume=25&issue=8>

32. Brondani LA, Boelter G, Assmann TS, Leitão CB, Canani LH, Crispim D. Irisin-encoding gene (FNDC5) variant is associated with changes in blood pressure and lipid profile in type 2 diabetic women but not in men. *Metabolism* [Internet]. 2015;64:952–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049515001377>
33. Kuloglu T, Aydin S, Eren MN, Yilmaz M, Sahin I, Kalayci M, et al. Irisin: a potentially candidate marker for myocardial infarction. *Peptides*. United States; 2014;55:85–91.
34. Shen S, Gao R, Bei Y, Li J, Zhang H, Zhou Y, et al. Serum Irisin Predicts Mortality Risk in Acute Heart Failure Patients. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. Germany; 2017;42:615–22.
35. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci*. 2011;12:3117–32.
36. Yu Y, Lyons TJ. A lethal tetrad in diabetes: hyperglycemia, dyslipidemia, oxidative stress, and endothelial dysfunction. *AmJMedSci*. 2005;330:227–32.
37. Lteif AA, Han K, Mather KJ. Obesity, insulin resistance, and the metabolic syndrome: determinants of endothelial dysfunction in whites and blacks. *Circulation*. 2005;112:32–8.
38. Vazquez LA, Pazos F, Berrazueta JR, Fernandez-Escalante C, Garcia-Unzueta MT, Freijanes J, et al. Effects of changes in body weight and insulin resistance on inflammation and endothelial function in morbid obesity after bariatric surgery. *JClinEndocrinolMetab*. 2005;90:316–22.
39. Avogaro A, de Kreutzenberg S V. Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. *ClinChimActa*. 2005;360:9–26.
40. Singhal A. Endothelial dysfunction: role in obesity-related disorders and the early origins of CVD. *ProcNutrSoc*. 2005;64:15–22.
41. Mauricio MD, Aldasoro M, Ortega J, Vila JM. Endothelial dysfunction in morbid obesity. *CurrPharmDes*. 2013;19:5718–29.
42. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EHC, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. England; 2009;196:193–222.
43. Deng W. Association of Serum Irisin Concentrations with Presence and Severity of Coronary Artery Disease. *Med Sci Monit. International Scientific Literature, Inc.*; 2016;22:4193–7.
44. Xiong X-Q, Chen D, Sun H-J, Ding L, Wang J-J, Chen Q, et al. FNDC5 overexpression and irisin ameliorate glucose/lipid metabolic derangements and enhance lipolysis in obesity. *Biochim Biophys Acta*. Netherlands; 2015;1852:1867–75.

45. Zhang C, Ding Z, Lv G, Li J, Zhou P, Zhang J. Lower irisin level in patients with type 2 diabetes mellitus: A case-control study and meta-analysis. *J Diabetes. Australia*; 2016;8:56–62.
46. Auer J, Weber T, Berent R, Lassnig E, Maurer E, Lamm G, et al. Obesity, body fat and coronary atherosclerosis. *IntJCardiol*. 2005;98:227–35.
47. Metelko Z, Pavlic I R, Babic Z. Diabetes mellitus and atherosclerosis. *Diabetol Croat*. 2000;29:9–18.
48. Chen K, Lindsey JB, Khera A, de Lemos JA, Ayers CR, Goyal A, et al. Independent associations between metabolic syndrome, diabetes mellitus and atherosclerosis: observations from the Dallas Heart Study⁸. *DiabVascDisRes*. 2008;5:96–101.
49. Bradshaw PT, Monda KL, Stevens J. Metabolic syndrome in healthy obese, overweight, and normal weight individuals: the Atherosclerosis Risk in Communities Study¹¹. *Obes*. 2013;21:203–9.
50. Askari H, Fatima S, Poorebrahim M, Haghi-Aminjan H, Raeis-Abdollahi E, Abdollahi M. A glance at the therapeutic potential of irisin against diseases involving inflammation, oxidative stress, and apoptosis: An introductory review. *Pharmacol Res*. 2018;129:44–55.
51. Mazur-Bialy AI, Bilski J, Pochec E, Brzozowski T. New insight into the direct anti-inflammatory activity of a myokine irisin against proinflammatory activation of adipocytes. Implication for exercise in obesity. *J Physiol Pharmacol an Off J Polish Physiol Soc. Poland*; 2017;68:243–51.
52. Dong J, Dong Y, Dong Y, Chen F, Mitch WE, Zhang L. Inhibition of myostatin in mice improves insulin sensitivity via irisin-mediated cross talk between muscle and adipose tissues. *Int J Obes (Lond)*. 2016;40:434–42.
53. Sillen M, Declerck PJ. Targeting PAI-1 in Cardiovascular Disease: Structural Insights Into PAI-1 Functionality and Inhibition . *Front. Cardiovasc. Med.* . 2020. p. 364.
54. Zhang Y, Mu Q, Zhou Z, Song H, Zhang Y, Wu F, et al. Protective Effect of Irisin on Atherosclerosis via Suppressing Oxidized Low Density Lipoprotein Induced Vascular Inflammation and Endothelial Dysfunction. *PLoS One. Public Library of Science*; 2016;11:e0158038–e0158038.
55. Lu J, Xiang G, Liu M, Mei W, Xiang L, Dong J. Irisin protects against endothelial injury and ameliorates atherosclerosis in apolipoprotein E-Null diabetic mice. *Atherosclerosis. Ireland*; 2015;243:438–48.
56. Woollard KJ, Chin-Dusting J. Therapeutic targeting of p-selectin in atherosclerosis. *Inflamm Allergy Drug Targets. United Arab Emirates*; 2007;6:69–74.
57. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Prim*. 2019;5:56.

58. Mazur-Bialy AI, Kozłowska K, Pocheć E, Bilski J, Brzozowski T. Myokine irisin-induced protection against oxidative stress in vitro. Involvement of heme oxygenase-1 and antioxidant enzymes superoxide dismutase-2 and glutathione peroxidase. *J Physiol Pharmacol an Off J Polish Physiol Soc. Poland*; 2018;69:117–25.
59. Subodh V, R. BM, J. AT. Endothelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease. *Circulation. American Heart Association*; 2003;108:2054–9.
60. Anandakumar P, Debela T. A Review on the Role of Irisin in Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus. *J Pharmacopuncture. 2017*;20:235–42.
61. Zhu D, Wang H, Zhang J, Zhang X, Xin C, Zhang F, et al. Irisin improves endothelial function in type 2 diabetes through reducing oxidative/nitrative stresses. *J Mol Cell Cardiol. England*; 2015;87:138–47.
62. Hou N, Han F, Sun X. The relationship between circulating irisin levels and endothelial function in lean and obese subjects. *Clin Endocrinol (Oxf). England*; 2015;83:339–43.
63. Askin L, Uzel K, Tanrıverdi O, Turkmen S. Serum Irisin: Pathogenesis and Clinical Research in Cardiovascular Diseases. *Cardiovasc Innov Appl. 2020*;4.
64. André P, Hartwell D, Hrachovinová I, Saffaripour S, Wagner DD. Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc Natl Acad Sci U S A. 2000*;97:13835–40.
65. Hisamatsu T, Miura K, Arima H, Fujiyoshi A, Kadota A, Kadowaki S, et al. Relationship of serum irisin levels to prevalence and progression of coronary artery calcification: A prospective, population-based study. *Int J Cardiol. Elsevier*; 2018;267:177–82.
66. Bots ML. Carotid intima-media thickness as a surrogate marker for cardiovascular disease in intervention studies. *Curr Med Res Opin. 2006*;22:2181–90.

5. RESUM DE RESULTATS

A continuació es presenta un compendi dels resultats obtinguts a les publicacions presentades amb dades addicionals que no consten a cap article. Els resultats fan referència a una població de 66 individus amb obesitat severa que van ser sotmesos a BS a l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida. La cohort es va dividir en dos grups d'estudi segons la presència (n = 32) o absència (n = 34) de placa d'ateroma.

Tot i que inicialment es reclutaren 80 participants, 14 van quedar finalment exclosos. D'aquests, 1 abandonà l'estudi per embaràs; a 5 persones no se'ls va poder injectar l'agent de contrast ecogràfic necessari per a la mesura dels vv; i els 8 individus restants no es van poder assignar a un grup per dificultats tècniques en la determinació de la presència o l'absència basal de placa.

Es va fer un seguiment mèdic de la població de 66 persones i es van obtenir 3 mostres de plasma a diferents temps: un mes abans de l'operació (OB), als 6 mesos (6M), i 12 mesos (12M) després. A més, durant la cirurgia es van extreure mostres d'AT subcutani.

D'altra banda, per complementar diferents aspectes de l'estudi, vam disposar de mostres i dades addicionals cedides pels col·laboradors del projecte:

- La Unitat de Detecció i Tractament de Malalties Cardiovasculars de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova va aportar dades de cIMT i VV d'un grup d'individus control (incloses a l'article 1).

- El cribratge de paràmetres implicats en l'estrès oxidatiu (explicat més endavant, secció 4.3.1) es va dur a terme en paral·lel al reclutament de la cohort d'estudi. És per aquest motiu que aquesta anàlisi preliminar es va realitzar amb mostres d'altres individus amb obesitat severa cedides per l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova. Per a aquest mateix assaig, el Dr. Josep Julve va aportar les mostres del grup control sa (afiliació: Centro de Investigación Biomédica en Red (Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas) (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain; Institut de Recerca i d'Investigació Biomèdica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB-Sant Pau, Barcelona, Espanya.).

- A més, els col·laboradors de BiosferTeslab SL (Reus) proporcionaren dades de glicoproteïnes d'un grup control coincident en sexe i edat amb la cohort (característiques a l'article 4).

A fi d'identificar molècules amb valor predictiu, diagnòstic, o que proporcionin informació sobre la gènesi i la formació de la placa, vam analitzar paràmetres potencialment implicats en els processos patològics de l'obesitat i l'ateroesclerosi.

En primer lloc es presenten aquells paràmetres corresponents a les característiques de la població d'estudi, i que poden estar relacionats amb factors de risc cardiovascular. Seguidament s'exposen els paràmetres relacionats amb la disfunció endotelial, una de les primeres etapes del procés ateromatós. En tercer lloc es recolliran com a factors moleculars de l'ateroesclerosi aquells paràmetres que podrien ampliar el coneixement sobre el desenvolupament de l'ateroesclerosi subclínica en l'obesitat i les comorbiditats associades. S'analitzaran molècules implicades en l'estrès oxidatiu i la inflamació, processos associats indirectament a la formació i al desenvolupament de la placa.

En general, els resultats obtinguts mostraren alterada la funció endotelial, així com els perfils oxidatiu i inflamatori dels individus amb obesitat severa. En conjunt, aquests perfils van millorar després de la BS, igual que els factors de risc cardiovascular tradicionals. Convé ressaltar que es van detectar diferències en l'evolució d'alguns paràmetres entre les persones que tenien placa ateromatosa i les que no.

5. 1 Obesitat severa i característiques de la població d'estudi

Les característiques de la població consten a totes les publicacions perquè són dades bàsiques que ofereixen informació d'interès clínic sobre l'estat general dels participants a l'estudi.

Els factors de risc ateroescleròtic poden ser nombrosos i tractar-se tant de condicions biològiques com d'estil de vida, essent sempre condicionants de la salut. Algunes de les característiques com ara el **sexe**, l'edat, o el BMI poden ser factors de risc ateroescleròtic. En aquest sentit, la cohort estudiada estava formada majoritàriament per dones; tanmateix, la proporció de sexes fou diferent entre grups: al grup de persones amb placa hi havia més homes que al grup sense ($P = 0.0139$). L'**edat** mitjana també resultà més alta en els individus amb placa en comparació amb aquells sense ($P = 0.0019$).

Els resultats obtinguts constaten tant la pèrdua de **pes** com la reducció del **BMI** 6 i 12 mesos després de la BS en els dos grups estudiats ($P < 0.0001$ en les dues mesures). Tanmateix, el percentatge de pèrdua d'excés de pes (**%EWL**) és la variable més utilitzada per conèixer el grau d'èxit d'aquest procediment quirúrgic. El %EWL es calcula com:

$$[(\text{pes inicial} - \text{pes actual}) / (\text{pes inicial} - \text{pes ideal})] \times 100 \quad (273)$$

On el pes ideal és:

$$(\text{alçada} - 100) - [(\text{alçada} - 150) / 2 \text{ (dones)} \text{ o } 4 \text{ (homes)}] \quad (273)$$

El pes s'expressa en Kg i l'alçada en cm. La Taula 6 mostra els valors de %EWL obtinguts.

Taula 6: Percentatge d'excés de pes perdut 6 i 12 mesos després de la BS. Dades presentades com a mitjana \pm SD. ANOVA de dos factors i post-test de Bonferroni. El símbol “**” indica diferències en el post-test als 12 mesos vs els 6 mesos, entre el mateix grup. Tres símbols, $p < 0.0001$.

	Amb placa			Sense placa			P valor
	OB	6M	12M	OB	6M	12M	Placa / Temps / Interacció
N	32			34			-
%EWL	0	60.5 \pm 13.6	69.5 \pm 15.9 ***	0	58.0 \pm 14.5	69.8 \pm 16.9 ***	ns/<0.0001/ns

Abreviatures: %EWL, percentatge de pèrdua d'excés de pes

A partir d'aquestes dades, l'escala BAROS (*Bariatric Analysis and Reporting Outcome System*) adaptada al tractament endoscòpic (273), indica que amb un %EWL entre 50-74%, l'efectivitat de la BS és bona.

A més, alguns autors consideren que al %EWL s'hi ha de sumar la circumstància que el BMI sigui, en qualsevol cas, menor a 35 kg/m² (273), condició que també s'assolí a la cohort d'estudi (BMI a l'any de 30.2 kg/m² als individus sense placa i 29.8 kg/m² als individus amb placa).

En referència al **consum de tabac**, no es van trobar diferències entre grups: en el grup amb placa, 6 eren fumadors, 15 no, i 11 ex-fumadors; dels participants sense ateroma, 8 fumaven, 13 no i els altres 13 eren ex-fumadors.

Malgrat l'efectivitat del tractament quirúrgic, els ateromes no van remetre en cap cas als 12M.

Feta la caracterització de la població d'estudi i vistos els canvis que la BS hi indueix, el següent pas va ser analitzar la prevalença de les comorbiditats.

5.1.1 Comorbiditats

Tal com s'ha explicat amb anterioritat, l'obesitat sovint va acompanyada d'altres factors de risc com l'HT, la T2DM i la DLP. A la població estudiada, la prevalença d'aquestes comorbiditats va disminuir en tots dos grups després de la BS. No obstant, la incidència era més alta al grup d'individus amb placa durant tot el període estudiat.

En concret, l'**HT** és la comorbiditat que més patien les persones amb obesitat severa (en total un 57% dels participants), en especial aquelles amb placa ateromatosa ($P < 0.001$ vs el grup sense placa abans de la BS). Tot i que la prevalença va baixar, l'HT fou també la més persistent després de la cirurgia. Al grup amb placa es va reduir un 56% vs el 71 i 77% de la DLP i la T2DM, respectivament. Al grup sense placa l'HT va remetre en un 61% de les persones mentre que la DLP ho va fer en un 78% i la T2DM en un 100%.

En relació amb la **T2DM**, es van analitzar els nivells de **glucosa**, que baixaven després de la cirurgia ($P < 0.0001$) i eren més alts als individus amb placa d'ateroma en general ($P = 0.0031$), sobre tot abans de la BS ($P < 0.01$). En el cas de l'**HbA1c**, el resultat va ser similar ($P < 0.0001$ pel factor temps i $P = 0.0049$ pel factor presència de placa). El **HOMA-IR** (avaluació del model homeostàtic per la resistència a la insulina), que es fa servir per a la determinació de la resistència a la insulina, també era més alt en les persones amb ateroma durant tot el període estudiat ($P = 0.0049$) i va disminuir en ambdós grups després de l'operació ($P < 0.0001$). Un dels resultats més importants pel que fa a aquesta comorbiditat, és que als 12M va remetre en tots els individus sense placa.

Cal mencionar que a l'inici de l'estudi tots els individus amb T2DM rebien tractament amb insulina o antidiabètics orals segons les indicacions de l'equip mèdic. Després de la cirurgia, va ser precís modificar el tractament: els 21 individus recuperats ja no requerien medicació. Dels 6 que encara tenien T2DM un any després de la BS, 3 van passar de rebre insulina abans de la BS, a antidiabètics orals; 1 va mantenir el tractament amb insulina; i 2 van continuar prenent fàrmacs antidiabètics orals, igual que al principi.

Sobre la **DLP**, es va estudiar mitjançant el perfil lipídic de les anàlisis clíniques convencionals. Pel que fa al **colesterol**, tant el total com el cLDL van canviar amb la BS ($P < 0.0001$ i $P = 0.0009$, respectivament); tots dos disminuïren 6 mesos després de la cirurgia i van pujar de nou als 12M. Sorprenentment, no es van trobar diferències entre els grups amb ateroma i sense per aquests dos paràmetres. En canvi, el colesterol **HDL** augmentà significativament un any després de la intervenció ($P < 0.0001$), essent també igual entre el grup amb placa i aquell sense. Al contrari, els nivells de **TAG** eren més alts a les persones amb placa durant tot el període estudiat ($P = 0.0082$) i van decreixer als 12M ($P < 0.0001$).

La prevalença de la DLP fou més alta en els individus amb ateroma durant tot el període estudiat ($P < 0.001$ en OB; $P < 0.01$ als 6M; i $P < 0.05$ als 12M). Tot i això, el número de persones amb aquesta comorbiditat va decreixer 12M després de la BS en tots dos grups ($P < 0.01$ al grup sense placa i $P < 0.001$ al grup amb placa).

Com que l'ateroesclerosi acostuma a cursar de manera subclínica i té una etiologia multifactorial, un cop vistes les diferències en les comorbiditats entre els dos grups, es va procedir a valorar la funció endotelial, possiblement una de les primeres afectacions de la patologia.

5.2 Anàlisi de la funció endotelial

Per a la mesura de la funció endotelial es va avaluar la presència de placa d'ateroma i un conjunt de paràmetres que podrien estar implicats en l'ateroesclerosi subclínica.

Per començar es van determinar canvis morfològics en la paret arterial com ara el cIMT, l'augment del qual és subjacent als esdeveniments cardiovasculars; i la densitat dels VV. També s'analitzaren possibles marcadors d'ateroesclerosi subclínica com el PAI-1, inhibidor de la fibrinòlisi; i l'AIP (índex aterogènic del plasma). Les dades obtingudes referents al dany vascular, es troben al següent article:

1. Carmona-Maurici et al., 2020. *Impact of bariatric surgery on subclinical atherosclerosis in patients with morbid obesity*, **Surgery for Obesity and Related Diseases**, 2020 Oct;16(10):1419-1428. doi: 10.1016/j.soard.2020.05.035.

Cal destacar que la densitat de **VV** dels individus amb obesitat severa fou significativament més alta que la del grup control ($P < 0.0001$). No obstant, es normalitzà 12 mesos després de la BS tant en el grup de participants amb placa com en aquells sense ($P < 0.0001$). En canvi, les persones amb placa ateromatosa presentaven un major **cIMT** que els controls i que els individus sense placa ($P < 0.0001$), els quals presentaven el mateix gruix que el grup control al llarg de tot l'estudi. La concentració de **PAI-1** també va resultar més alta en els participants amb ateroma durant tot el període de seguiment ($P < 0.0001$), però tot i així va decreixer després de la cirurgia en ambdós grups ($P < 0.0001$). D'acord amb aquests resultats, l'**AIP** va baixar als 12M en els dos grups ($P < 0.0001$) i, a més, només els individus sense placa assoliren valors que indiquen baix risc cardiovascular ($AIP < 0.23$).

A més d'analitzar el dany endotelial o disfunció mecànica, es van voler determinar molècules potencialment implicades en processos patogènics que poden modificar la integritat de l'endoteli i contribuir a les fases inicials de l'ateroesclerosi. Les dades obtingudes es mostren a la publicació 2:

2. Carmona-Maurici et al., 2020. *Effect of bariatric surgery on inflammation and endothelial dysfunction as processes underlying subclinical atherosclerosis in morbid obesity*, **Surgery of Obesity and Related Diseases**; Dec;16(12):1961-1970. doi: 10.1016/j.soard.2020.07.036.

En referència a l'angiogènesi i la remodelació vascular, la concentració d'**Ang-1**, que és crítica per la maduració, la permeabilitat i la supervivència dels vasos, va baixar després de la BS ($P = 0.0272$). No es van observar diferències en els nivells plasmàtics de **BDNF**, factor amb la funció d'estimular l'angiogènesi i mantenir la integritat vascular, entre d'altres. L'**Ang-2**, en canvi promou el remodelat de vasos immadurs i la mort cel·lular, i va restar igual entre temps i grups d'estudi.

En relació a les molècules implicades en el to vascular, l'**ET1**, un potent vasoconstrictor, va resultar igual entre els dos grups d'estudi i va decreixer després de la BS ($P = 0.0004$). La **TM**, que inhibeix la coagulació, era més alta en els individus amb placa al llarg de tot el període de seguiment ($P < 0.0001$), i va disminuir als 12 mesos de la BS ($P < 0.0001$).

La concentració de les molècules que participen en l'adhesió i la migració transendotelial dels leucòcits, com són les molècules d'adhesió i les selectines, va baixar significativament després de la BS en tots dos grups ($P = 0.0003$ en el cas de la **P-sel**; $P < 0.0001$ pel que fa a l'**E-sel**; $P = 0.0011$ per la **ICAM**; i $P < 0.0001$ en relació a la **VCAM**). Convé ressaltar que la P-sel va resultar més alta en el grup amb ateroma durant tot el període estudiat ($P = 0.0480$).

Un cop valorat l'estat de l'endoteli vascular, es va abordar l'estudi de paràmetres moleculars que podrien estar alterant-ne la funció.

5.3 Anàlisi molecular de l'ateroesclerosi

Aquesta secció resumeix els resultats de l'anàlisi a nivell molecular dels fenòmens biològics que poden participar en l'ateroesclerosi. L'anàlisi àmplia de nous paràmetres és important perquè podria establir biomarcadors identificables en sang i amb capacitat de predicció i detecció, aplicable a persones amb obesitat severa.

5.3.1 Estrès oxidatiu

Com s'ha descrit a la introducció, en els últims anys s'han establert associacions entre l'OS i les malalties cardiovasculars. Al present treball es planteja la possibilitat que l'OS sigui un esdeveniment precoç en el desenvolupament de la disfunció endotelial i de la subseqüent afecció cardiovascular. Així doncs, s'analitzaren diversos paràmetres plasmàtics relacionats amb l'OS en els individus amb obesitat severa agrupats en funció de la presència de placa.

Aquestes variables no es van quantificar directament, com a punt de partida es va fer un cribatge per seleccionar aquelles proteïnes que es mesurarien de manera quantitativa. Aquesta tria es va fer amb mostres de plasma d'una altra població de persones amb obesitat severa recollides a dos temps: basals i 12M després de la BS, cedides pels col·laboradors de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida. Aquestes dades prèvies no estan publicades, de manera que el protocol seguit s'explica a continuació.

L'assaig de cribatge es va dur a terme amb el "Human cell stress array kit" (d'R&D Systems, Minneapolis, Estats Units), que permet la determinació qualitativa de 36 proteïnes relacionades amb l'estrès cel·lular. Es va seguir el procediment indicat pel fabricant, basat en l'ús de membranes de nitrocel·lulosa que contenen diferents anticossos de captura immobilitzats per duplicat. Les membranes es van incubar amb el plasma (200µL en aquest cas) i, posteriorment, amb un còctel d'anticossos de detecció biotinilats. La quimioluminescència es detectà mitjançant l'analitzador d'imatges LAS3000 (Fujifilm, Tòquio, Japó). Amb el *software* "Multi Gauge V3.0" (també Fujifilm) es va mesurar el senyal de cada taca en UA. Les membranes inclouen 6 taques

d'un control positiu estàndard que serveix per normalitzar els resultats i referir-los en %. A la Figura 18 es mostra un exemple dels resultats obtinguts.



Figura 18: Imatge representativa d'una membrana d'estrès cel·lular amb mostra de plasma humà. Temps d'exposició 4 minuts. La cantonada de baix a la dreta és el control negatiu, les altres tres cantonades són els controls positius.

Per determinar quins paràmetres d'estrès podrien estar relacionats amb l'obesitat severa i el risc cardiovascular (en aquest cas associat a les comorbiditats T2DM, DLP i HT) es van utilitzar 5 membranes, cadascuna incubada amb un pool de 3 plasmes de cadascun dels següents grups de la població de cribratge:

1. Controls sans
2. Sense comorbiditats, OB (menor risc cardiovascular)
3. Amb comorbiditats, OB (major risc cardiovascular)
4. Sense comorbiditats, 12M (menor risc cardiovascular)
5. Amb comorbiditats, 12M (major risc cardiovascular)

Els resultats obtinguts queden recollits a l'Annex 1. Amb la finalitat de triar les proteïnes a quantificar, es van establir els següents criteris (sempre considerant la mitjana de senyal dels controls positius com el 100%):

1. Nivells de la molècula en plasma relativament alts: senyals superiors al 30%.
2. Si en algun grup una proteïna presenta valor zero i en qualsevol altre s'obtenen valors més grans d'1.5% per la mateixa.
3. Diferències en el nivell del paràmetre superiors al 50% entre qualsevol dels grups d'assaig.

Com a resultat del cribratge, les proteïnes que complien com a mínim dos criteris són: Citocrom c, Fosfo-HSP27 (*Heat Shock Proteins*), HSP60, HSP70, Fosfo-quinasa c-Jun N-terminal (JNK) Pan, inhibidor de la quinasa dependent de ciclina 1 (p21/CIP1), PON1, PON2, PON3, Tioredoxina i SOD2.

Un cop acabat el cribratge es va procedir a quantificar (mitjançant ELISA) la PON1, PON3 i la SOD2 en la nostra població d'estudi. Vam començar per aquests paràmetres perquè donada la seva funció antioxidant podrien informar de l'estat oxidatiu dels individus amb obesitat i ateroma. En el cas de la PON3, no es va detectar senyal al plasma (ELISA de Finetest, Wuhan, China), els resultats obtinguts per a la resta de paràmetres es recullen al següent article:

3. Carmona-Maurici et al., 2020. *Effect of bariatric surgery in the evolution of oxidative stress depending on the presence of atheroma in patients with morbid obesity*, **Surgery of Obesity and Related Diseases**; 2020 Sep;16(9):1258-1265. doi: 10.1016/j.soard.2020.04.040.

Els resultats obtinguts fan referència als paràmetres antioxidants CAT, SOD2 i PON1. En tots tres casos no es van observar diferències entre el grup amb placa i el grup sense abans de la cirurgia. Tanmateix, després de la BS l'activitat **CAT** i els nivells de **PON1** van augmentar ($P < 0.001$ en els dos casos), sobre tot en els individus sense ateroma. Tant és així, que després de la BS sí que hi havia diferències significatives entre els grups amb placa i sense: els individus amb placa mantenien nivells o activitat més baixos als 12M ($P = 0.0003$ per la CAT; i $P = 0.0147$ en la PON1). Al contrari, la **SOD2** va disminuir després de la BS ($P < 0.001$) i de la mateixa manera en tots dos grups.

A més, es van considerar dos marcadors d'OS: l'**MDA**, que es defineix com un producte final de la peroxidació lipídica; i les partícules oxLDL que, com s'ha mencionat, a més tenen un paper important en l'inici i la progressió de l'ateroesclerosi. La concentració d'ambdós paràmetres va disminuir un any després de la cirurgia ($P < 0.001$). Cal subratllar que els nivells d'**oxLDL** van resultar significativament més alts en aquelles persones amb placa ($P = 0.0430$), sobretot als 12M.

5.3.2 Inflamació

Per altra banda, es van mesurar molècules implicades en la inflamació, ja que els processos inflamatoris es troben presents de manera freqüent en l'obesitat severa i s'associen també al desenvolupament de les comorbiditats i l'ateroesclerosi. De nou, es van estudiar tant les diferències entre el grup amb ateroma i el grup sense com l'evolució dels participants després de la BS.

Per determinar quins paràmetres inflamatoris seria més interessant analitzar, es va seguir la mateixa estratègia de cribratge que per a les molècules implicades en l'OS. Aquest cop, però, es va dur a terme el cribratge amb membranes que inclouen 105 citoquines i factors de creixement (Proteome profiler Human XL cytokine Array kit, R&D Systems, Minneapolis, Estats Units). En aquest cas ja es disposava de mostres a 6 mesos, pel que es van fer servir mostres de plasma d'individus de la pròpia cohort d'estudi, en concret un *pool* de 4 plasmes de cadascun dels següents grups:

1. Individus amb placa ateromatosa, OB.
2. Individus sense placa ateromatosa, OB.
3. Individus amb placa ateromatosa, 6M.
4. Individus sense placa ateromatosa, 6M.

A l'Annex 2 es recullen els resultats complets i a l'Annex 3 una publicació en format pòster que es va presentar a l' "European Congress on Obesity, 2018" (274).

Les citoquines que complien al menys dos dels criteris següents van ser considerades per mesurar-les quantitativament (el percentatge es calcula assumint el senyal dels controls positius com a 100%):

1. Nivells de proteïna superiors al 30%.
2. Variacions entre qualsevol dels grups de més d'un 30%.
3. Rol descrit en inflamació o funció endotelial (recollits a l'Annex 3).

Així, els paràmetres triats van ser: adiponectina, Ang-1, Ang-2, BDNF, CRP, FGF21, ICAM, interleuquines (IL) IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-15, leptina, lipocalina-2, PAI-1, TNF- α i VCAM.

Les IL 1 β , 5, 10 i 15 no es van poder quantificar mitjançant ELISA (Elabscience, Houston, Estats Units) a causa dels baixos nivells en plasma. És per això que es varen mesurar també altres paràmetres relacionats que podien complementar aquests resultats, recollits a l'article 2, citat amb anterioritat.

Entre els resultats de la quantificació dels paràmetres implicats en el procés inflamatori, cal destacar els de les molècules proinflamatòries **leptina**, **IL-6**, **TNF α** , **PAI1**, **CRP**, **NEFA** i **Lp(a)**, que disminuïren significativament en els dos grups un any després de la cirurgia ($P < 0.0001$ en tots els casos excepte: NEFA, $P = 0.0008$; i Lp(a), $P = 0.0146$). En canvi, en el cas de **PAI1** i **CRP** hi havia diferències entre grups d'estudi, essent els nivells més alts en el grup de persones amb placa al llarg del període estudiat ($P = 0.0239$ en el cas de la CRP, els resultats de PAI-1 es resumeixen a la secció 4.2, es recorden aquí breument perquè també està implicat en la inflamació).

En referència als paràmetres antiinflamatoris, en canvi, es va poder observar que la concentració d'**adiponectina** augmentà amb la cirurgia i la subseqüent pèrdua de pes ($P < 0.0001$). Convé ressaltar que els nivells van incrementar més tard en el grup amb placa. En contraposició, la concentració d'**FGF-21**, va disminuir després de l'operació ($P < 0.0001$) i no es van observar diferències entre individus amb placa i sense.

Les citokines proinflamatòries indueixen la glicosilació de proteïnes, que consisteix en la unió d'un o diversos monosacàrids. Durant la glicosilació no només pot variar la concentració de glicoproteïnes, sinó que també es pot modificar l'estructura del glicà, augmentant les ramificacions i els residus dels monosacàrids que el conformen. Així, les **glicoproteïnes** poden influir en diferents processos biològics, incloent la inflamació, i podrien estar implicades en l'obesitat o l'ateroesclerosi. Els resultats de la caracterització de les proteïnes glicosilades en la nostra cohort es mostren a l'article 4 (preparat per enviar):

4. Carmona-Maurici et al., *Subclinical atherosclerosis and severe obesity: role of GlycA and B in inflammation and bariatric surgery effect.*

Les variables GlycA, B i F, i la ratio H/W de GlycA i B conformen el perfil de glicoproteïnes i van resultar ser més altes als individus amb obesitat severa que als normo-pes (dades d'aquest grup cedides per BiosferTeslab) ($P < 0.0001$). En concordança amb la majoria de paràmetres inflamatoris mesurats,

el perfil de glicoproteïnes millorà i, en general, fins i tot es va normalitzar després de la BS ($P < 0.0001$ per tots els paràmetres mencionats excepte per GlycF, on $P = 0.0003$). Els resultats van ser els mateixos independentment de la presència de placa.

Un cop valorats l'OS i la inflamació i donat el vincle entre aquests dos processos, es varen determinar relacions rellevants entre alguns dels paràmetres que podrien afectar la funció de l'endoteli vascular. Les que no consten als articles es recullen a la Taula 7.

Taula 7: Correlacions entre paràmetres estudiats. Test de Pearson incloent tots els individus i tot el període de seguiment. Un símbol, $p < 0.05$; dos símbols, $p < 0.01$; tres símbols, $p < 0.001$.

		BMI	Inflamació						
			PAI-1	CRP	IL6	TNF α	NEFA	Leptina	Adiponectina
BMI		-	0,386 ***	0,396 ***	0,461 ***	0,454 ***	0,235 **	0,780 ***	-0,419 ***
OS	PON1	-0,363 ***	-0,327 ***	-0,218 **	-0,316 ***	-0,018	-0,237 **	-0,167 *	0,179 *
	SOD2	0,199 *	0,201 *	0,163	0,179 *	0,117	0,160	0,138	-0,109
	CAT	-0,352 ***	-0,304 ***	-0,251 **	-0,302 ***	-0,185 *	-0,079	-0,273 **	0,250 **
	MDA	0,362 ***	0,363 ***	0,019	0,074	0,213 *	0,236 **	0,353 ***	-0,340 ***
	oxLDL	0,446 ***	0,437 ***	0,402 ***	0,206 *	0,257 **	-0,119	0,493 ***	-0,235 **
Dany vascular	vv	0,325 ***	0,267 **	0,079	0,100	0,321 ***	-0,045	0,184 *	-0,311 ***

Abreviatures: BMI, índex de massa corporal; CAT, catalasa; CRP, proteïna C reactiva; IL6, interleuquina 6; MDA, malondialdehid; NEFA, àcids grassos no esterificats; oxLDL, lipoproteïnes de baixa densitat oxidades; PAI-1, inhibidor de l'activador del plasminogen 1; PON1, paraoxonasa 1; SOD2, superòxid dismutasa 2; TNF α , factor de necrosi tumoral α ; vv, vasa vasorum.

El següent pas va ser mesurar paràmetres que complementessin aquests resultats per afinar la detecció del risc cardiovascular.

5.3.3 miRNA

Els nivells de miRNA circulants poden participar en el desenvolupament o regressió tant de l'obesitat com de l'ateroesclerosi i a més podrien servir com a paràmetres predictius. A l'Article 5 es poden veure els resultats obtinguts en l'anàlisi del perfil de miRNA de la població d'estudi:

5. Carmona-Maurici et al., *MicroRNA signature in human with subclinical atherosclerosis and severe obesity, effect of bariatric surgery.* Pendent de publicar.

La primera fase de l'estudi va consistir en dur a terme un cribratge inicial: es van mesurar 188 miRNA de plasma humà en un subgrup de 24 mostres repartides en 8 grups segons la presència de placa, les comorbiditats i el temps de mostreig (basal i 12M), de manera que es van fer pools de 3 mostres de cada grup. Dels 188 miRNA humans mesurats, es va detectar la presència de 182 miRNA plasmàtics, i 79 van mostrar diferències significatives com a mínim entre 2 dels grups.

La segona part de l'assaig consistia en validar els resultats obtinguts al cribratge, per fer-ho es van analitzar totes les mostres de la cohort. Tenint en compte els canvis en l'expressió, la funció i les dianes de cada miRNA se'n van triar 24 per validar. D'entre els 24, cinc van resultar estar expressats de manera diferencial abans i després de la BS: el **miR-375** va augmentar ($P = 0.0024$), mentre que els **miR-145**, **miR-20a-3p**, **miR-144-5p** i **miR-21-3p** van disminuir als 12M ($P = 0.0366$; $P = 0.0017$ i $P < 0.0001$ pels dos darrers, respectivament). Cal destacar que es van trobar 3 miRNA expressats significativament diferent entre els individus amb placa i aquells sense: el **miR-21** i el **miR-133a-3p** estaven sobre expressats en el grup amb ateroma ($P = 0.0099$ i $P = 0.0007$, respectivament); i al contrari, el **miR-126** fou superior en les persones sense placa ($P = 0.0058$). En concret, el miR-133a-3p va mostrar una bona capacitat de predicció determinada per la corba ROC (*Receiver Operating Characteristic*) ($AUC = 0.8981$; AUC, àrea sota la corba).

5.3.4 Irisina

Els resultats relacionats amb la irisina es poden trobar a l'article 6:

6. Carmona-Maurici et al. *Irisin as a marker of subclinical atherosclerosis in severe obesity: Association between irisin plasma levels, FNDC5 genetic variability and atheroma presence.* Enviat, pendent de revisió pels editors.

En resum, es va detectar una correlació positiva entre la irisina i el BMI a la cohort d'estudi ($r = 0.23$, $p = 0.0064$). Cal destacar que els nivells d'irisina eren significativament més baixos als individus amb placa durant tot el període estudiat ($P = 0.0002$). A més, la corba ROC indicà que la irisina té una bona capacitat de predicció per la presència de placa ($AUC = 0.806$). Per altra banda, es va avaluar el polimorfisme rs3480, que no va resultar estar relacionat ni amb la concentració final d'irisina ni amb la presència de placa.

5.3.5 Perfil lipoproteic

Les lipoproteïnes sovint s'associen a un increment del risc cardiovascular i la seva anàlisi exhaustiva podria resultar útil per al diagnòstic precoç d'aquestes malalties.

En aquest cas, es va analitzar el perfil de lipoproteïnes per $^1\text{HNMR}^{(275)}$. En primer lloc, es va comparar la població amb obesitat severa abans de la BS amb un grup control. Els resultats es recullen a la Taula 8, on es pot observar que, en general, els nivells de lipoproteïnes mostraves diferències significatives entre els participants amb obesitat severa i el grup control normo-pes (mateixa edat i proporció de sexes).

Seguidament vàrem avaluar l'evolució del perfil de lipoproteïnes amb la BS i en funció de la presència de placa. Les dades del nombre de partícules de cada subtipus per mides es recullen a la Taula 9.

També en referència a l'efecte de la BS i a la presència d'ateroma, la Figura 19 mostra els valors obtinguts pel que fa al contingut de TAG i la Figura 20 el contingut en colesterol de les diferents lipoproteïnes.

Pel que fa al nombre de partícules de **VLDL**, abans de la BS era més alt a les persones amb obesitat que al grup control ($P < 0.0001$). No obstant, el nombre d'aquestes partícules es va normalitzar com a resultat de la BS ($P = 0.0087$), independentment de si els individus tenien placa o no. Aquesta disminució del nombre total sobretot es deu a les VLDL petites. El contingut en TAG i colesterol de les VLDL (Figures 19 i 20) era superior al grup d'individus amb obesitat severa i es normalitzà després de la BS, independentment de la presència de placa ($P = 0.0093$; $P = 0.0033$, respectivament).

El nombre de partícules d'LDL també era superior al grup amb obesitat severa, sobretot el de les persones amb placa ($P = 0.0127$), tot i que va disminuir després de la cirurgia ($P = 0.0195$). És interessant observar que, al principi de l'estudi, els individus amb ateroma tenien un nombre de partícules LDL petites (i més aterogèniques) més elevat que aquells sense ($P = 0.0058$), i que el grup control ($P < 0.001$). La BS va comportar la normalització d'aquests valors ($P = 0.0007$).

Finalment, tant el nombre de partícules **HDL** com el seu contingut en colesterol i TAG va resultar més alt al grup control que al grup d'individus amb obesitat severa ($P < 0.0001$ en tots els casos). Després de la BS, aquests paràmetres van millorar tant en les persones amb placa com en aquelles sense ($P < 0.0001$), assolint valors iguals que els del grup control.

Taula 8: Perfil de lipoproteïnes mitjançant 1HNMR del grup control i dels individus amb obesitat severa. Els valors es presenten com la mitjana \pm SD. L'estadística es va dur a terme mitjançant la prova t-Student.

PARÀMETRES		Control (n=40)	OB (n=37)	p-valor
Total-C (mg/dL)		179.2 \pm 15.8	190.0 \pm 30.3	Ns
Total-TAG (mg/dL)		78.80 \pm 21.82	95.74 \pm 29.6	0.0033
VLDL	VLDL-C (mg/dL)	10.38 \pm 5.47	14.77 \pm 6.25	0.0007
	VLDL-TAG (mg/dL)	44.42 \pm 17.20	63.80 \pm 24.78	<0.0001
	Nombre VLDL-P (nmol/L)	33.26 \pm 13.24	47.08 \pm 19.12	< 0.0001
	VLDL-P grans (nmol/L)	0.98 \pm 0.42	1.29 \pm 0.43	0.0011
	VLDL-P mitjanes (nmol/L)	2.96 \pm 1.61	4.72 \pm 1.52	< 0.0001
	VLDL-P petites (nmol/L)	29.32 \pm 11.70	41.06 \pm 17.39	0.0002
	ratio VLDL-C/VLDL-P total	0.30 \pm 0.06	0.31 \pm 0.04	Ns
	Diàmetre de partícula VLDL (Z, nm)	41.93 \pm 0.40	42.10 \pm 0.23	Ns
LDL	LDL-C (mg/dL)	106.70 \pm 14.08	120.90 \pm 24.81	0.0092
	LDL-TAG (mg/dL)	10.80 \pm 2.73	12.94 \pm 3.75	0.0084
	Nombre LDL-P (nmol/L)	1081.6 \pm 130.90	1217 \pm 249.40	0.0127
	LDL-P grans (nmol/L)	154.90 \pm 21.45	180.80 \pm 30.58	<0.0001
	LDL-P mitjanes (nmol/L)	265.30 \pm 77.75	315.81 \pm 113.5	0.0672
	LDL-P petites (nmol/L)	661.32 \pm 71.44	720.23 \pm 136.4	0.0752
	ratio LDL-C/LDL-P total	0.10 \pm 0.003	0.31 \pm 0.04	<0.0001
	Diàmetre de partícula LDL (Z, nm)	20.85 \pm 0.26	20.97 \pm 0.29	0.0262
HDL	HDL-C (mg/dL)	55.02 \pm 10.84	45.62 \pm 5.56	<0.0001
	HDL-TAG (mg/dL)	15.17 \pm 3.53	9.65 \pm 3.37	<0.0001
	Ratio HDL-TG/HDL-C	0.28 \pm 0.09	0.22 \pm 0.08	0.0002
	Nombre HDL-P (μ mol/L)	28.42 \pm 4.58	22.37 \pm 2.91	<0.0001
	HDL-P grans (μ mol/L)	0.23 \pm 0.02	0.26 \pm 0.03	<0.0001
	HDL-P mitjanes (μ mol/L)	9.31 \pm 1.46	8.71 \pm 0.90	Ns
	HDL-P petites (μ mol/L)	18.88 \pm 3.52	13.39 \pm 3.11	<0.0001
	Ratio HDL-C/HDL-P	1.93 \pm 0.12	2.04 \pm 0.10	<0.0001
	Diàmetre de partícula HDL (Z, nm)	8.25 \pm 0.06	8.38 \pm 0.13	<0.0001
Altres paràmetres lipídics	No-HDL-C (mg/dL)	124.1 \pm 16.9	144.4 \pm 124.1	0.0006
	Ratio Total-P/HDL-P	41.41 \pm 8.79	57.17 \pm 12.31	<0.0001
	Ratio LDL-P/HDL-P	39.19 \pm 8.44	55.03 \pm 12.01	<0.0001
	AC = (Non-HDL-C)/HDL-C	2.37 \pm 0.67	3.19 \pm 0.64	<0.0001
	AIP = log(TAG/HDL-C)	0.15 \pm 0.16	0.31 \pm 0.15	<0.0001
	CRI-I = (TC/HDL-C)	3.37 \pm 0.67	4.19 \pm 0.63	<0.0001
	CRI-II = (LDL-C/HDL-C)	2.02 \pm 0.50	2.67 \pm 0.53	<0.0001

Abreviatures: SE: obesitat severa; TAG: triacilglicèrids; C: colesterol; VLDL: lipoproteïnes de molt baixa densitat; LDL: lipoproteïnes de baixa densitat; HDL: lipoproteïnes d'alta densitat; P: partícules; ¹HNMR: ressonància magnètica nuclear de protó; ns: no significatiu; AC, Coeficient aterogènic {(No-HDL-C)/HDL-C}; AIP, Índex aterogènic del plasma {(logTG)/HDL-C}; CRI-I i CRI-II; Índex de risc de Castelli 1 i 2, (TC/HDL-C i LDL-C/HDL-C). Les comparacions estadístiques es consideren significatives quan $P < 0.05$.

Taula 9: Perfil de lipoproteïnes mitjançant 1HNMNR en els grups amb i sense placa, abans i després de la cirurgia bariàtrica. Els valors es presenten com la mitjana \pm SD. L'estadística es va dur a terme mitjançant la prova de mesures repetides ANOVA de dos factors (amb/sense placa i temps de seguiment), i el post-test Bonferroni de múltiples comparacions.

PARAMETRES	Control (n=40)	Amb placa		Sense placa		ANOVA (p value)	
		OB (n=7)	12M (n=7)	OB (n=17)	12M (n=17)	placa	temps
VLDL	Nombre VLDL-P (nmol/L)	47.0 \pm 12.5 ^c	34.9 \pm 6.7	50.6 \pm 22.5 ^{ccc}	33.3 \pm 9.0 ^{oo}	ns	0.0087
	VLDL-P grans (nmol/L)	1.3 \pm 0.3	1.2 \pm 0.3	1.4 \pm 0.5 ^{cc}	0.97 \pm 0.30 ^o	ns	0.0426
	VLDL-P mitjanes (nmol/L)	4.7 \pm 0.8 ^c	3.4 \pm 0.7	4.9 \pm 1.6 ^{ccc}	3.4 \pm 1.3 ^{oo}	ns	0.0018
	VLDL-P petites (nmol/L)	41.0 \pm 11.7	30.4 \pm 6.9	44.3 \pm 20.6 ^{ccc}	29.0 \pm 7.9 ^o	ns	0.0108
	Ratio VLDL-C/VLDL-P total	0.31 \pm 0.03	0.29 \pm 0.02	0.31 \pm 0.04	0.29 \pm 0.05	ns	0.0283
LDL	Diàmetre de partícula VLDL (Z, nm)	42.1 \pm 0.3	42.2 \pm 0.3	42.1 \pm 0.2	42.1 \pm 0.3	ns	ns
	Nombre LDL-P (nmol/L)	1365.2 \pm 318.5 ^{ccc}	1121.6 \pm 114.9 ^o	1131.3 \pm 127.2 ^{**}	1103.2 \pm 206.2	ns	0.0195
	LDL-P grans (nmol/L)	189.9 \pm 29.6	178.5 \pm 22.8	174.3 \pm 25.5	184.1 \pm 34.3	ns	ns
	LDL-P mitjanes (nmol/L)	366.0 \pm 147.0 ^c	278.2 \pm 76.4	280.7 \pm 78.4	296.9 \pm 114.6	ns	ns
	LDL-P petites (nmol/L)	809.3 \pm 160.4 ^{ccc}	664.9 \pm 38.5 ^{oo}	676.4 \pm 68.9 ^{**}	622.2 \pm 70.6	0.0058	0.0007
	Ratio LDL-C/LDL-P total	0.099 \pm 0.003	0.103 \pm 0.003	0.099 \pm 0.004	0.103 \pm 0.003 ^{oo}	ns	0.0006
	Diàmetre de partícula LDL (Z, nm)	20.91 \pm 0.24	21.02 \pm 0.27	20.97 \pm 0.31	21.17 \pm 0.24 ^o	ns	0.0441
HDL	Ratio HDL-TG/HDL-C	0.20 \pm 0.05 ^c	0.20 \pm 0.05 ^c	0.23 \pm 0.10	0.21 \pm 0.07	ns	ns
	Nombre HDL-P (μ mol/L)	22.7 \pm 1.9 ^{cc}	27.4 \pm 3.9 ^{oo}	22.1 \pm 2.8 ^{ccc}	27.2 \pm 3.1 ^{ooo}	ns	<0.0001
	HDL-P grans (μ mol/L)	0.27 \pm 0.03 ^{cc}	0.26 \pm 0.03 ^c	0.26 \pm 0.02 ^{cc}	0.28 \pm 0.04 ^{ccc}	ns	ns
	HDL-P mitjanes (μ mol/L)	8.1 \pm 0.6	9.8 \pm 1.0 ^{oo}	8.9 \pm 0.9	11.0 \pm 1.1 ^{ooo*}	0.0057	<0.0001
	HDL-P petites (μ mol/L)	14.3 \pm 2.1 ^{cc}	17.4 \pm 3.3 ^o	13.0 \pm 2.9 ^{ccc}	15.9 \pm 2.9 ^{ooo cc}	ns	<0.0001
Index	Ratio HDL-C/HDL-P	2.0 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1	2.0 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1 ^{oo}	ns	0.0029
	Diàmetre de partícula HDL (Z, nm)	8.3 \pm 0.1	8.3 \pm 0.1	8.4 \pm 0.1	8.4 \pm 0.1	ns	ns
	Total-C	179.16 \pm 15.8	204.5 \pm 35.8 ^{cc}	181.61 \pm 17.4 [*]	189.7 \pm 24.9	ns	ns
Total-TAG	78.80 \pm 21.8	96.60 \pm 20.0 ^c	77.46 \pm 10.34	78.32 \pm 18.6 ^o	ns	0.0154	

Abreviatures: OB: basal, un mes abans de la cirurgia; 12M: 12 mesos; TAG: triacilglicèrids; C: colesterol; VLDL: lipoproteïnes de molt baixa densitat; LDL: lipoproteïnes de baixa densitat; HDL: lipoproteïnes d'alta densitat; P: partícula; 1HNMNR: ressonància magnètica nuclear de protó; ns: no significatiu; AC, coeficient aterogènic {(No-HDL-C)/HDL-C}; AIP, índex aterogènic del plasma {(logTG)/HDL-C}; CRI-I i CRI-II, índex de risc de Castelli 1 i 2 (TC/HDL-C i LDL-C/HDL-C). Les comparacions estadístiques es consideren significatives quan $P < 0.05$. El símbol (*) indica diferències vs el grup amb placa; el símbol (°) indica diferències vs OB; i el símbol (c) indica diferències vs control. Un símbol p < 0.05; dos símbols p < 0.01; tres símbols p < 0.001.

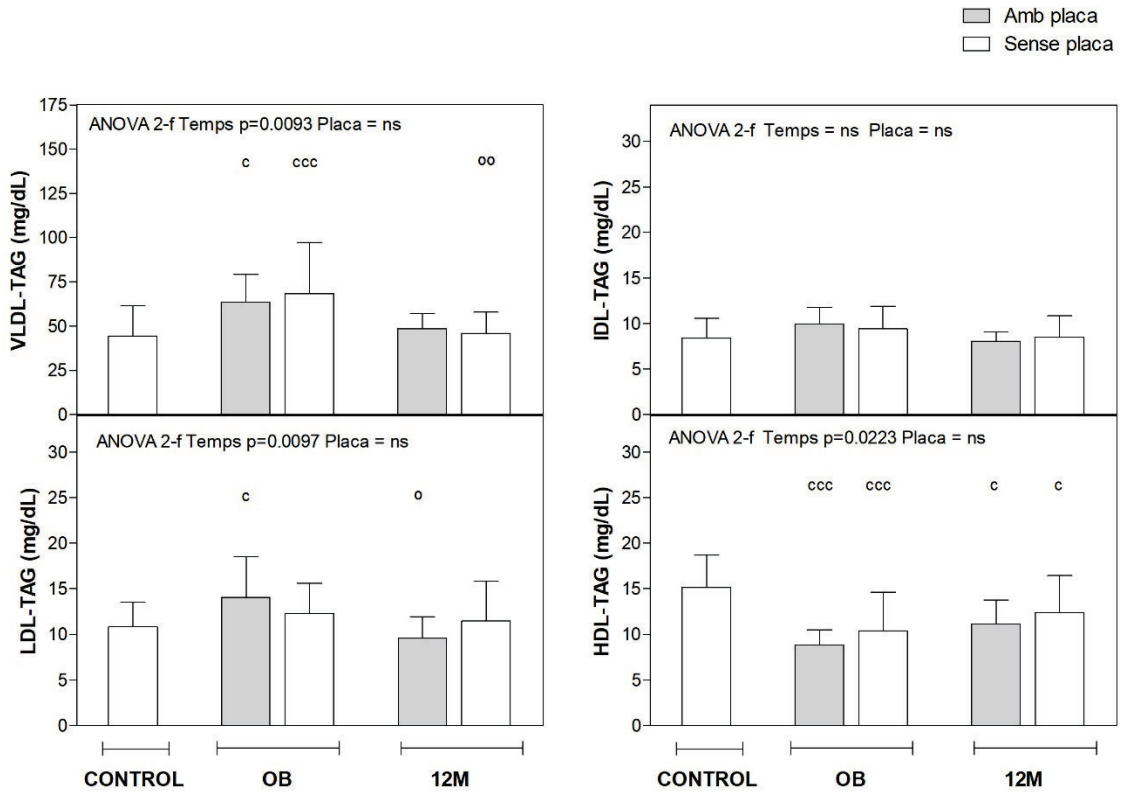


Figura 19: Contingut de TAG a les diferents lipoproteïnes al llarg del temps segons la presència de placa. Els resultats es mostren com la mitjana \pm SD. S'han fet els càlculs mitjançant ANOVA de dos factors (amb/sense placa i temps de seguiment) i el post-test de Bonferroni. **A:** contingut de TAG en les VLDL. **B:** contingut de TAG en les IDL. **C:** contingut de TAG en les LDL **D:** contingut de TAG en les HDL. Abreviatures: OB, abans de la BS; 12M, 12 mesos després de la BS; TAG, triacilglicèrids; VLDL, lipoproteïnes de molt baixa densitat; IDL, lipoproteïnes de densitat intermèdia; LDL, lipoproteïnes de baixa densitat; HDL, lipoproteïnes d'alta densitat; ns: no significatiu. El símbol (*) representa diferències vs OB. El símbol (c) representa diferències vs el grup control. Un símbol p < 0.05; dos símbols p < 0.01; tres símbols p < 0.001.

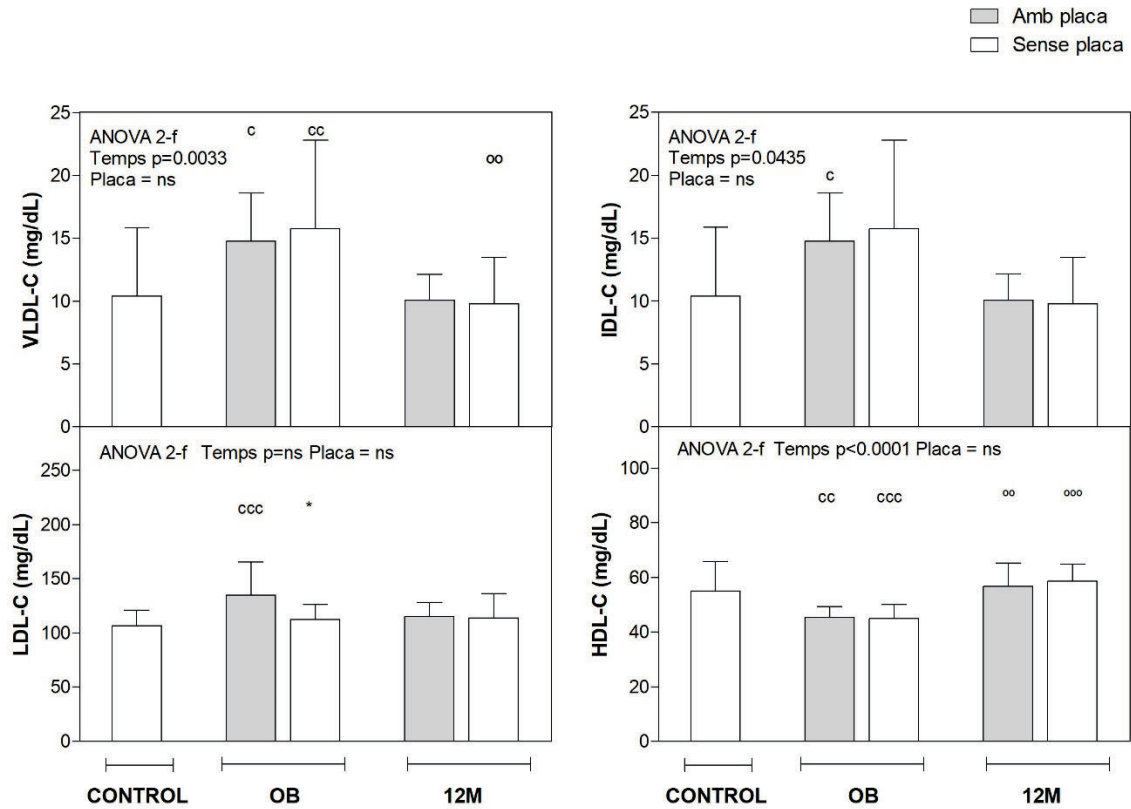


Figura 20: Contingut de colesterol a les diferents lipoproteïnes al llarg del temps segons la presència de placa. Els resultats es mostren com la mitjana \pm SD. S'han fet els càlculs mitjançant ANOVA de dos factors (amb/sense placa i temps de seguiment) i el post-test de Bonferroni. A: contingut de colesterol en les VLDL. B: contingut de colesterol en les ILDL. C: contingut de colesterol en les LDL D: contingut de colesterol en les HDL. Abreviatures: OB, abans de la BS; 12M, 12 mesos després de la BS; C, colesterol; VLDL, lipoproteïnes de molt baixa densitat; IDL, lipoproteïnes de densitat intermèdia; LDL, lipoproteïnes de baixa densitat; HDL, lipoproteïnes d'alta densitat; ns: no significatiu. El símbol (°) representa diferències vs OB. El símbol (*) indica diferències vs el grup amb placa. El símbol (c) representa diferències vs el grup control. Un símbol p 0.05; dos símbols p < 0.01; tres símbols p < 0.001

5.4 Biomarcadors i models predictius per la presència de placa

De l'anàlisi dels processos potencialment implicats en el desenvolupament de la placa, en van sorgir 26 paràmetres significativament diferents entre grups (Taula 10).

Taula 10: Resum de les variables estudiades diferencials entre persones amb obesitat severa, amb placa i sense. P-valor de l'ANOVA de dos factors.

Variables	p valor (presència de placa)	Variables	p valor (presència de placa)
Edat	0.0019	PAI-1	<0.0001
Sexe	0.0139	CRP	0.0239
Diàmetre del coll	0.0078	oxLDL	0.043
HT	0.0013	PON-1	0.0147
HR	0.0426	CAT	0.0003
DLP	0.0011	TM	<0.0001
T2DM	0.0001	P-SEL	0.0480
Glucosa	0.0031	miR-21-3p	0.0099
HOMA-IR	0.0003	miR-133a-3p	0.0007
Hba1C	0.0049	miR-126-3p	0.0058
AIP	0.0183	Irisina	0.0002
TAG	0.0082	LDL-p petites	0.0058
cIMT	<0.0001	HDL-p mitjanes	0.0057

Abreviatures: HT, hipertensió arterial; HR, freqüència cardíaca; DLP, dislipèmia; T2DM, diabetis mellitus tipus 2; HOMA-IR, avaluació del model homeostàtic per la resistència a la insulina; Hba1c, hemoglobina glicada; AIP, índex aterogènic del plasma; TAG, triacilglicèrids; cIMT, gruix íntima-mitjana carotídi; PAI-1, activador de l'inhibidor del plasminogen 1; CRP, proteïna C reactiva; oxLDL, lipoproteïnes de baixa densitat oxidades; PON-1, paraoxonasa 1; CAT, catalasa; TM, trombomodulina; P-sel, p-selectina; miR, micro àcid ribonucleic d'interferència.

A continuació es presenten dos models predictius realitzats a partir de les dades dels 66 participants a l'estudi i incloent els paràmetres amb diferències basals. És a dir, els models avaluen la capacitat de predicció per la presència de placa en persones amb obesitat severa abans de la BS. El primer model inclou totes les variables mesurades, també els factors de risc utilitzats actualment en la pràctica clínica. El segon analitza únicament la capacitat de predicció dels paràmetres bioquímics estudiats.

Tot el procediment es va dur a terme mitjançant el Software R (versió 3.5.0. R, Viena, Àustria). Breument, primer es va realitzar l'estadística descriptiva de totes les variables basals segons els grups "presència" o "absència" de placa. Per a les variables quantitatives, es va fer la comparació entre grups proporcionant el p-valor per a contrastar la hipòtesi nul·la d'igualtat entre els grups. Per les variables categòriques es van utilitzar els p-valors de la prova χ -quadrat i el test exacte de Fisher per a la comparació de les proporcions entre grups.

5.4.1 Model predictiu amb totes les variables estudiades

D'entre les variables que van resultar significatives es va aplicar el mètode *False Discovery Rate* (FDR), que calcula els p-valor ajustats per comparacions múltiples i té en compte la proporció de falsos positius⁽²⁷⁶⁾. Els p-valors ajustats de les variables edat, HT, DLP, glucosa, T2DM, HOMA-IR i TM van resultar menors a 0.05 i, per tant, aquestes es van incloure al model inicial.

Aquest primer model es va sotmetre al mètode LASSO (*least absolute shrinkage and selection operator*), que fa una selecció de variables a partir d'un anàlisi de regressió⁽²⁷⁷⁾. Posteriorment es va fer un ajust de paràmetres per *leave-one-out cross validation* (LOOCV). La Taula 11 mostra les estimacions dels coeficients i la significació de les variables incloses al model.

Taula 11: Taula resum del model amb tots els paràmetres mesurats, incloent els factors de risc més utilitzats en clínica (referència sense placa).

Variables	Point estimation	CI 95% baix	CI 95% alt	p-valor
Intercept	-18.0538	-52.8856	-2.9838	0.1107
DLP.No	-4.3512	-12.7265	-0.5217	0.1077
Glucèmia	0.0913	-0.0200	0.2889	0.2132
T2DM.No	-1.5889	-8.3561	6.1587	0.6556
HOMA-IR	0.1796	-0.3663	0.8018	0.5156
TM	1.9710	0.5325	4.7095	0.0396

Abreviatures: CI, interval de confiança; DLP, dislipèmia; T2DM, diabetis mellitus tipus 2; HOMA-IR, de l'anglès, *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*; No., sense la comorbiditat; TM, trombomodulina.

Els *Odds ratio* per als paràmetres inclosos al model queden recollits a la Taula 12.

Taula 12: Odds ratio del model amb tots els paràmetres mesurats (referència sense placa)

Variables	Odds ratio	CI 95% baix	CI 95% alt
DLP.No	0.0129	0.0000	0.5935
Glucèmia	1.0956	0.9802	1.3349
T2DM.No	0.2041	0.0002	4.8251
HOMA-IR	1.1968	0.6933	2.2296
TM	7.1780	1.7031	11.9927

Abreviatures: CI, interval de confiança; DLP, dislipèmia; T2DM, diabetis meillitus tipus 2; HOMA-IR, de l'anglès, *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*; No., sense comorbiditat; TM, trombomodulina.

La bondat de la predicció del model es quantificà a través del càlcul de la corba ROC, proporcionant el càlcul de l'AUC i el seu interval de confiança (Figura 21).

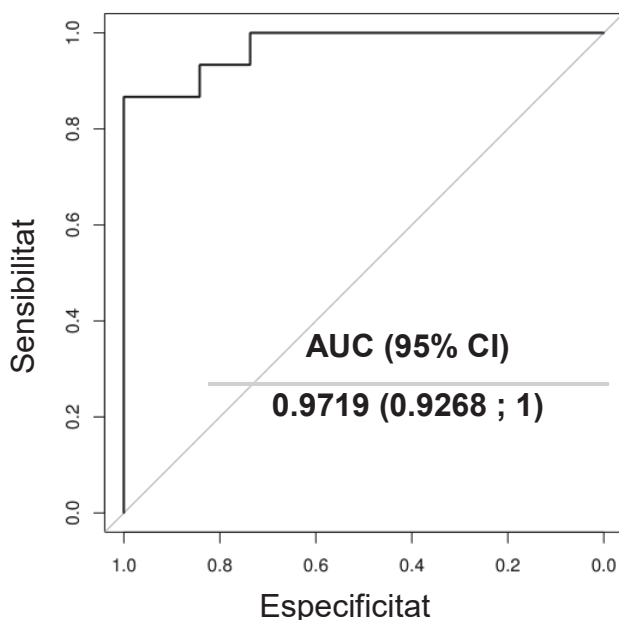


Figura 21: Corba ROC del model predictiu amb tots els paràmetres mesurats.

5.4.2 Model predictiu amb els nous biomarcadors

Per avaluar la capacitat predictiva dels paràmetres que hem descrit com a potencials biomarcadors, vam fer un segon model predictiu sense incloure els factors de risc clàssics. Igual que en el cas anterior, es van calcular els p-valor ajustats per comparacions múltiples pel mètode FDR⁽²⁷⁶⁾ dels biomarcadors proposats. Les variables amb p-valors ajustats menors a 0.05 es van incloure al model inicial, van resultar ser: TM, irisina i miR-133a-3p.

De nou, aquest model es va sotmetre a una selecció de variables pel mètode LASSO⁽²⁷⁷⁾, amb ajust de paràmetres per LOOCV. Les variables seleccionades es mostren a la Taula 13, que conté també les estimacions dels coeficients i la significació.

Taula 13: Taula resum del model amb nous marcadors (Referència sense placa).

Variables	Point estimation	CI 95% baix	CI 95% alt	p-valor
(Intercept)	-3.5593	-10.1221	2.1066	0.2376
TM	1.3184	0.5960	2.2850	0.0016
Irisina	-0.3173	-0.5748	-0.1311	0.0040
miR-133a-3p	0.0316	0.0076	0.0605	0.0160

Abreviatures: CI, interval de confiança; miR, microRNA; TM, trombomodulina.

Els *Odds ratio* per a cada variable inclosa al model queden recollits a la Taula 14.

Taula 14: Odds ratio del model amb nous marcadors (referència sense placa)

Variables	Odds ratio	CI 95% baix	CI 95% alt
TM	3.7375	1.8148	9.8255
Irisina	0.7281	0.5628	0.8772
miR-133a-3p	1.0321	1.0077	1.0624

Abreviatures: CI, interval de confiança; miR, microRNA; TM, trombomodulina.

La bondat de la predicció d'aquest segon model es quantificà també a través del càlcul de la corba ROC, proporcionant el càlcul de l'AUC i el seu interval de confiança (Figura 22).

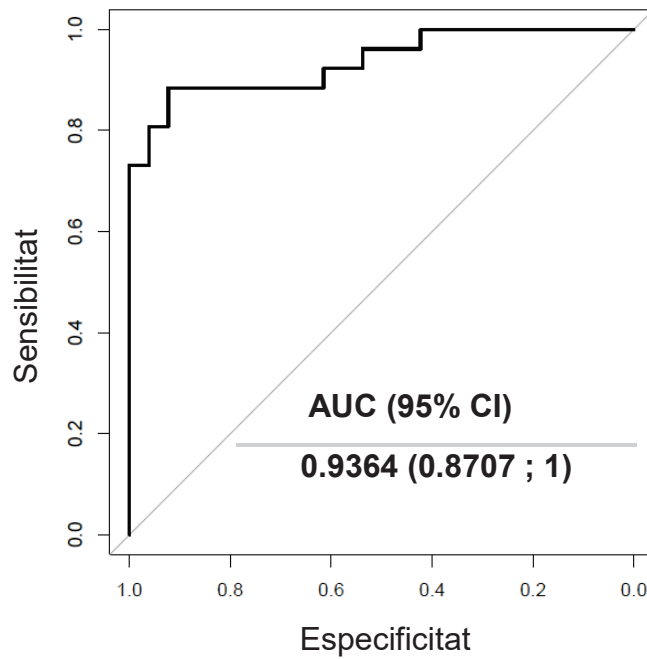


Figura 22: Corba ROC del model predictiu amb nous marcadors.

6. DISCUSSIÓ

És ben sabut que les persones amb obesitat severa i comorbiditats tenen un alt risc cardiovascular. No obstant, l'avaluació del risc de patir esdeveniments aguts de les persones amb obesitat severa és poc acurada. Això és degut a que els factors que es fan servir en clínica per detectar aquest risc són limitats en certes cohorts i representen només el 50% dels factors de risc de malalties arterioescleròtiques⁽²⁷⁸⁾. A més, per diagnosticar l'ateroesclerosi subclínica mitjançant l'exploració ecogràfica de les artèries calen instruments validats i professionals sanitaris amb formació específica en aquestes tècniques diagnòstiques, condicions que no es donen en tots els hospitals. A aquest fet se suma la dificultat (o en molts casos, impossibilitat) de detectar la presència d'ateromes per ultrasons en individus amb obesitat severa a causa de l'acumulació de greix al voltant de la caròtida i del coll.

A més a més, els mecanismes concrets que relacionen l'obesitat severa amb l'ateroesclerosi encara no es coneixen del tot. És per aquests motius que sovint, en les persones amb obesitat severa, l'ateroesclerosi no es diagnostica a temps i el tractament s'inicia després d'un episodi clínic, el que representa un abordatge terapèutic tardà⁽²⁷⁹⁾. Per tant, sobre tot en persones amb obesitat severa, l'estudi de la fase preclínica és crucial per prevenir esdeveniments cardiovasculars greus.

Per aclarir la complexa relació entre l'obesitat severa i l'ateroesclerosi, i trobar biomarcadors de la presència de placa, hem analitzat una població formada per 66 persones amb obesitat severa i, el més important, dividides segons la presència o absència de placa. Se sap que la BS és el tractament més efectiu per tractar l'obesitat severa i les comorbiditats associades, per tant, tenir un seguiment de la cohort d'un any després de la BS afegeix valor a aquest estudi.

En aquesta població, primer hem analitzat la inflamació i l'OS com a processos comuns entre l'obesitat i l'ateroesclerosi, pel que en el transcurs de la discussió s'anirà comentant el seu paper al llarg del procés ateromatós.

A continuació hem mesurat un ampli ventall de paràmetres antropomètrics, fisiològics i moleculars implicats en les diferents etapes de l'ateroesclerosi: des del desenvolupament de la lesió mecànica, passant per la disfunció endotelial i l'acumulació lipídica a l'íntima, fins al trencament de l'ateroma. És important recalcar que també hem valorat l'efecte de la BS en cadascun d'aquests processos.

Finalment, per poder detectar l'ateroesclerosi abans d'un esdeveniment clínic agut, d'entre aquest panell de variables analitzades hem cercat potencials biomarcadors de la presència de placa i del risc cardiovascular i hem establert un model predictiu.

6.1 L'obesitat severa com a factor de risc ateroescleròtic

L'obesitat augmenta el risc ateroescleròtic i a més desencadena altres factors de risc com l'HT, la DLP o la T2DM. El BMI elevat és dels factors de risc cardiovascular més estudiats⁽¹²⁷⁾.

6.1.1 L'obesitat s'acompanya de comorbiditats i la BS n'atenua el risc cardiovascular associat

En general, les persones amb obesitat severa no solen ser metabòlicament sanes. Tal i com mostren els resultats obtinguts, els individus amb obesitat severa tenen alterats factors com ara la pressió sanguínia, els TAG, el colesterol, la glucosa i el HOMA-IR. Aquestes condicions, en conjunt o per si soles, poden donar lloc a les comorbiditats associades a l'obesitat i són també factors de risc cardiovascular.

D'acord amb les dades del present estudi, existeix una forta relació entre el BMI i l'HT ^(280,281). En aquesta línia, els resultats d'aquest treball mostren que, tot i ser la comorbiditat més persistent, la cirurgia redueix la prevalença de l'HT, que remet en més del 50% dels casos. Això suggereix que la BS millora la rigidesa arterial i l'elasticitat de la paret vascular, disminuint així la velocitat del flux sanguini. La disminució de la pressió observada podria frenar el dany a l'endoteli, millorar-ne la permeabilitat i disminuir la proliferació de cèl·lules musculars llises⁽⁵⁰⁾. Aquestes millores es donarien sobre tot en els individus

sense placa, ja que l'HT remet en la majoria de persones d'aquest grup. Si la placa ja està formada, la BS podria prevenir l'evolució de la placa i disminuir el risc de ruptura mitjançant la remissió de l'HT.

Tal i com hem vist en les persones amb obesitat severa abans de la BS, la **T2DM** es caracteritza per hiperglucèmia, IR i hiperinsulinèmia. Això pot dur a complicacions micro i macro vasculars ^(112,113), el que concorda amb la major prevalença de T2DM observada entre el grup de persones amb placa. D'acord amb els estudis previs del grup⁽⁴⁴⁾, tant la T2DM com els nivells de glucosa i els d'insulina milloren dràsticament un any després de la intervenció quirúrgica, el que suggereix una millora de l'hemodinàmica i de la coagulació.

La **DLP** també és un important factor de risc cardiovascular associat a l'obesitat. Hem observat que la BS aconsegueix una millora en el perfil lipídic mesurat a les analítiques clíniques rutinàries: disminueixen el cLDL, el colesterol total i els TAG, i augmenten els nivells de cHDL. Això podria millorar el risc de patir dany vascular i aterosclerosi, ja que els nivells lipídics alterats abans de la BS poden afavorir el seu dipòsit a les parets arterials i l'aparició de les plaques d'ateroma.

6.1.2 L'obesitat severa es caracteritza per inflamació crònica de baix grau, que disminueix amb la BS

Com hem mencionat i d'acord amb els resultats obtinguts, l'obesitat severa i les comorbiditats s'associen a un estat d'inflamació crònic de baix grau. Els paràmetres proinflamatoris mesurats com la CRP, la leptina, el TNF α o la IL-6 han resultat significativament elevats en la nostra població abans de la BS i correlacionen positivament amb el BMI.

En canvi, els nivells d'adiponectina, considerada antiinflamatòria, són més baixos a la cohort amb obesitat severa abans de la BS, el que pot ser degut a les condicions alterades de la mateixa inflamació i d'OS durant l'obesitat⁽²⁸²⁾, tal i com reflecteixen les correlacions negatives entre l'adiponectina i l'MDA i les oxLDL.

Aquest increment de paràmetres inflamatoris i la disminució de les adipoquines antiinflamatòries observats abans de la BS es pot explicar pel balanç d'energia positiu durant l'obesitat severa, que causa estrès a l'AT. Cal recordar que l'excés de greix patològic provoca que l'AT esdevingui hipertròfic i hiperplàsic

i no pugui dur a terme correctament totes les reaccions metabòliques necessàries⁽²⁸³⁾.

La hiperleptinèmia que hem detectat abans de la BS també promou la proliferació de monòcits i macròfags, i la producció de citoquines proinflamatòries⁽²⁸⁴⁾. A més, actua directament augmentant la capacitat fagocítica dels macròfags, té efecte en les cèl·lules T, els neutròfils i les cèl·lules endotelials^(285,286).

L'augment de l'AT causa també hipòxia local⁽²⁸⁷⁾, que s'ha relacionat amb alta infiltració de macròfags i amb l'increment de l'expressió de factors inflamatoris com la leptina, la IL6 i el TNF α , o de molècules d'adhesió cel·lular^(288,289), pel que podria explicar també l'augment de la inflamació observat en la població d'estudi.

A més, hem detectat alts nivells de NEFA plasmàtics abans la BS. En l'entorn proinflamatori que hem exposat, els NEFA poden promoure la inflamació activant NF- κ B⁽²⁹⁰⁻²⁹²⁾.

D'acord amb el descrit fins ara, els resultats obtinguts confirmen que la població d'aquest estudi es caracteritza per un estat proinflamatori abans de la BS. L'ateroesclerosi també ha estat catalogada com a malaltia inflamatòria, pel que més endavant es discutirà la inflamació com a enllaç entre ambdues malalties i el seu paper en les diferents etapes de l'aterogènesi.

6.1.3 L'obesitat severa està associada a l'estrès oxidatiu, que disminueix amb la BS

A més d'un estat proinflamatori, cal destacar que abans de la BS els individus amb obesitat severa mostraven un perfil prooxidant, ja que els nivells dels marcadors d'OS (MDA i oxLDL) eren elevats.

Aquest increment d'OS durant l'obesitat severa pot ser degut a l'elevat BMI, que dona lloc a l'augment de la càrrega mecànica i del metabolisme muscular (incloent el del miocardi) i, per tant, el consum d'oxigen augmenta⁽²⁹³⁾. Com a conseqüència, incrementa la respiració mitocondrial, la transferència d'electrons és massa ràpida i hi ha pèrdua d'electrons a la cadena de transport, el que resulta en la disfunció mitocondrial i la formació de ROS⁽²⁹⁴⁻²⁹⁸⁾.

Els nivells de NEFA elevats que hem observat abans de la BS també promouen la generació de ROS a la cadena de transport d'electrons mitocondrial⁽²⁹⁹⁾. A més, si hi ha nivells elevats de lípids (com és el cas de la nostra cohort) és més probable que s'oxidin⁽³⁰⁰⁾. La susceptibilitat dels lípids a ser oxidats es posa de manifest per les altes concentracions d'MDA (producte final de la peroxidació lipídica) que hem observat abans de la BS.

La hiperglucèmia detectada abans de la BS també indueix la generació de ROS a través de diferents vies⁽³⁰¹⁾. En aquesta situació, l'excés de glucosa incrementaria la glucòlisi, donant lloc a una sobreproducció de NADH i FADH. Com a resultat, l'increment de gradient de protons a la membrana mitocondrial causa la producció de ROS⁽³⁰¹⁾.

La hiperleptinèmia que hem vist als individus amb obesitat severa abans de la intervenció també participa en l'OS. La leptina pot activar les NADPH oxidases i induir la producció de ROS⁽³⁰²⁾. Val la pena afegir que la leptina redueix l'activitat de l'antioxidant PON-1⁽²⁸⁴⁾, el que concorda amb la correlació negativa que hem descrit al present treball.

Els resultats explicats fins aquí corroboren que les persones amb obesitat severa tenen un perfil prooxidant i donen informació sobre les possibles causes. En aquest context d'OS elevat, les defenses antioxidants poden resultar disfuncionals. Així, hem vist alterats els enzims antioxidants SOD2, CAT i PON1 abans de la BS respecte a un any després. Podria ser que en un primer moment l'increment d'OS causi l'estimulació dels enzims antioxidants per contrarestar-lo. No obstant, al cap d'un temps d'increment d'OS continuat, l'activitat i/o la síntesi dels enzims antioxidants no es podria mantenir⁽³⁰³⁾. Seria el cas de l'activitat de la CAT, que augmenta després de la BS. El fet que sigui més baixa durant l'obesitat severa es podria explicar per la disminució en l'expressió del seu mRNA⁽³⁰⁰⁾.

En la mateixa línia, hem observat nivells de PON1 més baixos en els individus amb obesitat abans de la cirurgia. Els nivells més baixos poden ser deguts a l'augment de les citoquines proinflamàtores, que inhibeixen la síntesi hepàtica de PON1^(304–306). Les fortes correlacions negatives que hem trobat entre la PON1 i les citoquines proinflamàtores recolzen aquesta hipòtesi.

En canvi, l'enzim SOD2 ha resultat més alt abans de la BS que un any després. Cal recordar que la SOD2 redueix les concentracions del radical

superòxid i protegeix així les cèl·lules de l'OS. La CAT completa aquest procés de detoxificació reduint l'H₂O₂ a O₂ i aigua. En el context de la població estudiada, amb baixa activitat CAT, l'augment de SOD2 pot desencadenar un excés en la concentració del substrat prooxidant H₂O₂, una de les ROS que contribueix a la instauració d'OS i peroxidació lipídica. Per tant, la sobreexpressió de SOD2 que hem observat abans de la BS podria causar més danys que beneficis.

6.1.4 Interaccions entre inflamació i OS en l'obesitat: el cercle viciós

L'augment detectat en la producció de citocines proinflamatòries i l'OS pot establir un cercle viciós, que incrementaria el risc cardiovascular^(307,308). Les adipocitoquines proinflamatòries, elevades en la població d'estudi, són potents estimuladors de la producció de ROS^(309,310). Al lloc de la inflamació, els macròfags i els monòcits alliberen ROS. Al seu torn, durant l'obesitat les ROS poden iniciar una cascada de senyalització intracel·lular activant factors com ara NF-κβ o la via de la NADPH oxidasa, que augmenten l'expressió de gens proinflamatoris⁽³¹¹⁾ (Figura 23).

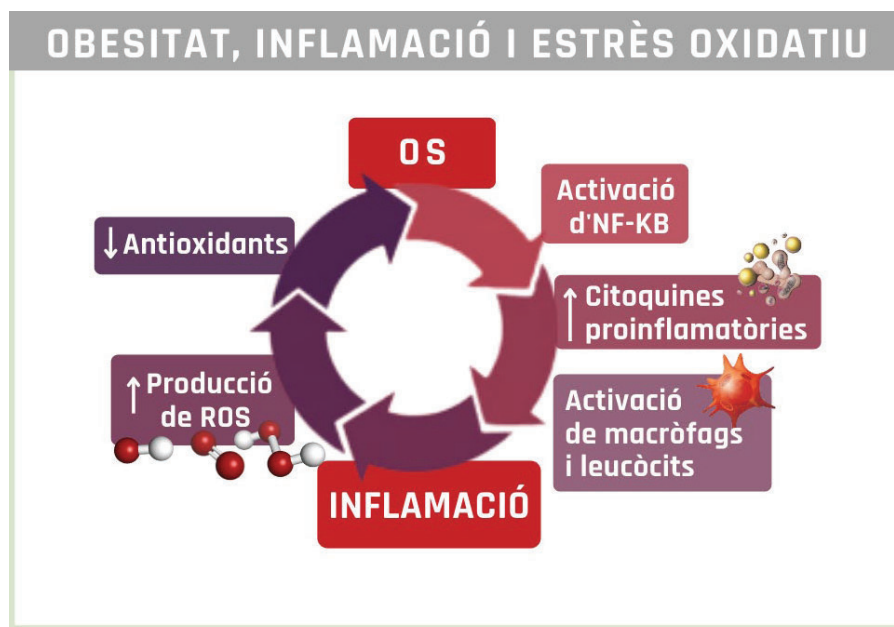


Figura 23: El cercle viciós entre OS i inflamació en l'obesitat severa. Abreviatures: NF-κβ, factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules; ROS, espècies reactives de l'oxigen; OS, estrès oxidatiu.

Així doncs, sembla que l'OS i la inflamació són vies comunes per a la patogènesi i les complicacions de l'obesitat, encara que és difícil confirmar quin dels processos precedeix l'altre. En la cohort analitzada els marcadors d'OS (MDA i oxLDL) correlacionen positivament amb els paràmetres proinflamatoris (com PAI-1, leptina o TNF α), i negativament amb els paràmetres antiinflamatoris (com l'adiponectina). A més, els nivells de PON1 i l'activitat CAT, correlacionen de manera negativa amb paràmetres considerats proinflamatoris (com PAI-1, IL-6 o CRP).

6.2 El procés ateromatós durant l'obesitat severa.

Fins aquí hem vist que l'obesitat severa està relacionada amb un augment de les comorbiditats, de la inflamació i de l'OS, processos que es retroalimenten.

En aquest apartat es discutiran la inflamació i l'OS com a enllaç entre l'obesitat severa i l'ateroesclerosi, i la seva possible afectació sobre les diferents fases del procés ateroescleròtic durant l'obesitat severa. A més, s'analitzarà l'efecte de la BS en l'ateroesclerosi subclínica.

6.2.1 A l'inici, els estímuls mecànics promouen les lesions primerenques a l'endoteli vascular

Cal recordar que ben a l'inici del procés ateroescleròtic els canvis i la pèrdua de funcionalitat són més evidents a zones de bifurcació dels vasos, ja que el flux sanguini a aquestes àrees és turbulent, baix, o oscil·latori⁽³¹²⁾. El flux alterat i l'HT observada a la cohort d'estudi causen un ambient aterogènic, el que promou lesions endotelials que posteriorment desencadenen la formació de placa⁽³¹³⁾.

Per tant, seria de gran interès poder mesurar aquestes lesions primerenques, que es podrien veure reflectides en el gruix de les parets, en l'angiogènesi o en la densitat dels vasos. És per això que hem analitzat els VV i el cIMT en les persones amb obesitat, amb placa i sense; amb la intenció de detectar les lesions vasculars fins i tot abans que es formin les plaques i veure'n l'evolució.

En els individus del present estudi la densitat dels VV es normalitza després de la BS. Aquesta neovascularització que hem observat durant l'obesitat podria ser un mecanisme compensatori per fer arribar oxigen i nutrients a les artèries danyades. La inflamació detectada n'és un estímul clau, tal i com suggereix la correlació positiva entre la densitat dels VV i TNF α o PAI-1. Tot i que *a priori* l'augment de VV és un mecanisme compensatori, l'alteració de factors angiogènics com Ang1, juntament amb l'entorn prooxidant i proinflamatori que hem trobat abans de la BS, poden resultar en VV disfuncionals, immadurs i fràgils⁽¹⁵⁸⁾.

Per altra banda, els resultats indiquen que la densitat dels VV és igual entre les persones amb placa i sense, pel que no sembla que els VV iniciïn la formació plaques. Tanmateix, l'augment de VV immadurs durant l'obesitat severa podria agreujar l'estat de les plaques ja existents i accelerar els esdeveniments aguts en aquests individus.

En canvi, pel que fa al gruix dels vasos, hem vist que el cIMT és superior en les persones amb placa i no canvia després de la BS. A més, el cIMT és diferent entre les persones sanes i el grup de persones amb placa de la cohort estudiada. El fet el que cIMT no canviï en funció del BMI però sí que ho faci segons la presència de placa, suggereix que l'augment d'aquest paràmetre és un factor important en la progressió de l'ateroesclerosi i pot ser un marcador de risc cardiovascular. No obstant, en les persones amb obesitat severa, el cIMT seria de difícil mesura perquè es determina per tècniques d'imatge.

6.2.2 La inflamació i l'OS causen disfunció endotelial i propicien l'ateroesclerosi a nivell molecular

A més de les lesions mecàniques ja discutides, la disfunció de l'endoteli es pot considerar com un dels principals canvis patològics entre l'exposició als factors de risc cardiovascular i el desenvolupament de l'ateroesclerosi⁽³¹⁴⁾.

Darrerament s'han proposat diferents mètodes per mesurar la funció endotelial i alguns s'han extrapolat a la clínica. És el cas de l'AI i RHI, paràmetres basats en el principi de la dilatació de l'endoteli en resposta a la hiperèmia⁽³¹⁵⁾. En el present treball hem mesurat ambdós paràmetres i hem comprovat que no són diferencials entre persones amb i sense placa. A més l'AI, que mesura la rigidesa arterial, empitjora amb la BS. És per això que proposem que s'ha

d'aprofundir en els causes d'aquest empitjorament i investigar acuradament l'EndoPAT com a mesura del to vascular en la població amb obesitat severa.

Amb tot plegat, trobar eines d'anàlisi que permetin la detecció precoç de la disfunció endotelial abans del desenvolupament clínic de l'ateroesclerosi seria un pas important per a la prevenció. En aquest sentit, la mesura de la funcionalitat de l'endoteli podria aportar informació integrant tots els factors aterogènics i protectors presents en un individu. És per això que a continuació s'analitza l'estat de la funció endotelial de les persones amb obesitat severa en funció de la presència o no de placa. També proposem que la gran quantitat de citoquines secretades durant l'obesitat severa poden participar en la disfunció endotelial modificant els processos inflamatoris i l'OS a l'endoteli. Els resultats obtinguts han demostrat alteracions en les funcions de vasodilatació, d'angiogènesi i d'adhesió a l'endoteli en els individus amb obesitat.

El to vascular: vasoconstrictor i protrombòtic durant l'obesitat severa

Es creu que una de les característiques de la disfunció endotelial és el deteriorament de la vasodilatació⁽¹³¹⁾. Tal i com indiquen els nivells d'ET-1 i de TM reportats en aquest treball abans de la BS, l'obesitat pot afectar el to vascular. A més, la concentració de TM és superior en els individus amb placa respecte aquells sense, per la qual cosa podria tenir un paper crític en el desenvolupament de la placa afectant la dilatació i la permeabilitat dels vasos. L'augment d'aquest vasodilatador en les persones amb ateroma podria ser un mecanisme compensatori contra l'ambient proinflamatori i protrombòtic⁽³¹⁶⁾. A més, l'increment de TM i d'ET-1 podria reflectir la incapacitat de l'endoteli vascular de dilatar-se correctament en resposta a l'augment del flux sanguini i resultar en un augment de l'HT, el que pot dur a trombosi i aterosclerosi en l'obesitat severa⁽³¹⁷⁾.

L'efecte de l'obesitat severa en el to vascular pot donar-se a través de l'increment de les citoquines, ja que entre les múltiples funcions fisiològiques que tenen, s'inclou la regulació de la vasodilatació i la vasoconstricció⁽³¹⁸⁾. Per exemple, la leptina pot contribuir a desenvolupar complicacions vasculars potenciant l'increment de l'expressió de citoquines proinflamatòries a les cèl·lules

endotelials^(319,320), el que concorda amb la correlació positiva entre nivells de leptina i els de PAI-1 i CRP a la cohort estudiada.

El PAI-1 és una citoquina expressada tant a l'AT com a l'endoteli vascular. Els resultats demostren que els nivells de PAI-1 estan augmentats en l'obesitat severa, especialment en les persones amb placa. A l'endoteli, l'increment de PAI-1, pot inhibir la fibrinòlisi, donant lloc a un ambient procoagulant que facilita la formació de la placa.

La CRP (que ha resultat diferent entre els grups amb ateroma i sense) també pot contribuir a la disfunció endotelial regulant el to vascular. Per una banda, redueix la biodisponibilitat del vasodilatar NO, causant OS i hiperplàsia a l'íntima⁽³²¹⁾. Per altra banda, en altes concentracions com les que hem trobat abans de la BS, la CRP es pot acumular directament a l'íntima, fet que precedeix l'aparició de monòcits i incrementa encara més la inflamació^(322,323).

En conjunt, la síntesi desregulada de citoquines proinflamàtores i vasoactives en l'obesitat severa, sobre tot en les persones amb placa, pot participar en la vasoconstricció i l'activació inflamatòria, compromentent el to vascular.

Les ROS també poden alterar el to vascular i la trombosi, ja que promouen diversos mecanismes com la reducció de l'NO, la formació de peroxinitrit, el desacoblament de l'eNOS, i l'estimulació de l'expressió del vasoconstrictor ET-1 observada⁽³²⁴⁾.

Les cèl·lules de l'endoteli vascular danyat produeixen citoquines i molècules d'adhesió

La funció d'adhesió és d'importància cabdal per al manteniment de la integritat de l'endoteli, pel que la mesura de molècules implicades podria ser indicativa de l'estat de l'endoteli vascular. Cal recordar que les molècules d'adhesió duen a terme el reclutament de cèl·lules inflamatòries circulants a l'espai subendotelial⁽³²⁵⁾. En aquest treball hem trobat concentracions més elevades de molècules d'adhesió i de selectines abans de la BS. Aquest augment podria ser degut a les adipoquines proinflamàtores i l'OS característics de l'obesitat severa⁽³²⁶⁾. Això suggereix que l'obesitat severa augmenta l'adhesió i empitjora la funció endotelial.

Per exemple, hem vist que TNF- α correlaciona positivament amb ICAM, pel que aquesta citoquina podria afavorir l'adhesió i la migració dels leucòcits⁽³²⁷⁾. A més, la sobreexpressió de TNF- α activa NF-KB, contribuint així a la proliferació de VSMC a l'íntima i induint l'expressió de més molècules proinflamatòries per part dels macròfags i les VSMC^(328,329). D'acord amb la correlació presentada, la IL-6 estimularia també l'adhesió a les cèl·lules endotelials mitjançant l'increment d'E-selectina⁽³³⁰⁾.

En canvi, l'increment dels nivells d'adiponectina després de la BS podria disminuir la inflamació vascular, suprimint TNF- α i IL6⁽³³¹⁾ i millorant així l'adhesió endotelial. En la mateixa línia, cal remarcar que la irisina ha resultat més baixa en les persones amb placa. Aquesta adipomioquina pot tenir efectes indirectes en la funció de l'endoteli controlant l'acumulació de lípids i l'homeòstasi de la glucosa al múscul esquelètic, al fetge i a l'AT, o suprimint l'expressió de citocines proinflamatòries⁽³³²⁻³³⁵⁾. En concordança, en aquest treball hem demostrat que la concentració d'irisina està correlacionada negativament amb NEFA, PAI-1 i cIMT. És per tot això que es proposa que la irisina té un paper protector en l'ateroesclerosi.

D'entre les selectines, és important mencionar que hem trobat concentracions més altes de P-sel en les persones amb ateroma. La P-sel s'expressa en resposta a les plaquetes activades, que inicien així una resposta inflamatòria a l'endoteli estimulants la diapedesi dels leucòcits a la paret vascular. Per tant, els resultats obtinguts en referència a la P-sel suggereixen un augment de la inflamació a la paret vascular, més marcada en els pacients amb placa.

En conjunt, hem pogut relacionar la inflamació i l'OS durant l'obesitat severa amb l'increment de les proteïnes d'adhesió, que causarien la migració de monòcits al lloc de la lesió de l'endoteli vascular. Com hem mencionat, els monòcits es transformaran en macròfags, que s'activen i causen un augment de ROS. Les ROS inicien la via inflamatòria NF-KB⁽³³⁶⁾, que retroalimentaria el sistema augmentant l'expressió de les CAM endotelials, de citoquines inflamatòries i de factors protrombòtics.

6.2.3 La BS disminueix l'OS i la inflamació, el que millora la funció endotelial

En aquest treball hem comprovat que la BS modula de manera beneficiosa els factors moleculars que condueixen a la disfunció endotelial. Després de la intervenció disminueixen els nivells circulants de molècules d'adhesió, el que probablement està relacionat amb la baixada de la inflamació i l'OS, tal i com mostren les correlacions abans mencionades. Els nivells de paràmetres que promouen el to vascular protrombòtic disminueixen després de la cirurgia, indicant una millora en la resposta vasodilatadora depenent de l'endoteli. Aquests resultats suggereixen que la disfunció endotelial molecular és reversible en les persones sense placa. Els individus amb placa es troben en una altra etapa i, tot i que l'entorn proinflamatori, prooxidant i procoagulant millora, els nivells de CRP, de PAI-1, de P-sel i de TM es mantenen més alts en els individus amb placa després de la BS i la millora és menys acusada. Aquests paràmetres tenen potencial com a marcadors de la presència de placa tan abans com després de la BS.

6.2.4 L'acumulació lipídica a l'íntima és afavorida pel perfil lipídic aterogènic i per la disfunció endotelial. La BS redueix els nivells i l'oxidació lipídics.

Un cop caracteritzat l'estat de la funció de l'endoteli vascular durant l'obesitat severa, es proposa que les alteracions bioquímiques observades també poden deteriorar la permeabilitat de l'endoteli i afavorir l'acumulació de lípids a l'íntima, etapa clau en la formació de la placa.

A la cohort estudiada, els perfils lipídics i lipoproteics han resultat alterats abans de la BS. En concret, els individus amb obesitat severa tenen un perfil de lipoproteïnes aterogènic, caracteritzat per un alt contingut de colesterol i TAG a les VLDL i a les LDL, i per un nombre elevat de partícules d'aquestes lipoproteïnes. A més, els resultats mostren més quantitat de partícules LDL petites al grup de persones amb placa. Els orígens exactes de les mides d'LDL encara no són clars, però s'ha proposat l'existència de dues situacions depenent de la disponibilitat de TAG hepàtics: amb nivells baixos de TAG, les partícules VLDL esdevenen IDL i LDL de mida gran; mentre que amb nivells de TAG

elevats, procedents bàsicament del fetge, les VLDL generen LDL petites⁽³³⁷⁾. Aquest seria el cas de les persones amb placa del nostre estudi.

És sabut que les partícules d'LDL petites són un factor de risc aterogènic, ja que tenen facilitat per travessar l'endoteli, hi romanen més temps i són més propenses a oxidar-se⁽²⁵¹⁾. A més, durant l'obesitat severa, la lesió endotelial i els canvis funcionals discutits prèviament propicien l'entrada d'aquestes LDL a l'íntima. Un cop a l'íntima, les LDL poden estimular un procés inflamatori a l'endoteli causant l'augment en les citoquines i en les proteïnes d'adhesió que hem detectat, el que promou el procés ateroescleròtic.

En referència a l'oxidació dels lípids, hem detectat alts nivells d'MDA a la població amb obesitat severa estudiada. Es proposa que aquest increment en la peroxidació lipídica pot ser causat pels elevats nivells lipoproteics juntament amb l'estat prooxidant detectat durant l'obesitat severa. Per tot això, suggerim que l'obesitat severa incrementa el risc associat al perfil lipídic, fent-lo més aterogènic a través de la inflamació, de l'OS elevat, i de la funció endotelial alterada observats.

Els resultats posen de manifest que la BS pot millorar el perfil lipoproteic en tots dos grups i normalitzar els nivells plasmàtics d'LDL petites en les persones amb placa. A més, en aquest treball hem demostrat que la BS redueix les oxLDL i l'MDA, probablement a través de la millora dels enzims antioxidants com la CAT i la PON1. Un altra explicació per a la disminució de l'oxidació després de la intervenció pot ser el decreixement observat en el nombre de partícules de lipoproteïnes i la reducció de l'OS. És important mencionar que, tot i que també disminueixen, els canvis en els nivells d'oxLDL després de la BS són menys marcats en les persones amb placa. En aquest ordre d'idees, als 12M després de la BS els antioxidants CAT i PON1 milloren només en els individus sense placa, pel que aquests dos paràmetres esdevenen significativament diferents entre grups després de la BS. Amb tot, la BS sembla tenir un paper important en la disminució de l'aterogeneïtat del perfil lipídic, sent més evident la millora en les persones sense placa.

6.2.5 L'obesitat severa afavoreix la vulnerabilitat dels ateromes. La BS no suposa la remissió de les plaques, però podria prevenir-ne la ruptura.

La lesió arterial, les condicions hemodinàmiques i l'acumulació de lípids que hem detectat poden tenir com a resultat la inestabilitat de la placa. Si la placa es trenca provoca la formació d'un coàgul que dona lloc a un esdeveniment cardiovascular agut^(325,338). Aquesta ruptura de plaques ateroscleròtiques inestables és un procés complex, i la manca de models animals restringeix la possibilitat d'explorar els processos moleculars que condueixen a la ruptura⁽³³⁹⁾.

Per tot això, actualment existeix la necessitat de prevenir els esdeveniments cardiovasculars aguts que deriven d'aquest trencament. En aquesta línia, a continuació es discuteix la relació del cercle viciós entre l'OS i la inflamació en l'obesitat amb els factors que duen a la inestabilitat i a la ruptura de la placa.

S'ha demostrat que l'hemorràgia intraplaca representa un factor determinant de la vulnerabilitat, ja que pot provocar una acumulació d'eritròcits al nucli de la placa, augmentar-ne el volum i propiciar el trencament de l'ateroma⁽¹⁷³⁾. L'augment de la densitat dels VV observada en les persones amb obesitat abans de la BS pot donar lloc a aquestes hemorràgies⁽¹⁵⁸⁾. Com hem mencionat, aquesta neoangiogènesi pot ser induïda per un estat hipòxic, pro-oxidant i inflamatori dins de la placa. És per això que les xarxes que formen els VV als ateromes com a mecanisme compensatori probablement siguin d'integritat feble i susceptibles a fuites⁽¹⁵⁸⁾. Per tant, el fet que la densitat de VV sigui superior abans de la BS suggereix que els ateromes són més propensos a la vulnerabilitat en persones amb obesitat severa que un cop perden pes.

D'altra banda, la formació del nucli necròtic i l'aprimament del cap fibrós també poden dur a la vulnerabilitat de la placa. Aquesta morfologia és conseqüència de l'acumulació de macròfags apoptòtics i de la inflamació⁽¹⁷³⁾. Per tant, la necrosi del nucli i la debilitació del cap poden ser induïdes pels mediadors proinflamatoris, que són més alts en les persones amb obesitat abans de la BS en comparació als 12 mesos post intervenció.

Finalment, en l'entorn prooxidant observat, s'ha descrit que les ROS provinents dels macròfags de l'íntima vascular promouen l'activació de les metal·loproteases, el que dona lloc a la degradació de la càpsula de col·lagen i també al trencament de la placa⁽³⁴⁰⁾.

Tot i que les plaques no remeten després de la cirurgia, les condicions mencionades, que poden fer que la placa passi a ser vulnerable, sí que milloren amb la intervenció. Per tant, a partir dels canvis favorables en aquests paràmetres, se suggereix que la BS podria frenar la progressió de l'ateroesclerosi i reduir el risc d'esdeveniments aguts en les persones amb obesitat severa.

6.3 Perspectiva global: l'ateroesclerosi subclínica en l'obesitat severa i efecte de la BS

L'estudi dels paràmetres implicats en l'obesitat, en les comorbiditats, en la inflamació, en l'OS i en la disfunció endotelial ha permès obtenir una visió àmplia de l'inici silencios de l'ateroesclerosi durant l'obesitat severa.

En resum, en l'obesitat severa hem detectat alteracions lligades a les comorbiditats, com ara nivells lipídics elevats, que incrementen el risc d'ateroesclerosi. A més, hem vist altes concentracions de factors inflamatoris i un augment d'OS, tant en les persones amb placa com en aquelles sense. Entre els possibles i diversos factors, el cercle viciós entre la inflamació i l'OS sembla ser una de les causes de la disfunció endotelial.

La Figura 24 resumeix els factors mesurats que poden dur a la disfunció endotelial durant l'obesitat severa.

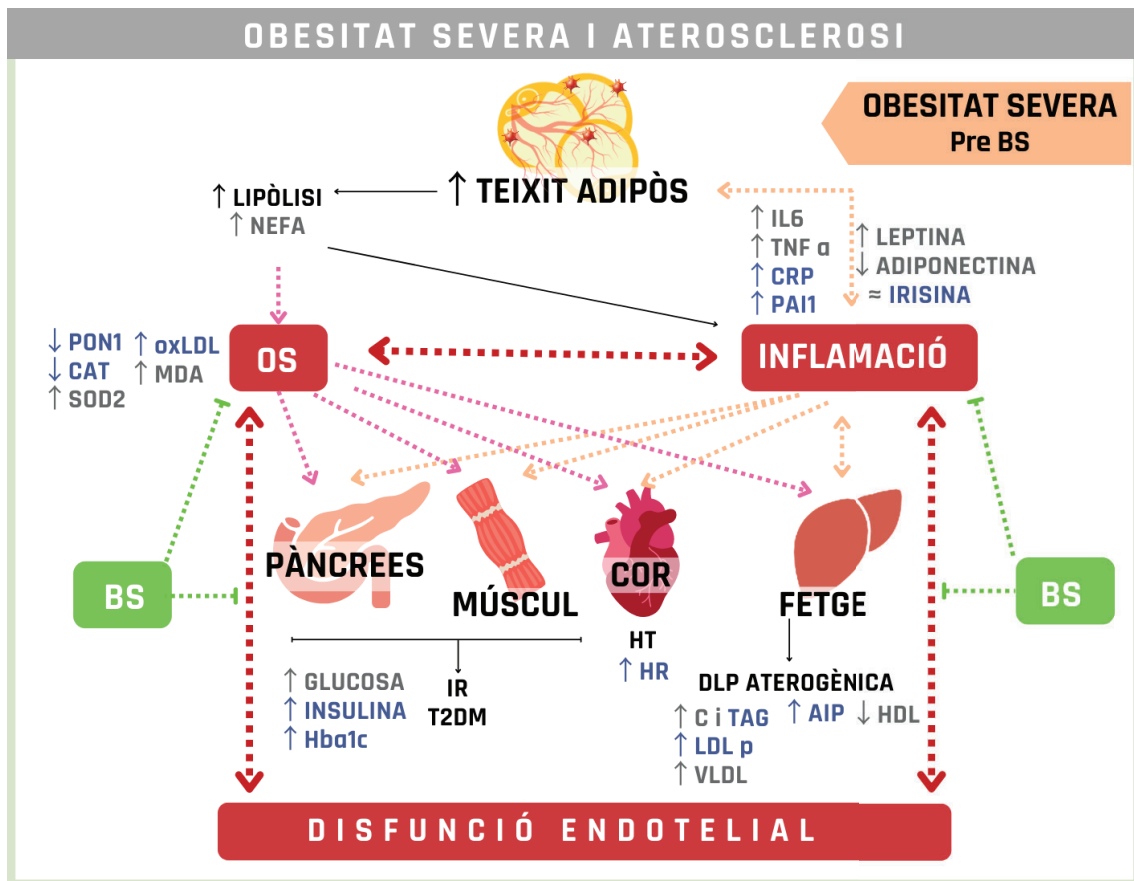


Figura 24: Obesitat severa i ateroesclosi subclínica, factors que duen a la disfunció endotelial vascular. Les fletxes indiquen els nivells en l'obesitat vs 12 mesos post BS. En blau, els paràmetres diferents entre persones amb placa d'ateroma i sense. Abreviatures: AIP, índex aterogènic del plasma; BS, cirurgia bariàtrica; C, colesterol total; CAT, catalasa; cHDL, colesterol en les lipoproteïnes d'alta densitat; cLDL, colesterol en les lipoproteïnes de baixa densitat; CRP, proteïna C-reactiva; HbA1c, hemoglobina glicada; HDL, lipoproteïnes d'alta densitat; HR, freqüència cardíaca; HT, hipertensió arterial; IL6, interleuquina 6; IR, resistència a la insulina; LDL, lipoproteïnes de baixa densitat; LDLp, lipoproteïnes de baixa densitat petites; MDA, malondialdehid; NEFA, àcids grassos no esterificats; OS, estrès oxidatiu; PON1, paraoxonasa 1; SOD2, superòxid dismutasa 2; T2DM, diabetis mellitus tipus 2; TAG, triacilglicèrids; TNF α factor de necrosi tumoral α ; VLDL, lipoproteïnes de molt baixa densitat.

La progressió de la disfunció endotelial fins a l'ateroesclerosi és complexa i implica diferents factors, s'esquematitzen a la Figura 25. Entre ells, durant l'obesitat severa hem observat una alteració en el to vascular, especialment en les persones amb placa. Amb l'OS i la inflamació, augmenta l'expressió i l'activació de molècules d'adhesió, que de nou dona lloc a l'increment de citocines inflamatòries a l'endoteli.

A mesura que la funció endotelial es deteriora durant l'obesitat, augmenta la permeabilitat de l'endoteli per les LDL petites. L'alteració de la mida i la composició de les lipoproteïnes i l'augment d'OS en les persones amb obesitat fa que el perfil lipídic sigui encara més aterogènic. L'acumulació d'oxLDL a l'íntima augmenta encara més la inflamació i inicia la formació de la placa.

En aquest entorn proinflamatori, prooxidant i protrombòtic observat als individus amb obesitat severa, és més probable que les plaques esdevinguin vulnerables.

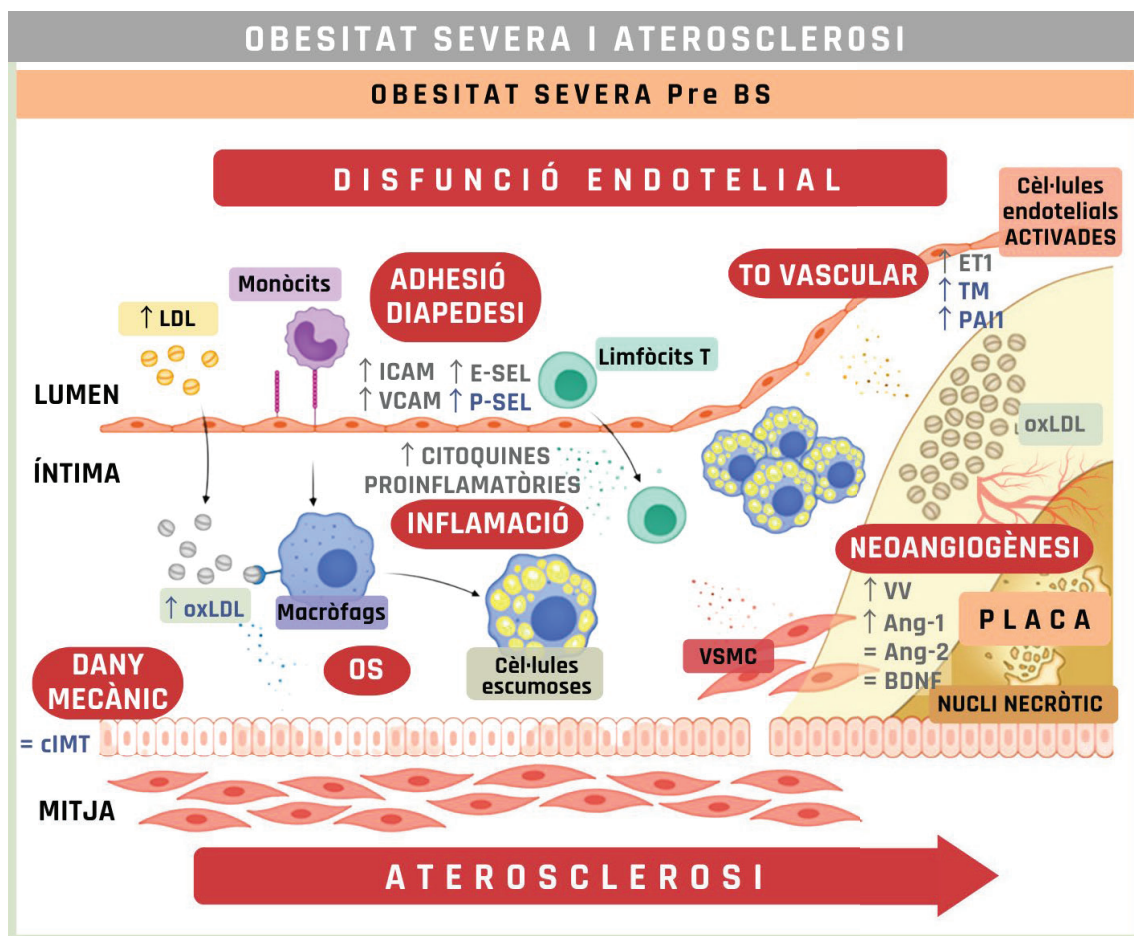


Figura 25: De l'obesitat severa a l'ateroesclerosi subclínica, biologia molecular de l'aterogènesi. Les fletxes indiquen els nivells en l'obesitat vs 12 mesos post BS. En blau, els paràmetres diferents entre persones amb placa d'ateroma i sense. Abreviatures: Ang1, angiotensina 1; Ang2, angiotensina 2; BDNF, factor neurotròfic derivat del cervell; cIMT, gruix íntima-mitja carotídi; E-sel, selectina endotelial; ET1, endotelina 1; ICAM, molècules d'adhesió intracel·lular; OS, estrès oxidatiu; oxLDL, lipoproteïnes de baixa densitat oxidades; PAI-1: inhibidor de l'activador del plasminogen; P-sel, selectina present a les plaquetes; TM, trombomodulina; VCAM, molècules d'adhesió de cèl·lules vasculares; VSMC, cèl·lules de la musculatura llisa vascular; VV, vasa vasorum. FONTS: imatge de l'endoteli adaptada de⁽³⁴¹⁾.

La BS frena aquest context proaterogènic trencant el cercle viciós entre inflamació i OS, el que es tradueix en la millora de la funció endotelial. Tot i que ambdós grups milloren, les plaques no remeten i els beneficis són més evidents en les persones sense placa. Donat que abans de l'operació els individus sense placa també tenen uns perfils força aterogènics i semblants als del grup amb placa, se suggereix que, si no fossin intervinguts per BS, aquestes persones desenvoluparien ateromes amb el temps.

Per tant, mentre l'obesitat severa propicia l'ateroesclerosi, la BS no només podria prevenir la formació d'ateromes, sinó també frenar la progressió de la placa i disminuir el risc de trencament de les plaques ja existents.

La mesura d'aquest ampli panell de factors ha permès caracteritzar millor l'ateroesclerosi subclínica i és un primer pas per detectar la presència i la vulnerabilitat de les plaques, i disminuir el risc d'esdeveniments cardiovasculars aguts en persones amb alt risc cardiovascular, com les que tenen obesitat severa.

6.4 Biomarcadors potencials de la presència de placa.

És important recordar que, tot i l'elevat risc cardiovascular associat a l'obesitat severa, sovint l'ateroesclerosi s'infradiagnostica en les persones amb aquesta patologia a causa de la dificultat per obtenir imatges dels vasos. Per altra banda, es creu que els factors de risc cardiovascular utilitzats en la clínica rutinària fallen en la predicció del desenvolupament de malalties cardiovascular en un 25-50% dels casos⁽²⁷⁸⁾. Aquests fets posen de manifest la necessitat creixent de trobar biomarcadors per detectar la presència de placa en persones amb obesitat severa.

En aquesta línia, la mesura de tots aquests factors implicats tant en l'obesitat com en l'ateroesclerosi, ens ha permès destacar 23 variables diferencials entre els grups amb placa i sense.

Seguint amb l'objectiu de definir biomarcadors de l'ateroesclerosi subclínica, hem mesurat 188 miRNA plasmàtics, ja que recentment s'ha proposat que aquest tipus de molècules tenen potencial com a marcadors de diferents malalties⁽³⁴²⁾. Durant l'obesitat severa, els miRNA poden regular la diferenciació d'adipòcits, l'OS, la inflamació, i l'angiogènesi. A més, s'ha descrit que els adipòcits segreguen microvesícules que contenen miRNA, el que suggereix que la comunicació intercel·lular entre l'AT i el teixit vascular podria tenir lloc per aquesta via^(343,344). Entre tots els miRNA mesurats, hem observat que els miR-21-3p, miR-133a-3p i miR-126-3p són diferents entre les persones amb placa i sense, pel que podrien ser marcadors de la presència d'ateromes. En concret, el miR-133-5p ha resultat un bon predictor de la presència de placa en les persones amb obesitat severa abans de la BS, amb una capacitat discriminatòria del 90%.

En conjunt, incloent els miRNA, un total de 26 paràmetres han resultat diferents entre els individus amb placa i aquells sense. Aquests paràmetres són potencials biomarcadors i podrien permetre identificar, d'entre les persones amb obesitat severa, aquelles amb més risc de patir esdeveniments cardiovasculars greus (Taula 10, *Resum de resultats*).

6.4.1 Capacitat de predicció de la presència de placa dels biomarcadors descrits

L'ús dels 26 paràmetres descrits pot proporcionar una signatura integrada de l'ateroesclerosi en individus amb obesitat severa i ser útil per al seguiment del risc cardiovascular abans i després de la BS. A més, vista la complexitat de l'obesitat i de la malaltia ateroscleròtica i els múltiples processos implicats, seria estrany que un únic marcador plasmàtic pogués ser indicador de la formació i progressió de les plaques. És per això que, un cop identificats els factors diferencials entre les persones amb placa i sense, hem generat models predictius per a la presència d'ateroma abans de la BS amb les mínimes variables possibles.

Per una banda, hem volgut avaluar la capacitat predictora dels paràmetres amb potencial d'esdevenir nous biomarcadors, sense tenir en compte els factors de risc utilitzats clínicament. Segons els resultats obtinguts, la **TM**, la **irisina** i el **miR-133a-3p** són els que tenen millor capacitat de predicció. Tot i que farien falta estudis amb més individus per a poder-los utilitzar com a biomarcadors en

clínica, el model realitzat demostra que, amb només aquests 3 paràmetres, es podria obtenir una predicció de la presència de placa del 94%, i podria suposar un primer pas per al diagnòstic precoç de l'ateroesclerosi subclínica.

Per altra banda, els factors de risc tradicionals, basats en l'estudi de Framingham⁽⁹³⁾ (com ara les comorbiditats, els nivells de colesterol...) són els que es fan servir actualment per estimar el risc cardiovascular en la prevenció primària. A l'Article 1 vam calcular la corba ROC d'un model que conté només factors de risc cardiovascular tradicionals (edat, sexe, DLP i T2DM), i vam obtenir un valor predictiu del 84%, inferior a la que hem trobat amb els biomarcadors nous.

Finalment, hem realitzat un model a partir de totes les variables mesurades, incloent tant aquelles que es consideren factors de risc tradicionals (com les comorbiditats), com els paràmetres proposats com a nous marcadors en aquest treball. A partir de l'anàlisi estadístic han quedat incloses al model les variables: **DLP, T2DM, glucèmia, HOMA-IR i TM**, i han resultat tenir una bona capacitat de predicció, del 97%. Per tant, afegint la TM als factors de risc tradicionals, l'AUC augmenta en un 13% i incrementa notablement la capacitat predictora del model.

Així doncs, els tres models tenen una bona capacitat de predicció per la presència de placa en persones amb obesitat severa, però el millor és el que integra els nous biomarcadors i els factors de risc tradicionals. Si es confirmessin els resultats en estudis amb més individus, aquest model seria relativament senzill d'aplicar en clínica, ja que només s'hauria d'afegir a les determinacions habituals l'anàlisi d'un paràmetre, la TM.

Des del punt de vista d'aplicació en clínica, val la pena comparar aquest model amb la detecció per imatge. En la nostra població, l'anàlisi per imatge no va permetre determinar la presència de placa en el 10% dels individus amb obesitat severa, tot i repetir la prova fins a tres vegades quan es trobaven dificultats tècniques. En canvi, el model predictiu proposat és més fàcilment aplicable a tots els individus i té una elevada capacitat de predicció. A més, a diferència de l'anàlisi ecogràfic, l'obtenció de la mostra de plasma per a l'anàlisi de HOMA-IR i TM està a l'abast de la majoria de centres de salut.

Seguint en l'àmbit clínic, el diagnòstic temprà de l'ateroesclerosi subclínica en persones amb obesitat severa podria ser útil per establir una prioritització per

la BS segons el risc cardiovascular. Un cop intervinguts, tenir l'ateroesclerosi subclínica diagnosticada permetria aplicar mesures de prevenció secundària per reduir l'aparició de nous episodis cardiovasculars. En síntesi, creiem que l'ús del model podria oferir una nova eina de diagnòstic que permetria iniciar un tractament preventiu abans de l'aparició d'esdeveniments cardiovasculars greus.

7. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Els individus amb obesitat severa i aterosclerosi subclínica presenten un perfil més prooxidant i proinflamatori que els individus sense placa ateromatosa.

La inflamació i l'estrès oxidatiu durant l'obesitat severa afavoreixen la disfunció de l'endoteli vascular, accentuada en les persones amb placa, i caracteritzada pel dany a les parets dels vasos, un to vascular protrombòtic, un entorn procoagulant, l'increment de la diapedesi i l'acumulació i oxidació lipídica.

2. La cirurgia bariàtrica millora aquest context proaterogènic, sobretot en els individus sense placa, en els quals podria disminuir el risc de l'aparició d'ateromes. En les persones que ja tenen placa, la BS podria reduir el risc d'esdeveniments cardiovasculars aguts.

3. D'entre els nous biomarcadors proposats, la combinació d'irisina, TM i miR-133a-3p té una capacitat elevada de predicció de la presència de placa. Tanmateix, només afegint la TM a un model basat en factors de risc clàssics, s'aconsegueix una capacitat de predicció del 97%.

Un cop validat, l'aplicació d'aquest model a la pràctica clínica permetria diagnosticar l'aterosclerosi subclínica precoçment en persones amb obesitat severa de manera relativament senzilla, efectiva, rentable i aplicable a qualsevol centre de salut, de manera que es podrien establir estratègies per reduir el risc cardiovascular abans d'un esdeveniment greu.

8. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- [1] Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol* 2019;15:288–98. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>.
- [2] World Health Organization. World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs. 2018. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272596> (accessed February 16, 2021).
- [3] World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Ginebra: 1998.
- [4] Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL. Indices of relative weight and obesity. *Int J Epidemiol* 2014;43:655–65. <https://doi.org/10.1093/ije/dyu058>.
- [5] Huxley R, MENDIS S, Zheleznyakov E, REDDY S, Chan J. Body mass index, waist circumference and waist:hip ratio as predictors of cardiovascular risk--a review of the literature. Review. *Eur J Clin Nutr* 2010;64:16–22.
- [6] Gil-Campos, M.; Pérez De La Cruz, A. y Gil Hernández A. Obesidad aspectos médicos y nutricionales. Santiago de Chile: Editorial Mediterráneo; 2014.
- [7] Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *Lancet (London, England)* 2017;390:2627–42. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32129-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32129-3).
- [8] Instituto Nacional de Estadística. Indicadores Clave del Sistema Nacional de Salud, Encuesta Nacional de Salud 2017 2017.
- [9] Network. GB of DC. Global Burden of Disease Study 2017 (GBD 2017) Burden by Risk 1990-2017. 2018.
- [10] THE GLOBAL HEALTH OBSERVATORY, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Preval Obes among Adults, BMI >= 30 (Age-Standardized Estim 2021. [https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/prevalence-of-obesity-among-adults-bmi-=-30-\(age-standardized-estimate\)-\(-\)](https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/prevalence-of-obesity-among-adults-bmi-=-30-(age-standardized-estimate)-(-)) (accessed November 10, 2021).
- [11] Fried M, Yumuk V, Oppert JM, Scopinaro N, Torres A, Weiner R, et al. Interdisciplinary European guidelines on metabolic and bariatric surgery. *ObesSurg* 2014;24:42–55.
- [12] Aronne LJ, Wadden TA, Peterson C, Winslow D, Odeh S, Gadde KM. Evaluation of phentermine and topiramate versus phentermine/topiramate extended-release in obese adults. *Obesity (Silver Spring)* 2013;21:2163–71. <https://doi.org/10.1002/oby.20584>.
- [13] Cercato C, Roizenblatt VA, Leança CC, Segal A, Lopes Filho AP, Mancini MC, et al. A randomized double-blind placebo-controlled study of the long-term efficacy and safety of diethylpropion in the treatment of obese subjects. *Int J Obes (Lond)* 2009;33:857–65. <https://doi.org/10.1038/ijo.2009.124>.
- [14] Hauptman J, Lucas C, Boldrin MN, Collins H, Segal KR. Orlistat in the long-term treatment of obesity in primary care settings. *Arch Fam Med* 2000;9:160–7. <https://doi.org/10.1001/archfami.9.2.160>.
- [15] Gadde KM, Allison DB, Ryan DH, Peterson CA, Troupin B, Schwieters ML, et al. Effects of low-dose, controlled-release, phentermine plus topiramate combination on weight and associated comorbidities in overweight and obese adults (CONQUER): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)* 2011;377:1341–52. <https://doi.org/10.1016/S0140->

BIBLIOGRAFIA

- 6736(11)60205-5.
- [16] Greenway FL, Fujioka K, Plodkowski RA, Mudaliar S, Guttadauria M, Erickson J, et al. Effect of naltrexone plus bupropion on weight loss in overweight and obese adults (COR-1): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* (London, England) 2010;376:595–605. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60888-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60888-4).
- [17] Pi-Sunyer X, Astrup A, Fujioka K, Greenway F, Halpern A, Krempf M, et al. A Randomized, Controlled Trial of 3.0 mg of Liraglutide in Weight Management. *N Engl J Med* 2015;373:11–22. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411892>.
- [18] Tchang B, Aras M, Rekha B K, Aronne LJ. Pharmacologic Treatment of Overweight and Obesity in Adults. *Endotext* [Internet] 2021.
- [19] Committee for medicinal products for human use. Guideline on clinical evaluation of medicinal products used in weight management. *Eur Med Agency* 2016. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-evaluation-medicinal-products-used-weight-management-revision-1_en.pdf (accessed May 3, 2022).
- [20] Neovius M, Narbro K, Keating C, Peltonen M, Sjöholm K, Agren G, et al. Health care use during 20 years following bariatric surgery. *JAMA* 2012;308:1132–41.
- [21] Robinson MK. Surgical treatment of obesity--weighing the facts. *N Engl J Med* 2009;361:520–1.
- [22] Guerreiro V, Neves JS, Salazar D, Ferreira MJ, Oliveira SC, Souteiro P, et al. Long-Term Weight Loss and Metabolic Syndrome Remission after Bariatric Surgery: The Effect of Sex, Age, Metabolic Parameters and Surgical Technique – A 4-Year Follow-Up Study. *Obes Facts* 2019;12:639–52. <https://doi.org/10.1159/000503753>.
- [23] Nguyen NT, Varela JE. Bariatric surgery for obesity and metabolic disorders: state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:160–9. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.170>.
- [24] Elder KA, Wolfe BM. Bariatric surgery: a review of procedures and outcomes. *Gastroenterology* 2007;132:2253–71.
- [25] Cummings DE, Rubino F. Metabolic surgery for the treatment of type 2 diabetes in obese individuals. *Diabetologia* 2018;61:257–64. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4513-y>.
- [26] Peterli R, Wolnerhanssen B, Peters T, Devaux N, Kern B, Christoffel-Court, et al. Improvement in glucose metabolism after bariatric surgery: comparison of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and laparoscopic sleeve gastrectomy: a prospective randomized trial. *Ann Surg* 2009;250:234–41.
- [27] Wang Y, Guo X, Lu X, Mattar S, Kassab G. Mechanisms of Weight Loss After Sleeve Gastrectomy and Adjustable Gastric Banding: Far More Than Just Restriction. *Obesity* (Silver Spring) 2019;27:1776–83. <https://doi.org/10.1002/oby.22623>.
- [28] González Jiménez E. Obesity: etiologic and pathophysiological analysis. *Endocrinol y Nutr Organo La Soc Esp Endocrinol y Nutr* 2013;60:17–24. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2012.03.006>.
- [29] Daza C. La obesidad: Un desorden metabólico de alto riesgo para la salud. *Rev Colomb Médica* (ISSN 0120-8322) Vol 33 Num 2 2002;33.

BIBLIOGRAFIA

- [30] Balistreri CR, Caruso C, Candore G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm* 2010;2010:802078. <https://doi.org/10.1155/2010/802078>.
- [31] Dragoo JL, Shapiro SA, Bradsell H, Frank RM. The essential roles of human adipose tissue: Metabolic, thermoregulatory, cellular, and paracrine effects. *J Cartil Jt Preserv* 2021;1:100023. <https://doi.org/10.1016/j.jcjp.2021.100023>.
- [32] Scheja L, Heeren J. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nat Rev Endocrinol* 2019;15:507–24. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0230-6>.
- [33] Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10:24–36. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.204>.
- [34] Wang W, Seale P. Control of brown and beige fat development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016;17:691–702. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.96>.
- [35] adipòcit. *Gran Enciclopèdia Catalana* n.d.
- [36] Langin D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *PharmacolRes* 2006;53:482–91.
- [37] Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *ProcNutrSoc* 2001;60:329–39.
- [38] Chait A, den Hartigh LJ. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease . *Front Cardiovasc Med* 2020;7:22.
- [39] Kajimura S, Spiegelman BM, Seale P. Brown and beige fat: physiological roles beyond heat generation. *Cell Metab* 2015;22:546–59.
- [40] Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Metab* 2007.
- [41] Villarroya J, Cereijo R, Villarroya F. An endocrine role for brown adipose tissue? *Am J Physiol Metab* 2013;305:E567–72. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00250.2013>.
- [42] Cremieux PY, Ledoux S, Clerici C, Cremieux F, Buessing M. The impact of bariatric surgery on comorbidities and medication use among obese patients. *ObesSurg* 2010;20:861–70.
- [43] Peluso L, Vanek VW. Efficacy of gastric bypass in the treatment of obesity-related comorbidities. *NutrClinPract* 2007;22:22–8.
- [44] Pardina Arrese E. Comorbilitats associades a l'obesitat mòrbida i la seva evolució amb la cirurgia bariàtrica: diabetis, dislipèmia i esteatosi hepàtica. Universitat de Barcelona, 2012.
- [45] Dyson PA. The therapeutics of lifestyle management on obesity. *Diabetes Obes Metab* 2010;12:941–6. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01256.x>.
- [46] Poirier P, Giles TD, BRAY GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical. *Circulation* 2006;113:898–918.

BIBLIOGRAFIA

- [47] Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* (London, England) 2014;384:766–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60460-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60460-8).
- [48] Bakris GL, Sorrentino MJ. *Hypertension : a companion to Braunwald's heart disease* 2018.
- [49] World Health Organization. *Hypertension. Key facts*. 2019. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/hypertension> (accessed January 2, 2022).
- [50] LOZANO JA. Hipertensión arterial. Prevención y tratamiento. *Offarm* 2001;20:75–87.
- [51] Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486–97. <https://doi.org/10.1001/jama.285.19.2486>.
- [52] Thomas U, Claudio B, Fadi C, A. KN, R. PN, Dorairaj P, et al. 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. *Hypertension* 2020;75:1334–57. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15026>.
- [53] Schillaci G, Pirro M, Vaudo G, Gemelli F, Marchesi S, Porcellati C, et al. Prognostic value of the metabolic syndrome in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1817–22. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2003.12.049>.
- [54] Gyamfi D, Ofori Awuah E, Owusu S. Chapter 2 - Lipid Metabolism: An Overview. In: Patel VBBT-TMN of F, editor., Academic Press; 2019, p. 17–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811297-7.00002-0>.
- [55] McEvoy JW, Whelton Seamus P., Blumenthal RS. 38 - Dyslipidemia. In: Bakris GL, Sorrentino MJBT-HAC to BHD (Third E, editors., Elsevier; 2018, p. 353–60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42973-3.00038-X>.
- [56] Wengrofsky P, Lee J, N. Makaryus A. Dyslipidemia and Its Role in the Pathogenesis of Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Implications for Evaluation and Targets for Treatment of Dyslipidemia Based on Recent Guidelines. In: I. McFarlane S, editor. *Dyslipidemia*, IntechOpen; 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85772>.
- [57] Lozano JA. Dislipidemias. *Offarm* 2005;24:100–8.
- [58] Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J* 2020;41:111–88. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz455>.
- [59] Ference BA, Kastelein JJP, Catapano AL. Lipids and Lipoproteins in 2020. *JAMA* 2020;324:595–6. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.5685>.
- [60] Noels H, Lehrke M, Vanholder R, Jankowski J. Lipoproteins and fatty acids in chronic kidney disease: molecular and metabolic alterations. *Nat Rev Nephrol* 2021;17:528–42. <https://doi.org/10.1038/s41581-021-00423-5>.
- [61] Xiao C, Stahel P, Lewis GF. Regulation of Chylomicron Secretion: Focus on

BIBLIOGRAFIA

- Post-Assembly Mechanisms. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2019;7:487–501. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.10.015>.
- [62] Soppert J, Lehrke M, Marx N, Jankowski J, Noels H. Lipoproteins and lipids in cardiovascular disease: from mechanistic insights to therapeutic targeting. *Adv Drug Deliv Rev* 2020;159:4–33. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.019>.
- [63] Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, et al., editors., South Dartmouth (MA): 2000.
- [64] King MW. *Integrative Medical Biochemistry: Examination and Board Review*, McGraw-Hill Education; 2014, p. 912. <https://doi.org/doi:10.1036/9780071832755>.
- [65] Jomard A, Osto E. High Density Lipoproteins: Metabolism, Function, and Therapeutic Potential. *Front Cardiovasc Med* 2020;7:39. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00039>.
- [66] Brewer HBJ, Remaley AT, Neufeld EB, Basso F, Joyce C. Regulation of plasma high-density lipoprotein levels by the ABCA1 transporter and the emerging role of high-density lipoprotein in the treatment of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1755–60. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000142804.27420.5b>.
- [67] Organization WH. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications : report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus n.d.
- [68] World Health Organization. HEARTS D: diagnosis and management of type 2 diabetes. Geneva PP - Geneva: World Health Organization; n.d.
- [69] Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies². *Lancet* 2010;375:2215–22.
- [70] Frühbeck G, Toplak H, Woodward E, Yumuk V, Maislos M, Oppert J-M. Obesity: the gateway to ill health - an EASO position statement on a rising public health, clinical and scientific challenge in Europe. *Obes Facts* 2013;6:117–20. <https://doi.org/10.1159/000350627>.
- [71] Upadhyay J, Farr O, Perakakis N, Ghaly W, Mantzoros C. Obesity as a Disease. *Med Clin North Am* 2018;102:13–33. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2017.08.004>.
- [72] Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997;20:1183–97. <https://doi.org/10.2337/diacare.20.7.1183>.
- [73] Yazıcı D, Sezer H. Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity. *Adv Exp Med Biol* 2017;960:277–304. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_12.
- [74] Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Prim* 2019;5:56. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>.
- [75] Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull WJ, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular

BIBLIOGRAFIA

- Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995;92:1355–74. <https://doi.org/10.1161/01.cir.92.5.1355>.
- [76] Patriitti JP, Deferrari A, Patriitti Isasi JJ. Diagnóstico no invasivo de la aterosclerosis subclínica: Riesgo cardiovascular. *Arch Med Interna* 2009;31:3–10.
- [77] Thomas H, Diamond J, Vieco A, Chaudhuri S, Shinnar E, Cromer S, et al. Global Atlas of Cardiovascular Disease 2000-2016: The Path to Prevention and Control. *Glob Heart* 2018;13:143–63. <https://doi.org/10.1016/j.gheart.2018.09.511>.
- [78] Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.04.052>.
- [79] Institute for Health Metrics and Evaluation Global Burden of Disease. DEATHS - CARDIOVASCULAR DISEASES - SEX: BOTH - AGE: AGE-STANDARDIZED (RATE). *Glob Burd Dis Collab Network Glob Burd Dis Study 2019 (GBD 2019) Results* Seattle, United States Inst Heal Metrics Eval 2019. <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool> (accessed May 3, 2022).
- [80] World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs), key facts 2021. [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (accessed May 3, 2022).
- [81] Barquera S, Pedroza-Tobías A, Medina C, Hernández-Barrera L, Bibbins-Domingo K, Lozano R, et al. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Arch Med Res* 2015;46:328–38.
- [82] Biasillo G, Leo M, Della Bona R, Biasucci LM. Inflammatory biomarkers and coronary heart disease: from bench to bedside and back. *Intern Emerg Med* 2010;5:225–33. <https://doi.org/10.1007/s11739-010-0361-1>.
- [83] Harter K, Levine M, Henderson SO. Anticoagulation drug therapy: a review. *West J Emerg Med* 2015;16:11–7. <https://doi.org/10.5811/westjem.2014.12.22933>.
- [84] Mostaza JM, Pintó X, Armario P, Masana L, Ascaso JF, Valdivielso P. Standards for global cardiovascular risk management arteriosclerosis. *Clin e Investig En Arterioscler Publ Of La Soc Esp Arterioscler* 2019;31 Suppl 1:1–43. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2019.03.004>.
- [85] Fedder DO, Koro CE, L'Italien GJ. New National Cholesterol Education Program III guidelines for primary prevention lipid-lowering drug therapy: projected impact on the size, sex, and age distribution of the treatment-eligible population. *Circulation* 2002;105:152–6. <https://doi.org/10.1161/hc0202.101971>.
- [86] Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen M-R, Wiklund O, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J* 2011;32:1769–818. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr158>.
- [87] Gupta KK, Ali S, Sanghera RS. Pharmacological Options in Atherosclerosis: A Review of the Existing Evidence. *Cardiol Ther* 2019;8:5–20. <https://doi.org/10.1007/s40119-018-0123-0>.
- [88] Phan BAP, Dayspring TD, Toth PP. Ezetimibe therapy: mechanism of action and

BIBLIOGRAFIA

- clinical update. *Vasc Health Risk Manag* 2012;8:415–27. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S33664>.
- [89] Fazio S, Linton MF. The role of fibrates in managing hyperlipidemia: mechanisms of action and clinical efficacy. *Curr Atheroscler Rep* 2004;6:148–57. <https://doi.org/10.1007/s11883-004-0104-8>.
- [90] Blood pressure-lowering treatment based on cardiovascular risk: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet (London, England)* 2014;384:591–8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61212-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61212-5).
- [91] Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, et al. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* 2019;140:e596–646. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000678>.
- [92] Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol* 2020;76:2982–3021. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>.
- [93] KANNEL WB, DAWBER TR, KAGAN A, REVOTSKIE N, STOKES J 3rd. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1961;55:33–50. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-55-1-33>.
- [94] Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 2003;24:987–1003. [https://doi.org/10.1016/s0195-668x\(03\)00114-3](https://doi.org/10.1016/s0195-668x(03)00114-3).
- [95] North BJ, Sinclair DA. The intersection between aging and cardiovascular disease. *Circ Res* 2012;110:1097–108. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.246876>.
- [96] Strong JP, Malcom GT, McMahan CA, Tracy RE, Newman WP 3rd, Herderick EE, et al. Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: implications for prevention from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study. *JAMA* 1999;281:727–35. <https://doi.org/10.1001/jama.281.8.727>.
- [97] Viña J, Borrás C, Gambini J, Sastre J, Pallardó F V. Why females live longer than males: control of longevity by sex hormones. *Sci Aging Knowledge Environ* 2005;2005:pe17. <https://doi.org/10.1126/sageke.2005.23.pe17>.
- [98] Farley TM, Collins J, Schlesselman JJ. Hormonal contraception and risk of cardiovascular disease. An international perspective. *Contraception* 1998;57:211–30. [https://doi.org/10.1016/s0010-7824\(98\)00019-5](https://doi.org/10.1016/s0010-7824(98)00019-5).
- [99] Zhou B, Perel P, Mensah GA, Ezzati M. Global epidemiology, health burden and effective interventions for elevated blood pressure and hypertension. *Nat Rev Cardiol* 2021. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00559-8>.
- [100] Iglesias Cubero G, Rodríguez Reguero J, Barriales Alvarez V. [Coronary risk factors]. *Med Clin (Barc)* 1995;104:142–7.
- [101] Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res* 2016;118:535–46.

BIBLIOGRAFIA

- <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307611>.
- [102] Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* (London, England) 2002;360:1903–13. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(02\)11911-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(02)11911-8).
- [103] Safar ME, Levy BI, Struijker-Boudier H. Current Perspectives on Arterial Stiffness and Pulse Pressure in Hypertension and Cardiovascular Diseases. *Circulation* 2003;107:2864–9. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000069826.36125.B4>.
- [104] Ebrahim S. Detection, adherence and control of hypertension for the prevention of stroke: a systematic review. *Health Technol Assess* 1998;2:i–iv, 1–78.
- [105] Messerli FH, Williams B, Ritz E. Essential hypertension. *Lancet* (London, England) 2007;370:591–603. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61299-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61299-9).
- [106] Basatemur GL, Jørgensen HF, Clarke MCH, Bennett MR, Mallat Z. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2019;16:727–44. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0227-9>.
- [107] Otter W, Kleybrink S, Doering W, Standl E, Schnell O. Hospital outcome of acute myocardial infarction in patients with and without diabetes mellitus. *Diabet Med* 2004;21:183–7. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2004.01114.x>.
- [108] Norhammar A, Malmberg K, Diderholm E, Lagerqvist B, Lindahl B, Rydén L, et al. Diabetes mellitus: the major risk factor in unstable coronary artery disease even after consideration of the extent of coronary artery disease and benefits of revascularization. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:585–91. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2003.08.050>.
- [109] Diabetes Mellitus, Fasting Glucose, and Risk of Cause-Specific Death. *N Engl J Med* 2011;364:829–41. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1008862>.
- [110] Libby P, Plutzky J. Diabetic macrovascular disease: the glucose paradox? *Circulation* 2002;106:2760–3. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000037282.92395.ae>.
- [111] Moini J. Chapter 3 - Pathophysiology of Diabetes. In: Moini JBT-E of D, editor., Elsevier; 2019, p. 25–43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816864-6.00003-1>.
- [112] Ferroni P, Basili S, Falco A, Davì G. Platelet activation in type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Haemost* 2004;2:1282–91. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00836.x>.
- [113] DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Prim* 2015;1:15019. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>.
- [114] Howard B V. Insulin resistance and lipid metabolism. *Am J Cardiol* 1999;84:28J-32J. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(99\)00355-0](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(99)00355-0).
- [115] Xavier R, Sergio R-R, Belén O, Fátima S-C, M. G-RJ, Francisca C, et al. Glycated Hemoglobin and Subclinical Atherosclerosis in People Without Diabetes. *J Am Coll Cardiol* 2021;77:2777–91. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.03.335>.
- [116] Havel RJ. Plasma Lipoproteins and Atherosclerosis: Accomplishments and

BIBLIOGRAFIA

- Opportunities. *Cell* 2000;101:152–3. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80825-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80825-9).
- [117] Goff DCJ, Bertoni AG, Kramer H, Bonds D, Blumenthal RS, Tsai MY, et al. Dyslipidemia prevalence, treatment, and control in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA): gender, ethnicity, and coronary artery calcium. *Circulation* 2006;113:647–56. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.552737>.
- [118] Borén J, Chapman MJ, Krauss RM, Packard CJ, Bentzon JF, Binder CJ, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J* 2020;41:2313–30. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz962>.
- [119] Ballantyne CM. Low-density lipoproteins and risk for coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1998;82:3Q-12Q. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(98\)00769-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(98)00769-3).
- [120] Rodríguez Á, J M, Blasco-Valle M, Escanilla F. Guía Clínica para la Detección, Diagnóstico y Tratamiento de la Dislipemia Aterogénica en Atención Primaria. 2013. Sociedad Española de Arteriosclerosis (SEA), Sociedad Española de Médicos de Atención Primaria (SEMERGEN), Sociedad Española de Medicina de . 2013.
- [121] Holmes M V, Ala-Korpela M. What is ‘LDL cholesterol’? *Nat Rev Cardiol* 2019;16:197–8. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0157-6>.
- [122] Eckel RH. What is it about very low density lipoproteins (VLDL) and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus: is it the triglycerides or the cholesterol? *Atherosclerosis* 2014;237:138–9.
- [123] Berrougui H, Momo CN, Khalil A. Health benefits of high-density lipoproteins in preventing cardiovascular diseases. *J Clin Lipidol* 2012;6:524–33. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2012.04.004>.
- [124] Stehbens WE. Coronary heart disease, hypercholesterolemia, and atherosclerosis. II. Misrepresented data. *Exp Mol Pathol* 2001;70:120–39. <https://doi.org/10.1006/exmp.2000.2339>.
- [125] Talayero BG, Sacks FM. The role of triglycerides in atherosclerosis. *Curr Cardiol Rep* 2011;13:544–52. <https://doi.org/10.1007/s11886-011-0220-3>.
- [126] JBS 2: Joint British Societies’ guidelines on prevention of cardiovascular disease in clinical practice. *Heart* 2005;91 Suppl 5:v1-52. <https://doi.org/10.1136/hrt.2005.079988>.
- [127] Stevens J, Cai J, Pamuk ER, Williamson DF, Thun MJ, Wood JL. The effect of age on the association between body-mass index and mortality. *N Engl J Med* 1998;338:1–7. <https://doi.org/10.1056/NEJM199801013380101>.
- [128] Kibble J, Halsey C. *Medical Physiology : The Big Picture*. 2nd ed., New York: McGraw Hill; 2009.
- [129] Humphrey JD, McCulloch AD. *The Cardiovascular System — Anatomy, Physiology and Cell Biology*. Vienna: Springer; 2003. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-7091-2736-0_1.
- [130] Moreno PR, Purushothaman KR, Zias E, Sanz J, Fuster V. Neovascularization in human atherosclerosis. *Curr Mol Med* 2006;6:457–77.

BIBLIOGRAFIA

- [131] Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD. Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev* 2019;2019:8563845. <https://doi.org/10.1155/2019/8563845>.
- [132] Niland JAE and S. The Extracellular Matrix of Blood Vessels. *Curr Pharm Des* 2009;15:1385–400. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/138161209787846757>.
- [133] Servier Medical. Drawing Layers of artery - no labels. Netherlands, Leiden – Leiden Univ Med Cent 2021. <https://anatomytool.org/content/servier-drawing-layers-artery-no-labels> (accessed December 5, 2021).
- [134] Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* 2019;176:1248–64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>.
- [135] Akwii RG, Sajib MS, Zahra FT, Mikelis CM. Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Cells* 2019;8:471. <https://doi.org/10.3390/cells8050471>.
- [136] McGregor CE, English AW. The Role of BDNF in Peripheral Nerve Regeneration: Activity-Dependent Treatments and Val66Met. *Front Cell Neurosci* 2018;12:522. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00522>.
- [137] De Vincenti AP, Ríos AS, Paratcha G, Ledda F. Mechanisms That Modulate and Diversify BDNF Functions: Implications for Hippocampal Synaptic Plasticity. *Front Cell Neurosci* 2019;13:135. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00135>.
- [138] Kermani P, Hempstead B. Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17:140–3. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2007.03.002>.
- [139] Koshida R, Ou J, Matsunaga T, Chilian WM, Oldham KT, Ackerman AW, et al. Angiostatin. *Circulation* 2003;107:803–6. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000057551.88851.09>.
- [140] Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium; Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis* 2016;248:97–109. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007>.
- [141] Li Y-H, Shi G-Y, Wu H-L. The role of thrombomodulin in atherosclerosis: from bench to bedside. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2006;4:183–7. <https://doi.org/10.2174/187152506776369953>.
- [142] Gkaliagkousi E, Ferro A. Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011;16:1873–97. <https://doi.org/10.2741/3828>.
- [143] Thorin E, Webb DJ. Endothelium-derived endothelin-1. *Pflugers Arch* 2010;459:951–8. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0763-y>.
- [144] Yuan S, Rigor R. The Endothelial Barrier. *Regul. Endothel. Barrier Funct.*, San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.
- [145] Alphonse CS, Rodseth RN. The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier. *Anaesthesia* 2014;69:777–84. <https://doi.org/10.1111/anae.12661>.
- [146] Davignon J, Ganz P. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III-27-III-32.

- <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000131515.03336.f8>.
- [147] Alexander Y, Osto E, Schmidt-Trucksäss A, Shechter M, Trifunovic D, Duncker DJ, et al. Endothelial function in cardiovascular medicine: a consensus paper of the European Society of Cardiology Working Groups on Atherosclerosis and Vascular Biology, Aorta and Peripheral Vascular Diseases, Coronary Pathophysiology and Microcirculation, and Thr. *Cardiovasc Res* 2021;117:29–42. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa085>.
- [148] Sima A V, Stancu CS, Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis. *Cell Tissue Res* 2009;335:191–203. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0678-5>.
- [149] Lähteenvuo J, Rosenzweig A. Effects of aging on angiogenesis. *Circ Res* 2012;110:1252–64. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.246116>.
- [150] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;473:298–307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>.
- [151] Gimbrone Jr MA, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* 2016;118:620–36. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301>.
- [152] Yin M, Li C, Jiang J, Le J, Luo B, Yang F, et al. Cell adhesion molecule-mediated therapeutic strategies in atherosclerosis: From a biological basis and molecular mechanism to drug delivery nanosystems. *Biochem Pharmacol* 2021;186:114471. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114471>.
- [153] Dehghani T, Panitch A. Endothelial cells, neutrophils and platelets: getting to the bottom of an inflammatory triangle. *Open Biol* 2020;10:200161. <https://doi.org/10.1098/rsob.200161>.
- [154] McEver RP. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res* 2015;107:331–9. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv154>.
- [155] Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature* 2021;592:524–33. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03392-8>.
- [156] Ravani A, Werba JP, Frigerio B, Sansaro D, Amato M, Tremoli E, et al. Assessment and relevance of carotid intima-media thickness (C-IMT) in primary and secondary cardiovascular prevention. *Curr Pharm Des* 2015;21:1164–71. <https://doi.org/10.2174/1381612820666141013121545>.
- [157] Touboul P-J, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, et al. Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, . *Cerebrovasc Dis* 2012;34:290–6. <https://doi.org/10.1159/000343145>.
- [158] Xu J, Lu X, Shi GP. Vasa vasorum in atherosclerosis and clinical significance. *Int J Mol Sci* 2015;16:574–608.
- [159] Michelsen MM, Mygind ND, Pena A, Aziz A, Frestad D, Host N, et al. Peripheral Reactive Hyperemia Index and Coronary Microvascular Function in Women With no Obstructive CAD: The iPOWER Study. *JACC Cardiovasc Imaging* 2016;9:411–7.
- [160] Wilkinson IB, Hall IR, MacCallum H, Mackenzie IS, McEniery CM, van der Arend BJ, et al. Pulse-wave analysis: clinical evaluation of a noninvasive, widely

BIBLIOGRAFIA

- applicable method for assessing endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:147–52. <https://doi.org/10.1161/hq0102.101770>.
- [161] Hughes AD, Park C, Davies J, Francis D, McG Thom SA, Mayet J, et al. Limitations of Augmentation Index in the Assessment of Wave Reflection in Normotensive Healthy Individuals. *PLoS One* 2013;8:e59371.
- [162] Axtell AL, Gomari FA, Cooke JP. Assessing endothelial vasodilator function with the Endo-PAT 2000. *J Vis Exp* 2010;15.
- [163] Rosenberry R, Nelson MD. Reactive hyperemia: a review of methods, mechanisms, and considerations. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 2020;318:R605–18. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00339.2019>.
- [164] Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes Jr. DR, Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:2137–41.
- [165] Botts SR, Fish JE, Howe KL. Dysfunctional Vascular Endothelium as a Driver of Atherosclerosis: Emerging Insights Into Pathogenesis and Treatment. *Front Pharmacol* 2021;12:787541. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.787541>.
- [166] Melaku L, Dabi A. The cellular biology of atherosclerosis with atherosclerotic lesion classification and biomarkers. *Bull Natl Res Cent* 2021;45:225. <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00685-w>.
- [167] Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature* 2021;592:524–33. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03392-8>.
- [168] Nelson JR, Wani O, May HT, Budoff M. Potential benefits of eicosapentaenoic acid on atherosclerotic plaques. *Vascul Pharmacol* 2017;91:1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.02.004>.
- [169] Jebari-Benslaiman S, Galicia-García U, Larrea-Sebal A, Olaetxea JR, Alloza I, Vandembroeck K, et al. Pathophysiology of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* 2022;23:3346. <https://doi.org/10.3390/ijms23063346>.
- [170] Insull WJ. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med* 2009;122:S3–14. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2008.10.013>.
- [171] Saam T, Hatsukami TS, Takaya N, Chu B, Underhill H, Kerwin WS, et al. The vulnerable, or high-risk, atherosclerotic plaque: noninvasive MR imaging for characterization and assessment. *Radiology* 2007;244:64–77. <https://doi.org/10.1148/radiol.2441051769>.
- [172] Fishbein MC. The vulnerable and unstable atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Pathol* 2010;19:6–11. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2008.08.004>.
- [173] Inay K, Abbas A, Nelson F, Aster J. *Blood vessels: Atherosclerosis*. *Pathol. Basis Dis.*, Saunders; 2009.
- [174] Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem* 2012;68:701–11.
- [175] Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 2011;12:3117–32.
- [176] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J*

- Biochem Cell Biol 2007;39:44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.
- [177] Toyokuni S, Akatsuka S. Pathological investigation of oxidative stress in the post-genomic era. *Pathol Int* 2007;57:461–73. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2007.02127.x>.
- [178] Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2021;20:689–709. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1>.
- [179] Hayden MR, Tyagi SC. Intimal redox stress: accelerated atherosclerosis in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Atheroscleropathy. Cardiovasc Diabetol* 2002;1:3. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-1-3>.
- [180] Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med* 2018;54:287–93. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.
- [181] Fridovich I. SUPEROXIDE RADICAL AND SUPEROXIDE DISMUTASES. *Annu Rev Biochem* 1995;64:97–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>.
- [182] Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:192–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>.
- [183] Furlong CE, Marsillach J, Jarvik GP, Costa LG. Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their functions? *Chem Biol Interact* 2016;259:51–62. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.036>.
- [184] Litvinov D, Mahini H, Garelnabi M. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases. *N Am J Med Sci* 2012;4:523–32. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.103310>.
- [185] Bäck M, Yurdagul A, Tabas I, Öörni K, Kovanen PT. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cardiol* 2019;16:389–406. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0169-2>.
- [186] Keaney JF, Vita JA. The Value of Inflammation for Predicting Unstable Angina. *N Engl J Med* 2002;347:55–7. <https://doi.org/10.1056/NEJM200207043470112>.
- [187] Nigro E, Scudiero O, Monaco ML, Palmieri A, Mazzarella G, Costagliola C, et al. New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. *Biomed Res Int* 2014;2014:658913. <https://doi.org/10.1155/2014/658913>.
- [188] Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7:941–6. <https://doi.org/10.1038/90984>.
- [189] Lau DCW, Dhillon B, Yan H, Szmítko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H2031-41. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01058.2004>.
- [190] Kokkinos J, Tang S, Rye K-A, Ong KL. The role of fibroblast growth factor 21 in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2017;257:259–65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.11.033>.
- [191] Tabari FS, Karimian A, Parsian H, Rameshknia V, Mahmoodpour A, Majidinia M, et al. The roles of FGF21 in atherosclerosis pathogenesis. *Rev Endocr Metab*

BIBLIOGRAFIA

- Disord 2019;20:103–14. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09488-x>.
- [192] Hartman J, Frishman WH. Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. *Cardiol Rev* 2014;22:147–51. <https://doi.org/10.1097/CRD.0000000000000021>.
- [193] Villar-Fincheira P, Sanhueza-Olivares F, Norambuena-Soto I, Cancino-Arenas N, Hernandez-Vargas F, Troncoso R, et al. Role of Interleukin-6 in Vascular Health and Disease. *Front Mol Biosci* 2021;8:79.
- [194] Nehring SM, Goyal A, Bansal P, Patel BC. *C Reactive Protein.*, Treasure Island (FL): 2021.
- [195] Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:49–62. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.169>.
- [196] Sethi JK, Hotamisligil GS. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. *Nat Metab* 2021;3:1302–12. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00470-z>.
- [197] McKellar GE, McCarey DW, Sattar N, McInnes IB. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nat Rev Cardiol* 2009;6:410–7. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2009.57>.
- [198] Pan WW, Myers MG. Leptin and the maintenance of elevated body weight. *Nat Rev Neurosci* 2018;19:95–105. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.168>.
- [199] Raman P, Khanal S. Leptin in Atherosclerosis: Focus on Macrophages, Endothelial and Smooth Muscle Cells. *Int J Mol Sci* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22115446>.
- [200] Liberale L, Bonaventura A, Vecchiè A, Casula M, Dallegri F, Montecucco F, et al. The Role of Adipocytokines in Coronary Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2017;19:10. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0644-3>.
- [201] Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Vilariño-García T, Sánchez-Margalet V. Role of Leptin in Inflammation and Vice Versa. *Int J Mol Sci* 2020;21:5887. <https://doi.org/10.3390/ijms21165887>.
- [202] Cybulska B, Kłosiewicz-Latoszek L, Penson PE, Banach M. What do we know about the role of lipoprotein(a) in atherogenesis 57 years after its discovery? *Prog Cardiovasc Dis* 2020;63:219–27. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2020.04.004>.
- [203] Liu T, Yoon W-S, Lee S-R. Recent Updates of Lipoprotein(a) and Cardiovascular Disease. *Chonnam Med J* 2021;57:36–43. <https://doi.org/10.4068/cmj.2021.57.1.36>.
- [204] de Nooijer R, Verkleij CJN, von der Thüsen JH, Jukema JW, van der Wall EE, van Berkel TJC, et al. Lesional Overexpression of Matrix Metalloproteinase-9 Promotes Intraplaque Hemorrhage in Advanced Lesions But Not at Earlier Stages of Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:340–6. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000197795.56960.64>.
- [205] Amersfoort J, Schaftenaar FH, Douna H, van Santbrink PJ, Kröner MJ, van Puijvelde GHM, et al. Lipocalin-2 contributes to experimental atherosclerosis in a stage-dependent manner. *Atherosclerosis* 2018;275:214–24. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.06.015>.

BIBLIOGRAFIA

- [206] Ebbert JO, Jensen MD. Fat depots, free fatty acids, and dyslipidemia. *Nutrients* 2013;5:498–508. <https://doi.org/10.3390/nu5020498>.
- [207] I. S. Sobczak A, A. Blindauer C, J. Stewart A. Changes in Plasma Free Fatty Acids Associated with Type-2 Diabetes. *Nutr* 2019;11. <https://doi.org/10.3390/nu11092022>.
- [208] Fuertes-Martín R, Taverner D, Vallvé J-C, Paredes S, Masana L, Correig Blanchar X, et al. Characterization of (1)H NMR Plasma Glycoproteins as a New Strategy To Identify Inflammatory Patterns in Rheumatoid Arthritis. *J Proteome Res* 2018;17:3730–9. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00411>.
- [209] Fuertes-Martín R, Moncayo S, Insenser M, Martínez-García MÁ, Luque-Ramírez M, Grau NA, et al. Glycoprotein A and B Height-to-Width Ratios as Obesity-Independent Novel Biomarkers of Low-Grade Chronic Inflammation in Women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *J Proteome Res* 2019;18:4038–45. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00528>.
- [210] Malo A-I, Rull A, Girona J, Domingo P, Fuertes-Martín R, Amigó N, et al. Glycoprotein Profile Assessed by 1H-NMR as a Global Inflammation Marker in Patients with HIV Infection. A Prospective Study. *J Clin Med* 2020;9. <https://doi.org/10.3390/jcm9051344>.
- [211] Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., editors. No Title. Cold Spring Harbor (NY): 2015.
- [212] Fuertes-Martín R, Correig X, Vallvé J-C, Amigó N. Title: Human Serum/Plasma Glycoprotein Analysis by (1)H-NMR, an Emerging Method of Inflammatory Assessment. *J Clin Med* 2020;9. <https://doi.org/10.3390/jcm9020354>.
- [213] Otvos J, Shalaurova I, Wolak-Dinsmore J, Connelly M, Mackey R, Stein J, et al. GlycA: A Composite Nuclear Magnetic Resonance Biomarker of Systemic Inflammation. *Clin Chem* 2015;61. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.232918>.
- [214] Hsu SH, Ghoshal K. MicroRNAs in Liver Health and Disease. *CurrPathobiolRep* 2013;1:53–62.
- [215] Huang Y, Shen XJ, Zou Q, Wang SP, Tang SM, Zhang GZ. Biological functions of microRNAs: a review. *J Physiol Biochem* 2011;67:129–39. <https://doi.org/10.1007/s13105-010-0050-6>.
- [216] O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation . *Front Endocrinol* 2018;9:402.
- [217] Churov A, Summerhill V, Grechko A, Orekhova V, Orekhov A. MicroRNAs as Potential Biomarkers in Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* 2019;20:5547. <https://doi.org/10.3390/ijms20225547>.
- [218] Santovito D, Mezzetti A, Cipollone F. MicroRNAs and atherosclerosis: new actors for an old movie. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22:937–43. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2012.03.007>.
- [219] Zhou S, Jin J, Wang J, Zhang Z, Freedman JH, Zheng Y, et al. miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacol Sin* 2018;39:1073–84. <https://doi.org/10.1038/aps.2018.30>.
- [220] Kim M, Zhang X. The Profiling and Role of miRNAs in Diabetes Mellitus. *J Diabetes Clin Res* 2019;1:5–23. <https://doi.org/10.33696/diabetes.1.003>.

BIBLIOGRAFIA

- [221] Deiluiis JA. MicroRNAs as regulators of metabolic disease: pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *Int J Obes (Lond)* 2016;40:88–101. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.170>.
- [222] Li Y, Kowdley K V. MicroRNAs in common human diseases. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2012;10:246–53. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2012.07.005>.
- [223] Estrella Ibarra P, García-Solís P, Solís-Sáinz JC, Cruz-Hernández A. Expression of miRNA in obesity and insulin resistance: a review. *Endokrynol Pol* 2021;72:73–80. <https://doi.org/10.5603/EP.a2021.0002>.
- [224] Zhang R, Wang D, Xia Z, Chen C, Cheng P, Xie H, et al. The role of microRNAs in adipocyte differentiation. *Front Med* 2013;7:223–30. <https://doi.org/10.1007/s11684-013-0252-8>.
- [225] Kasiappan R, Rajarajan D. Role of MicroRNA Regulation in Obesity-Associated Breast Cancer: Nutritional Perspectives. *Adv Nutr* 2017;8:868–88. <https://doi.org/10.3945/an.117.015800>.
- [226] Tang X, Tang G, Özcan S. Role of microRNAs in diabetes. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 2008;1779:697–701. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2008.06.010>.
- [227] Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. Role of microRNAs in obesity and the metabolic syndrome. *ObesRev* 2010;11:354–61.
- [228] Heneghan HM, Miller N, McAnena OJ, O'Brien T, Kerin MJ. Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E846–50.
- [229] Beermann J, Piccoli M-T, Viereck J, Thum T. Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches. *Physiol Rev* 2016;96:1297–325. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2015>.
- [230] Condorelli G, Latronico MVG, Cavarretta E. microRNAs in cardiovascular diseases: current knowledge and the road ahead. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:2177–87. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.01.050>.
- [231] Feinberg MW, Moore KJ. MicroRNA Regulation of Atherosclerosis. *Circ Res* 2016;118:703–20. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306300>.
- [232] Madrigal-Matute J, Rotllan N, Aranda JF, Fernández-Hernando C. MicroRNAs and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2013;15:322. <https://doi.org/10.1007/s11883-013-0322-z>.
- [233] Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012;481:463–8. <https://doi.org/10.1038/nature10777>.
- [234] Novelle MG, Contreras C, Romero-Picó A, López M, Diéguez C. Irisin, two years later. *Int J Endocrinol* 2013;2013:746281. <https://doi.org/10.1155/2013/746281>.
- [235] Jia J, Yu F, Wei W-P, Yang P, Zhang R, Sheng Y, et al. Relationship between circulating irisin levels and overweight/obesity: A meta-analysis. *World J Clin Cases* 2019;7:1444–55. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v7.i12.1444>.
- [236] Anandakumar P, Debela T. A Review on the Role of Irisin in Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus. *J Pharmacopuncture* 2017;20:235–42.

- <https://doi.org/10.3831/KPI.2017.20.029>.
- [237] Zhang C, Ding Z, Lv G, Li J, Zhou P, Zhang J. Lower irisin level in patients with type 2 diabetes mellitus: A case-control study and meta-analysis. *J Diabetes* 2016;8:56–62. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12256>.
- [238] Xiong X-Q, Chen D, Sun H-J, Ding L, Wang J-J, Chen Q, et al. FNDC5 overexpression and irisin ameliorate glucose/lipid metabolic derangements and enhance lipolysis in obesity. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852:1867–75. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.06.017>.
- [239] Zhu D, Wang H, Zhang J, Zhang X, Xin C, Zhang F, et al. Irisin improves endothelial function in type 2 diabetes through reducing oxidative/nitrative stresses. *J Mol Cell Cardiol* 2015;87:138–47. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.07.015>.
- [240] Demirpence M, Yilmaz H, Colak A, Yalcin H, Toprak B, Turkon H, et al. The effect of sleeve gastrectomy on serum irisin levels in patients with morbid obesity. *EndokrynolPol* 2016;67:481–6.
- [241] Blüher S, Panagiotou G, Petroff D, Markert J, Wagner A, Klemm T, et al. Effects of a 1-year exercise and lifestyle intervention on irisin, adipokines, and inflammatory markers in obese children. *Obesity (Silver Spring)* 2014;22:1701–8. <https://doi.org/10.1002/oby.20739>.
- [242] Sanchis-Gomar F, Lippi G, Mayero S, Perez-Quilis C, García-Giménez JL. Irisin: a new potential hormonal target for the treatment of obesity and type 2 diabetes. *J Diabetes* 2012;4:196. <https://doi.org/10.1111/j.1753-0407.2012.00194.x>.
- [243] Zhang Y, Li R, Meng Y, Li S, Donelan W, Zhao Y, et al. Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling. *Diabetes* 2014;63:514–25. <https://doi.org/10.2337/db13-1106>.
- [244] Hou N, Han F, Sun X. The relationship between circulating irisin levels and endothelial function in lean and obese subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015;83:339–43. <https://doi.org/10.1111/cen.12658>.
- [245] Belviranlı M, Okudan N, Çelik F. Association of Circulating Irisin with Insulin Resistance and Oxidative Stress in Obese Women. *Horm Metab Res = Horm Und Stoffwechselforsch = Horm Metab* 2016;48:653–7. <https://doi.org/10.1055/s-0042-116155>.
- [246] Byun K, Lee S. The Potential Role of Irisin in Vascular Function and Atherosclerosis: A Review. *Int J Mol Sci* 2020;21. <https://doi.org/10.3390/ijms21197184>.
- [247] Mallol R, Amigo N, Rodriguez MA, Heras M, Vinaixa M, Plana N, et al. Liposcale: a novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion-ordered 1H NMR spectroscopy. *J Lipid Res* 2015;56:737–46. <https://doi.org/10.1194/jlr.D050120>.
- [248] Aday AW, Lawler PR, Cook NR, Ridker PM, Mora S, Pradhan AD. Lipoprotein Particle Profiles, Standard Lipids, and Peripheral Artery Disease Incidence. *Circulation* 2018;138:2330–41. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035432>.
- [249] Mora S, Glynn RJ, Ridker PM. High-density lipoprotein cholesterol, size, particle number, and residual vascular risk after potent statin therapy. *Circulation* 2013;128:1189–97. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002671>.

BIBLIOGRAFIA

- [250] Brunzell JD, Davidson M, Furberg CD, Goldberg RB, Howard B V, Stein JH, et al. Lipoprotein management in patients with cardiometabolic risk: consensus statement from the American Diabetes Association and the American College of Cardiology Foundation. *Diabetes Care* 2008;31:811–22. <https://doi.org/10.2337/dc08-9018>.
- [251] Holmes M V, Millwood IY, Kartsonaki C, Hill MR, Bennett DA, Boxall R, et al. Lipids, Lipoproteins, and Metabolites and Risk of Myocardial Infarction and Stroke. *J Am Coll Cardiol* 2018;71:620–32. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.12.006>.
- [252] Pichler G, Amigo N, Tellez-Plaza M, Pardo-Cea MA, Dominguez-Lucas A, Marrachelli VG, et al. LDL particle size and composition and incident cardiovascular disease in a South-European population: The Hortega-Liposcale Follow-up Study. *Int J Cardiol* 2018;264:172–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.03.128>.
- [253] Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* 2008;451:904–13. <https://doi.org/10.1038/nature06796>.
- [254] Pownall HJ, Rosales C, Gillard BK, Gotto AM. High-density lipoproteins, reverse cholesterol transport and atherogenesis. *Nat Rev Cardiol* 2021. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00538-z>.
- [255] Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG. Remnant cholesterol as a causal risk factor for ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:427–36. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.08.1026>.
- [256] Chapman MJ, Ginsberg HN, Amarenco P, Andreotti F, Borén J, Catapano AL, et al. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur Heart J* 2011;32:1345–61. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr112>.
- [257] Kuryłowicz A, Wicik Z, Owczarz M, Jonas MI, Kotlarek M, Świerniak M, et al. NGS Reveals Molecular Pathways Affected by Obesity and Weight Loss-Related Changes in miRNA Levels in Adipose Tissue. *Int J Mol Sci* 2017;19. <https://doi.org/10.3390/ijms19010066>.
- [258] Shi C, Huang F, Gu X, Zhang M, Wen J, Wang X, et al. Adipogenic miRNA and meta-signature miRNAs involved in human adipocyte differentiation and obesity. *Oncotarget* 2016;7:40830–45. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8518>.
- [259] Laffont B, Rayner KJ. MicroRNAs in the Pathobiology and Therapy of Atherosclerosis. *Can J Cardiol* 2017;33:313–24. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2017.01.001>.
- [260] Chen Q, Li X, Kong L, Xu Q, Wang Z, Lv Q. miR-101-3p induces vascular endothelial cell dysfunction by targeting tet methylcytosine dioxygenase 2. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2020;52:180–91. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmz154>.
- [261] Cipollone F, Felicioni L, Sarzani R, Uchino S, Spigonardo F, Mandolini C, et al. A unique microRNA signature associated with plaque instability in humans. *Stroke* 2011;42:2556–63. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.597575>.
- [262] Improta Caria AC, Nonaka CKV, Pereira CS, Soares MBP, Macambira SG, Souza BS de F. Exercise Training-Induced Changes in MicroRNAs: Beneficial

- Regulatory Effects in Hypertension, Type 2 Diabetes, and Obesity. *Int J Mol Sci* 2018;19. <https://doi.org/10.3390/ijms19113608>.
- [263] Iacomino G, Siani A. Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. *Genes Nutr* 2017;12:23. <https://doi.org/10.1186/s12263-017-0577-z>.
- [264] Wang N, Yuan Y, Sun S, Liu G. microRNA-204-5p Participates in Atherosclerosis Via Targeting MMP-9. *Open Med (Warsaw, Poland)* 2020;15:231–9. <https://doi.org/10.1515/med-2020-0034>.
- [265] Fang Y-C, Yeh C-H. Role of microRNAs in Vascular Remodeling. *Curr Mol Med* 2015;15:684–96. <https://doi.org/10.2174/1566524015666150921105031>.
- [266] Vasu S, Kumano K, Darden CM, Rahman I, Lawrence MC, Naziruddin B. MicroRNA Signatures as Future Biomarkers for Diagnosis of Diabetes States. *Cells* 2019;8:1533. <https://doi.org/10.3390/cells8121533>.
- [267] Melak T, Baynes HW. Circulating microRNAs as possible biomarkers for coronary artery disease: a narrative review. *EJIFCC* 2019;30:179–94.
- [268] Karaçorlu ÖF, Cetin M, Yumrutaş Ö, Bozgeyik I, Dumlupınar E, Bagis H. Circulating miR-196a-5p miR-373-3p and miR-375: Novel candidate biomarkers for diagnosis of acute coronary syndrome. *Meta Gene* 2018;17. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2018.03.013>.
- [269] Hernández-Alonso P, Giardina S, Salas-Salvadó J, Arcelin P, Bulló M. Chronic pistachio intake modulates circulating microRNAs related to glucose metabolism and insulin resistance in prediabetic subjects. *Eur J Nutr* 2017;56:2181–91. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1262-5>.
- [270] Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Nonell L, Puigdecenet E, Rodríguez-Hermosa JI, et al. Surgery-Induced Weight Loss Is Associated With the Downregulation of Genes Targeted by MicroRNAs in Adipose Tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:E1467-76. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2357>.
- [271] Zhou Z, Chen J, Wu T, Liu Q, Song H, Sun S. Profiling of plasma circulating miRNA in coronary heart disease patients detected by next-generation small RNA sequencing. *Int J Clin Exp Med* 2017;10:8060–8.
- [272] Vigneron N, Meryet-Figuière M, Guttin A, Issartel J-P, Lambert B, Briand M, et al. Towards a new standardized method for circulating miRNAs profiling in clinical studies: Interest of the exogenous normalization to improve miRNA signature accuracy. *Mol Oncol* 2016;10:981–92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.03.005>.
- [273] Espinet Coll E, López-Nava Breviere G, Nebreda Durán J, Marra-López Valenciano C, Turró Arau R, Esteban López-Jamar JM, et al. Spanish Consensus Document on Bariatric Endoscopy. Part 1. General considerations. *Rev Esp Enfermedades Dig Organo Of La Soc Esp Patol Dig* 2018;110:386–99. <https://doi.org/10.17235/reed.2018.4503/2016>.
- [274] 25th European Congress on Obesity, Vienna, Austria, May 23-26, 2018: Abstracts. *Obes Facts* 2018;11(suppl 1:1–364. <https://doi.org/10.1159/000489691>.
- [275] Mallol R, Amigó N, Rodríguez MA, Heras M, Vinaixa M, Plana N, et al. Liposcale: a novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion-ordered 1H NMR spectroscopy. *J Lipid Res* 2015;56:737–46. <https://doi.org/10.1194/jlr.D050120>.

BIBLIOGRAFIA

- [276] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling The False Discovery Rate - A Practical And Powerful Approach To Multiple Testing. *J R Stat Soc* 1995;57:289–300. <https://doi.org/10.2307/2346101>.
- [277] Tibshirani R. Regression Shrinkage and Selection via the Lasso. *J R Stat Soc Ser B* 1996;58:267–88.
- [278] Reriani MK, Lerman LO, Lerman A. Endothelial function as a functional expression of cardiovascular risk factors. *Biomark Med* 2010;4:351–60. <https://doi.org/10.2217/bmm.10.61>.
- [279] Terrada O, Cherradi B, Raihani A, Bouattane O. A novel medical diagnosis support system for predicting patients with atherosclerosis diseases. *Informatics Med Unlocked* 2020;21:100483. <https://doi.org/10.1016/j.imu.2020.100483>.
- [280] Aronow WS. Association of obesity with hypertension. *Ann Transl Med* 2017;5:350–350. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.06.69>.
- [281] Nguyen NT, Magno CP, Lane KT, Hinojosa MW, Lane JS. Association of Hypertension, Diabetes, Dyslipidemia, and Metabolic Syndrome with Obesity: Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2004. *J Am Coll Surg* 2008;207:928–34. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2008.08.022>.
- [282] Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2010;314:1–16. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.07.031>.
- [283] Delgado Roche L, Vázquez López AM, Martínez-Sánchez G, Delgado RL, Vázquez LAM, Martínez-Sánchez G. Pathogenic molecular processes of atherosclerosis and therapeutic alternatives for control. *Rev Cuba Farm* 2012;46:267–80.
- [284] Beltowski J, Wójcicka G, Jamroz A. Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia. *Atherosclerosis* 2003;170:21–9. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(03\)00236-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(03)00236-3).
- [285] German AJ, Ryan VH, German AC, Wood IS, Trayhurn P. Obesity, its associated disorders and the role of inflammatory adipokines in companion animals. *Vet J* 2010;185:4–9. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.004>.
- [286] López-Jaramillo P, Gómez-Arbeláez D, López-López J, López-López C, Martínez-Ortega J, Gómez-Rodríguez A, et al. The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2014;18:37–45. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2013-0053>.
- [287] Trayhurn P, Wang B, Wood IS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *BrJ Nutr* 2008;100:227–35.
- [288] Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2017;2:17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
- [289] Rausch ME, Weisberg S, Vardhana P, Tortoriello D V. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration *IntJ Obes* 2008;32:451–63.
- [290] Vitseva OI, Tanriverdi K, Tchkonina TT, Kirkland JL, McDonnell ME, Apovian CM, et al. Inducible Toll-like receptor and NF-κB regulatory pathway expression in human adipose tissue *Obesity(SilverSpring)* 2008;16:932–7.

BIBLIOGRAFIA

- [291] Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 2010;140:900–17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.034>.
- [292] Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 2006;444:875–80. <https://doi.org/10.1038/nature05487>.
- [293] Saiki S, Sato T, Kohzuki M, Kamimoto M, Yosida T. Changes in serum hypoxanthine levels by exercise in obese subjects. *Metabolism* 2001;50:627–30. <https://doi.org/10.1053/meta.2001.24197>.
- [294] Ji LL. Exercise, oxidative stress, and antioxidants. *Am J Sports Med* 1996;24:S20-4.
- [295] Vincent HK, Morgan JW, Vincent KR. Obesity exacerbates oxidative stress levels after acute exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36:772–9. <https://doi.org/10.1249/01.mss.0000126576.53038.e9>.
- [296] Koh EH, Park J-Y, Park H-S, Jeon MJ, Ryu JW, Kim M, et al. Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes. *Diabetes* 2007;56:2973–81. <https://doi.org/10.2337/db07-0510>.
- [297] Gao C-L, Zhu C, Zhao Y-P, Chen X-H, Ji C-B, Zhang C-M, et al. Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2010;320:25–33. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.01.039>.
- [298] Sutherland LN, Capozzi LC, Turchinsky NJ, Bell RC, Wright DC. Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295:E1076-83. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90408.2008>.
- [299] Bakker SJ, IJzerman RG, Teerlink T, Westerhoff H V, Gans RO, Heine RJ. Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and beta-cell failure? *Atherosclerosis* 2000;148:17–21. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(99\)00329-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(99)00329-9).
- [300] Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752–61. <https://doi.org/10.1172/JCI21625>.
- [301] Hulsmans M, Van Dooren E, Holvoet P. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Risk of Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2012;14:264–76. <https://doi.org/10.1007/s11883-012-0237-0>.
- [302] Fortuño A, Bidegain J, Baltanás A, Moreno MU, Montero L, Landeche MF, et al. Is leptin involved in phagocytic NADPH oxidase overactivity in obesity? Potential clinical implications. *J Hypertens* 2010;28:1944–50. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32833c21af>.
- [303] Rani J, Chandramouli V, Seela B, Professor A, Chalmeda A, Rao, et al. Effect of Obesity on Anti Oxidant Enzymes and Type 2 Diabetes. 2018. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.15692.51845>.
- [304] Feingold KR, Memon RA, Moser AH, Grunfeld C. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis* 1998;139:307–15. <https://doi.org/10.1016/S0021->

BIBLIOGRAFIA

- 9150(98)00084-7.
- [305] Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. Human Serum Paraoxonase/Arylesterase's Retained Hydrophobic N -Terminal Leader Sequence Associates With HDLs by Binding Phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2214–25. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.9.2214>.
- [306] Rainwater D. Serum leptin levels are independently correlated with two measures of HDL. *Atherosclerosis* 1997;132:237–43. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(97\)00104-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(97)00104-4).
- [307] Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2017;127:1–4. <https://doi.org/10.1172/JCI92035>.
- [308] Pouvreau C, Dayre A, Butkowski EG, de Jong B, Jelinek HF. Inflammation and oxidative stress markers in diabetes and hypertension. *J Inflamm Res* 2018;11:61–8. <https://doi.org/10.2147/JIR.S148911>.
- [309] Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem* 2012;68:701–11. <https://doi.org/10.1007/s13105-012-0154-2>.
- [310] Collins T. Acute and chronic inflammation. Cotran RS, V. Kumar, Collins T. *Robbins Pathol Basis Dis 6th Ed Pennsylvania WB Saunders* 1999.
- [311] Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:5698931. <https://doi.org/10.1155/2016/5698931>.
- [312] Urschel K, Tauchi M, Achenbach S, Dietel B. Investigation of Wall Shear Stress in Cardiovascular Research and in Clinical Practice—From Bench to Bedside. *Int J Mol Sci* 2021;22:5635. <https://doi.org/10.3390/ijms22115635>.
- [313] Roux E, Bougaran P, Dufourcq P, Couffignal T. Fluid Shear Stress Sensing by the Endothelial Layer. *Front Physiol* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00861>.
- [314] Yang G, Lucas R, Caldwell R, Yao L, Romero MJ, Caldwell RW. Novel mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *J Cardiovasc Dis Res* 2010;1:59–63. <https://doi.org/10.4103/0975-3583.64432>.
- [315] Moerland M, Kales AJ, Schrier L, van Dongen MGJ, Bradnock D, Burggraaf J. Evaluation of the EndoPAT as a Tool to Assess Endothelial Function. *Int J Vasc Med* 2012;2012:1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/904141>.
- [316] Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EHC, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)* 2009;196:193–222. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01964.x>.
- [317] Lin Y-J, Juan C-C, Kwok C-F, Hsu Y-P, Shih K-C, Chen C-C, et al. Endothelin-1 exacerbates development of hypertension and atherosclerosis in modest insulin resistant syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;460:497–503. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.017>.
- [318] Barton M, Baretella O, Meyer MR. Obesity and risk of vascular disease: importance of endothelium-dependent vasoconstriction. *Br J Pharmacol* 2012;165:591–602. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01472.x>.
- [319] Koh KK, Park SM, Quon MJ. Leptin and Cardiovascular Disease. *Circulation* 2008;117:3238–49. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.741645>.

BIBLIOGRAFIA

- [320] Poetsch MS, Strano A, Guan K. Role of Leptin in Cardiovascular Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00354>.
- [321] Stancel N, Chen C-C, Ke L-Y, Chu C-S, Lu J, Sawamura T, et al. Interplay between CRP, Atherogenic LDL, and LOX-1 and Its Potential Role in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Clin Chem* 2016;62:320–7. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.243923>.
- [322] Montecucco F, Mach F. New evidences for C-reactive protein (CRP) deposits in the arterial intima as a cardiovascular risk factor. *Clin Interv Aging* 2008;3:341–9. <https://doi.org/10.2147/cia.s2706>.
- [323] Badimon L, Peña E, Arderiu G, Padró T, Slevin M, Vilahur G, et al. C-Reactive Protein in Atherothrombosis and Angiogenesis. *Front Immunol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00430>.
- [324] Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes Res Clin Pract* 2013;7:e330–41. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2013.05.004>.
- [325] Park K-H, Park WJ. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *J Korean Med Sci* 2015;30:1213–25. <https://doi.org/10.3346/jkms.2015.30.9.1213>.
- [326] Amanso AM, Griendling KK. Differential roles of NADPH oxidases in vascular physiology and pathophysiology. *Front Biosci (Schol Ed)* 2012;4:1044–64. <https://doi.org/10.2741/s317>.
- [327] Barton M. Prevention and endothelial therapy of coronary artery disease. *Curr Opin Pharmacol* 2013;13:226–41. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.05.005>.
- [328] Canello R, Clément K. Review article: Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* 2006;113:1141–7. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2006.01004.x>.
- [329] Hulsmans M, Holvoet P. The vicious circle between oxidative stress and inflammation in atherosclerosis. *J Cell Mol Med* 2010;14:70–8. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00978.x>.
- [330] Rolski F, Błyszczuk P. Complexity of TNF- α Signaling in Heart Disease. *J Clin Med* 2020;9:3267. <https://doi.org/10.3390/jcm9103267>.
- [331] Zhao S, Kusminski CM, Scherer PE. Adiponectin, Leptin and Cardiovascular Disorders. *Circ Res* 2021;128:136–49. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.314458>.
- [332] So WY, Leung PS. Irisin ameliorates hepatic glucose/lipid metabolism and enhances cell survival in insulin-resistant human HepG2 cells through adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 2016;78:237–47. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.07.022>.
- [333] Perakakis N, Triantafyllou GA, Fernández-Real JM, Huh JY, Park KH, Seufert J, et al. Physiology and role of irisin in glucose homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 2017;13:324–37. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.221>.
- [334] Zhang Y, Mu Q, Zhou Z, Song H, Zhang Y, Wu F, et al. Protective Effect of Irisin on Atherosclerosis via Suppressing Oxidized Low Density Lipoprotein Induced Vascular Inflammation and Endothelial Dysfunction. *PLoS One*

BIBLIOGRAFIA

- 2016;11:e0158038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158038>.
- [335] Lu J, Xiang G, Liu M, Mei W, Xiang L, Dong J. Irisin protects against endothelial injury and ameliorates atherosclerosis in apolipoprotein E-Null diabetic mice. *Atherosclerosis* 2015;243:438–48. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.020>.
- [336] Widlansky ME, Gutterman DD. Regulation of Endothelial Function by Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:1517–30. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3642>.
- [337] Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res* 2002;43:1363–79. <https://doi.org/10.1194/jlr.R200004-JLR200>.
- [338] Pelisek J, Eckstein H-H, Zerneck A. Pathophysiological mechanisms of carotid plaque vulnerability: impact on ischemic stroke. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2012;60:431–42. <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0192-z>.
- [339] Mughal MM, Khan MK, DeMarco JK, Majid A, Shamoun F, Abela GS. Symptomatic and asymptomatic carotid artery plaque. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2011;9:1315–30. <https://doi.org/10.1586/erc.11.120>.
- [340] Hajjar DP, Gotto AMJ. Biological relevance of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of arterial diseases. *Am J Pathol* 2013;182:1474–81. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.01.010>.
- [341] Ji E, Lee S. Antibody-Based Therapeutics for Atherosclerosis and Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci* 2021;22:5770. <https://doi.org/10.3390/ijms22115770>.
- [342] Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells* 2020;9:276. <https://doi.org/10.3390/cells9020276>.
- [343] Churov A, Summerhill V, Grechko A, Orekhova V, Orekhov A. MicroRNAs as Potential Biomarkers in Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* 2019;20:5547. <https://doi.org/10.3390/ijms20225547>.
- [344] Hulsmans M, De Keyzer D, Holvoet P. MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis. *FASEB J* 2011;25:2515–27. <https://doi.org/10.1096/fj.11-181149>.

9. ANNEXOS

Annex 1: Resultats del cribratge de paràmetres d'estrès cel·lular

Taula 15: Resultats de les membranes de cribratge de paràmetres d'estrès cel·lular. Resultats en % respecte als controls positius de cada membrana. C+ indica presència de comorbiditats; C- indica absència de comorbiditats.

Grup	Control	OB C -	12M C -	OB C +	12M C +
Analit	(% vs. Control+)				
ADAMTs1	4,7	0,0	3,4	3,6	7,0
Bcl-2	0,0	0,0	0,0	0,3	3,6
Carbonic Anhydrase IX	1,0	0,0	1,9	1,3	3,8
Cited-2	1,3	0,0	1,5	1,6	3,9
COX2	1,6	0,0	0,6	1,5	5,0
Citocrom c	4,4	0,0	3,1	4,2	10,5
Dkk-4	0,7	0,0	1,6	1,2	3,7
FABP-1	2,7	0,0	2,4	2,3	5,2
HIF-1 α	0,0	0,0	0,0	1,1	3,0
HIF-2 α	0,0	0,0	1,1	0,3	4,7
Phospho-HSP27 (S78/S82)	0,5	0,0	1,5	1,9	13,8
HSP60	1,9	0,0	1,7	2,5	9,8
HSP70	7,2	4,2	5,6	8,8	30,9
IDO	2,6	0,0	1,9	2,4	7,3
Phospho-JNK Pan (T183/Y185)	2,3	0,0	2,4	4,0	9,0
NFkB1	0,6	0,0	0,7	1,4	5,0
p21/CIP1	2,3	0,0	2,4	4,1	11,5
p27	0,3	0,0	1,3	1,1	3,8
Phospho-p38 α (T180/Y182)	0,0	0,0	0,0	0,0	5,3
Phospho-p53 (S46)	0,0	0,0	0,0	3,0	4,9
PON1	8,2	0,0	5,0	8,4	10,0
PON2	0,0	0,0	2,5	1,9	7,7
PON3	66,3	17,6	45,1	52,8	90,7
THIOREDOXINA-1	24,1	7,7	17,9	23,4	32,6
SIRT2	0,0	0,0	2,7	1,8	12,6
SOD2	24,1	8,4	17,2	24,5	43,1

Annex 2: Resultats del cribratge de citoquines

Taula 16: Resultats de les membranes de citoquines. Resultats en % respecte als controls positius de cada membrana.

Grups	SENSE PLACA		AMB PLACA	
	% vs. C+		% vs. C+	
Analit	OB	6M	OB	6M
Controls	90,4	91,7	80,5	98,5
Adiponectina	120,9	121,4	96,48	102,7
Apolipoproteïna A-I	109,9	116,6	119,19	121
Angiogenina	261,9	307,5	247,28	254,5
Angiopoietina-1	23,4	15	11,76	13,7
Angiopoietina-2	24,3	13,6	10,16	10,5
BAFF	65	61,6	98,35	63,3
BDNF	32,1	20,3	11	17
Complement Component C5/C5a	106	104,7	98,04	95,3
CD14	36,4	32,7	25,28	28,8
CD30	0	5,1	3,26	3,9
Controls	97,5	101,4	104,88	96,6
CD40 lligand	24,1	27,9	16,1	16,3
Chitinase 3-like 1	146,5	146	176,27	160,1
Complement Factor D	85,1	96	89,62	80,9
CRP	265	271,8	230,88	229,7
Cystatin C	113,7	118,1	134,2	131,8
Dkk-1	14,9	10,4	9,19	10,3
DPPiV	121,3	121,4	131,73	129,4
EGF	73,2	43,3	32,67	52,3
Emprina	61,8	54,7	46,13	41,2
ENA-78	53	44	30,86	70,7
Endoglina	117,4	122,4	140,58	121,7
Fas Lligand	10,3	8,6	10,25	13,1
FGF bàsic	20,8	14,9	17,91	23,7
FGF-7	6,9	3,6	4,23	5,9
FGF-19	26,5	26,1	17,54	28,5
Flt-3 Lligand	9	9,3	9,9	9,5
G-CSF	8,2	7,6	6,85	10
GDF-15	46,1	47,9	57,98	51,7
GM-CSF	7,6	6,7	6,22	5,1
GRO- α	5,8	5,9	4,49	5,8
Hormona del creixement	7,8	16,3	8,83	30,2
HGF	7,4	7,5	10,34	8,2
ICAM-1	59,9	55,6	81,01	65,8
IFN- α	7,6	6,1	6,26	5,3
IGFBP-2	113,9	104,7	125,23	118,1
IGFBP-3	52,8	50,2	50,61	53,2
IL-1 α	4,9	5	2,32	2,6
IL-1 β	2,3	2,9	6,29	2,3
IL-1ra	9,2	8,6	6,25	5,1
IL-2	5,5	3,4	4,09	3,9
IL-3	6,7	3,8	5,54	3,9
IL-4	11,1	10,2	9,2	11,9
IL-5	2,9	8,5	0	0
IL-6	6,7	7,7	5,66	7,7
IL-8	14,8	18,1	10,76	12
IL-10	4,8	5,8	5,11	7,2

ANNEXOS

Grups	SENSE PLACA		AMB PLACA	
	% vs. C+		% vs. C+	
Analit	OB	6M	OB	6M
IL-11	13	23,1	12,21	9,2
IL-12	5,6	9	3,79	5,9
IL-13	1,6	4,3	2,3	2,5
IL-15	1,6	4,2	1,47	2,1
IL-16	4,7	7,5	2,6	3,1
IL-17A 3	24,6	18,3	14,44	20,7
IL-18	108,5	95,4	111,3	114,2
IL-19	12,1	6,9	8,67	7,1
IL-22	11,9	9,5	10,8	13,2
IL-23	6,6	5,3	5,97	6,8
IL-24	5,5	5,2	4,29	3,8
IL-27	6,9	6,8	6,85	4,4
IL-31	2,5	3,6	3,13	4,5
IL-32	4,2	5,5	4,86	4,2
IL-33	1	2,8	2,51	1,8
IL-34	0,6	2,9	2,25	2,1
IP-10	12,8	12,5	11,69	11,2
I-TAC	8,6	7,1	4,74	4,9
Kallikrein 3	16,9	13,5	11,07	10,6
Leptina	251,1	125,4	228,57	104,3
LIF	8,2	5,8	5,95	4,1
Lipocalina-2	92,4	78,1	91,41	91
MCP-1	12	9,6	12,06	11,7
MCP-3	4,2	2,6	3,77	3,3
M-CSF	5,6	4,8	4,51	4,1
MIF	36,3	37	38,23	36,3
MIG	4,3	5,5	5,56	4
MIP-1 α /MIP-1 β	3,6	4,6	6,95	5,8
MIP-3 α	3,4	3,6	4	3,2
MIP-3 β	12,8	12,4	15,79	10,1
MMP-9	84,7	76,6	91,09	76,1
Mieloperoxidasa	25,8	13,1	15,58	14,8
Osteopontina	147,3	127,2	141,25	151
PDGF-AA	75,8	48,8	50,86	62,9
PDGF-AB/BB	56,1	33,8	37,81	45,6
Pentraxina 3	15	14,8	13,17	13,7
PF4	106,6	110,4	140,12	133,7
RAGE 177	15,8	14	12,59	12,7
RANTES	70,4	70,5	73,39	70,3
RBP-4	256,8	266,2	231,67	285,6
Relaxina-2	6,9	3,8	0	0
Resistina	59,9	60,2	41,43	40,2
SDF-1 α	34,9	40,3	35,81	35,9
PAI-I	247,5	233,3	202,82	188,6
SHBG	79,6	77,6	69,72	71
IL-1	25,5	22,5	38,87	35,8
TARC	18,9	16,4	12,7	13,5
TFF3	53,9	56	54,18	51,6
TfR	25,2	19,1	21,19	21,7
TGF- α	5,8	4,1	4,8	4,7
Trombospondina-1	58	65,7	54,02	46,3
TNF- α	9,7	7,9	10,28	16,1
uPAR	37,3	37,3	35,51	38
VEGF	7,8	6,3	7,67	6,9
Controls	112,1	106,9	114,62	104,9

ANNEXOS

Grups	SENSE PLACA		AMB PLACA	
	% vs. C+		% vs. C+	
Analit	OB	6M	OB	6M
Vitamina D	136,2	141,8	139,89	132,7
CD31	139,7	123,2	133,25	132,8
TIM-3	127,6	120,6	108,11	101,7
VCAM-1	149,9	155,1	140,44	123,5
Controls negatius	0	0	0	0


Annex 3: Pòster del perfil de citoquines, presentat al congrés ECO, 2018

A continuació es mostra per parts i amb mida reduïda el pòster presentat.

Cytokines involved in the amelioration of inflammation and cardiovascular risk after bariatric surgery. An approach


Júlia Carmona-Maurici¹, Elena Cuello², Eva Pardina¹, David Ricart-Jané¹, Juan Antonio Baena-Fustegueras², Albert Lecube³, M. Cruz de la Fuente², Ferran Herrerías², Jorge J. Olsina², Julia Peinado-Onsurbe¹

1. Departamento de Bioquímica y Biomedicina Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Barcelona. 2. Unidad de Cirugía, Hospital Arnau de Vilanova, Lleida. 3. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, CIBERDEM, Barcelona; Unidad de Investigación en Diabetes y Metabolismo, Instituto de Investigación Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona; Departamento de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitario Arnau de Vilanova, Universidad de Lleida, Lleida.




INTRODUCTION

Some of the beneficial effects of bariatric surgery on cardiovascular risk associated with obesity might be achieved by preventing the progression of the initial stages of atheromatosis. Inflammation of adipose tissue could be related to altered angiogenesis. Cytokines, chemokines and growth factors are potential cardiovascular risk modulators. Progress in the knowledge of this highly complex network of molecules will open the way for effective therapeutic interventions.



OBJECTIVE

The aim of this study is to make a preliminary evaluation of the main molecules that could be involved in the initial phases of atherosclerosis by comparing molecules related with inflammation and angiogenesis in morbid obese without atherosclerotic plaques prior to bariatric surgery and after six months.



METHODS

We evaluated the presence and behaviour of 105 cytokines, chemokines and growth factors in plasma from 4 morbidly obese women (BMI ≥ 40 kg/m²) who underwent bariatric surgery, before and after a six-month follow-up period. No presence of atherosclerotic plaque was detected in any patient by ultrasound with microbubbles contrast technique. The relative amount of proteins was measured by a membrane-based sandwich immunoassay array (R&D Systems).

Figura 26: Pòster del perfil de citoquines part 1: introducció, objectius i mètodes



RESULTS



Figure 1: PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES

The inflammation state observed in morbidly obese patients may be one consequence of the increment of adipose tissue mass and hypoxia. Inflammatory pathways have been implicated in the initiation and progression of cardiovascular diseases.

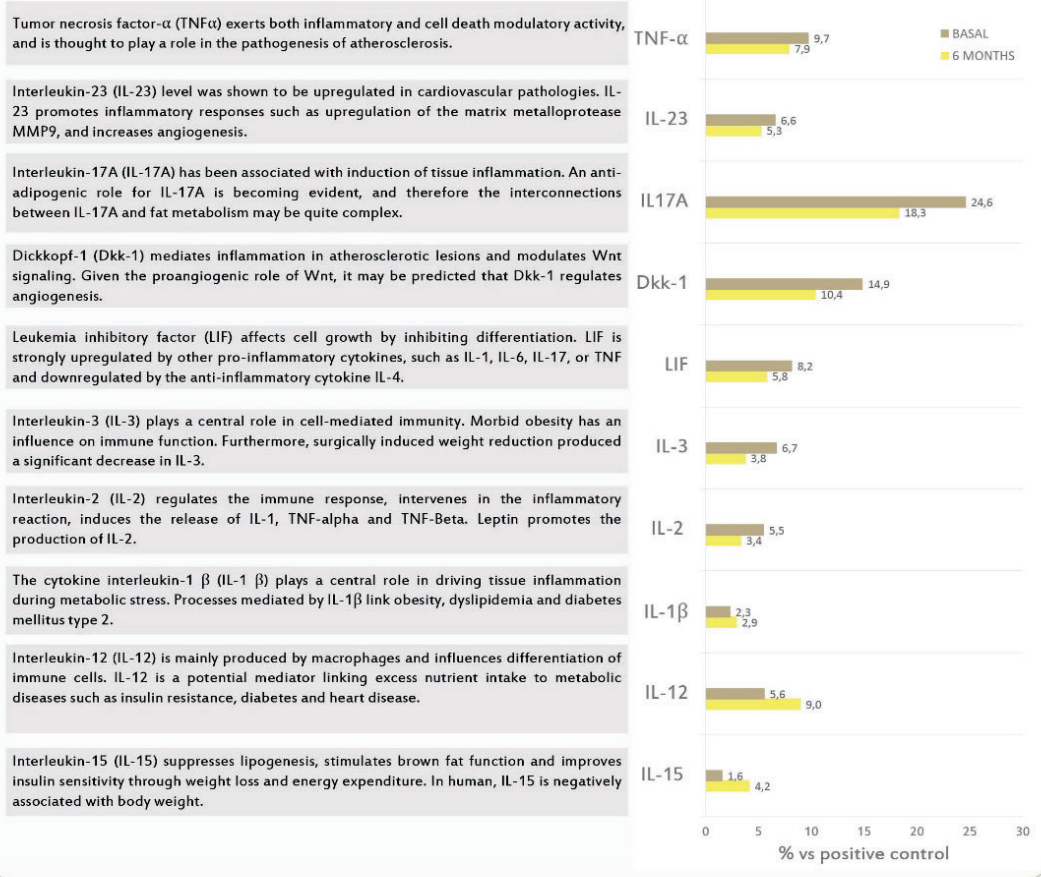


Figura 27: Pòster del perfil de citoquines part 2: resultats

Figure 2: ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES

In lean individuals, anti-inflammatory adipokines mediate physiological functions, whilst in states of metabolic disease, obese adipose tissue mainly release pro-inflammatory cytokines.

Interleukin-5 (IL-5) links adaptative and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis.

The interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) competitively binds to the IL-1 receptor on the cell surface, thereby inhibiting the inflammatory effects of IL-1. IL-1RA plays a role in cholesterol excretion.

Interleukin-13 (IL-13) acts to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines or counteract many biological effects of pro-inflammatory mediators. In addition, IL-13 contributes to glucose homeostasis and to beige cell biogenesis.

Interleukin-11 (IL-11) suppresses cytokine synthesis, in large part by prevention of NF-kappa β activation. IL-11 inhibits pro-inflammatory cytokines response by monocyte/macrophages.

Interleukin-10 (IL-10) posses multifaceted anti-inflammatory properties. IL-10 is expressed in advanced human atherosclerosis and is associated with low levels of apoptosis, further supporting a protective role for this anti-inflammatory cytokine.

Interleukin-4 (IL-4) inhibits pro-inflammatory cytokines synthesis. adipocyte differentiation and lipid accumulation. IL-4 promotes lipolysis in mature adipocytes to decrease lipid deposits.

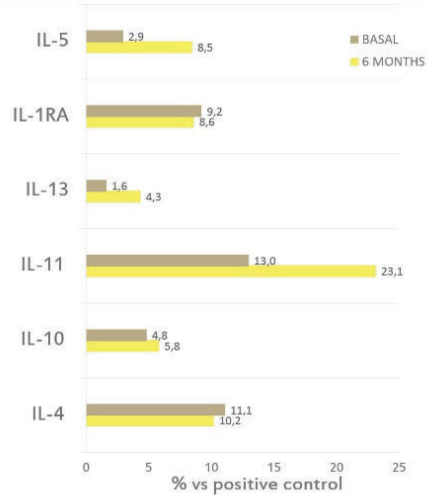


Figure 3: ANGIOGENIC MARKERS

During the expansion of fat mass in obesity, vascularization of adipose tissue is insufficient to maintain tissue normoxia. Local hypoxia develops and may result in altered adipokine expression, pro-inflammatory macrophage recruitment.

Myeloperoxidase (MPO) catalyzes the formation of a number of reactive oxidant species which contribute to tissue damage during inflammation. MPO-catalyzed reactions have been attributed to potentially proatherogenic biological activities.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) role in the athermotosis is both detrimental (development of a neoangiogenic process within the atherosclerotic plaque) and beneficial (promotion of collateral vessel formation) effects.

Transforming growth factor alpha (TGF-alpha) may mediate angiogenesis, epidermal regrowth, and formation of granulation tissue in vivo.

Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates differentiation of endothelial cells and migration of pericytes. In addition to the regulation of vascular development, PDGF is also involved in atherosclerosis. As hypoxia induces PDGF expression, it may be involved in stimulation of angiogenesis during adipose tissue remodeling in obesity.

Basic fibroblast growth factor (bFGF) are potent mitogens for vascular endothelial and smooth muscle cells and also promote angiogenesis that contribute to the pathogenesis of atherosclerosis. It is synthesized and secreted by human adipocytes.

Angiopoietin-1 (Ang-1) plays a crucial role in endothelial cell survival and vessel wall remodeling. Ang-1 has protective properties in the microvasculature. It stimulates TNF- α , monocyte and neutrophil migration, critical players in atherosclerosis.

Angiopoietin-2 (Ang-2) competes with Ang-1 for receptor binding. The protein disrupts the vascular remodeling ability of Ang-1 and may induce endothelial cell apoptosis. Ang-2 has been implicated in mediating inflammatory processes.

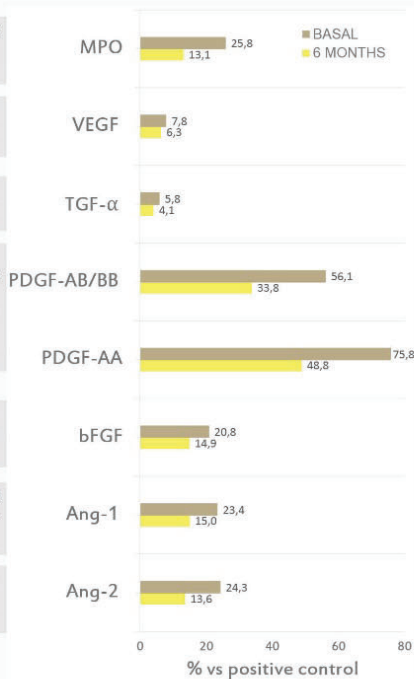
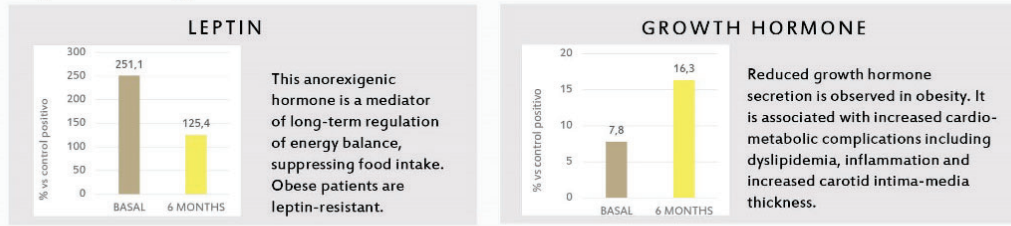


Figura 28: Pòster del perfil de citoquines part 3: resultats

Figure 4: HORMONES

In obesity there is an hormonal imbalance: hormones act in appetite, in metabolism, distributing body fat and causing greater storage of excess energy.



CONCLUSIONS

- Inflammation and angiogenesis biomarkers are possible modulators of the initial stages of atheromatosis. These molecules increase in morbidly obese patients without plaque.
- Weight loss associated with bariatric surgery appears to modulate the production of cytokines: six months after surgery, pro-inflammatory mediators such as TNF- α and IL-17 decrease (Figure 1) and anti-inflammatory markers such as IL-5 and IL-11 increase (Figure 2).
- Angiogenic markers such as PDGF, bFGF and Ang, are higher in the obese patient than 6 months after surgery, the increase of angiogenesis in morbidly obese patients could be a defense mechanism against hypoxia induced by obesity (Figure 3).
- The higher levels of inflammation and angiogenesis biomarkers in the obese state than 6 months after surgery, establish a starting point for a deeper analysis on the participation of these molecules in the progression and improvement of cardiovascular risk in patients with morbid obesity.

Funding: This work was supported by Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PI15/00190 to JP-O PI15/00332 to JAB-F) and the FEDER Funds of the EU (Fondo Europeo de Desarrollo Regional: "Una manera de hacer Europa").



Figura 29: Pòster del perfil de citoquines part 4: resultats i conclusions

Annex 4: Taules de resultats

Taula 17: Característiques clíniques dels individus amb obesitat severa abans i després de la BS. Les variables quantitatives s'expressen com la mitjana \pm SEM. Les variables categòriques s'expressen com "sí/no", indicant si els individus pateixen la patologia o no, amb els resultats expressats com a percentatge. El símbol $^{\circ}$ representa diferències vs OB, mateix grup. El símbol + representa diferències vs placa. Un símbol, $p < 0.05$; dos símbols, $p < 0.01$; tres símbols, $p < 0.001$; ns, no significatiu.

Variables	Sense placa			Amb placa			ANOVA P valor Placa / Temps
	OB	6M	12M	OB	6M	12M	
N	34	-	-	32	-	-	-
Sexe (dones / homes)	29 / 5 +++	-	-	18 / 14	-	-	.0139
Edat (anys)	43.5 \pm 1.8 ++	-	-	51.8 \pm 1.8	-	-	.0019
Pes (kg)	119.1 \pm 3.3	86.9 \pm 2.7 ooo	79.5 \pm 2.9 ooo	120.7 \pm 4.0	87.9 \pm 2.7 ooo	81.5 \pm 2.5 ooo	ns / <.0001
BMI (kg/m ²)	45.7 \pm 1.0	33.8 \pm 0.9 ooo	30.2 \pm 0.9 ooo	44.0 \pm 1.3	32.0 \pm 0.8 ooo	29.8 \pm 0.8 ooo	ns / <.0001
%EWL	0	58.0 \pm 14.5	69.8 \pm 16.9 ***	0	60.5 \pm 13.6	69.5 \pm 15.9 ***	ns/<.0001
Cintura (cm)	130.0 \pm 2.6			126.4 \pm 2.1			ns
Coll (cm)	40.6 \pm 08	35.6 \pm 0.7 ooo	34.2 \pm 0.6 ooo ++	42.5 \pm 0.9	37.9 \pm 0.7 ooo	37.5 \pm 0.7 ooo	.0078 / <.0001
HR (bpm)	68.6 \pm 1.6	56.6 \pm 1.5 ooo	56.9 \pm 1.9 ooo	73.3 \pm 2.7	61.2 \pm 2.2 oo	60.1 \pm 1.9 ooo	.0426 / <.0001
TC (mg/dL)	177.2 \pm 4.8	152.9 \pm 5.5 ooo	163.3 \pm 6.9	185.9 \pm 8.0	162.02 \pm 8.1 $^{\circ}$	180.9 \pm 7.1	ns / <.0001
cHDL (mg/dL)	46.8 \pm 1.4	46.0 \pm 1.7	54.7 \pm 2.0 ooo	51.9 \pm 6.4	49.7 \pm 5.0	53.8 \pm 1.8 $^{\circ}$	ns / <.0001
cLDL (mg/dL)	107.4 \pm 4.6	87.9 \pm 4.8 ooo	94.2 \pm 6.8	107.9 \pm 6.9	90.3 \pm 6.2	106.8 \pm 6.4	ns / .0009
TAG (mg/dL)	124.2 \pm 8.0	94.0 \pm 4.8 ooo	76.6 \pm 4.5 ooo	164.3 \pm 14.6	118.4 \pm 9.8 oo	98.9 \pm 10.9 oo	.0082 / <.0001
AIP (AU)	0.51 \pm 0.05	0.37 \pm 0.04 $^{\circ}$	0.23 \pm 0.04 ooo	0.40 \pm 0.04	0.30 \pm 0.03 $^{\circ}$	0.13 \pm 0.03 ooo,+	.0183 / <.0001
Glucosa (mg/dL)	99.8 \pm 3.7 ++	82.1 \pm 1.7 ooo	82.8 \pm 1.7 ooo	128.3 \pm 7.8	90.1 \pm 3.4 ooo	99.6 \pm 12.1	.0031 / <.0001
HbA1c (%)	5.70 \pm 0.16 ++	5.16 \pm 0.11 ooo	5.13 \pm 0.07 ooo	6.61 \pm 0.25	5.57 \pm 0.22 oo	5.54 \pm 0.15 ooo	.0049 / <.0001
HOMA-IR	1.96 \pm 0.42 +	0.66 \pm 0.06	0.53 \pm 0.04 $^{\circ}$	5.17 \pm 0.97	1.22 \pm 0.41 $^{\circ}$	1.31 \pm 0.43 $^{\circ}$.0003 / .0001
Comorbiditats sí / no (%)	50 / 50 +++	65 / 45	79 / 21 $^{\circ}$	13 / 87	50 / 50 oo	56 / 44 ooo	-
HT. sí / no (%)	38 / 62 +++	29 / 71 +	15 / 85 +++, $^{\circ}$	78 / 22	43 / 57 oo	35 / 65 ooo	-
DLP . sí / no (%)	28 / 72 +++	12 / 88 +, $^{\circ}$	6 / 94 +, $^{\circ}$	69 / 31	30 / 70 ooo	16 / 84 ooo	-
T2DM. sí / no (%)	19 / 81 +++	6 / 94 +	0 / 100 +, $^{\circ}$	66 / 34	29 / 71 ooo	19 / 81 ooo	-

ANNEXOS

Taula 18: Paràmetres d'estrès oxidatiu dels individus amb obesitat severa abans i després de la BS. Les variables quantitatives s'expressen com la mitjana \pm SD. El símbol $^{\circ}$ representa diferències vs OB, mateix grup. El símbol + representa diferències vs placa. Un símbol, $p < 0.05$; dos símbols, $p < 0.01$; tres símbols, $p < 0.001$; ns, no significatiu.

Variables	Sense placa			Amb placa			P valor
	OB	6M	12M	OB	6M	12M	Placa / Temps
N	34	-	-	32	-	-	-
oxLDL (U/l)	87,29 \pm 5,72	44,77 \pm 4,43 ^{ooo}	41,48 \pm 4,09 ^{ooo}	102,48 \pm 11,10	49,38 \pm 4,20 ^{oo}	64,30 \pm 7,69 ^{ooo+}	.0430 / < .001
MDA (μM)	3,67 \pm 0,72	0,54 \pm 0,09 ^{ooo}	0,78 \pm 0,13 ^{oo}	5,34 \pm 1,00	0,99 \pm 0,17 ^{oo}	1,49 \pm 0,29 ^{oo}	ns / < .001
PON1 (ng/mL)	110,63 \pm 7,20	147,84 \pm 6,32 ^{ooo}	235,66 \pm 9,08 ^{ooo}	123,97 \pm 11,85	134,75 \pm 7,94	143,87 \pm 7,93 ⁺⁺⁺	.0147 / < .001
SOD2 (ng/mL)	62,35 \pm 2,70	49,40 \pm 2,58 ^{ooo}	47,60 \pm 4,06 ^{oo}	56,93 \pm 3,42	50,12 \pm 2,89	53,90 \pm 2,63	ns / < 0.001
activitat CAT (nmol/min/mL)	15,59 \pm 1,47	21,05 \pm 1,48 ^o	32,29 \pm 1,28 ^{ooo}	16,33 \pm 1,28	15,08 \pm 1,24 ⁺	21,90 \pm 1,15 ^{ooo+++}	0.0003 / < .001

ANNEXOS

Taula 19: Paràmetres inflamatoris dels individus amb obesitat severa abans i després de la BS. Les variables quantitatives s'expressen com la mitjana \pm SD. El símbol ° representa diferències vs OB, mateix grup. El símbol + representa diferències vs placa. Un símbol, $p < 0.05$; dos símbols, $p < 0.01$; tres símbols, $p < 0.001$; ns, no significatiu.

Variables	Sense placa			Amb placa			P valor Placa / Temps
	OB	6M	12M	OB	6M	12M	
N	34	-	-	32	-	-	-
FGF-21 (pg/ml)	330.48 \pm 36.12	294.95 \pm 34.87	189.91 \pm 17.45 _{ooo}	383.13 \pm 60.66	299.28 \pm 48.24	209.22 \pm 29.47 _o	ns / <0.0001
Adiponectina (ng/ml)	8.89 \pm 0.81	14.27 \pm 1.37 _{ooo}	14.10 \pm 1.19 _{ooo}	6.33 \pm 0.44	10.18 \pm 0.96 _{ooo}	13.91 \pm 1.09 _{ooo}	ns / <0.0001
Leptina (ng/ml)	42.67 \pm 3.53	12.78 \pm 1.71 _{ooo}	10.85 \pm 1.71 _{ooo}	31.52 \pm 3.02	6.72 \pm 1.27 _{ooo}	9.03 \pm 1.39 _{ooo}	ns / <0.0001
IL-6 (pg/ml)	4.05 \pm 0.42	2.72 \pm 0.44 _o	1.84 \pm 0.33 _{ooo}	4.35 \pm 0.35	3.39 \pm 0.42 _o	2.30 \pm 0.23 _{ooo}	ns / <0.0001
TNF-α (pg/ml)	1.06 \pm 0.05	0.93 \pm 0.06	0.80 \pm 0.04 _{ooo}	1.10 \pm 0.06	0.88 \pm 0.04 _{oo}	0.83 \pm 0.04 _{ooo}	ns / <0.0001
NEFA (mmol/l)	0.52 \pm 0.04	0.42 \pm 0.03	0.41 \pm 0.03 _o	0.49 \pm 0.04	0.37 \pm 0.04	0.37 \pm 0.04	ns / 0.0008
Lipocalina-2 (ng/ml)	50.84 \pm 2.76	54.08 \pm 2.31	52.16 \pm 2.93	53.38 \pm 2.70	51.52 \pm 2.36	49.44 \pm 2.40	ns
Lp(a) (U/l)	258.17 \pm 64.82	173.09 \pm 41.62	181.38 \pm 38.45 _{oo}	420.77 \pm 81.77	305.76 \pm 75.52	300.25 \pm 54.85 _o	ns / 0.0146
CRP (mg/l)	8.80 \pm 1.31	4.88 \pm 1.28 _o	3.37 \pm 1.20 _{ooo}	11.68 \pm 1.46	8.43 \pm 2.21 _o	4.87 \pm 0.98 _{ooo}	0.0239 / <0.0001
PAI-1 (ng/mL)	66,11 \pm 2,63	41,71 \pm 3,34 _{ooo}	25,93 \pm 2,58 _{ooo}	80,61 \pm 5,01 ₊	63,97 \pm 6,17 _{o++}	64,44 \pm 4,58 _{o+++}	<0.0001 / <0.0001

ANNEXOS

Taula 20: Paràmetres inflamatoris, glicoproteïnes, dels individus amb obesitat severa abans i després de la BS. Les variables quantitatives s'expressen com la mitjana \pm SD. El símbol ^o representa diferències vs OB, mateix grup. El símbol c representa diferències vs control. Un símbol, $p < 0.05$; dos símbols, $p < 0.01$; tres símbols, $p < 0.001$; ns, no significatiu.

Variables	Control	Amb placa		Sense placa		ANOVA (<i>p</i> valor)	
	(n=40)	OB (n=7)	12M (n=7)	OB (n=17)	12M (n=17)	placa	temps
GlycA ($\mu\text{mol/L}$)	605,54 \pm 86,54	731,91 \pm 81,04 cc	556,97 \pm 44,2 ooo	735,77 \pm 110,31 ccc	551,40 \pm 81,91 ooo	ns	< .0001
H/W GlycA (a.u.)	14,11 \pm 2,14	16,55 \pm 1,89 c	12,65 \pm 1,41 ooo	16,94 \pm 2,24 ccc	12,96 \pm 2,15 ooo	ns	< .0001
GlycB ($\mu\text{mol/L}$)	313,20 \pm 33,71	364,06 \pm 37,59 cc	284,52 \pm 30,00 ooo	364,12 \pm 45,09 ccc	289,72 \pm 42,15 ooo	ns	< .0001
H/W GlycB (a.u.)	3,94 \pm 0,43	4,58 \pm 0,47 cc	3,58 \pm 0,38 ooo	4,58 \pm 0,57 ccc	3,64 \pm 0,53 ooo	ns	< .0001
GlycF ($\mu\text{mol/L}$)	201,71 \pm 30,94	198,48 \pm 26,52	166,55 \pm 19,64 ooo ccc	200,11 \pm 36,42	158,31 \pm 16,49 C	ns	.0003

ANNEXOS

Taula 21: Paràmetres relacionats amb la funció endotelial dels individus amb obesitat severa abans i després de la BS. Les variables quantitatives s'expressen com la mitjana \pm SD. El símbol $^{\circ}$ representa diferències vs OB, mateix grup. El símbol + representa diferències vs placa. El símbol c representa diferències amb el grup control, en el cas del cIMT i els vv. Un símbol, $p < 0.05$; dos símbols, $p < 0.01$; tres símbols, $p < 0.001$; ns, no significatiu

Variables	Sense placa			Amb placa			P valor Placa / Temps
	OB	6M	12M	OB	6M	12M	
N	34	-	-	32	-	-	-
cIMT (mm)	0,70 \pm 0,02	0,70 \pm 0,03	0,71 \pm 0,02	0,80 \pm 0,03 c +	0,83 \pm 0,04 cc ++	0,81 \pm 0,03 cc +	< .0001 / ns
RHI	2.02 \pm 0.12	2.00 \pm 0.14	2.17 \pm 0.12	2.11 \pm 0.09	2.07 \pm 0.10	2.14 \pm 0.12	ns / ns
AI (%)	13.1 \pm 1.8	25.8 \pm 4.2 $^{\circ}$	26.3 \pm 3.1 $^{\circ}$	15.4 \pm 2.1	26.2 \pm 4.5 $^{\circ}$	23.5 \pm 3.2 $^{\circ}$	ns / .0002
vv (AU)	0,78 \pm 0,03 ccc	0,72 \pm 0,02 cc	0,66 \pm 0,02 $^{\circ}$	0,74 \pm 0,02 ccc	0,72 \pm 0,02 cc	0,65 \pm 0,02 $^{\circ}$	ns / < .0001
Ang1 (ng/mL)	6613,97 \pm 835,59	5505,85 \pm 823,11	4060,24 \pm 461,38 $^{\circ}$	6667,33 \pm 1218,23	4091,15 \pm 441,65 $^{\circ}$	5385,74 \pm 720,53	ns / .0272
Ang2 (ng/mL)	2511,41 \pm 287,41	2815,23 \pm 399,68	2592,68 \pm 284,69	2801,66 \pm 261,27	2626,39 \pm 287,47	2646,70 \pm 216,48	ns
BDNF (ng/mL)	5665,00 \pm 803,67	5452,55 \pm 1213,98	5504,54 \pm 571,65	6336,98 \pm 592,49	5512,78 \pm 820,40	4941,69 \pm 799,41	ns
ET1 (pg/mL)	1,80 \pm 0,14	1,47 \pm 0,11	1,28 \pm 0,13 $^{\circ}$	1,60 \pm 0,08	1,39 \pm 0,10	1,30 \pm 0,06 $^{\circ}$	ns / .0004
NO (μM)	16,66 \pm 1,3	16,78 \pm 1,44	19,50 \pm 1,59	22,98 \pm 3,09	20,80 \pm 2,20	25,48 \pm 2,33	ns
TM (ng/mL)	5,78 \pm 0,22	5,67 \pm 0,24 $^{\circ}$	5,25 \pm 0,24 $^{\circ}$	7,29 \pm 0,17 +++	7,02 \pm 0,14 +++	6,84 \pm 0,16 $^{\circ}$ +++	<.0001 / <.0001
ICAM (ng/mL)	187,88 \pm 9,24	178,31 \pm 7,37	172,94 \pm 8,73	194,49 \pm 7,42	176,21 \pm 5,90 $^{\circ}$	169,83 \pm 7,17 $^{\circ}$	ns / .0011
VCAM (ng/mL)	1301,14 \pm 49,38	1271,68 \pm 54,63	1155,13 \pm 38,20 $^{\circ}$	1328,32 \pm 41,36	1263,81 \pm 47,71	1190,88 \pm 35,79 $^{\circ}$	ns / < .0008
Psel (ng/mL)	57,03 \pm 4,59	50,13 \pm 4,84	43,84 \pm 3,99 $^{\circ}$	67,21 \pm 3,92	55,39 \pm 4,06	53,20 \pm 2,92 $^{\circ}$.0048 / .0003
Esel (ng/mL)	63,93 \pm 5,18	49,05 \pm 5,62	45,16 \pm 3,78 $^{\circ}$	72,62 \pm 6,96	50,77 \pm 3,35 $^{\circ}$	47,44 \pm 4,14 $^{\circ}$	ns / <.0001

Taula 22: Perfil de lipoproteïnes mitjançant 1HNMR en els grups amb i sense placa, abans i després de la cirurgia bariàtrica. Els valors es presenten com la mitjana \pm SD. L'estadística es va dur a terme mitjançant la prova de mesures repetides ANOVA de dos factors (amb/sense placa i temps de seguiment), i el post-test Bonferroni de múltiples comparacions. El símbol ° representa diferències vs OB, mateix grup. El símbol + representa diferències vs placa. El símbol c representa diferències vs el grup control. Un símbol, p < 0.05; dos símbols, p < 0.01; tres símbols, p < 0.001; ns, no significatiu

PARAMETRES	Control (n=40)	Amb placa		Sense placa		ANOVA (p valor)	
		OB (n=7)	12M (n=7)	OB (n=17)	12M (n=17)	placa	temps
VLDL	Nombre VLDL-P (nmol/L)	47.0 \pm 12.5 °	34.9 \pm 6.7	50.6 \pm 22.5 ^{ccc}	33.3 \pm 9.0 °°	ns	0.0087
	VLDL-P grans (nmol/L)	1.3 \pm 0.3	1.2 \pm 0.3	1.4 \pm 0.5 °c	0.97 \pm 0.30 °	ns	0.0426
	VLDL-P mitjanes (nmol/L)	4.7 \pm 0.8 °	3.4 \pm 0.7	4.9 \pm 1.6 ^{ccc}	3.4 \pm 1.3 °°	ns	0.0018
	VLDL-P petites (nmol/L)	41.0 \pm 11.7	30.4 \pm 6.9	44.3 \pm 20.6 ^{ccc}	29.0 \pm 7.9 °	ns	0.0108
	Ratio VLDL-C/VLDL-P total	0.31 \pm 0.03	0.29 \pm 0.02	0.31 \pm 0.04	0.29 \pm 0.05	ns	0.0283
Diàmetre de partícula VLDL (Z, nm)	41.9 \pm 0.40	42.2 \pm 0.3	42.1 \pm 0.2	42.1 \pm 0.3	ns	ns	
LDL	Nombre LDL-P (nmol/L)	1365.2 \pm 318.5 ^{ccc}	1121.6 \pm 114.9 °	1131.3 \pm 127.2 ++	1103.2 \pm 206.2	ns	0.0195
	LDL-P grans (nmol/L)	189.9 \pm 29.6	178.5 \pm 22.8	174.3 \pm 25.5	184.1 \pm 34.3	ns	ns
	LDL-P mitjanes (nmol/L)	366.0 \pm 147.0 °	278.2 \pm 76.4	280.7 \pm 78.4	296.9 \pm 114.6	ns	ns
	LDL-P petites (nmol/L)	809.3 \pm 160.4 ^{ccc}	664.9 \pm 38.5 °°	676.4 \pm 68.9 ++	622.2 \pm 70.6	0.0058	0.0007
	Ratio LDL-C/LDL-P total	0.099 \pm 0.002	0.103 \pm 0.003	0.099 \pm 0.004	0.103 \pm 0.003 °°	ns	0.0006
HDL	Diàmetre de partícula LDL (Z, nm)	20.91 \pm 0.24	21.02 \pm 0.27	20.97 \pm 0.31	21.17 \pm 0.24 °	ns	0.0441
	Ratio HDL-TG/HDL-C	0.20 \pm 0.05 °	0.20 \pm 0.05 °	0.23 \pm 0.10	0.21 \pm 0.07	ns	ns
	Nombre HDL-P (µmol/L)	22.7 \pm 1.9 °c	27.4 \pm 3.9 °°	22.1 \pm 2.8 ^{ccc}	27.2 \pm 3.1 °°°	ns	<0.0001
	HDL-P grans (µmol/L)	0.27 \pm 0.03 °c	0.26 \pm 0.03 °	0.26 \pm 0.02 °c	0.28 \pm 0.04 °cc	ns	ns
	HDL-P mitjanes (µmol/L)	8.1 \pm 0.6	9.8 \pm 1.0 °°	8.9 \pm 0.9	11.0 \pm 1.1 °°°+	0.0057	<0.0001
Altres	HDL-P petites (µmol/L)	14.3 \pm 2.1 °c	17.4 \pm 3.3 °	13.0 \pm 2.9 °cc	15.9 \pm 2.9 °°° °c	ns	<0.0001
	Ratio HDL-C/HDL-P	2.0 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1	2.0 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1 °°	ns	0.0029
	Diàmetre de partícula HDL (Z, nm)	8.3 \pm 0.1	8.3 \pm 0.1	8.4 \pm 0.1	8.4 \pm 0.1	ns	ns
	Total-C	179.16 \pm 15.8	188.51 \pm 15.3	181.61 \pm 17.4 +	189.7 \pm 24.9	ns	ns
	Total-TAG	78.80 \pm 21.8	77.46 \pm 10.34	100.41 \pm 34.84 °c	78.32 \pm 18.6 °	ns	0.0154

Taula 23: Contingut de colesterol i TAG a les diferents lipoproteïnes al llarg del temps segons la presència de placa. Els resultats es mostren com la mitjana \pm SD. El símbol (°) representa diferències vs OB. El símbol (c) representa diferències vs el grup control. El símbol (+) representa diferències vs el grup amb placa, mateix temps. Un símbol $p < 0.05$; dos símbols $p < 0.01$; tres símbols $p < 0.001$.

PARÀMETRES	Control (n=40)	Amb placa		Sense placa		ANOVA (<i>p</i> valor)	
		OB (n=7)	12M (n=7)	OB (n=17)	12M (n=17)	placa	temps
VLDL-C (mg/dL)	10,38 \pm 5,46	14,75 \pm 3,82 c	10,06 \pm 2,07	15,76 \pm 7,02 cc	9,76 \pm 3,72 °°	ns	.0033
VLDL-TAG (mg/dL)	44,41 \pm 17,20	63,75 \pm 15,59 c	48,72 \pm 8,26	68,37 \pm 28,95 ccc	45,92 \pm 11,96 °°	ns	.0093
IDL-C (mg/dL)	7,01 \pm 2,60	9,67 \pm 3,03 c	6,66 \pm 1,45	8,45 \pm 2,71	7,81 \pm 3,11	ns	.0435
IDL-TAG (mg/dL)	8,42 \pm 2,13	9,92 \pm 1,87	8,05 \pm 1,04	9,43 \pm 2,45	8,52 \pm 2,32	ns	ns
LDL-C (mg/dL)	106,74 \pm 14,08	134,74 \pm 30,94	115,11 \pm 13,29	112,42 \pm 14,07 ccc +	113,60 \pm 22,50	ns	ns
LDL-TAG (mg/dL)	10,79 \pm 2,73	14,06 \pm 4,46	9,58 \pm 2,34	12,26 \pm 3,34 c	11,48 \pm 4,31 °	ns	.0097
HDL-C (mg/dL)	55,02 \pm 10,84	45,34 \pm 4,02 ccc	56,69 \pm 8,56 °°°	44,97 \pm 5,07 cc	58,58 \pm 5,09 °°	ns	< .0001
HDL-TAG (mg/dL)	15,16 \pm 3,53	8,83 \pm 1,66 ccc	11,12 \pm 2,68 c	10,34 \pm 4,27 ccc	12,39 \pm 4,05 c	ns	.0223

Taula 24: $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ dels miRNA amb diferències significatives. Els resultats s'han calculat pel mètode *global mean* i es mostren com la mitjana. El símbol (°) representa diferències vs OB. El símbol (+) representa diferències vs el grup amb placa, mateix temps. Un símbol p < 0.05; dos símbols p < 0.01; tres símbols p < 0.001.

$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$							
miRNA	Sense placa			Amb placa			P valor
	OB	6M	12M	OB	6M	12M	Placa / Temps
miR-144-5p	0,299	0,121 °	0,120 °	0,275	0,134 °	0,161 °	ns / < .0001
miR-126-3p	18,856	18,019	20,313	14,691	11,144	14,640	0.0058 / ns
miR-145-5p	8,024	7,562	6,083	7,503	4,173	4,738	ns / .0366
miR-21-3p	0,302	0,238	0,213 °	0,519	0,263 °°°	0,244 °°°	.0099 / <.0001
miR-375	0,198	0,265	0,340 °	0,186	0,378	0,385 °	ns/ .0024
miR-20a-3p	0,351	0,232	0,247	0,419	0,253	0,246	ns/ .0017
miR-133a-3p	16,62	20,34	20,35	49,032 ++	51,153	47,700	ns/ .0007

