



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

() Facultad de
Medicina y Odontología

Departamento de Fisiología

**Estudio del efecto de la cirugía de bypass gástrico en Y de
Roux sobre los mecanismos moleculares asociados a la
fisiopatología de la obesidad**

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Fisiología (3127)

Presentada por:

Zaida María Abad Jiménez

Dirigida por:

Dra. Milagros Rocha Barajas

Dr. Víctor Manuel Víctor González

Valencia, septiembre de 2022

Programa de Doctorado 3127. Doctorado en Fisiología (RD 99/2011).
Facultad de Medicina y Odontología. Departamento de Fisiología.
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA.

Doctoranda

Zaida María Abad Jiménez

Graduada en Enfermería

Universidad de Valencia

Directores

Dra. Milagros Rocha Barajas

Investigadora Senior

FISABIO - Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia

Dr. Víctor Manuel Víctor González

Profesor Titular de la Universidad de Valencia e Investigador

FISABIO - Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia

Con la colaboración de:

Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia

Instituto de Salud Carlos III. Acción Estratégica en Salud

Publicado en **Valencia, 2022**



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

([ò ʌ]) Facultad de
Medicina y Odontología

Departamento de Fisiología

Dra. Milagros Rocha Barajas, Investigadora Senior en la Fundació per al Foment de la Investigació Sanitària i Biomèdica de la Comunitat Valenciana (FISABIO) – Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia,

Dr. Víctor Manuel Víctor González, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia e Investigador en la Fundació per al Foment de la Investigació Sanitària i Biomèdica de la Comunitat Valenciana (FISABIO) – Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia

CERTIFICAN:

Que Dña. **Zaida María Abad Jiménez**, Graduada en Enfermería por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “*Estudio del efecto de la cirugía de bypass gástrico en Y de Roux sobre los mecanismos moleculares asociados a la fisiopatología de la obesidad*” y autorizan su presentación como Tesis Doctoral para la obtención del grado de Doctor en Fisiología por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a todos los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia a 15 de Septiembre de 2022.

Dra. Milagros Rocha Barajas

Dr. Víctor Manuel Víctor González

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el grupo de Investigación Traslacional en Nutrición y Metabolismo del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Doctor Peset, perteneciente a la *Fundación para la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana* (FISABIO). Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias a las siguientes fuentes de financiación:

- Contrato predoctoral para la formación de Investigadores otorgada por el Instituto de Investigación Sanitaria Carlos III, con código FI17/00144.
- Proyecto de concurrencia competitiva financiado por el Instituto de Salud Carlos III en la Convocatoria AES 2013 — Proyectos de Investigación en Salud — “Papel de la autofagia y el inflamasoma en la fisiopatología de la obesidad: Efecto de la pérdida de peso y posibles implicaciones terapéuticas” con referencia PI16/00301, y cuya Investigadora Principal es Milagros Rocha Barajas, siendo el periodo de ejecución desde el 01/01/2017 hasta el 31/12/2019.
- Proyecto de concurrencia competitiva financiado por el Instituto de Salud Carlos III en la Convocatoria AES 2016 — Proyecto de Investigación en Salud — “Estudio de la dinámica y la función mitocondrial, el inflamasoma y su relación con las complicaciones cardiovasculares en la diabetes tipo 2: Implicaciones fisiopatológicas y clínicas” con referencia PI16/01083, y cuyo Investigador Principal ha sido Víctor Manuel Víctor González, siendo el periodo de ejecución desde el 01/01/2017 hasta el 31/12/2019.
- Proyecto de concurrencia competitiva financiado por el Instituto de Salud Carlos III en la Convocatoria AES 2019 — Proyectos de Investigación en Salud — “Efecto del tratamiento periodontal no quirúrgico sobre la activación de leucocitos y la diversidad del microbioma oral en pacientes con resistencia a la insulina: un enfoque de sexo y género” con referencia PI19/00437, y cuyo Investigador Principal es Milagros Rocha Barajas, siendo el periodo de ejecución desde el 01/01/2020 hasta el 31/12/2022.

- Proyecto de concurrencia competitiva financiado por el Instituto de Salud Carlos III en la Convocatoria AES 2019 — Proyectos de Investigación en Salud — “Estudio de la función mitocondrial, la autofagia y la mitofagia en la diabetes tipo 2: relación con las complicaciones cardiovasculares e implicaciones clínicas” con referencia PI19/00838, y cuyo Investigador Principal es Víctor Manuel Víctor González, siendo el periodo de ejecución desde el 01/01/2020 hasta el 31/12/2022.
- Proyecto de concurrencia competitiva financiado por la Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital de la Generalitat Valenciana — Subvenciones programa Prometeo para grupos de investigación de excelencia — “Patofisiología de las enfermedades cardiometabólicas” con referencia PROMETEO/2019/027, y cuyo Investigador Principal es Víctor Manuel Víctor González, siendo el periodo de ejecución desde el 01/03/2020 hasta el 30/04/2023.
- Proyecto de concurrencia competitiva financiado por el Instituto de Salud Carlos III en la Convocatoria AES 2013 — Proyectos de Investigación en Salud — “Efecto de la pérdida de peso sobre marcadores de estrés de retículo endoplasmático en la obesidad mórbida: Implicaciones fisiopatológicas y nuevas dianas terapéuticas” con referencia PI13/00073, y cuya Investigadora Principal es Milagros Rocha Barajas, siendo el periodo de ejecución desde el 01/01/2014 hasta el 31/12/2016.

Estas ayudas han sido cofinanciadas con fondos FEDER “A way to build Europe”.

Para la creación de las figuras contenidas en esta memoria se han utilizado los recursos de Servier Medical Art, proporcionado por Servier, bajo una licencia Creative Commons Attribution 3.0.

“Lo que conocemos es una gota, lo que no conocemos es un océano”
Isaac Newton

AGRADECIMIENTOS

Qué maravillosa es la vida cuando te das cuenta que has pasado del momento en que explicaba a mis padres, con destellos en mis ojos, que quería entrar en Enfermería porque me APASIONA el cuerpo humano por dentro (palabras textuales) a escribir los agradecimientos de mi tesis doctoral en Fisiología. Con el permiso del/la querido/a lector/a, ya que significativamente estoy segura que no me van a premiar con un Oscar en mi vida, me voy a recrear en lo inmensamente agradecida que estoy por haber llegado hasta aquí.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores Dra. Milagros Rocha y Dr. Víctor Manuel Víctor por acogerme y darme la oportunidad de poder realizar la Tesis Doctoral. A Milagros, por nuestras charlas tan productivas, por el esfuerzo y dedicación ofrecida sin esperar nada a cambio, por estar siempre dispuesta a ayudarme, por todos los consejos ofrecidos en todo momento. A Víctor, por sus mensajes de ánimo y su lucha inspiradora, por las correcciones y comentarios ofrecidos durante todos estos años, los cuales han sido de gran ayuda. Muchísimas gracias a ambos por ser mis mentores y creer en mí desde el primer día, cuando yo no lo hacía. Quiero también agradecer a todos los miembros del Servicio de Endocrinología y Nutrición y el Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo por su colaboración y amabilidad en todo momento. En especial, gracias al Jefe de Servicio Dr. Morillas y Dr. Sean Gómez, por creer en nuestros proyectos y facilitarnos tanto las cosas. Gracias a todos por vuestra disponibilidad y afán por la ciencia, vuestro trabajo es inmensamente inspirador. Gracias también a Mari Blanch y Dra. Prof. Rosario Salvador por vuestra comprensión y amabilidad en todo momento. Gracias también a Brian por su ayuda editorial en todos los manuscritos, incluida esta Tesis.

Siento una enorme gratitud con todos los miembros del laboratorio. Sois mis mitocondrias. Sin duda, no hubiera llegado a defender la Tesis Doctoral sin todos vosotros. A las personas que me recibieron con los brazos abiertos cuando llegué (algo perdida) como un pollito en mis prácticas de Máster: A Sandra, por ser mi primera compañera en el grupo de investigación, gracias por recibirme y haberme enseñado tantísimas cosas, por esas charlas delante del ordenador sobre bases de datos y obesidad – y sobre la vida–, por tu optimismo y humor. A Arantxa, por ese día en el microscopio de fluorescencia, por tu paciencia de aguantar que te hiciera tantas preguntas

insaciablemente, por compartir tantas horas en bancada y alegrías, por ser mi mentora de vida y seguir queriendo compartir tantos momentos conmigo. A Celia B, por tu afán de conocimiento y lucha constante, por todos tus consejos. A Rosa, por cuidarme en todo momento y darme la Biblia, por tus palabras tan cariñosas y amables, eres un increíble refugio ante la adversidad. A Irene, mi renita, por ser mi compañera de locuras, de disfraces, de tonterías. Gracias por todas las lágrimas y dolores de barriga de reír, por tu manera de trabajar y tu paciencia. A Carmen, por todas tus bromas y alegrías, por mantener la compostura cuando mi torpeza afloraba en la bancada. A Francesca, mi *pecorina*, gracias por ser mi pollito italiano, por todos tus abrazos y cariño que me has dado en todo momento, por tu lucha constante. A Susana, por ser un modelo en la pérdida de miedo a alcanzar la excelencia, por todos tus esfuerzos. A Noelia, por tu dedicación, manera de ver la ciencia y ejemplo de entrega. A Estefanía, por tu inmensa dulzura y esfuerzo; A Rubén, mi compañero de escritorio, por guiarme y ofrecerme una enorme sonrisa siempre que me giraba a la derecha, eres un gran referente. A los de ahora: A Pancho, gracias hacerme reír tanto y compartir tantos juegos conmigo; a Pedro, por enseñarme que hay vida más allá de la Tesis Doctoral, por tu humor y bromas. Ya sabéis que somos familia más allá del laboratorio. A Teresa, mi otra compañera de escritorio. Eres un ángel, sabes de sobra lo mucho que te admiro, gracias por tu enorme optimismo, alumbras mis días. A Celia G, por tu constancia y perseverancia. A Mey, por transmitirme toda tu energía y alegría por la ciencia y la vida. A Javi, por tus charlas durante la comida y tus bromas. A Bea, por tu gran dedicación y simpatía. A Belén, por su trabajo e implicación. A Cecilia, por tu enorme empatía y amabilidad. Al grupo de Oftalmología, a Óscar y Silvia, por la enorme simpatía que habéis tenido siempre conmigo, hemos compartido muchas aventuras juntos. Mención especial a Ana, mi otra mamá, y a Sergio. Gracias por tus abrazos y cariño Ana, sois todo un ejemplo a seguir. A todos los compañeros que han realizado prácticas en el Laboratorio, he aprendido más de vosotros de lo que os he podido enseñar. Gracias. Todos y cada uno de los que habéis pasado por el Laboratorio sois personas increíbles, gracias por todos estos años a vuestro lado.

A la gente que me acompaña en mi vida desde Enfermería, a mi otra familia. Eladio, Yuse, Sara, Juanma, Capi, Odei, Bosque, Mer, Larisa, Pepelu... sois personas muy especiales para mí y gracias por seguir queriendo compartir vuestra vida conmigo. A nuestro banco. A mis profesores y mentores Prof. Dr. Julián, por la ayuda ofrecida durante mi carrera como después, gracias por tu afán por la ciencia, es tremendamente contagioso;

y a Chelo, mi profesora de Biología y amiga, nutres mi corazón con tu alma, esperanza y afición por la ciencia, gracias por todos los cafés y por mantenerte fuerte, esta Tesis es tuya también.

I would also like to thank the people who welcomed me and took care of me during my scientific stay in Maastricht. Thanks to Prof. Dr. Stehouwer for motivating me in research and for his time dedicated to the statistics classes, to Dr. Houben for always welcoming me with a smile, for allowing me to feel like one more in his research group. Thanks also to Prof. Dr. Schalkwijk and Prof. Dr. van Greevenbroek for such productive meetings. To Kim, Pomme, Amée, Kai, Eline, Frank, Evelien, Armand, for those Friday meetings and coffees, for the patience you had with me and my English. A Rubén, Valeria, Irina, Bea, Mireya, Perla. Hicisteis que me sintiera como en casa en todo momento, gracias por nuestras cenas españolas y por todas las confidencias compartidas.

Por último, y no menos importante, a mis padres por absolutamente todo lo que luchan por mí, los esfuerzos que realizan (y por qué no dejarlo por escrito, en todo lo que me aguantan) y en el amor que me dan. Yo no sería quien soy sin todos los valores y educación que me habéis dado, sin esperar nada a cambio. Mención especial a mis abuelitas y mi tita Loli, que son capaces de brillar en el cielo igual que lo hacían en la tierra. Os quiero mucho y espero que estéis orgullosas de mí. A Rafa, el otro pilar de mi vida, quien es capaz de avivar mi corazón más que las hogueras de San Juan. Gracias por haber estado en mis peores y mejores días, por tus siempre reconfortantes palabras, tu humor, tu amor y por querer compartir tu vida conmigo. A las tres Carmen y a Filo. A todos vosotros, os estoy y estaré eternamente agradecida y escribiría 20 Tesis Doctorales más para poder dejar constancia de todo lo que os quiero. A la familia de Málaga y Valencia. A mi gata Tona, por sus ronroneos, su amor y despertarme a las 5 de la mañana para estudiar cuando iba al instituto. A mi perro Calcetines, que a día de hoy no se ha comido la Tesis, cuyo cambio de color de pelo podría investigarse perfectamente. A la raza “mopillo” y, especialmente, a Isis.

A mis padres.

A Rafa.

REGULACIÓN Y ESTRUCTURA

Según la normativa aprobada por la Escuela de Doctorado y la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Fisiología de la Universidad de València:

1. La presente Tesis Doctoral se ha estructurado en forma de compendio de publicaciones: El núcleo de la tesis está compuesto por cuatro artículos originales de primer autor (o cofirmantes) publicados en revistas Q1 y Q2 según la base de datos “Journal Citation Reports” (Anexo I: Publicaciones). La tesis también incluye un resumen global que consiste en un capítulo de introducción que expone los antecedentes descritos en la bibliografía científica y su contextualización (temática), un capítulo con la hipótesis y objetivos de la presente Tesis Doctoral, un capítulo que estipula la metodología realizada para la consecución de los objetivos, un capítulo que contiene los principales resultados y la discusión, y un capítulo final que expone las conclusiones generales, justificando la aportación original.

2. En base a la presente Tesis Doctoral, la Sra. Zaida María Abad Jiménez desea solicitar la Mención Internacional de Doctorado:

Durante el periodo de formación la doctoranda ha realizado una estancia de 103 días en un prestigioso centro de investigación en Países Bajos (Maastricht UMC+, Maastricht, Países Bajos), financiada a través de la Ayuda de Movilidad para personal investigador contratado en el marco de la AES (MV20/00070). Se ha incluido un resumen (abstract) y conclusiones en inglés, por ser una de las lenguas no oficiales de la Universidad de Valencia, apartados que serán expuestos en inglés.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABSTRACT	1
RESUMEN GLOBAL	27
1. TEMÁTICA	28
1.1. La obesidad	29
1.1.1. Definición y diagnóstico	29
1.1.2. Epidemiología y factores de riesgo	30
1.1.3. Fisiopatología de la obesidad	31
1.1.3.1. Tejido adiposo.....	32
1.1.3.2. Sistema inmunitario	35
1.1.3.3. Disfunción endotelial	37
1.2. Comorbilidades asociadas a la obesidad	41
1.2.1. Hipertensión arterial	41
1.2.2. Dislipidemia aterogénica	42
1.2.3. Insulin resistencia y diabetes mellitus	43
1.2.4. Síndrome metabólico y obesidad metabólicamente sana	45
1.3. Mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de la obesidad y comorbilidades	46
1.3.1. Estrés oxidativo	46
1.3.2. Formación del complejo inflammasoma	53
1.3.3. Autofagia	56
1.3.4. Metabolismo mitocondrial	62
1.3.5. Estrés de retículo endoplasmático y apoptosis celular	65
1.4. Abordaje terapéutico de la obesidad.....	69
1.4.1. Intervenciones en el estilo de vida	69
1.4.2. Tratamiento farmacológico	71
1.4.3. Cirugía metabólica: Bypass gástrico en Y de Roux	73
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	75
3. METODOLOGÍA	78
3.1. Reclutamiento de la población a estudio	79

3.2. Recogida de muestras y pruebas de laboratorio	79
3.3. Inmunoensayos	80
3.4. Análisis de las subfracciones de LDLc y HDLc.....	81
3.5. Aislamiento de leucocitos y tejido adiposo visceral.....	81
3.6. Extracción de proteína y electrotransferencia	82
3.7. Citometría estática	85
3.8. Extracción de células endoteliales y análisis de las interacciones leucocito-endotelio.....	85
3.9. Análisis estadístico	87
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89
5. CONCLUSIONES.....	111
CONCLUSIONS.....	113
BIBLIOGRAFÍA	115
ANEXO I. PUBLICACIONES	145
ANEXO II. GRAPHICAL ABSTRACT.....	201
ANEXO III. OTROS MÉRITOS DURANTE LA FORMACIÓN DEL DOCTORADO	203

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inflamación crónica de bajo grado en la obesidad.....	35
Figura 2. Interacciones leucocito-endotelio y formación de placa aterosclerótica.....	40
Figura 3. Estrés oxidativo y defensas antioxidantes.....	50
Figura 4. Activación del complejo inflammasoma NLRP3	55
Figura 5. Autofagia y mitofagia	59
Figura 6. Metabolismo mitocondrial	64
Figura 7. Estrés de retículo endoplasmático.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios, diluciones y especificaciones empleadas	83
---	----

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Montaje del sistema de cámara de flujo en microscopio..... 87

LISTA DE ABREVIATURAS

ALR: Absent in melanoma 2-like receptor (receptor similar al ausente en el melanoma 2)

AMP: Adenosine monophosphate (adenosina monofosfato)

AMPK: AMP-activated protein kinase (proteína cinasa activada por AMP)

ASC: Adaptor molecule apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain (molécula adaptadora tipo speck asociada a la apoptosis que contiene un dominio de activación y reclutamiento de caspasa)

AT: Adipose tissue (tejido adiposo)

ATF6: Activating transcription factor 6 (factor de transcripción activador 6)

ATG: Autophagy-related protein (proteína relacionadas con la autofagia)

ATP: Adenosine triphosphate (adenosina trifosfato)

BAT: Brown adipose tissue (tejido adiposo marrón)

BECLIN1: Coiled-coil moesin-like BCL2-interacting protein (proteína de bobina enrollada similar a la moesina que interactúa con BCL2)

BMI: Body mass index (índice de masa corporal)

C3c: Complement component 3 (complemento del componente 3)

CAM: Cell adhesion molecules (moléculas de adhesión celular)

CAT: Catalase (catalasa)

CD: Cluster of differentiation (cluster de diferenciación)

CHOP: C/EBP homologous protein (proteína homóloga de C/EBP)

CMA: Chaperone-mediated autophagy (autofagia mediada por chaperonas)

CRP: C-reactive protein (proteína c reactiva)

CVD: Cardiovascular diseases (enfermedades cardiovasculares)

DAMP: Damage-associated molecular patterns (patrones moleculares asociados al daño)

DBP: Diastolic blood pressure (presión arterial diastólica)

DHE: Dihydroethidium (dihidroetidido)

DRP1: Dynamin-related protein 1 (proteína relacionada con la dinamina 1)

eIF2 α : Eukaryotic initiation factor 2 α (factor de iniciación eucariota 2 α)

eNOS: Endothelial nitric oxide synthase (ácido nítrico sintasa endotelial)

ER: Endoplasmic reticulum (retículo endoplasmático)

ET1: Endothelin 1 (endotelina 1)

ETC: Electron transport chain (cadena de transporte de electrones)

FADH₂: Flavin adenine dinucleotide (flavín adenín dinucleótido)

FFA: Free fatty acids (ácidos grasos libres)

FIS1: Mitochondrial fission protein 1 (proteína de fisión 1 mitocondrial)

GPX: Glutathione peroxidase (glutación peroxidasa)

GRP78: 78 kDa glucose-regulated protein (proteína de 78KDa regulada por glucosa)

GTP: Guanosine triphosphate (trifosfato de guanosina)

H₂O₂: Hydrogen peroxide (peróxido de hidrógeno)

HbA1c: Glycated hemoglobin (hemoglobina glicosilada)

HBSS: Hanks' balanced salt solution (solución salina balanceada de Hank)

HDL: High-density lipoprotein (lipoproteína de alta densidad)

HDLc: HDL cholesterol (colesterol HDL)

HFD: High fat diet (dieta en alto contenido graso)

HIF1 α : Hypoxia-inducible factor 1 α (factor 1 α inducible por hipoxia)

HOMA-IR: Homeostatic model assessment for IR (evaluación del modelo homeostático para la IR)

HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells (células endoteliales de la vena umbilical humana)

ICAM: Intercellular adhesion molecule (molécula de adhesión intercelular)

IL: Interleukin (interleucina)

IR: Insulin resistance (resistencia a la insulina)

IRE1 α : Inositol-requiring 1 α (proteína 1 α que requiere inositol)

JNK: c-Jun N-terminal kinase (cinasa c-Jun N-terminal)

LAMP: Lysosome-associated membrane protein (proteína de membrana asociada al lisosoma)

LC3: Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (proteína 1 de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos)

LDL: Low-density lipoprotein (lipoproteína de baja densidad)

LDLc: LDL cholesterol (colesterol LDL)

LIR: LC3 interacting region (región de interacción LC3)

LPS: Lipopolysaccharide (lipopolisacárido)

MCP1: Monocyte chemoattractant protein 1 (proteína quimioatrayente de monocitos 1)

MetS: Metabolic syndrome (síndrome metabólico)

MFF: Mitochondrial fission factor (factor de fisión mitocondrial)

MFN: Mitofusin (mitofusina)

MiD: Mitochondrial dynamics proteins (proteínas dinámicas mitocondriales)

MIEAP: Mitochondria-eating protein (proteína que se alimenta de las mitocondrias)

MPO: Myeloperoxidase (mieloperoxidasa)

mtDNA: Mitochondrial DNA (ADN mitocondrial)

mTOR: Mammalian target of rapamycin (proteína diana de la rapamicina en mamíferos)

mtROS: Mitochondrial ROS (especies reactivas de oxígeno mitocondriales)

NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide (nicotinamida adenina dinucleótido)

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato)

NBR1: Neighbor of the BRCA1 gene (proteína vecino del gen BRCA1)

NF- κ B: Nuclear factor kappa B (factor nuclear kappa B)

NLR: Nucleotide-binding and leucine repeat receptor (receptor de unión a nucleótidos y de repetición de leucina)

NLRP3: NLR pyrin domain-containing 3 (dominio de pirina NLR que contiene 3)

NO: Nitric oxide (óxido nítrico)

NRF: Nuclear respiratory factor (factor respiratorio nuclear)

-OH: Hydroxyl radical (radical hidroxilo)

$^1\text{O}_2$: Singlet oxygen (oxígeno singlete)

O_2 : Molecular oxygen (oxígeno molecular)

O_2^- : Superoxide (superóxido)

ONOO $^-$: Peroxynitrite (peroxinitrito)

OPA1: Optic atrophy 1 (proteína de la atrofia óptica 1)

oxLDL: Oxidized LDL (lipoproteínas de baja densidad oxidadas)

OXPHOS: Oxidative phosphorylation (fosforilación oxidativa)

p62: Sequestosome 1 (secuestrosoma 1)

PAMP: Pathogen-associated molecular patterns (patrones moleculares asociados a patógenos)

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells (células mononucleares de sangre periférica)

PBS: Phosphate buffered saline (tampón fosfato salino)

PERK: PKR-like ER kinase (cinasa del RE tipo PKR)

PGC1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (coactivador 1 α del receptor activado por el proliferador de peroxisomas)

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase (fosfatidilinositol 3 cinasa)

PINK1: Phosphatase and tensin homologue-induced putative kinase 1 (cinasa 1 inducida por homólogos de fosfatasa y tensina)

PMN: Polymorphonuclear leukocyte (leucocito polimorfonuclear)

PRKN: Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase (ubiquitina proteína ligasa parkin RBR E3)

RAAS: Renin–angiotensin–aldosterone system (sistema renina-angiotensina-aldosterona)

RNS: Reactive nitrogen species (especies reactivas de nitrógeno)

ROS: Reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno)

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RYGB: Roux-en-Y gastric bypass (bypass gástrico en Y de Roux)

SARS-Cov-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (coronavirus tipo 2, síndrome respiratorio agudo severo)

SAT: Subcutaneous AT (tejido adiposo subcutáneo)

SBP: Systolic blood pressure (presión arterial sistólica)

sdLDL: Small dense LDL (lipoproteínas de baja densidad pequeñas y densas)

SIRT: Sirtuin (sirtuina)

SOD: Superoxide dismutase (superóxido dismutasa)

sXBP1: Spliced XBP1

T2D: Type 2 diabetes (diabetes mellitus tipo 2)

TBS-T: Tris-buffered saline with tween (solución salina tamponada con tris con polisorbato)

TFAM: Mitochondrial transcription factor A (factor de transcripción A mitocondrial)

TG: Triglycerides (triglicéridos)

TLR: Toll-like receptor (receptor tipo Toll)

TMRM: Tetramethylrhodamine; methyl ester (tetrametilrodamina; metilo de éster)

TNF α : Tumor necrosis factor α (factor de necrosis tumoral α)

UCP: Uncoupling protein (proteína desacoplante)

ULK1: Unc-51 like autophagy activating kinase 1 (cinasa 1 activadora de autofagia tipo Unc-51)

UPR: Unfolded protein response (respuesta a proteínas mal plegadas)

VAT: Visceral adipose tissue (tejido adiposo visceral)

VCAM1: Vascular cell adhesion molecule 1 (molécula de adhesión celular vascular 1)

VDAC: Voltage-dependent anion-selective channel (canal selectivo de aniones dependiente del voltaje)

VLCD: Very low calorie diet (dieta muy baja en calorías)

VLDL: Very low-density lipoproteins (lipoproteínas de muy baja densidad)

WAT: White adipose tissue (tejido adiposo blanco)

WHO: World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)

XBP1: X-box binding protein 1 (proteína 1 de unión a X-box)

ABSTRACT

Introduction

Obesity is a complex and multifactorial disease that represents one of the largest problems facing public health in modern societies. It is characterized by an imbalance between excessive intake and low energy expenditure, leading to excess body fat and metabolic overload. The predominant storage of fat in the visceral adipose tissue (VAT) depot characteristic of the abdominal obesity phenotype is typically accompanied by a wide range of abnormalities, including metabolic (insulin resistance [IR], type 2 diabetes [T2D], and dyslipidemia) and cardiovascular (hypertension, stroke, and endothelial dysfunction) disorders, musculoskeletal complications, physical disabilities, mental illnesses, and cancer. Indeed, excess weight, and particularly accumulation of abdominal fat, has also been epidemiologically associated with increased cardiovascular morbidity and mortality. Obesity thus represents a global health challenge, and knowing the causes and consequences of this disease is essential for prevention and health promotion.

The international diagnostic method for overweight and obesity is the body mass index (BMI). This value is obtained by dividing the patient's weight by the square of their height, expressed in kg/m^2 . Classification is defined as underweight ($<18.5 \text{ kg/m}^2$), normal weight ($18.5\text{-}24.9 \text{ kg/m}^2$), overweight ($25.0\text{-}29.9 \text{ kg/m}^2$), grade I obesity ($30\text{-}34.9 \text{ kg/m}^2$), grade II ($35\text{-}39.9 \text{ kg/m}^2$), grade III obesity or morbid obesity ($\geq 40 \text{ kg/m}^2$). However, it is recommended to complement this measurement with waist circumference for a more accurate assessment.

Focusing on the prevalence of the disease worldwide, the World Health Organization (WHO) states that 1.9 billion adults were overweight and 650 million were diagnosed with obesity in 2016. The global prevalence of obesity has tripled, with an estimated 18% and 21% obesity rate in men and women, respectively, by 2025. In Spain, the prevalence of obesity in the adult population represented 21.6% between 2014 and 2015. In addition, the healthcare resources allocated to the population with obesity increase according to BMI, where the population with obesity grade II or higher present a higher risk of hospitalization. Regarding the causes that trigger obesity, it is postulated that it is the result of a complex interaction between genetic, epigenetic, behavioral and psychological risk factors, together with environmental and socioeconomic risks. Currently, the imbalance between caloric intake and energy expenditure may be conditioned by a lifestyle of increased consumption of fast food and sugary drinks, lack of physical activity, sedentary nature and psychological conditions, among others. In addition to the

ABSTRACT

previously mentioned risk factors, energy balance can be influenced by individual (social and family environment) and collective (institutions and public policies) variables.

This translates into an increased risk of morbidity and mortality in patients with obesity. For example, an association of BMI with the mortality ratio has been demonstrated after 24 years of follow-up, as patients with grade I and II obesity had a higher risk of all-cause mortality compared to individuals with normal weight. This disease also affects life expectancy, with an average reduction of 3 years in patients with grade I obesity and 8 years in patients with grade III obesity. Given these premises, strategies that focus on weight loss in patients with obesity are sure to have a beneficial effect. Specifically, bariatric surgery can considerably reduce the risk of death from cardiovascular diseases (CVD), T2D or cancer, pathologies that are highly related to an increase in BMI. In this sense, knowing the causes and consequences of obesity is essential for prevention and health promotion, with the aim of reducing the impact of its morbimortality in the actual society.

Regarding the physiopathology of obesity at the cellular level, the ectopic storage of fat and excessive storage of free fatty acids (FFA) in the adipocyte as a consequence of high nutrient input leads to lipotoxicity, hypertrophy and dysfunction of adipose tissue (AT). This situation induces loss of functionality due to an increase in adipocyte size, ectopic fat accumulation and induction of proinflammatory cytokines, hypoxia and fibrosis. Chronic low-grade inflammation is an intrinsic characteristic of obesity and involves AT (adipose tissue) and leukocytes. First, hypertrophic AT stimulates the secretion of proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin (IL) 1 β , IL6 and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1). In addition, there is an increase in leptin expression and a decrease in adiponectin expression, with subsequent activation of immune and endothelial cells. Such alterations in these cytokines promote immune cell infiltration in metabolic tissues, thus prolonging and exacerbating the inflammatory response and promoting and maintaining IR. Recruitment of macrophages with an M1-type phenotype involves an exacerbated immune response by which TNF α and IL6 are locally releasing, thereby favoring pathological remodeling and amplification of the inflammatory response of the AT. In addition, during adipocyte hypertrophy, the blood supply to the AT can be limited and hypoxia-related markers are induced, resulting in increased expression levels of angiogenic factors and fibrotic factors. Specifically, hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) is elevated in the AT of patients with obesity

compared to normal-weight individuals. In parallel, the hypertrophic AT signals induce an inflammatory cascade response in leukocytes by activating toll-like receptors (TLR), nuclear factor kappa B (NF- κ B) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathways, all of them resulting in the release of proinflammatory cytokines.

Another tissue involved in the pathophysiology of obesity is the immune system. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are known to be capable of reflecting the nutritional responses of key tissues involved in energy homeostasis. Specifically, they are closely associated with adiposity since they are able to express key genes of lipid metabolism. In the context of obesity, an increased recruitment of T lymphocytes has been shown to correlate with BMI, with greater infiltration in VAT than in the subcutaneous AT (SAT). Because the leptin receptor is present on T lymphocytes, it is postulated that increased leptin in obesity affects the activation of Th1 cells (characterized by TNF α production) rather than a Th2 phenotype. Therefore, T cells may also contribute to the maintenance of chronic low-grade inflammation. In parallel, neutrophils are a polymorphonuclear leukocyte (PMN) population and are the first leukocyte line to initiate an inflammatory response, releasing cytokines involved in the recruitment and activation of other immune cells. Several cohort studies of patients have shown an increased percentage and activation of neutrophils in obesity. In addition to immune cells, C-reactive protein (CRP) and complement component 3 (C3c) are related to immune mechanisms. Both proteins provide a response to acute phases of inflammation. CRP is synthesized in the liver in response to the cytokine IL6, while C3c is secreted by hepatocytes, activated macrophages and adipocytes. Plasma CRP and C3c levels are elevated in patients with obesity and their increase correlates directly with BMI, body fat, waist circumference, triglycerides (TG) and IR. Overall, there is a shift towards a proinflammatory phenotype during obesity.

The progression of obesity-related IR involves a failure of long-term adaptation of β -cells, reduction in their mass, impaired insulin secretion and T2D progression, all of which leading to chronic hyperglycemia. Chronic release of FFA by lipolysis of the adipocytes stimulates β -pancreatic cell dysfunction and hepatic overproduction of TG and alters the size, density and metabolic characteristics of low-density lipoprotein (LDL) particles, triggering atherogenic dyslipidemia. This disorder is clinically diagnosed by presenting elevated levels of TG and small dense LDL (sdLDL), together with a reduced level of high-density lipoprotein (HDL). sdLDL represents a condition observed in

ABSTRACT

individuals with central adiposity and is generally associated with cardiovascular risk. Together, altered fasting basal glucose, abdominal obesity, hypertension and dyslipidemia represent key factors in the development of metabolic syndrome. In contrast, patients with metabolically healthy obesity are characterized by an absence of these metabolic abnormalities. It is now thought that metabolically healthy obesity is a transient phenotype that can develop into unhealthy metabolic obesity during the progression of the disease. Patients with metabolically healthy obesity are characterized by storage of fat predominantly in the subcutaneous depot, less immune cell infiltration into the VAT depot, and a favorable inflammatory profile, including a lower release of TNF α and IL1 β . Nevertheless, the risk of developing CVD is still higher compared to individuals with normal weight.

Obesity is characterized by a metabolic imbalance in vascular homeostasis that promotes the development of endothelial dysfunction and the atherosclerotic process. Vascular health is impaired in several ways during obesity, including arterial stiffening, endothelial dysfunction and atherosclerosis, which are primary phases in the development of major CVD such as stroke and coronary diseases. In this context, proinflammatory status, IR, and oxidative stress are recognized as major inducers of vascular damage and endothelial dysfunction.

Endothelial dysfunction is characterized by a reduction in the bioavailability of vasodilator components and an increase in endothelium-derived contractile factors. Mechanisms attributed to the progression of endothelial dysfunction in obesity include elevated levels of LDL and TG, increased free radicals, and elevated levels of inflammatory mediators. Proinflammatory cytokines stimulate endothelial NF- κ B signaling, resulting in a procoagulant phenotype that promotes leukocyte adhesion by increasing the release of cell adhesion molecules (CAM).

The exposure of the intimal endothelium to damaging stimuli such as circulating proinflammatory cytokines, activated leukocytes and oxidized LDL (oxLDL) particles triggers the activation of endothelial cells and the initiation of the endothelial adhesion cascade. In this process, the leukocytes slow down the speed at which they circulate through the blood vessel and begin to roll over the endothelium. Afterwards, they firmly adhere to the endothelium and initiate the process of transmigration across the endothelial barrier. These processes are initiated by CAM selectin-dependent adhesion molecules (E-selectin and P-selectin) and mediated by intercellular adhesion molecules (ICAM) and

vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1), which are increased in obesity. oxLDL are recognized and taken up by specific receptors on infiltrating endothelium macrophages, a process that generates the accumulation of lipid-laden macrophages (known as foam cells). The accumulation of this cell type produces large amounts of inflammatory molecules that maintain the activation of endothelial cells and initiate the activation of muscle cells and fibroblasts. Chronic inflammation will lead to necrosis of foam cells, which create a necrotic core characterized by the production of proinflammatory and proapoptotic signaling. In this inflammatory environment, muscle cells modify their properties, acquiring the ability to migrate, thus stabilizing the atherosclerotic lesion. This situation largely perpetuates the inflammatory response and contributes to the vascular remodeling observed in obesity.

In this context, oxidative stress is recognized as a major inducer of vascular damage and endothelial dysfunction. Oxidative stress is a hallmark of obesity caused by undermined antioxidant capacity and increased levels of reactive oxygen species (ROS) production. There are different types of ROS: superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($-OH$) and singlet oxygen (1O_2). In addition, there are reactive nitrogen species (RNS) such as peroxynitrite ($ONOO^-$). In this sense, excess ROS is detected in the AT and immune cells of patients with obesity. As a whole, hyperlipidemia and hyperglycemia induce ROS/RNS stress, either by increased free radical production or through impairment of antioxidant defenses. Previous studies have reported an impairment of the main antioxidant systems in patients with obesity, including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX), which are considered the front line of enzymatic ROS scavenging. The resulting accumulation of ROS leads to oxidation of macromolecules that include lipids, proteins and DNA, eventually affecting cellular homeostasis and function. In particular, oxidizing species cause injury in the vascular wall by interrupting the bioavailability of NO (nitric oxide) and oxidizing LDL particles. One of the explanations for the pathological increase in ROS observed in obesity is the mitochondrial dysfunction that occurs as a consequence of the augmented nutrient supply. This term includes maladaptive mitochondrial responses to alterations in mitochondrial metabolism, which promote mitochondrial DNA (mtDNA) mutations, mitochondrial ROS (mtROS) production and apoptosis. In addition, myeloperoxidase (MPO) enzyme activity — a non-mitochondrial source of ROS — is involved in the production of different ROS. MPO is associated with an increased risk of coronary artery disease and

ABSTRACT

overall mortality, and so the excessive or unregulated production of this compound could exacerbate oxidative stress in leukocytes.

mtROS originate from electrons that do not follow the transfer order in the electron transport chain (ETC), and they dissipate directly without coupling to ATP (adenosine triphosphate) synthesis. It is known that excess of energetic substrates in obesity induces an exacerbated electron supply to the ETC, leading to altered mitochondrial membrane potential and increased electron leakage. Specifically, the release of mtROS in adipocytes interferes with fatty acid oxidation and favors the accumulation of TG. This alteration leads to the release of proinflammatory cytokines, accentuating mitochondrial dysfunction. Moreover, it is known that adipocyte mitochondria of obese subjects display a lower oxidative capacity and gene expression of ETC complexes. All this implies a slowing of mitochondrial respiration and an increase in the nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) reserve, thus enhancing the generation of mtROS.

The induction of the inflammasome complex is also intimately linked to oxidative stress and mitochondrial dysfunction. In this way, the inflammasome complex is a key component of the host defense and inflammatory response. It consists of a multimeric complex formed by the nucleotide-binding and leucine repeat receptor (NLR) or absent in melanoma 2-like receptor (ALR) sensors; namely, the adaptor molecule apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain (ASC) and the procaspase 1 effector. The target of the formation of the inflammasome complex is the activation of caspase 1, which proteolytically activates the cytokines IL1 β and IL18, both responsible for generating proinflammatory activity.

The inflammasome complex requires both priming and an activation signal mediated by pathogen-associated molecular patterns (PAMP) or damage-associated molecular patterns (DAMP). First, PAMP-mediated TLR-lipopolysaccharide (LPS) adaptor molecules or cytokines receptors activate nuclear transcription of NF- κ B. This nuclear factor acts by inducing the transcriptional expression of NLR pyrin domain-containing 3 (NLRP3) and pro-IL1 β . The second signal of inflammasome activation is triggered by DAMP, which is thought to activate the NLRP3 inflammasome by inducing various cellular events, including K⁺ efflux, Ca²⁺ signaling, mitochondrial damage, ROS, oxidized mtDNA, uric acid crystal and cholesterol. In addition, it is postulated that the NLRP3 inflammasome can be activated by hyperglycemia, elevated FFA, proinflammatory cytokines, hyperleptinemia and oxLDL, highly prevalent disorders in

patients with obesity. In obesity, these metabolic abnormalities are accompanied by higher levels of both immune cell infiltration and expression of NLRP3, caspase 1 and IL1 β in their VAT. The NLRP3 inflammasome has also been associated with hypertrophy in the AT of patients with obesity, where increased *caspase 1* gene expression was inversely correlated with insulin sensitivity. Taken together, these data establish a role for the NLRP3 inflammasome in the identification of obesity-associated danger signals and in the release of proinflammatory cytokines, and thus in obesity — and IR — induced inflammation.

Considering the metabolic role of adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) in insulin signaling and inflammatory pathways, it has also been postulated as a key pathogenic factor involved in obesity. It is known that AMPK enables cellular metabolism to adapt in response to nutritional challenges. In particular, AMPK is activated by physiological or pathological inputs involving ATP depletion, thereby inducing catabolic cellular processes and inhibiting energy-consuming processes. Thus, under caloric restriction, AMPK activation promotes glucose uptake and glycolysis and activates lipolysis and oxidation. These changes are associated with a significant regulation of autophagy, mitochondrial metabolism and endoplasmic reticulum (ER) stress.

For its part, autophagy is a catabolic process with an important role in the recycling of cytosolic macromolecules and damaged cellular organelles. It is considered as energy sensor for cell survival, since autophagy leads to increased availability of amino acids necessary for the synthesis of new proteins, contributes to the elimination of pathogens and prevents cellular stress. In this process, cytosolic macromolecules and damaged organelles are a target for autophagosomal capture following degradation by lysosome fusion and their release into the cellular environment. Autophagosome formation is initiated by nutrient deprivation or an increased AMP/ATP ratio, which induces AMPK. Subsequently, a signaling cascade in the ER involving mammalian target of rapamycin (mTOR) protein and unc-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1) activation is initiated. This process continues with the formation and elongation of an isolation membrane driven by phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) / coiled-coil moesin-like BCL2-interacting protein (BECLIN1) complex and several autophagy-related proteins (ATG), catalyzing the conjugation and lipidation of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) I to LC3II, which acts as a bridge between the ubiquitinated cargo

ABSTRACT

and autophagosome. The proteins sequestosome 1 (p62) and neighbor of the BRCA1 gene (NBR1) are responsible for ubiquitinating the components to be degraded. These proteins interact with LC3II via the LC3 interacting region (LIR) domains. Similarly, the selective engulfment of dysfunctional mitochondria by autophagosomes — referred to as mitophagy — is driven principally by mitochondria-eating protein (MIEAP) or phosphatase and tensin homologue-induced putative kinase 1 (PINK1) / parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase (PRKN) signaling. When the mitochondrial membrane potential is disrupted, PINK1 accumulates on the outer mitochondrial membrane and initiates a signaling cascade through mitochondrial clearance. PRKN-induced polyubiquitination of mitochondria serves as an anchor point for p62 and facilitates recognition by LC3, allowing it to bind to the autophagosome, which helps to control mitochondrial quality.

In the context of obesity, the evidence on the modulation of autophagy is controversial. Obesity or overfeeding can suppress or promote autophagy depending on the nature and evolution of obesity, as well as the type of tissue or specific cell. In this sense, it would be expected that obesity — a chronic state of nutrient overabundance — is associated with the downregulation of autophagy. However, there is strong evidence that autophagy markers are upregulated in VAT and SAT of patients with obesity in whom there is a proinflammatory state in the AT. This may be because inflammation can increase autophagy to mitigate and resolve the production of proinflammatory cytokines. On the contrary, in PBMC, a high-fat diet was found to lead to a decrease of autophagy markers and an increase in macrophage polarization to M1, a highly inflammatory phenotype.

To maintain metabolic homeostasis, organisms adjust the capacity and efficiency of ATP generation according to cellular energy demand. Mitochondria are known to play a key role in ATP production by oxidative phosphorylation (OXPHOS), as well as regulation of Ca^{2+} homeostasis and programmed cell death. To deal with these challenges, mitochondria mediate a series of processes, such as mitochondrial biogenesis and dynamics, which determine mitochondrial morphology, quality and abundance.

The main responsible for mitochondrial biogenesis is peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC1 α), activated by AMPK and sirtuin (SIRT) 1 in situations of caloric restriction. Among the mediators activated by PGC1 α , mitochondrial transcription factor A (TFAM) and nuclear respiratory factor (NRF) 1 and 2 are involved in mitochondrial encoded gene transcription and mtDNA replication. The proinflammatory status and hypoxia observed in obesity decreases the PGC1 α expression

in adipocytes, followed by lower TFAM and mtDNA levels in PBMC of patients with IR and obesity.

In parallel, changes in the architecture of the mitochondrial network involve mitochondrial fusion and fission. First, fusion of the outer membrane and inner membrane involves mitofusin (MFN) 1 and 2 and optic atrophy 1 (OPA1) proteins. In turn, mitochondrial fission is mediated by dynamin-related protein 1 (DRP1), mitochondrial fission protein 1 (FIS1), mitochondrial fission factor (MFF) and mitochondrial dynamics proteins (MiD) 49 and 51. Under conditions of energy balance, mitochondria continue to be distributed around the cytosol without forming complexes; in contrast, under fasting conditions they tend to fuse together to share mitochondrial structures. There is growing evidence of a direct connection between mitochondrial dynamics and nutrient availability status, suggesting that modifications in mitochondrial architecture and networks are a mechanism of bioenergetic adaptation to metabolic demands. Interestingly, a reduction in MNF1, MNF2 and OPA1 has been associated with an impairment of insulin sensitivity. In addition, it is known that MFN2 is involved in the stimulation of mitochondrial respiration, substrate oxidation and ETC proteins. In terms of metabolic demands, cellular starvation has been linked to the elongation of mitochondria through upregulated fusion and increased ATP synthesis capacity, while a rich-nutrient environment tends to generate mitochondrial fragmentation and apoptotic function via increased fission. For its part, fragmentation probably reduces mitochondrial oxidative metabolism, as displayed in the adipocytes of animal models and patients with obesity.

The ER is the cell organelle involve in protein synthesis and folding. In situations of oxidative stress, the possibility of effective protein folding is hindered, resulting in dysfunctional proteins and provoking a situation of ER stress. In response to ER stress, the unfolded protein response (UPR) is activated through three transmembrane proteins: inositol-requiring 1 α (IRE1 α), double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase (PERK) and activating transcription factor 6 (ATF6). Upon ER dysregulation, the dissociation of 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78) with these three proteins is triggered and the UPR is activated. In the case of the first cell signaling cascade, dissociation of GRP78 activates PERK and phosphorylates eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α), thus inhibiting protein translation. The second UPR pathway is ATF6, which translocates to the nucleus and induces ER stress response genes, such as chaperones, x-box binding protein 1 (XBP1) and C/EBP homologous protein (CHOP).

ABSTRACT

Finally, IRE1 α induces the processing of the XBP1 gene into spliced XBP1 (sXBP1) by deletion of an intron. sXBP1 acts as a transcription factor that induces the expression of chaperones and genes involved in protein degradation. IRE1 α is also involved in the activation of kinase signaling cascades, such as JNK, involved in the induction of inflammatory cascades. The persistent activation of UPR pathways during metabolic overload can lead to pathological events, including impairment of insulin signaling, initiation of inflammatory cascades, or even expression of CHOP, a transcription factor involved in the modulation of numerous proapoptotic factors.

Increased protein folding load can induce depolarization of the inner mitochondrial membrane, while increased mtROS, on the other hand, produces a decrease in ATP. Thus, ER stress and oxidative stress potentiate and feedback each other, altering cellular homeostasis and activating proapoptotic signaling. It has been speculated that when the capacity of misfolded proteins exceeds the proteasome-mediated degradation system, autophagy is activated to eliminate these proteins. In this context, it has been reported that ER stress is upregulated in the SAT of patients with obesity, due to nutrient overload and the inflammatory state of these individuals. Therefore, ER stress in patients with obesity may affect metabolic regulation and contribute to obesity-associated comorbidities. In turn, ER stress has been reported to be reduced in the AT of patients with obesity after bariatric surgery, suggesting an association between relief of ER stress and metabolic improvements in this population.

As explained, the different pathophysiological factors involved in obesity make it a difficult disease to address. Strategies to treat obesity, including lifestyle interventions and pharmacotherapy, often produce unsatisfactory results. In addition, poor patient adherence can render these strategies ineffective insofar as achieving long-lasting benefits. In this sense, Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) is a weight loss surgical technique that has been shown to have consistent short and long-term effects on many obesity hallmarks, including improvement of classic metabolic syndrome outcomes and inflammatory and subclinical atherosclerotic parameters. The first-choice medical approach to achieve glycemic control and reduce cardiovascular risk factors in T2D patients is oral anti-diabetic medication. Metformin is the most commonly prescribed drug for T2D and is thought to exert its primary antidiabetic action by suppressing hepatic glucose production and through a direct effect on cellular metabolism by inducing AMPK and inhibiting mtROS production through mitochondrial complex I. Metformin not only

displays anti-hyperglycemic properties, but also improves endothelial function through CAM reduction. In addition, it is currently attracting attention due to its role as an immune system modulator with antiinflammatory properties. RYGB intervention and the use of metformin in patients with obesity and comorbidities have become the subject of special interest in recent years. It is postulated that they can modulate the pathophysiology of obesity, although their main targets and mechanisms of action are largely unknown.

Hypothesis and objectives

Obesity is a multifactorial disease involving a series of metabolic alterations such as chronic low-grade inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction, which contribute to the development of comorbidities such as IR, altered lipid profile and arterial hypertension. It is known that AT and the immune system play a fundamental role in the pathophysiology of this disease, as they contribute to the development of associated comorbidities. Specifically, AT hypertrophy induces an excessive release of proinflammatory cytokines that perpetuates chronic low-grade inflammation. In parallel, nutrient overload induces an alteration in mitochondrial homeostasis and, as a consequence, increased electron leakage and ROS formation. These alterations converge in an overactivation of the cells of the immune system and alteration of the permeability of the vascular endothelium, resulting in an increase in the interactions of leukocytes with the endothelium, which contributes to the initiation of the atherosclerotic process and subsequent development of vascular complications. At the intracellular level, there is evidence reflecting the involvement of different molecular pathways in the pathophysiology of obesity, such as autophagy activation, ER stress and alterations in mitochondrial dynamics.

Currently, there are several pharmacological and surgical treatments that help to improve the metabolic status of patients with obesity and associated comorbidities, although the mechanisms by which this improvement is mediated is still poorly understood. In this context, research into the molecular mechanisms involved in weight loss could help to increase knowledge of the pathophysiology and lead to the discovery of new therapeutic targets to combat the disease. Specifically, the use of metformin in patients with metabolic disease would seem to lead to an improvement in the inflammatory response and oxidative stress. However, the underlying mechanisms involved in the response in obesity are unknown.

ABSTRACT

Under these premises, we hypothesized that RYGB-induced weight loss and hypoglycemic drug treatment can modulate several metabolic pathways in leukocytes — primordial components of the immune system —, and AT — the tissue that is most affected by obesity —, respectively.

Therefore, the aim of the present PhD thesis is to determine the effect of RYGB surgery on the modulation of chronic low-grade inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction, exploring the involvement of the inflammasome complex, autophagy, mitochondrial dynamics and ER stress. Furthermore, given the beneficial effect of metformin on ROS production and cellular metabolism, we wondered whether this drug can improve the metabolic state of AT through modulation of inflammatory and autophagy pathways.

To this end, we set out the following specific objectives:

1. To explore the effect of RYGB surgery-induced weight loss on the activation and oxidative status of peripheral blood leukocytes and endothelial dysfunction.
2. To examine whether RYGB surgery-induced weight loss modulates AMPK activity, ER stress, autophagy and mitophagy in peripheral blood leukocytes.
3. To evaluate whether RYGB surgery-induced weight loss in women modulates mitochondrial dynamics in peripheral blood leukocytes.
4. To determine whether the molecular mechanisms underlying the immunomodulatory effects of metformin involve activation of the NLRP3 inflammasome complex and/or modulation of autophagy in VAT of patients with obesity.

Material and methods

Recruitment of the study population

Patients with obesity undergoing a RYGB surgery protocol were recruited between 2014 and 2019 from the Department of Endocrinology and Nutrition and Department of General and Digestive System Surgery of University Hospital Dr. Peset (Valencia, Spain). The entire study population was informed about the objectives and methodology of the study and signed a written informed consent. The study protocol was approved by the Hospital's Human Ethics Committee (code 96/16), in line with the guidelines of the Declaration of Helsinki. The inclusion criteria were patients aged between 18 and 65 years, with a BMI ≥ 35 kg/m² and selected to undergo RYGB surgery. Pregnancy or

lactation, severe renal or hepatic disease, chronic drug abuse, psychiatric disorders, malignant tumors, history of CVD, chronic inflammatory disease or secondary obesity (hypothyroidism, Cushing's syndrome) were considered exclusion criteria. The variables to be analyzed were obtained at the time of surgery, at a visit prior to surgery or at a visit 12 months post-surgery.

Sample collection

The study cohort attended the Endocrinology and Nutrition Nursing Service for the extraction of peripheral blood, obtained from the brachial vein under fasting conditions. Anthropometric measurements including weight, height, systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP), and waist circumference were obtained during the physical exploration. Subsequently, BMI, percentage of excess weight loss, and waist-to-hip ratio were calculated. Serum and plasma were obtained from collection tubes and aliquots were immediately stored at -80°C for immunoassay analyses or LDL and HDL subfractions. Biochemical parameters such as lipid profile — total cholesterol, LDL cholesterol (LDLc), HDL cholesterol (HDLc), TG —, parameters of carbohydrate metabolism — glucose, insulin, glycated hemoglobin (HbA1c), homeostatic model assessment for IR (HOMA-IR) —, CRP, C3c and blood count were determined.

Immunoassays

The ELISA technique was used for the quantification of SOD and protein carbonylation, both of which were evaluated with a commercial kit following the manufacturer's instructions. The Luminex® 200 analyzer system was used to quantify serum levels of the proinflammatory molecules IL6, IL1 β , IL18, TNF α , ICAM1, P-selectin and MPO.

Analysis of LDLc and HDLc subfractions

LDLc and HDLc subfractions were identified and quantified through polyacrylamide gel electrophoresis using the Quantimetrix Lipoprint® computer system. For LDL, the electrophoretic profile is classified according to particle size as pattern A (characterized by large LDL particles), intermediate pattern, and pattern B (predominance of sdLDL particles). For the qualitative analysis of HDL, the system differentiates 10 subfractions: 1-3 represents large HDL particles; 4-7 indicates medium HDL particles; and 8-10 represents small HDL particles.

ABSTRACT

Isolation of leukocytes and visceral adipose tissue

To isolate the PBMC and PMN population, collected whole blood was mixed and incubated with 3% dextran for 45 minutes. Subsequently, a Ficoll-Hypaque density gradient was used to isolate leukocyte populations. After centrifugation at 650g for 25 min, the PBMC halo was collected and the PMN pellet was incubated with erythrocyte-specific lysis buffer. Both leukocyte populations were washed with HBSS (Hanks' balanced salt solution). Finally, cells were quantified with a cell counter. VAT biopsies of approximately 1.5 – 2.0 g of tissue were extracted from the omentum region, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Intracellular protein expression analysis

First, PBMC and VAT protein extraction, purification and quantification were performed using specific kits according to standard protocols. A total of 25 µg of protein was resolved on SDS-polyacrylamide gels. After electrophoresis, the samples were transferred to nitrocellulose membranes. Depending on the protein of interest, specific primary antibodies were incubated (grouped by metabolic pathways): marker of inflammation — MCP1 —, antioxidant defense — GPX1 —, inflammasome complex activation — ASC, NF-κB, NLRP3 —, related to energy balance — AMPK, phosphorylated AMPK —, autophagy mediators — ATG5, BECLIN1, LC3, NBR1, p62, MIEAP, PINK1 —, mitochondrial metabolism — PGC1α, TFAM, OXPHOS complex, MFN1, MFN2, OPA1, FIS1, phosphorylated DRP1 —, ER stress — ATF6, CHOP —, and actin and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) as loading control markers. Subsequently, the signal was detected by chemiluminescence and quantification of protein expression was performed by densitometric analysis.

Static cytometry

Leukocytes were seeded in a 48-well plate and incubated for 30 minutes at 37°C with the following fluorescent probes: MitoSOX for the detection of mtROS production; dihydroethidium (DHE) to determine intracellular O₂⁻ and tetramethylrhodamine; methyl ester (TMRM) to indicate mitochondrial membrane potential; and Hoescht to indicate nuclear morphology. Fluorescence images were captured and analyzed with an Olympus IX81 fluorescence microscope coupled to "ScanR" static cytometry software.

Analysis of leukocyte-endothelium interactions

An *in vitro* adhesion assay model was used to evaluate the interaction between immune cells and endothelial cells. This model is based on the use of a flow chamber attached to

an inverted microscope connected to a video camera. The camera had a coverslip with human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). A suspension of 1 million leukocytes in 1 mL of RPMI (Roswell Park Memorial Institute) medium was drawn across the HUVEC monolayer and recorded for 5 min. The following parameters were evaluated during video analysis: leukocyte rolling flux was calculated by counting the number of leukocytes rolling over 100 μm^2 of HUVEC in 1 minute; rolling velocity was measured as the average time it took 20 consecutive leukocytes to roll along 100 μm of the endothelial monolayer; and adhesion was assessed by counting the number of leukocytes that maintained firm contact with the endothelium for at least 30 seconds.

Statistical analysis

SPSS 20.0 software was used for data analysis. The normality of the population distribution was tested using the Shapiro-Wilk test, which was chosen due to the sample size. The data of the variables to be compared were analyzed with a Student's t test and Mann-Whitney U test for parametric variables and a paired Student's t test or Wilcoxon test for nonparametric variables. Pearson's correlation coefficient was used to determine the degree of relationship between the study variables in the longitudinal study. A χ^2 test was used to compare proportions. Potential confounding variables, such as age, were used as covariates to generate a general univariate linear model to analyze biochemical parameters. A 95% confidence interval was used for all tests and differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results and discussion

We will first present the data of the cohort studies that evaluated the effect of weight loss associated with the RYGB technique, and we will conclude with the cross-sectional study carried out on the VAT of patients with obesity.

Cohort studies

The 57 patients with obesity who underwent RYGB-induced weight loss had a mean age of 45 years, and women comprised approximately 84%. The group of patients undergoing RYGB had an average BMI of 40 kg/m^2 . At one-year follow-up the patients' BMI decreased significantly to 29 kg/m^2 . In parallel, waist circumference and percentage of excess body weight were significantly reduced one year after the intervention. Additionally, patients displayed a drop in SBP and DBP and an improvement in fasting

ABSTRACT

glucose levels, insulin, HOMA-IR index and HbA1c with respect to basal values. Regarding lipid profile, we observed an increase in HDLc levels and a decrease in levels of TG, total cholesterol, and LDLc. In terms of the qualitative separation of lipoproteins, in addition to the decrease in LDLc after RYGB, we observed a significant decrease in the most atherogenic pattern (sdLDL) and a significant increase in the less atherogenic particles (intermediate pattern). However, no detectable changes in the larger LDL particles were detected. A significant increase in HDLc was observed, with a significant increase in large HDL particles and a significant decrease in intermediate and small HDL particles, which are more proatherogenic subfractions. In light of these data, RYGB would seem to induce a decrease in the proatherogenic profile and in the cardiovascular risk associated with a quantitative and qualitative change in cholesterol-carrying lipoproteins.

Approximately 37%, 23% and 30% of the cohort of study were prescribed antihypertensive, lipid-lowering and antidiabetic drugs, respectively, and these percentages were reduced to 16%, 9% and 4%, respectively, after 1-year follow-up. In this sense, our rates of remission confirmed the successful remission of obesity-associated metabolic diseases as a result of RYGB, and are higher than those reported by other studies.

It is worth noting that the literature focuses on inflammation as the main factor relating obesity to metabolic alterations, and confirms it is ameliorated after weight loss. In line with this, our results reflect a decrease in the state of chronic inflammation after RYGB, in which circulating levels of the acute phase inflammation reactants CRP and C3c, blood leukocyte count, and the cytokines IL6 and TNF α were decreased 1 year post-operation. This suggests an improvement of the systemic inflammatory response after the intervention. It is known that CRP rises with the degree of adiposity and is able to induce IL6 and TNF α secretion by macrophages and adipocytes. Moreover, it is directly involved in the development of atherosclerosis through complement system activation and promotion of endothelial dysfunction. Therefore, elevated levels of circulating inflammatory mediators — in particular CRP — are considered independent predictors of cardiovascular events. Consequently, RYGB may have attenuate the cardiovascular risk of the studied cohort.

Obesity-related inflammatory status has been closely linked to cellular oxidative stress. For example, it is known that leukocytes show an increase in O₂⁻ production

proportionally to BMI, with higher levels when BMI > 40 kg/m². It has been postulated that a reduction of oxidative damage in patients with obesity could help to reduce the risk of the development and progression of atherosclerosis. In our cohort, RYGB-associated weight loss resulted in a significant decrease in O₂⁻ production in leukocytes, together with a lower protein carbonylation and MPO activity at the serum level, which is in accordance with previous results observed in patients with gastric banding and rodent models of RYGB. Thus, weight loss associated with RYGB restores MPO activity and protein carbonylation levels to similar values to those seen in patients without obesity. Another aspect of obesity is the impairment of antioxidant defenses. In our patients, we observed a significant increase in serum SOD activity and protein expression of GXP1 in PBMC, with a clear increase in antioxidant defenses following the intervention. This increase in antioxidant defenses is consistent with other studies conducted by gastric banding or hypocaloric diet.

Our results suggest a partial recovery of the oxidative balance mediated by a decrease in prooxidant signalling in favor of antioxidant responses in both leukocytes and serum, which leads to a reduction in the risk of the development and progression of cardiovascular disease. In fact, accumulating scientific evidence suggests an association between leukocyte prooxidant status, endothelial dysfunction, and increased adherent phenotype in patients with obesity. One possible explanation is that the O₂⁻ and MPO released by immune cells are involved in an increase of vascular permeability, leukocyte recruitment and migration across the endothelium.

In the context of obesity, an increase in the number of leukocytes that interact and adhere to the endothelium depends on the degree of BMI and adiposity. In contrast, weight loss strategies employing a very low calorie diet (VLCD) are able to reverse this proadherent effect of obesity. In accordance with this, we observed a significant decrease in the number of leukocytes that interacted and adhered to the endothelium one year after the intervention. A molecule closely related to the induction of rolling and firm adhesion of leukocytes to the endothelium is the MCP1 protein. In fact, it is capable of promoting macrophage infiltration into tissues, which amplifies and exacerbates the inflammatory response, thus contributing to the maintenance of IR. In this context, we observed a decrease in MCP1 protein expression by PBMC one year post intervention. In line with this result, several studies have reported lower MCP1 expression in VAT and lower systemic detection in the serum of patients after RYGB. According to this, we have

ABSTRACT

observed a similar response in other metabolic cells, such as leukocytes. Therefore, it is plausible that weight loss induced by RYGB can undermine the induction of proinflammatory signals that promote endothelial infiltration of leukocytes, which is associated with the reductions in leukocyte-endothelium interactions that we have observed.

Based on the response of the leukocytes with respect to their interactions with the endothelium, the next step was to study whether this process was related to the systemic release of CAM. Due to their role in the recruitment of leukocytes to the endothelium, elevated circulating levels of these molecules are known to be associated with endothelial dysfunction and are prognostic of CVD. In fact, the VAT of obese patients is known to have elevated gene and protein expression of ICAM1 and VCAM1. In contrast to this, one year after RYGB we observed a significant decrease in serum levels of ICAM1 and P-selectin, both involved in the initial stages of leukocyte uptake and interaction with the endothelium. Considered as a whole, the available evidence endorses RYGB surgery as an effective strategy to relieve endothelial dysfunction by modulating oxidative status, leucocyte-endothelium interactions and CAM expression.

In light of all of this, it is likely that attenuation of the prooxidant phenotype of leukocytes after bariatric surgery helps to ameliorate endothelial dysfunction and reduce leukocyte recruitment, thus protecting against the development of atherosclerosis. In this scenario, it becomes necessary to evaluate different molecular pathways, such as AMPK activation, ER stress, autophagy, inflammasome complex formation, and mitochondrial dysfunction in leukocytes, as these signaling cascades are closely related to oxidative stress.

AMPK is capable of acting as a sensor of changes in energy balance required by metabolism. Under caloric restriction, AMPK is associated with an undermining of inflammatory pathways, resulting in the alleviation of ER stress. Moreover, it is linked to a significant upregulation of autophagy, mitophagy and mitochondrial metabolism. First, increased AMPK activity has been observed in PBMC one year after bariatric surgery involving RYGB or sleeve gastrectomy. These antecedents are in line with our results; we reported that leukocytes expressed an increase in the protein content of total AMPK and its phosphorylated form one year after RYGB. In terms of the effect of AMPK on oxidative stress, previous studies showed a negative correlation between increased AMPK activation, carbonylated proteins and BMI. Furthermore, AMPK was capable of modulating inflammation by inhibiting signaling cascades promoted by TNF α , IL6, and

MPC1, being in concordance with our results. In this sense, the decrease in AMPK activity would appear to be related to IR state and obesity.

Second, there is a close relationship between ER stress activation and metabolic disturbances. In this context, previous research has highlighted a significant increase in ER stress markers with high concentrations of FFA, LPS and glucose. In line with this, ATF6 and sXBP1 expression in adipocytes were shown to be significantly correlated with BMI and body fat percentage, suggesting that weight loss and metabolic relief can attenuate ER stress markers. AMPK activation may also mediate ER metabolism, as AMPK activators have been reported to prevent FFA-induced inflammation through relieving ER stress in macrophages. Hepatic expressions of GRP78, sXBP1, CHOP were found to be decreased at 1-year follow-up of RYGB. Our results are consistent with these studies, in addition to corroborating an association between weight loss, inflammatory markers and a significant decrease in ATF6 and CHOP in leukocytes one year after RYGB.

Third, AMPK can directly phosphorylate ULK1, thereby activating autophagy and selective removal of damaged mitochondria. With respect to the effect of weight loss on autophagy markers, our results revealed a significant increase in protein expression of BECLIN1, ATG5-ATG12 complex, LC3I, LC3II and NBR1 in PBMC of obese patients one year after RYGB. These are markers of the nucleation, elongation and recruitment steps of the autophagosome formation, respectively. Few studies have evaluated the possible interaction between autophagy and weight loss in obese models, showing that the downregulation of hepatic autophagy by means of a high fat diet (HFD) promotes ER stress and IR, whereas RYGB is reported to improve hepatic lipid metabolism through an increase in the LC3II/LC3I ratio. It is postulated that autophagy acts as the molecular effector that restores lipid accumulation and ER stress by activating macroautophagy and chaperone-mediated autophagy. Considered together, these findings suggest a role for the activation of autophagic pathways in ameliorating the metabolic consequences of obesity. Mitophagy is not only regulated by AMPK, but also by PINK1/PRKN-mediated removal of depolarized mitochondria. We observed a significant increase in MIEAP and PINK1 proteins and a significant decrease in mitochondrial membrane potential (measured through the TMRM) one year after RYGB, which may be a mechanism of the elimination and recycling of damaged mitochondria. In concordance, we have previously reported

ABSTRACT

that weight-loss through a VLCD induced a significant decrease of TMRM after 6 months of diet.

Simultaneous to mitophagy, a molecular machinery responsible for cleaving and binding the mitochondria is required for the correct elimination of damaged mitochondria. Moreover, these processes require the activation of nuclear transcriptional factors in order to synthesize new mitochondria. As a whole, autophagy is closely related to mitochondrial metabolism, which includes processes of biogenesis and mitochondrial dynamics.

In the context of obesity, chronic low-grade inflammation and oxidative stress lead to decreased biogenesis and mitochondrial dysfunction, which are associated with IR and the development of T2D. Specifically, it is known that *pgc1 α* gene expression is reduced in the AT of patients with obesity and that weight loss associated with RYGB and caloric restriction are able to significantly reverse this condition in muscle, as well as inducing a significant increase in mtDNA content. In this regard, a significant increase in protein expression of PGC1 α and TFAM has been reported in leukocytes one year after RYGB, suggesting an increase in mitochondrial biogenesis also in this cell type. Because TFAM induction is able to prevent HFD-induced IR in mouse muscle, it has been suggested that the increase detected in patients after RYGB contributes to an amelioration of the metabolic consequences of obesity and a remodeling of the respiratory chain. In this sense, in our study cohort, surgery induced a significant increase in the complexes involved in OXPHOS complex I and ATPase, with a marked upward trend in complex IV. In contrast, no changes were detected in complexes II and III at 1-year follow-up. Our results suggest that RYGB promotes an increase in the concentrations of proteins involved in oxidative phosphorylation (initial complex of the electron transport chain and ATPase). Previous studies in metabolic tissues such as liver, adipose or muscle have reported an increase in the gene expression of mitochondrial complexes after caloric restriction or RYGB. In fact, OXPHOS failure can lead to ROS overproduction and accumulation of unhealthy mitochondria, which need to be repaired or eliminated to preserve the stability and health of cells. Recently, a novel mechanism has been proposed for mitochondrial quality control, in which the regulator MIEAP induces intramitochondrial structures that engulf and degrade damaged mitochondria through the accumulation of lysosomes. In accordance with this, we observed an increase in the MIEAP expression of PBMC after 1 year. This effect points to a postsurgical amelioration

of mitochondrial activity and function that could be associated with the improvement in metabolic outcomes observed in our cohort.

Finally, there is growing evidence of an intriguing relationship between mitochondrial dynamics and nutrient status, suggesting that modifications in mitochondrial architecture represent a mechanism of adaptation to metabolic demands and bioenergetic efficiency. This corresponds to the coordination of mitochondrial biogenesis and fusion and fission mechanisms. In particular, researchers have argued that obesity is characterized by reduced gene expression of *opa1* and *mfn1* in rat liver and skeletal muscle, which could contribute to mitochondrial dysfunction. In addition, decreased MFN1 and MFN2 and increased DRP1 have been reported in the skeletal muscle of patients with obesity. Although there is increasing evidence that RYGB can enhance mitochondrial fusion, the data available are still limited and controversial. In our cohort, the study of mitochondrial fusion markers revealed a slight increase in the protein expression of MFN2 and OPA1 that was accompanied by a significant increase in the protein content of MFN1 in PBMC 1 year after RYGB. In contrast, the mitochondrial fission proteins FIS1 and phosphorylated DRP1 remained unaltered. We can speculate that the boost in mitochondrial fusion contributes positively to the enlargement and functionality of the mitochondrial network by stimulating OXPHOS complex expression and respiration, as reported previously in the liver of rats with obesity.

Our results improve understanding of the mechanisms underlying the relationship between obesity and weight loss. In this sense, RYGB surgery promoted pronounced weight loss in our patients, and was accompanied by an improvement in anthropometric and biochemical parameters at one-year follow-up. Patients undergoing RYGB exhibited a decrease in systemic proatherogenic factors such as systemic inflammation (CRP, C3c, IL6, TNF α and IL1 β), ROS production (MPO and carbonyl proteins), and atherogenic dyslipidemia profile, and an increase in antioxidant defences (SOD). As a whole, these improvements may contribute to an amelioration of endothelial dysfunction through a reduction in CAM expression (ICAM1 and P-selectin), leukocyte rolling and adhesion to the endothelium. In light of these results, we explored the modulation of intracellular stress responses in leukocytes after weight loss and observed a decreased production of intracellular ROS (O₂⁻), inflammatory mediators (MCP1, NF- κ B), ER stress (ATF6 and CHOP) and mitochondrial membrane potential associated with increased antioxidant defence (GPX1), and enhanced expression of AMPK, phosphorylated AMPK,

ABSTRACT

autophagy/mitophagy markers (ATG5, BECLIN1, LC3, NBR1, PINK1 and MIEAP), and mitochondrial metabolism (PGC1 α , TFAM, OXPHOS complex and MFN1). As a whole, these results shed light on possible mechanisms underlying the beneficial role of weight loss with respect to metabolic control and cellular homeostasis.

Cross-sectional study

To evaluate the possible involvement of metformin in oxidative stress, inflammation and autophagy in VAT of patients with obesity and T2D, a cross-sectional study was designed in which 68 patients were divided into two groups: metabolically healthy patients with obesity (defined as the absence of diagnosis and treatment of comorbidities associated with obesity, except waist circumference) and patients with T2D. Both groups of participants were composed of the same number of patients (34), and women represented 85% and 71%, respectively. In this study, significant differences were detected between the age groups, since the mean age of the metabolically healthy group was 38 years and that of the T2D group was 52 years. In this sense, a general linear univariate model was generated, treating age as a confounding or modifying variable. Regarding anthropometric variables, no differences were detected in BMI, although the group of patients with T2D treated with metformin had higher waist circumference, waist-to-hip ratio, SBP, DBP and TG than the metabolically healthy group. However, no differences in leukocyte count, CRP and lipid profile were detected between the two groups. Specifically, both groups showed elevated CRP and leukocyte count, which could have been associated with a higher cardiovascular risk. In contrast, T2D patients treated with metformin displayed significant differences in glucose metabolism parameters, including elevated levels of glucose, insulin, HOMA-IR and HbA1c with respect to the metabolically healthy group.

Once the anthropometric and biochemical characteristics were evaluated, the next step was to determine whether the mechanisms underlying the molecular effects of metformin involve activation of inflammatory pathways, the NLRP3 inflammasome complex and/or modulation of autophagy in the VAT of patients with obesity. Firstly, the results showed a decrease in the production of mtROS and MPO in T2D patients treated with metformin. It is known that metformin is able to reduce cellular O₂ (molecular oxygen) consumption in both AT and skeletal muscle through inhibition of mitochondrial complex I and reduction of substrate oxidation. This implies a decrease in NADH oxidation, proton

gradient and O₂ consumption rate. In accordance with this, several studies have observed a reduction of mtROS and total ROS in patients treated with metformin, so this drug may modulate inflammation in metabolic tissues. Since both groups of patients had the same BMI, it was postulated that obesity-mediated oxidative stress does not contribute to the increase in ROS, but rather that said increase is mediated through metformin, which reduces one of the main sources of oxidative stress (mtROS). Simultaneously, we observed a positive correlation between serum MPO activity — a protein related to vascular damage — and mtROS production. In addition, systemic cytokine levels of TNF α and IL6 were significantly lower in T2D patients treated with metformin, which is in line with previous studies showing a decrease in TNF α and IL6 levels in patients with IR receiving metformin. A preliminary theory to explain the alleviation of cytokine secretion is that metformin stimulates the polarization of macrophages to M2, a highly anti-inflammatory phenotype.

Following the evaluation of ROS in leukocytes and proinflammatory cytokines, we aimed to evaluate the formation of the NLRP3 inflammasome complex, whose activation is closely related to chronic low-grade inflammation in obesity. In this sense, we observed a significant decline in the expression of NF- κ B, NLRP3 and ASC in the PBMC of T2D patients treated with metformin. In turn, this response in leukocytes from T2D patients treated with metformin could be induced by the reduction of ROS observed previously. In line with this, we also detected a significant decrease in serum IL1 β and a downward trend in serum IL18. Thus, metformin could regulate the NLRP3 complex formation response from its induction to the final release of cytokines. It is postulated that, in leukocytes, metformin has a direct mechanism of action on NLRP3 mediated through AMPK activation. Another protein involved in inflammasome activation is MCP1. Inhibition of MCP1 through metformin treatment by a mechanism involving the NF- κ B pathway has been demonstrated in a model of palmitate hypertrophied adipocyte (conditions that mimic obesity). The previously described effect of metformin on macrophage polarization may also contribute to the reduced release of MCP1, as it is considered a key protein in macrophage polarization in VAT. In addition, we observed a positive and significant correlation between NLRP3 and MCP1 protein expression.

In terms of autophagy markers, we detected lower protein levels of ATG5 and BECLIN1 and significantly higher p62 levels with respect to metabolically healthy patients with obesity. ATG5 and BECLIN1 are known to be regulated by metformin through AMPK-

ABSTRACT

mediated induction of autophagy, although the drug may play different roles depending on the metabolic tissue under study. On the one hand, autophagy is regulated in a defective manner in the hypertrophic AT of mice and humans, where BMI reduction has been reported to lead to an attenuation of autophagy in SAT. On the other hand, autophagy has also been shown to increase progressively in epididymal AT in a lean mouse model after metformin treatment. Several studies have reported crosstalk between autophagy and inflammasome activation in macrophages, suggesting that both exhibit an autoregulatory mechanism to control their proinflammatory function. In this regard, we observed significant correlations between different markers of these pathways; NF- κ B, NLRP3, ASC, and MCP1 correlated positively with ATG5 and BECLIN1, whereas systemic IL1 β showed a positive association with ATG5 and a negative association with p62, which is constantly degraded during the autophagic process. This supports the hypothesis of a positive association between inflammatory mediators, inflammasome complex activation and autophagy. Finally, there was a significant decrease the proapoptotic marker CHOP in the group of T2D patients treated with metformin, which is consistent with improved AT functionality. In line with this, it has been reported that metformin prevented NLRP3 inflammasome activation by suppressing ER stress, which is consistent with the reduced expression of CHOP — a downstream signal of chronic ER stress activation — observed in the present study.

To sum up, in the present study we demonstrate that patients with obesity and T2D treated with metformin present a more favorable immunoinflammatory status than metabolically healthy patients with obesity. We hypothesize that metformin plays a role in decreasing leukocyte mtROS production, MPO, systemic inflammatory cytokines and mediators (CRP, TNF α , IL6, IL1 β), inflammasome complex activation (NF- κ B, NLRP3, ASC, MCP1), autophagy (ATG5, BECLIN1) and the apoptosis marker CHOP, and in increasing p62 protein expression in VAT.

Conclusions

1. RYGB-induced weight loss is associated with a reduction in oxidative stress parameters in leukocytes from obese patients and with an improvement in endothelial dysfunction. These responses are mediated by a decrease in prooxidant species and an increase in antioxidant defenses, in addition to a reduction in leukocyte-endothelium interactions, adhesion molecules and an

improvement in the proatherogenic lipid profile. These findings deepen the understanding of the mechanisms underlying the reduction of cardiovascular risk associated with the development of atherosclerosis in patients undergoing RYGB surgery.

2. RYGB surgery induces an increase in AMPK content and activation that is associated with attenuation of inflammatory activation, chronic ER stress and apoptosis markers in patients' PBMCs at one year post intervention. In addition, we observe an activation of cellular recycling mechanisms through increased markers of autophagy and mitophagy. These results suggest that RYGB induces adaptive responses oriented towards partial recovery of cellular homeostasis in leukocytes, having the potential to exert systemic effects on inflammation and IR.
3. When we consider female gender exclusively, RYGB surgery induces an improvement of mitochondrial function in addition to a reduction of inflammatory parameters and an increase of markers of biogenesis and mitochondrial dynamics in PBMCs one year after the intervention. The regulation of mitochondrial metabolism associated with RYGB-mediated weight loss may contribute to the improvement of clinical parameters and IR.
4. Metformin modulates NLRP3 inflammasome complex activation and autophagy in the VAT of subjects with obesity and T2D. Furthermore, these patients present a better systemic inflammatory profile and a reduction of mtROS in PBMCs compared to metabolically healthy patients with obesity. Therefore, we postulate that there is a cardiometabolic risk in metabolically healthy obese subjects despite the protective phenotype related with their clinical profile.

RESUMEN GLOBAL

1.TEMÁTICA

1. TEMÁTICA

1.1. La obesidad

1.1.1. Definición y diagnóstico

El sobrepeso y la obesidad son enfermedades metabólicas y multifactoriales que se caracterizan por un exceso de grasa corporal (adiposidad) debido a un desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético. La población con obesidad presenta un riesgo elevado de desarrollo de enfermedades crónicas como CVD, gastrointestinales, genitourinarias, metabólicas, musculoesqueléticas, neurológicas, obstétricas, respiratorias, cutáneas y/o reproductivas (Fruh, 2017; Hruby y Hu, 2015). Mención especial merece la posible asociación entre la obesidad y el SARS-CoV-2 (del inglés, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), donde estadios avanzados de obesidad representan un predictor independiente de complicaciones asociadas a SARS-CoV-2 y pueden promover la hospitalización e ingresos en unidades de cuidados intensivos (Stefan et al., 2021).

El método diagnóstico de referencia internacional de sobrepeso y obesidad es el BMI. Este valor, se obtiene al dividir el peso del/la paciente entre el cuadrado de su altura, obteniendo un dato expresado en kg/m^2 . Abarca el rango desde bajo peso ($< 18,5 \text{ kg/m}^2$), normopeso ($< 18,5 \text{ kg/m}^2 - 25 \text{ kg/m}^2$), sobrepeso ($\geq 25 \text{ kg/m}^2$), obesidad grado I ($\geq 30 \text{ kg/m}^2$), grado II ($\geq 35 \text{ kg/m}^2$) y obesidad grado III u obesidad severa ($\geq 40 \text{ kg/m}^2$) (Hruby y Hu, 2015). Sin embargo, la principal limitación del BMI es la falta de consideración de las proporciones del AT y del tejido muscular, por lo que no representa el método más eficaz para diagnosticar la obesidad. Ante esta premisa, la WHO expone el uso de esta herramienta antropométrica sólo como indicador del estado nutricional del/la paciente en edad adulta. Para una valoración más precisa, se recomienda complementar el BMI con la medición de la circunferencia de cintura (WHO, 2010). Esta medida se relaciona con la obesidad abdominal y representa una forma efectiva de identificar esta patología, donde los valores de corte estipulados son $\geq 102 \text{ cm}$ en hombres y $\geq 88 \text{ cm}$ en mujeres. El grupo de adiposidad visceral de la Sociedad Internacional de Aterosclerosis-Cátedra Internacional de Riesgo Cardiometabólico (IAS-ICCR) apunta que la combinación de BMI y circunferencia de la cintura pueden identificar un fenotipo de obesidad de alto riesgo y recomienda el uso clínico de estas herramientas antropométricas (Ross et al., 2020).

Debido a las limitaciones en las herramientas antropométricas para clasificar la obesidad, se han desarrollado otro tipo de técnicas más complejas: instrumentos de análisis de bioimpedancia, absorciometría de rayos X de energía dual, tomografías computerizadas, resonancia magnética o exploraciones de espectroscopía de resonancia. Estas metodologías aportan cuantificaciones de volumen y masa del AT o músculo esquelético. En cambio resultan mucho más inaccesibles, complicadas y costosas de obtener y evaluar en comparación con la medición de altura, peso y circunferencias (Nimptsch et al., 2019).

1.1.2. Epidemiología y factores de riesgo

Centrándonos en la prevalencia de la enfermedad a nivel mundial, la WHO afirma que en el año 2016 más de 1.900 millones de adultos presentaban sobrepeso, de ellos, 650 millones fueron diagnosticados con obesidad. La prevalencia global de obesidad (analizada en la infancia, adolescencia y adultez) se ha triplicado entre los años 1975 y 2016, donde las estimaciones para el año 2025 apuntan a un porcentaje de obesidad del 18% y 21% en hombres y mujeres, respectivamente (WHO, 2021a; NCD Risk Factor Collaboration, 2016). Centrándonos a nivel nacional, la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) afirma que la prevalencia de obesidad en la población adulta representó el 22% entre 2014 y 2015, mientras que un 33% corresponde a la definición de obesidad abdominal diagnosticada por la circunferencia de cintura, siendo más frecuente en mujeres (Caixàs et al., 2020). Los recursos sanitarios destinados a la población con obesidad aumentan en función del BMI, donde la población con obesidad grado II o superior presentan un mayor riesgo de recibir visitas domiciliarias u hospitalizaciones (Espallardo et al., 2017).

La etiología de la obesidad está constituida por una compleja interacción entre factores de riesgo genéticos, epigenéticos, comportamentales y psicológicos junto con riesgos ambientales o socioeconómicos, capaces de afectar desde las edades más tempranas hasta la población adulta. En la actualidad, el desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético puede estar condicionado por un aumento en el consumo de comida rápida y bebidas azucaradas, la falta de actividad física, naturaleza sedentaria, condiciones psicológicas o promoción de entornos obesogénicos (publicidad y marketing comercial, escasos espacios verdes, contaminación ambiental) (Díaz-Rodríguez et al., 2021; Hruby y Hu, 2015). Además de los factores de riesgo previamente mencionados, el equilibrio energético puede estar influenciado por variables individuales y colectivas como el

1. TEMÁTICA

ambiente social y familiar e instituciones y políticas públicas (González-Muniesa et al., 2017).

La obesidad se asocia con un aumento del riesgo de morbilidad y mortalidad. El estudio Framingham reveló una asociación del BMI con el ratio de mortalidad tras 24 años de seguimiento dónde los pacientes con obesidad grado I y II presentaban mayor riesgo de mortalidad por todas las causas en relación con individuos con normopeso (Xu et al., 2018). La esperanza de vida de mujeres y hombres de 40 años se redujo una media de 3 años en pacientes con obesidad grado I, donde la obesidad grado III se asoció con una reducción mayor a 8 años respecto a individuos con normopeso (Bhaskaran et al., 2018). En contraposición, estrategias que se enfoquen en la pérdida de peso en pacientes con obesidad muestran un efecto beneficioso en la morbimortalidad. Concretamente, la cirugía bariátrica es capaz de reducir considerablemente el riesgo de muerte por CVD, T2D o cáncer (Abdelaal et al., 2017) patologías altamente relacionadas con el aumento del BMI (Lin et al., 2020).

Es por ello que la obesidad constituye un reto para la salud a nivel mundial y, por lo tanto, conocer las causas y consecuencias de esta enfermedad es esencial para la prevención y promoción de la salud, con la finalidad de reducir el impacto de su morbimortalidad en la sociedad actual.

1.1.3. Fisiopatología de la obesidad

La obesidad constituye una alteración metabólica y anatómica que induce cambios ante la alteración de la homeostasis energética. Un balance energético positivo provoca un aumento del metabolismo de lípidos y glucosa, que a largo plazo origina la disfunción del AT dada su limitada capacidad de amortiguar un almacenamiento excesivo de FFA. Cuando esta situación se produce, se favorece la acumulación ectópica de lípidos en órganos como el hígado, páncreas o músculo, lo que conlleva una condición de lipotoxicidad y glucotoxicidad celular (Korac et al., 2021; Redinger, 2007). Es por ello que en los siguientes apartados se profundizará sobre las consecuencias de la obesidad especialmente en el AT y el sistema inmunitario, y cómo se correlaciona con la aparición de disfunción endotelial y aterosclerosis.

1.1.3.1. Tejido adiposo

El AT es un órgano metabólicamente activo el cual desempeña una función crítica en la homeostasis energética. El AT está constituido por dos depósitos que difieren en morfología y funciones metabólicas. En primer lugar, el BAT (del inglés, brown adipose tissue) se localiza principalmente en la zona supraclavicular y está especializado en la termogénesis generando calor a través de un desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones mediante la proteína UCP (del inglés, uncoupling protein) 1. Por el contrario, el WAT (del inglés, white adipose tissue) es el encargado del almacenamiento de lípidos en forma de TG (Choe et al., 2016; Reyes-Farias et al., 2021). En su conjunto, el WAT está formado por adipocitos maduros y fracción vascular estromal, incluyendo preadipocitos, fibroblastos, células endoteliales, células inmunitarias (macrófagos, células T, neutrófilos, linfocitos) y células madre pluripotentes. Anatómicamente, el WAT está en contacto con los órganos internos de la cavidad abdominal (VAT) o extendido bajo la dermis, referido como SAT. En este sentido, la distribución corporal de la grasa condiciona las complicaciones asociadas a la obesidad. Concretamente, el exceso de VAT está estrechamente asociado con la aparición de IR y T2D. En cambio, una acumulación de SAT podría asociarse con un menor riesgo metabólico en pacientes con obesidad (Lee et al., 2013; Choe et al., 2016; Reyes-Farias et al., 2021).

Además de la función de almacenamiento, el AT es un potente órgano endocrino que, a través de la secreción de numerosos factores reguladores, se comunica con otros órganos metabólicos, así como con el sistema nervioso central. Las adipoquinas leptina, adiponectina, resistina y RBP4 (del inglés, type 4 retinol binding protein), $TNF\alpha$, MCP1 e IL6 son las principales mediadoras en los procesos metabólicos. Situaciones que alteren la función de los adipocitos, como en la obesidad, originarán una desregulación en la producción de estas adipoquinas con efectos directos en las respuestas inflamatorias e instauración de comorbilidades asociadas a la obesidad (Ouchi et al., 2011; Cao, 2014).

Disfunción del tejido adiposo e inflamación crónica de bajo grado

La expansión del AT es el resultado de la combinación de procesos de hiperplasia e hipertrofia. En primer lugar, el crecimiento hiperplásico se caracteriza por un aumento del número de adipocitos, situación que garantiza la capacidad de acumulación de lípidos con un menor impacto metabólico. En cambio, en la obesidad se produce una disrupción en la capacidad hiperplásica del adipocito hacia una expansión y remodelación

1. TEMÁTICA

hipertrófica del AT, situación que origina la pérdida de funcionalidad al aumentar patológicamente el tamaño de los adipocitos (Korac et al., 2021).

La disfunción del AT e hipertrofia del adipocito características de la obesidad van a desencadenar una serie de consecuencias que promueven la IR, y la instauración de una inflamación crónica de bajo grado. En primer lugar, los adipocitos hipertrofiados muestran una elevada lipólisis y movilización de FFA hacia otros depósitos de AT y órganos metabólicos. Se conoce que los FFA estimulan la producción de TNF α , IL6 e IL1 β en los macrófagos y adipocitos, y a su vez, el TNF α induce la lipólisis para aumentar la liberación de FFA de los adipocitos (Cao, 2014; de Mello et al., 2018). Por lo tanto, la acumulación ectópica de grasa y el exceso de FFA séricos se asocian con la inducción de citoquinas proinflamatorias que a su vez, se sabe que provocan una alteración en la homeostasis de la glucosa, posiblemente a través de las cascadas de señalización inflamatorias que activan las vías JNK y NF- κ B, dos rutas que desembocan, a su vez, en la inducción de citoquinas proinflamatorias (Hammarstedt et al., 2018).

Por una parte, hay un aumento en la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF α , IL6 y MCP1 en el AT de pacientes con obesidad y, como consecuencia, una elevación de la infiltración de células inmunitarias (neutrófilos, leucocitos T y macrófagos). El reclutamiento de macrófagos infiltrados con un fenotipo tipo M1 supone una respuesta inmune exacerbada al liberar localmente TNF α e IL6, favoreciendo una remodelación patológica y amplificación de la respuesta inflamatoria del AT. De hecho, se ha demostrado una mayor expresión de marcadores de superficie de macrófagos en el AT de pacientes con obesidad e IR respecto a pacientes sin patología; con un desequilibrio hacia la modulación proinflamatoria al predominar marcadores de los macrófagos M1 y menor expresión de macrófagos M2 (relacionados con la función antiinflamatoria) (Kern et al., 2001; Di Gregorio et al., 2005; Bories et al., 2012; Castoldi et al., 2016). Además del efecto de las citoquinas sobre la activación de las células inmunes, el TNF α es capaz de inducir la expresión génica de otras citoquinas como *il6* y *mcp1* en cultivo de adipocitos humanos (Wang y Trayhurn, 2006). Por otra parte, en la obesidad existe una alteración en la expresión de leptina y adiponectina, dos adipoquinas con una potente función inmunomoduladora. La leptina es una hormona orexigénica que regula la ingestión a nivel hipotalámico, estimula la diferenciación de monocitos a macrófagos e induce la liberación de TNF α e IL6. Por el contrario, la adiponectina ejerce un efecto contrario a la leptina al

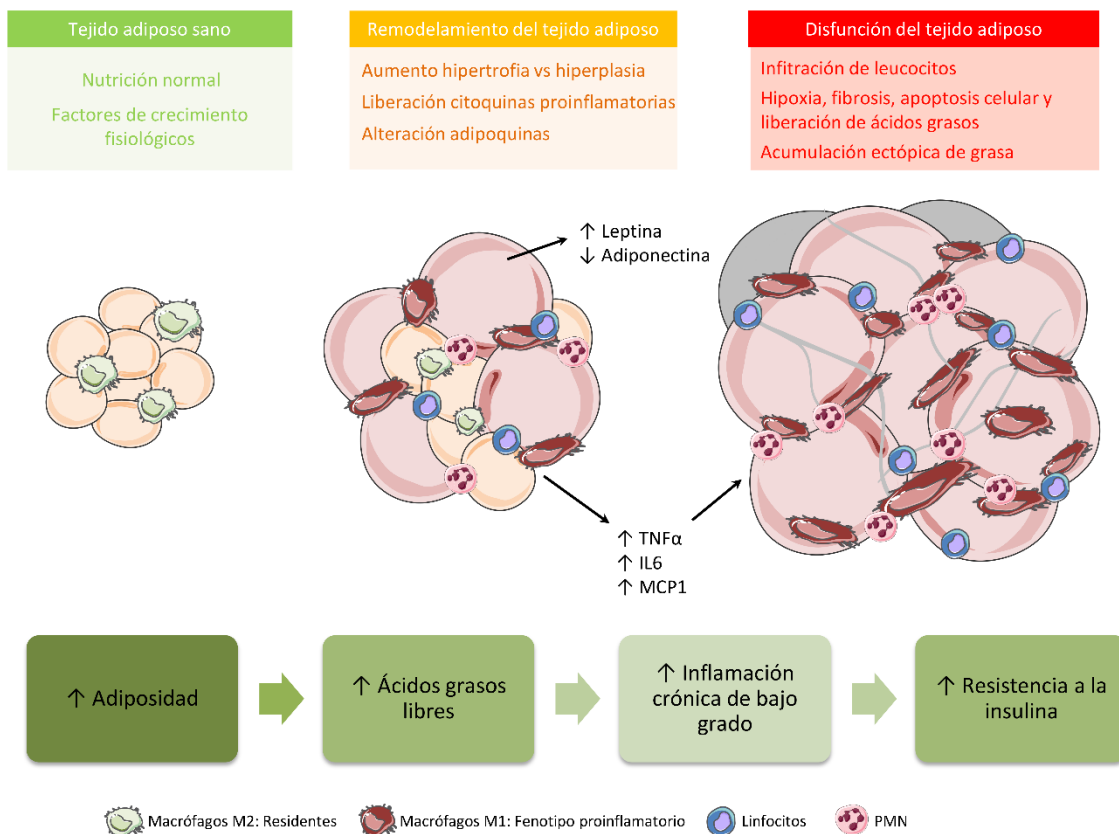
inhibir la producción de TNF α en los macrófagos, diferenciación de monocitos y síntesis de moléculas de adhesión endotelial. La resistencia a la leptina a nivel hipotalámico, la hiperleptinemia compensatoria y el descenso de los niveles séricos de adiponectina en la obesidad se traduce en un desequilibrio a favor de una inflamación crónica de bajo grado con posteriores consecuencias en la activación de las células inmunitarias y endoteliales (Gregor y Hotamisligil, 2011; de Heredia et al., 2012; Choe et al., 2016; Larabee et al., 2020).

Durante la hipertrofia de los adipocitos, el suministro de sangre al AT puede ser limitante e inducir marcadores relacionados con la hipoxia, dando lugar al aumento de los niveles de expresión de los factores angiogénicos, fibróticos y genes asociados a la respuesta inflamatoria. Cabe destacar que la expresión génica de *hif1 α* se encuentra elevada en el AT de pacientes con obesidad mórbida respecto a individuos con normopeso (Canello et al., 2005), situación que posiblemente esté acelerando la fibrosis del AT y la respuesta inflamatoria local debido a la implicación de HIF1 α en estas complicaciones (Rasouli y Kern, 2008; Choe et al., 2016). Si el AT es incapaz de compensar esta falta de O₂ y se mantiene esta condición en el tiempo, los adipocitos empezarán a mostrar fenotipos necróticos y apoptóticos. En este sentido, se ha evidenciado un aumento significativo de marcadores de necrosis adipocitaria en biopsias de AT de pacientes con obesidad (Cinti et al., 2005). Este aumento podría reflejar los efectos citotóxicos de la disfunción del AT e inducir la activación local de los macrófagos residentes presentes en la periferia de los adipocitos, con un impacto proinflamatorio mayor (Choe et al., 2016; Lindhorst et al., 2021).

Por lo tanto, la hipertrofia de los adipocitos perjudica la función de los mismos a través de mecanismos dependientes e independientes de la inflamación, exacerbando y manteniendo una inflamación crónica de bajo grado en la obesidad (**Figura 1**).

1. TEMÁTICA

Figura 1. Inflamación crónica de bajo grado en la obesidad



Mecanismos asociados a la inflamación crónica de bajo grado. Debido a un exceso de adiposidad y FFA, los adipocitos sufren un estado de hipertrofia y disfunción, originando una respuesta molecular por parte del adipocito. La inducción de citoquinas proinflamatorias TNF α , IL6, MCP1 y alteración en la expresión de leptina y adiponectina origina un estado crónico inflamatorio. Ante la sobrecarga e incapacidad de recuperar la función, el adipocito sufre procesos de hipoxia local y apoptosis. A nivel nuclear, también existe una modulación en factores de transcripción que promueven este estado proinflamatorio.

1.1.3.2. Sistema inmunitario

El sistema inmunitario está compuesto por un conjunto de procesos cuyo objetivo es identificar toxinas, alérgenos o patógenos ajenos al cuerpo humano y proceder a su correcta neutralización. En este proceso interviene la inmunidad innata, llevada a cabo por los monocitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, mastocitos, células dendríticas, células linfoides innatas y NK (del inglés, natural killer) y por la inmunidad adaptativa que ofrece una respuesta prolongada e induce la síntesis de células inmunitarias de memoria como los linfocitos T y B, encargados de la síntesis de anticuerpos. Respecto a la naturaleza de los leucocitos, morfológicamente se dividen en PBMC que se caracterizan por presentar un único núcleo redondeado y engloba a los linfocitos, monocitos y células dendríticas y en PMN, que presentan un núcleo

polilobulado y gránulos en el citoplasma, detectados a partir de tinciones específicas. Estos últimos se clasifican como neutrófilos, basófilos y eosinófilos (Delves y Roitt, 2008; Marshall et al., 2018).

Se sabe que los PBMC son células capaces de reflejar las respuestas nutricionales de tejidos claves involucrados en la homeostasis energética (Oliver et al., 2013). Son muy utilizadas en la investigación biomédica debido a su fácil biodisponibilidad y su capacidad de predicción inicial de la enfermedad tanto en modelos murinos como en humanos (Oliver et al., 2013; Costa et al., 2021). Además, se ha estipulado una clara asociación entre los PBMC y las alteraciones relacionadas con la adiposidad al expresar genes clave del metabolismo lipídico (Costa et al., 2021), tanto en individuos con normopeso como con sobrepeso.

En primer lugar, además del ya mencionado aumento de los macrófagos con fenotipo proinflamatorio en el AT de pacientes con obesidad, también se ha evidenciado un aumento del reclutamiento de linfocitos T (Duffaut et al., 2009), mediado posiblemente a través del aumento de antígenos y citoquinas liberadas por el adipocito hipertrofiado. De hecho, se ha constatado una correlación positiva entre la subpoblación linfocitos T CD (del inglés, cluster of differentiation) 3⁺ y el BMI, siendo mayor en el VAT respecto el SAT. Debido a que el receptor de la leptina está presente en los linfocitos T, se postula que el aumento de la leptina en la obesidad puede afectar a la activación de células Th1 (caracterizadas por producción de TNF α) en lugar de un fenotipo Th2 (Chatzigeorgiou et al., 2012). Por lo tanto, los linfocitos T también podrían estar contribuyendo al mantenimiento de una inflamación crónica de bajo grado. Por su parte los monocitos también parecen jugar un papel en la instauración de la inflamación. De hecho, se ha detectado un aumento de la subpoblación proinflamatoria (CD16)⁺ en pacientes con obesidad moderada y severa (Poitou et al., 2011), donde se encontró una correlación positiva entre el número de macrófagos infiltrados en el AT y el porcentaje de monocitos CD16⁺, lo que refuerza la importancia del estudio de los PBMC como marcadores de la disfunción del AT.

En segundo lugar, en cuanto al grupo de los PMN, los neutrófilos son la primera línea leucocitaria en iniciar una respuesta inflamatoria, liberando también citoquinas involucradas en el reclutamiento y activación de otras células inmunes (Pan et al., 2019).

1. TEMÁTICA

Alteraciones metabólicas que supongan una sobreactivación de los PMN serán más propensas a generar una respuesta inmunitaria exacerbada, como es el caso de la obesidad, donde diversos estudios de cohorte de pacientes han mostrado un mayor porcentaje y activación de los neutrófilos (Herishanu et al., 2006; Xu et al., 2015). Por lo tanto, se observa una alteración cuantitativa y cualitativa de los leucocitos en las personas con obesidad, donde además se evidencia un cambio hacia un fenotipo proinflamatorio.

Además de las células inmunitarias, existen una serie de proteínas que adquieren un papel importante en los mecanismos de inmunidad. Dos proteínas que cumplen esta función y se relacionan con el grado de adiposidad son la CRP y el C3c, ambas consideradas reactantes de inflamación de fase aguda. La CRP se sintetiza en el hígado en respuesta a la citoquina IL6 mientras que el C3c es secretado por los hepatocitos, macrófagos activados en los focos de inflamación y adipocitos (Lau et al., 2005; Karkhaneh et al., 2017). El rango fisiológico de la CRP mediante la detección de alta sensibilidad oscila entre 1mg/l y 3mg/l, donde a partir de este último valor se instaura el riesgo de CVD (Pearson et al., 2003). Los niveles de CRP y C3c en plasma son elevados en los pacientes con obesidad y su aumento se correlaciona directamente con el BMI, grasa corporal, perímetro de cintura, TG e IR (Lau et al., 2005; Park et al., 2005; Lapice et al., 2009; Karkhaneh et al., 2017). Por lo tanto, se considera a la CRP y el C3c como biomarcadores útiles para pacientes con MetS (del inglés, metabolic syndrome) y posibles mediadores en la relación causal entre la obesidad y T2D (Lau et al., 2005; Karkhaneh et al., 2017).

1.1.3.3. Disfunción endotelial

El endotelio es una monocapa de células localizada en la pared interna vascular y es responsable de la regulación del tono vascular, actividad plaquetaria, la respuesta inflamatoria, la coagulación y, por ende, de la homeostasis vascular. La disfunción endotelial se caracteriza por una reducción de la biodisponibilidad de los componentes vasodilatadores, en particular del NO (del inglés, nitric oxide) y la enzima eNOS (del inglés, endothelial nitric oxide synthase), y un aumento de los factores contráctiles derivados del endotelio. Un estado específico del endotelio a favor de la inflamación, proliferación y coagulación que va a favorecer la aterogénesis y los primeros pasos de la aterosclerosis subclínica (Fernández-Sánchez et al., 2011; Vita, 2011).

En el contexto de la obesidad, hay un desequilibrio en la homeostasis vascular que promueve el desarrollo de la disfunción endotelial y el inicio del proceso aterosclerótico. Los principales agentes que participan en la disfunción endotelial en la obesidad son la IR, la inflamación mediada por la disfunción del AT y la disminución de la biodisponibilidad del NO. Los mecanismos que se atribuyen a la progresión de la disfunción endotelial en la obesidad incluyen (1) niveles elevados de LDL y TG, (2) aumento de los radicales libres y (3) niveles elevados de mediadores inflamatorios (Kwaifa et al., 2020). En primer lugar, el déficit en la producción de adiponectina reduce la producción de NO en las células endoteliales (a través de vías dependientes de PI3K) y aumenta la producción de O_2^- y $TNF\alpha$, dos moduladores proinflamatorios que reducen la expresión de eNOS. A su vez, estas moléculas inducen la síntesis de ET1 (del inglés, endothelin 1) y PAI1 (del inglés, plasminogen activator inhibitor type 1), dos mediadores con una marcada actividad vasoconstrictora. La IR y los elevados niveles de FFA circulantes característicos de la obesidad promueven la síntesis y liberación de ROS y ET1 en las células endoteliales, PBMC y PMN con un desplazamiento del equilibrio fisiológico de NO/ET1 hacia el aumento de la contractibilidad de las células musculares lisas y vasoconstricción endotelial (Azekoshi et al., 2010; Campia et al., 2012; Rajendran et al., 2013; Viridis, 2016). La prolongada liberación de citoquinas proinflamatorias contribuye al desacoplamiento de la eNOS y generación de O_2^- , dañando el endotelio vascular y desencadenando un aumento de la permeabilidad vascular, permitiendo el movimiento de toxinas y componentes inflamatorios como citoquinas y CRP al espacio subendotelial (Rajendran et al., 2013). Las citoquinas proinflamatorias estimulan la señalización endotelial de NF- κ B, dando lugar a un fenotipo procoagulante que favorece la adhesión leucocitaria, al aumentar la liberación de las CAM que interactúan con las citoquinas proinflamatorias vasculares y promueven la extravasación y disfunción endotelial (Kwaifa et al., 2020).

Interacciones leucocito-endotelio y placa aterosclerótica

En el proceso de migración de los leucocitos hacia el foco de infección intervienen las CAM, glicoproteínas presentes en la superficie de leucocitos, plaquetas y células endoteliales que, mediante uniones entre los receptores endoteliales y sus respectivos ligandos leucocitarios, permiten la interacción de los leucocitos con el endotelio vascular. Las etapas de esta interacción incluyen la captura, el rodamiento, la adhesión del leucocito al lecho vascular y la posterior migración al tejido dañado (Nourshargh y Alon, 2014).

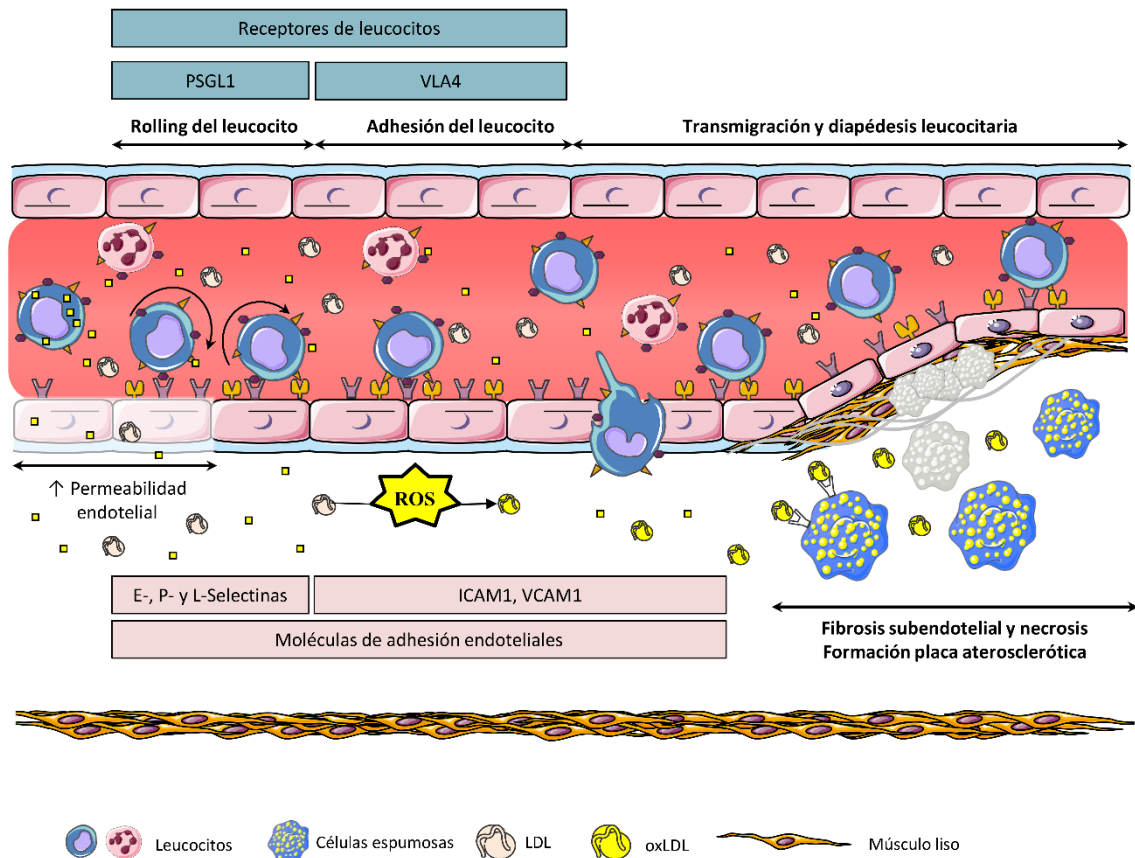
1. TEMÁTICA

El primer paso es la captación de los leucocitos circulantes mediante formación de interacciones débiles y transitorias entre el marcador leucocitario PSGL1 (del inglés, P-selectin glycoprotein ligand 1) y los receptores P- y E-selectina, presentes en las plaquetas y endotelio, respectivamente. Los leucocitos no captados pueden interactuar y unirse a los leucocitos captados mediante el receptor L-selectina. Tras la liberación de quimioatrayentes como la MCP1, se inicia una cascada de señalizaciones con el objetivo de aumentar el número y la intensidad de las interacciones. El proceso de rodamiento y adhesión está mediado por las integrinas leucocitarias LFA1 y VLA4 (del inglés, lymphocyte function-associated antigen 1 y very late antigen 4) y los ligandos ICAM1 y VCAM1. ICAM1 se expresa constitutivamente en las células endoteliales vasculares y en subclases de linfocitos y monocitos, donde su estimulación por citoquinas proinflamatorias aumenta su expresión. VCAM1 puede ser liberada por el endotelio, células dendríticas y fibroblastos. Su expresión está también inducida por citoquinas proinflamatorias, ROS, y alta concentración de glucosa, entre otros (Hubbard y Rothlein, 2000; Cook-Mills et al., 2011; Nourshargh y Alon, 2014). Una vez el leucocito está adherido firmemente al endotelio, migra al espacio subendotelial mediante la diapédesis. Actualmente existen diversos métodos que permiten la valoración y cuantificación de las interacciones leucocito-endotelio *in vivo* — a través de microscopía intravital convencional, microscopía de escaneo láser multifotón o microscopía de fuerza atómica (Zhang et al., 2004; Jain et al., 2013) — como en *ex vivo* — mediante cámaras de flujo paralelo — que permiten analizar una población de leucocitos sobre un cultivo de células endoteliales (Anderson et al., 2019).

La disfunción endotelial constituye el estadio inicial en la formación de lesiones ateromatosas y desarrollo de aterosclerosis. La disrupción de la permeabilidad vascular supone una mayor infiltración de citoquinas proinflamatorias, leucocitos y partículas LDL, las cuales son oxidadas por los ROS presentes en espacio subendotelial originando oxLDL. Las partículas de oxLDL acumuladas promueven la secreción de mediadores inflamatorios y CAM por parte de las células endoteliales y del músculo liso, culminando en una mayor acumulación de leucocitos en el espacio subendotelial. El reclutamiento de células inmunes potencia a su vez la oxidación de LDL, generando una retroalimentación positiva. Las oxLDL son reconocidas y captadas en una forma no regulada por receptores específicos de los macrófagos infiltrados, proceso que genera la acumulación de macrófagos cargados de lípidos (conocidos como células espumosas). Cuando la carga

lipídica de estas células excede su capacidad límite conduce a la célula a procesos apoptóticos, los cuales originan un daño vascular local y contribuyen a la progresión de la placa de ateroma al añadir remanentes antigénicos y trombogénicos a la lesión (Rocha y Libby, 2009) (**Figura 2**).

Figura 2. Interacciones leucocito-entotelio y formación de placa aterosclerótica



Etapas de adhesión leucocitaria al endotelio vascular y patogénesis del proceso aterosclerótico. En primer lugar, mediante intercomunicaciones entre receptores de leucocitos y moléculas de adhesión endoteliales, se produce la atracción del leucocito al endotelio (captura del leucocito). Este proceso está regulado a través de la reducción de la velocidad y rodamiento a través del endotelio para finalmente adherirse firmemente. En situaciones patológicas, como en el caso de la disfunción endotelial, el aumento de la permeabilidad permite el paso a través del endotelio de las LDL, las cuales son oxidadas por ROS originando las oxLDL presentes en el espacio subendotelial. Unido a una alta adhesión leucocitaria, los macrófagos fagocitan las oxLDL dando lugar a células espumosas, las cuales se acumulan junto con células del músculo liso, colágeno y otras células espumosas apoptóticas.

Respecto a la obesidad, se ha constatado un aumento en la expresión génica y proteica de ICAM1 y VCAM1 en el VAT (Bošanská et al., 2010) que se asoció a mayores niveles

1. TEMÁTICA

séricos de estas moléculas (Miller y Cappuccio, 2006). Además, se ha evidenciado un incremento en la concentración plasmática de oxLDL en pacientes con un aumento en los depósitos de VAT (Couillard et al., 2005), junto con mayor contenido de células espumosas (Shapiro et al., 2013). Un estudio histoquímico observó una acumulación de células inflamatorias y adipocitos perivasculares productores de MCP1 en regiones aórticas propensas a la aterosclerosis (Henrichot et al., 2005), donde el aumento de VAT fue un predictor independiente de la presencia y extensión de placas ateroscleróticas coronarias (Ohashi et al., 2010). Por lo tanto, la respuesta inmune exacerbada y la disfunción endotelial instauradas en la obesidad podría elevar el riesgo de formación de placas de ateroma y aterosclerosis subclínica en estos pacientes.

1.2. Comorbilidades asociadas a la obesidad

La obesidad desencadena una serie de alteraciones metabólicas sistémicas donde la disfunción del AT y la inflamación crónica de bajo grado parece desempeñar un papel central en la desregulación del metabolismo celular y, consecuente, en la aparición de hipertensión arterial, dislipidemia aterogénica e IR (Guh et al., 2009). Estas patologías no sólo afectan en la edad adulta, sino que también puede afectar en edades tempranas y adolescencia (Sharma et al., 2019).

1.2.1. Hipertensión arterial

La presión arterial hace referencia a la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de las arterias. Se diagnostica hipertensión si la SBP es ≥ 140 mmHg y/o la DBP es ≥ 90 mmHg. La hipertensión es una de las principales causas de muerte prematura mundial y aproximadamente el 46% de los pacientes con hipertensión no saben que la padecen (WHO, 2021b). El BMI, la SBP y la DBP presentan una asociación lineal, donde las estimaciones apuntan a un aumento de riesgo de instauración de hipertensión de 20-30% por cada aumento del 5% del peso corporal, por lo que la pérdida de peso se asocia con el restablecimiento de la presión arterial. En este sentido, el normopeso representa un factor protector en la prevención primaria de la hipertensión. Estudios clínicos con mujeres premenopáusicas concluyen que la obesidad elimina el efecto cardioprotector de los estrógenos, aumentando el riesgo de instauración de hipertensión en esta población (Natsis et al., 2020).

La hipertrofia del adipocito desempeña un papel clave en la instauración de la hipertensión al tener una implicación directa en la aterogénesis y desarrollo de CVD. En su conjunto, Chait y den Hartigh (2020) evidencian los diferentes mecanismos que podrían estar mediando esta respuesta en la obesidad: la elevada liberación de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL6, MCP1) con la infiltración de macrófagos activados en el endotelio y órganos adyacentes, el aumento de FFA y CRP. Estas rutas metabólicas aterogénicas, a su vez, van a producir el descenso de adiponectina (con una marcada acción anticoagulante) y agravar el carácter proaterosclerótico en los pacientes con obesidad. La hipertensión está asociada a la activación del RAAS (del inglés, renin-angiotensin-aldosterone system), donde el AT perivascular contribuye a la liberación de la mayoría de los componentes de RAAS. A su vez, la angiotensina II, péptido producido a partir del angiotensinógeno, promueve la secreción de factores de crecimiento vascular, moléculas de adhesión (L- y P- selectina), ICAM1, VCAM1 y sus ligandos. Este estado contribuye a la vasoconstricción, aumento de presión arterial y disfunción vasomotora (Benigni et al., 2010; Nosalski y Guzik, 2017). En este contexto, otra comorbilidad íntimamente relacionada con la aterosclerosis es la dislipidemia aterogénica.

1.2.2. Dislipidemia aterogénica

Diversos procesos metabólicos están involucrados en la captación, transporte y almacenamiento de los lípidos. Tras la ingesta dietética de grasas, los TG y el colesterol son captados por receptores en los enterocitos del intestino y ensamblados en forma de quilomicrones con el objetivo de ser transportados a través de la circulación periférica al hígado. Estas lipoproteínas son el resultado de la conjunción de los ésteres de colesterol, TG y fosfolípidos derivados de los alimentos. El hígado sintetiza lipoproteínas ricas en TG denominadas VLDL (del inglés, very-low density lipoprotein), encargadas de transportar y ceder TG a las células para su consumo y el almacenamiento de energía. Según van cediendo TG van reduciendo su diámetro durante el proceso de lipólisis para formar primeramente IDL (del inglés, intermediate density lipoprotein) y, finalmente, partículas LDL con bajo contenido en TG y alto de ésteres de colesterol, encargadas de transportar el colesterol a los tejidos periféricos (Feingold, 2000; Klop et al., 2013). Mediante la separación por ultracentrifugación, se definen 4 subclases de LDL en función de la densidad y tamaño de la partícula, incluyendo las LDL grandes (LDL I), intermedias (LDL II), pequeñas (LDL III) y sdLDL (LDL IV) (Ivanova et al., 2017). El transporte reverso de colesterol, es decir, aquel que se encarga del transporte del colesterol desde los

1. TEMÁTICA

tejidos periféricos al hígado para su posterior excreción a la bilis, se lleva a cabo mediante las HDL. Se postula que un aumento de las HDL a través de cambios de estilo de vida ocasiona efectos vasculares positivos. En cambio, los quilomicrones y las partículas LDL pueden quedar retenidas en el espacio subendotelial para posteriormente ser fagocitadas por los monocitos y macrófagos. Las sdLDL son más proaterogénicas al tener una mayor afinidad por los proteoglicanos arteriales, moléculas estructurales de los vasos sanguíneos, lo que origina una mayor retención de lipoproteínas en el espacio subendotelial (Klop et al., 2013; März et al., 2017).

La alteración lipídica conocida como dislipidemia aterogénica se diagnostica clínicamente al presentar elevados niveles de TG y sdLDL, junto con un nivel reducido de HDLc. Los cambios cualitativos de las lipoproteínas se inducen principalmente por anomalías en el metabolismo de los lípidos, debido al aumento de la reserva hepática de TG y una sobreproducción de VLDL (Lechner et al., 2020). La dislipidemia aterogénica representa la comorbilidad más común en la obesidad, seguida de la hipertensión y T2D, donde el índice cintura-cadera y la circunferencia de la cintura son predictores de esta condición (Paccaud et al., 2000; Tóth et al., 2012). La liberación crónica de FFA por parte de los adipocitos estimula la sobreproducción hepática de TG y altera el tamaño, densidad y características metabólicas de las partículas LDL. Se conoce que los individuos con obesidad tienen alterado el perfil lipídico, a favor del aumento de las partículas LDL (Magkos et al., 2008), donde las sdLDL representan una condición observada en individuos con adiposidad central y que generalmente se asocia con riesgo cardiovascular. Estas partículas muestran una menor afinidad por el receptor de LDL, tienen una vida media más larga en el plasma y una mayor susceptibilidad a la oxidación y la glicación (Nikolic et al., 2013; Manna y Jain, 2015). El estado de IR en la obesidad reduce la expresión del receptor LDL en el hígado, aumentando las LDL circulantes y disminuyendo la síntesis de HDL. Además, el exceso de FFA induce la sobreproducción de TG hepáticos, hecho que origina el aumento de gotas lipídicas en el hígado (originando acumulación de grasa hepática) y elevada secreción de VLDL. El resultado global es un metabolismo lipídico proaterogénico (Choi y Ginsberg, 2011; Ponziani et al., 2015).

1.2.3. Insulin resistencia y diabetes mellitus

En condiciones fisiológicas, la glucemia se regula a través de hormonas, como la insulina y el glucagón. Así, un aumento en los niveles de glucosa circulantes constituye un

importante regulador de la función de las células β pancreáticas, ya que representa el estímulo para la transcripción de genes relacionados con la síntesis y secreción de la insulina (Cerf, 2013).

Los defectos en la sensibilidad de los tejidos periféricos en la respuesta a la insulina se manifiestan a través de la IR. La progresión de la IR en el contexto de la obesidad supone un agotamiento e incapacidad de respuesta de las células β ante una hiperglucemia crónica. La hiperglucemia crónica estimula continuamente la síntesis de insulina con el fin de mantener la glucemia en rangos fisiológicos. Este hecho es clave en las alteraciones fisiopatológicas de la T2D, provocando finalmente un fallo en la función de las células β que se caracteriza por la reducción en su masa y el deterioro de la secreción de insulina estimulada por la glucosa (Ying et al., 2020). Se ha constatado una relación directa y bidireccional entre la obesidad y la T2D. La IR duplica el riesgo de CVD, donde la pérdida de peso podría revertir este estado (Andolfi y Fisichella, 2018). Un alto porcentaje de los pacientes con T2D presentan obesidad, siendo esta a su vez la principal causa de IR (Ying et al., 2020).

La condición de IR y fallo de las células β contribuye a aumentar los niveles circulantes de FFA que a su vez altera la síntesis de insulina y su secreción mediada por la glucosa (Algoblan et al., 2014). La inflamación crónica de bajo grado también tiene una implicación directa sobre la diabetes. A nivel sistémico, se ha constatado que los valores HOMA-IR se asocian significativamente con los niveles plasmáticos de $\text{TNF}\alpha$ (Manna y Jain, 2015). Profundizando en los mecanismos moleculares, se sabe que las citoquinas $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL1}\beta$ liberadas por las células infiltradas, generalmente macrófagos, en el páncreas pueden provocar la apoptosis celular de las células β a través de la inducción de estrés oxidativo y del estrés de ER (Cerf, 2013). Experimentalmente se ha observado que la incubación de las citoquinas $\text{IL1}\beta$ o $\text{TNF}\alpha$ en islotes pancreáticos humanos o cultivos de células β incrementan la apoptosis celular y reducen la secreción de insulina mediada por la glucosa (Ying et al., 2020). Este fallo β pancreático podría estar mediado a través de la señalización de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ y JNK (Donath et al., 2008). Por lo tanto, estas citoquinas podrían desempeñar un papel importante en la patogénesis de la insuficiencia progresiva de las células β en la T2D.

1. TEMÁTICA

1.2.4. Síndrome metabólico y obesidad metabólicamente sana

El MetS se caracteriza por un conjunto de factores de riesgo cardiometabólico que aumentan el riesgo de padecer CVD. Los componentes que engloban el MetS son la alteración de la glucosa basal en ayunas, la obesidad abdominal, la hipertensión y la dislipidemia (Ginsberg y MacCallum, 2009). En cuanto a su diagnóstico, varía ligeramente según las directrices publicadas en distintos organismos mundiales. Con el objetivo de homogeneizar los criterios a utilizar, Alberti *et al.* (2009) recoge en su publicación un consenso entre diversas instituciones internacionales relacionadas con la diabetes, obesidad y sistema circulatorio. Clínicamente, se diagnostica el MetS como la presencia de tres o más de las siguientes anomalías metabólicas: perímetro de cintura ≥ 102 cm en hombres o ≥ 88 cm en mujeres, niveles de HDL < 40 mg/dl en hombres y < 50 mg/dl en mujeres, TG ≥ 150 mg/dl, SBP ≥ 130 mmHg o DBP ≥ 85 mmHg y niveles de glucosa en sangre en ayunas ≥ 100 mg/dl. El tratamiento farmacológico para reducir los TG, la presión arterial o la glucemia son también indicadores representativos del MetS (Eckel *et al.*, 2010). La relación entre el MetS y el aumento del riesgo de CVD se ha establecido mediante los resultados de ensayos clínicos a gran escala (Ginsberg y MacCallum, 2009). En cambio, una vez que se instaura la T2D, se postula que el riesgo cardiovascular se multiplica.

En contraposición, se encuentra un grupo de pacientes con obesidad que presentan un fenotipo “cardioprotector”. El concepto de obesidad metabólicamente sana deriva de observaciones clínicas de pacientes con BMI mayor de ≥ 30 kg/m² (prevalencia entre 10-20%) que no muestran alteraciones cardiometabólicas. Se caracterizan por una función del AT preservada con menor depósito de VAT y una mayor sensibilidad a la insulina que los obesos con riesgo cardiometabólico y marcadores inflamatorios similares al grupo de individuos con normopeso. En cuanto a su diagnóstico, Blüher (2020) propone que no presenten criterios de TG, HDLc, presión arterial y glucemias establecidos para la definición de MetS; o no estar en tratamiento para hipertensión arterial, dislipidemia o T2D. Sin embargo, no existe un consenso claro entre la comunidad científica respecto a los criterios de clasificación.

La obesidad metabólicamente “sana” es un término que crea controversia y son muchos los investigadores que postulan las consecuencias perjudiciales a largo plazo. Constituye un fenotipo de obesidad que predominantemente afecta a mujeres premenopáusicas, a

pacientes jóvenes, con un BMI < 35 kg/m² y descendencia europea (Smith et al., 2019). Debe de tratarse con cautela ya que el riesgo de desarrollar CVD sigue siendo mayor respecto a individuos con normopeso, considerándose en muchos casos como una situación transitoria (Blüher, 2020). Entre los participantes del estudio prospectivo de Pizarra *et al.*, a los 6 años de seguimiento el 21% de la cohorte diagnosticada con obesidad metabólicamente sana al inicio desarrollaron T2D (Soriguer et al., 2013). Otros estudios longitudinales señalan que entre el 30% y 50% de pacientes con obesidad metabólicamente sana podrían evolucionar hacia una obesidad con factores de riesgo cardiometabólicos de 4 a 20 años de seguimiento. Postulan que el factor determinante sería la disminución de sensibilidad a la insulina y aumento de la glucemia, donde el mayor riesgo lo tendrían personas con BMI elevado, edad avanzada, estilo de vida sedentario o consumo de tabaco (Smith et al., 2019).

1.3. Mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de la obesidad y comorbilidades

En este apartado nos vamos a centrar en la comprensión de los mecanismos que podrían estar involucrados en la instauración y desarrollo de la obesidad y sus comorbilidades, así como en la identificación de posibles dianas terapéuticas.

1.3.1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un proceso celular causado por el desequilibrio entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes, destinadas a su neutralización. Un radical libre es una molécula inestable y reactiva que contiene un electrón no apareado en un orbital atómico, pudiendo donarlo a otras moléculas o aceptar un electrón de ellas. Existen diferentes tipos de ROS (O_2^- , H_2O_2 , $-OH$ y 1O_2) y RNS ($ONOO^-$). Existe una fuerte evidencia sobre el papel del estrés oxidativo en la instauración o desarrollo de determinadas enfermedades como el cáncer, CVD o enfermedades metabólicas, por lo que su estudio adquiere un papel fundamental en la fisiopatología de la obesidad (Lobo et al., 2010; Pizzino et al., 2017).

Fisiológicamente, la presencia de ROS es necesaria para llevar a cabo diferentes señalizaciones celulares como la fosforilación de proteínas, activación de factores transcripcionales o interviniendo en la diferenciación celular (Rajendran et al., 2014). En

1. TEMÁTICA

cambio, elevados niveles de ROS provocan daño a lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, lo que se traduce en la formación de peróxidos lipídicos, carbonilación de proteínas, compuestos glicosados y mutaciones del DNA. Esto supone cambios en la señalización celular y activación de rutas apoptóticas (Pizzino et al., 2017; Roy et al., 2017).

Producción de especies reactivas de oxígeno

Los radicales libres son el resultado de procesos metabólicos a través de reacciones enzimáticas (cadena respiratoria, fagocitosis, síntesis de prostaglandinas y sistema del citocromo P-450) y no enzimáticas (reacciones resultantes de compuestos orgánicos o iniciadas por radiaciones ionizantes). Su formación puede activarse a partir de fuentes endógenas como la activación de células inmunes, ejercicio excesivo o el envejecimiento; o por fuentes exógenas como la exposición a contaminantes ambientales (Pizzino et al., 2017). Centrándonos en la fuente endógena de producción de ROS, la mitocondria es el principal orgánulo responsable, aunque existen otras fuentes productoras.

Delimitada por una doble membrana y un espacio intermembrana, la mitocondria es la principal encargada de abastecer energía en forma de ATP a la célula a través de la respiración celular. En la matriz y membrana interna mitocondrial se desarrollan dos procesos metabólicos esenciales: el ciclo de Krebs y la ETC. El ciclo de Krebs se encarga de oxidar el piruvato cedido por la glicólisis, produciendo intermediarios energéticos en forma de NADH y FADH₂ (del inglés, flavin adenine dinucleotide). Estos compuestos transportan los electrones necesarios para el funcionamiento de la ETC. La ETC se localiza en la membrana interna mitocondrial y está compuesta por los complejos I-IV junto con la ubiquinona y citocromo C, cuya función es el transporte de electrones entre los diferentes complejos proteicos. El objetivo de la ETC es la creación de un gradiente electroquímico, mediante la transferencia de electrones al O₂ y el bombeo de protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana. Se conocen dos vías de transporte de electrones en la ETC: el complejo I/III/IV, con NADH como sustrato y el complejo II/III/IV, con FADH₂ como sustrato. Simultáneamente, los complejos I, III y IV bombean electrones al espacio intermembrana creando un gradiente electroquímico. Este gradiente es empleado por la ATP sintasa para formar ATP o disiparlo a la matriz mitocondrial por las UCP (Friedman y Nunnari, 2014; Di Meo et al., 2016; Zhao et al., 2019).

En condiciones fisiológicas, del 0,2 al 2% de los electrones no siguen el orden de transferencia en la ETC, sino que se disipan directamente sin acoplarse a la generación de ATP en un proceso conocido como fuga de electrones, que conduce a la formación de mtROS. El complejo I y III son los principales complejos involucrados en la producción de $O_2^{\cdot-}$. Los ROS generados por el complejo I se acumulan en la matriz mitocondrial y reaccionan fácilmente con el mtDNA u otros componentes vulnerables al daño oxidativo, como los lípidos, mientras que los ROS derivados del complejo III, localizadas en la matriz o espacio intermembrana, pueden servir como segundos mensajeros en la señalización celular (Bleier et al., 2015; Scialò et al., 2017; Zhao et al., 2019).

En cuanto a otras fuentes de ROS no mitocondriales, el citosol, los peroxisomas, la membrana plasmática y los lisosomas están también involucrados en la formación de ROS celulares. En estos compartimentos intervienen las enzimas xantina oxidasa, óxido nítrico sintasa y la NADPH (del inglés, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidasa, entre otras (Di Meo et al., 2016). Otra enzima importante en la generación de ROS en los leucocitos es la MPO. Está presente en orgánulos unidos a la membrana citoplasmática de neutrófilos, linfocitos y macrófagos. Su función es captar el H_2O_2 intracelular y oxidar sustratos para dar lugar a la formación de diversos ácidos, con el fin de actuar como bactericida celular. Sin embargo, las actividades antibacterianas de la MPO suponen la producción de diferentes ROS y RNS por lo que cualquier producción excesiva o no regulada de estos compuestos podrían exacerbar el estrés oxidativo en los leucocitos (Khan et al., 2018).

Por lo tanto, una excesiva producción de ROS tanto mitocondriales como no mitocondriales inducen un aumento de ROS en la célula creándose de esta forma un círculo vicioso. Es por esto que las defensas antioxidantes tienen un papel fundamental en la neutralización y eliminación de ROS.

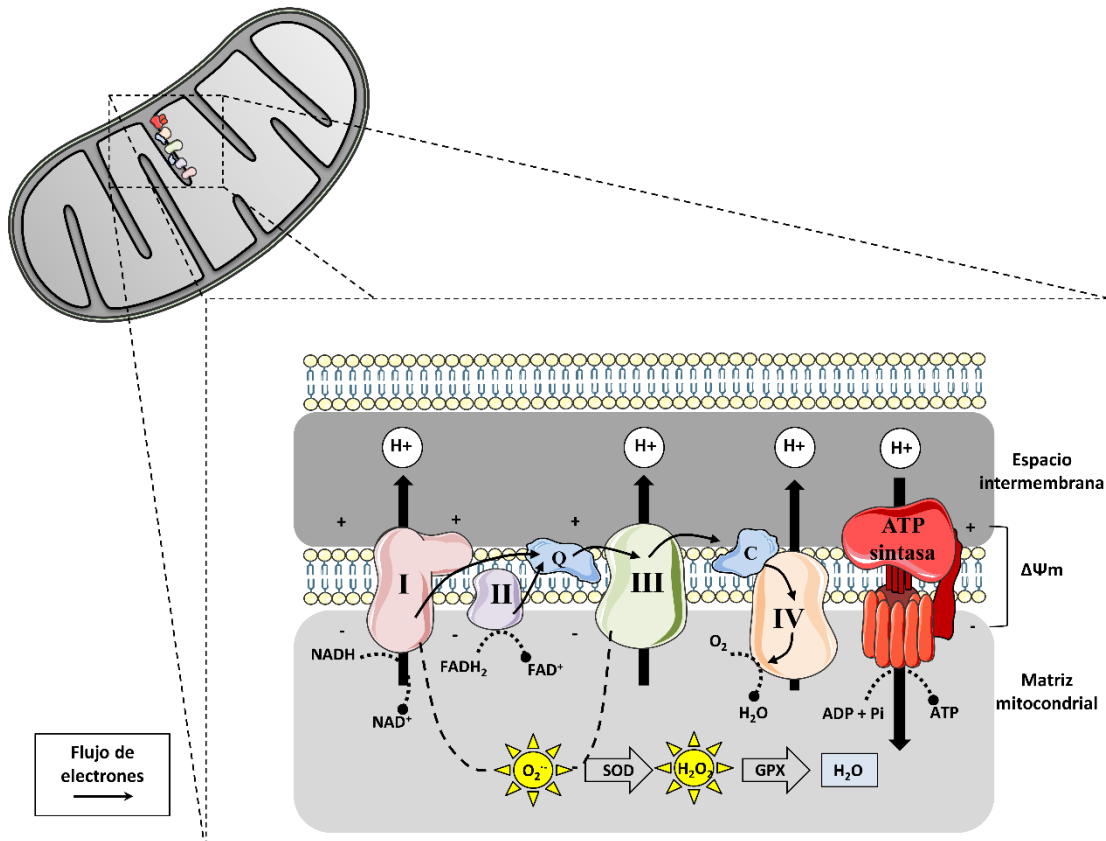
Defensas antioxidantes

Un antioxidante es una molécula que retrasa o inhibe el daño celular al ser capaz de neutralizar los radicales libres. Los antioxidantes ejercen su efecto suprimiendo la formación de radicales libres, la eliminación de los radicales ya formados o mediante la degradación y eliminación de las moléculas modificadas por la oxidación, previniendo su acumulación (Lobo et al., 2010).

1. TEMÁTICA

En primer lugar, la familia enzimática SOD están presentes en la gran mayoría de las células aeróbicas y llevan a cabo la descomposición del $O_2^{\cdot-}$ en O_2 y H_2O_2 . Existen tres isoformas de SOD con los siguientes metales asociados: SOD1 (Cu/Zn) localizada en el citoplasma, es la principal isoforma encargada de neutralizar el $O_2^{\cdot-}$ en el espacio intermembrana de las mitocondrias. La SOD2 (Mn) se localiza en la matriz mitocondrial y SOD3 (Cu/Zn), que actúa en vasos sanguíneos, pulmón y riñón. Tras la acción de las SOD, las CAT son las encargadas de la descomposición del H_2O_2 en H_2O y O_2 , las cuales se expresan principalmente en el hígado y eritrocitos. Por último, el sistema de glutatión, uno de los antioxidantes más importantes al mantenerse en forma reducida, incluye el glutatión (con 8 isoformas), glutatión reductasa, GPX y glutatión S-transferasa. Su mecanismo de acción consiste en la transformación de H_2O_2 en H_2O y O_2 o el hidroperóxido orgánico (ROOH) en el alcohol correspondiente (ROH). A diferencia de la CAT, la GPX detecta pequeñas elevaciones de H_2O_2 . Esta enzima tiene una isoforma, llamada GPX1, que es la forma más abundante en citosol y matriz mitocondrial (Lobo et al., 2010; Zhang et al., 2019) (**Figura 3**).

Figura 3. Estrés oxidativo y defensas antioxidantes



Mecanismos involucrados en la producción de ROS y defensas antioxidantes en la célula. En primer lugar, durante la OXPHOS se genera un flujo de electrones a través de los complejos mitocondriales I-IV, los cuales se acumulan en el espacio intermembrana de la mitocondria, para posteriormente retornar a la matriz mitocondrial mediante el paso por la ATP sintasa. La fuga de electrones, principalmente en el complejo I y III, origina la acumulación de O_2^- con consecuencias para la mitocondria, otros componentes celulares y macromoléculas. La enzima SOD2 es la encargada de neutralizar el O_2^- en O_2 y H_2O_2 , y la GPX transforma el H_2O_2 en H_2O .

Estrés oxidativo, obesidad y comorbilidades asociadas

El estrés oxidativo representa uno de los mecanismos fisiopatológicos más relevantes en el desarrollo de las comorbilidades asociadas a la obesidad. Concretamente, se postula que la inflamación crónica, la hiperlipidemia y la hiperglucemia inducen un desequilibrio oxidativo a través de la elevada producción de mtROS y una respuesta antioxidante ineficaz. Como consecuencia de estas alteraciones, el estrés oxidativo desencadena una alteración en la homeostasis mitocondrial. Sin embargo, el grado de contribución de cada uno de estos factores dependerá del estado metabólico del individuo (Vincent y Taylor, 2006).

1. TEMÁTICA

Inflamación crónica

Las adipoquinas son proteínas que median la inflamación crónica de bajo grado en la obesidad con implicación directa en la inducción del estrés oxidativo. A nivel mitocondrial, el tratamiento con TNF α en adipocitos 3T3-L1 supuso un aumento de la fuga de protones, un desacoplamiento del consumo de O₂ y una menor producción intracelular de ATP. En paralelo, impulsó una mayor liberación de mtROS, aumento de la carbonilación de proteínas y, finalmente, la fragmentación mitocondrial (Chen et al., 2010; Hahn et al., 2014). La leptina, la cual está elevada en pacientes con obesidad, induce la producción de mtROS y MCP1 en las células endoteliales aórticas (Yamagishi et al., 2001). Además, como ya hemos indicado previamente, interviene en la diferenciación de células T hacia un fenotipo proinflamatorio Th1, por lo que desempeña un papel fundamental en la fase inicial de la inflamación y estrés oxidativo.

Hiperlipidemia e hiperglucemia

La obesidad está íntimamente relacionada con la alteración del metabolismo de los lípidos y la hiperglucemia. El exceso de estos sustratos energéticos induce un suministro exacerbado de electrones a la ETC, lo que provoca un aumento de la polarización de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) y una mayor probabilidad de fuga de electrones, generando ROS y respuestas deletéreas (Zhao et al., 2019).

- 1) Hiperlipidemia: Los FFA plasmáticos elevados impiden el intercambio de ATP y ADP (del inglés, adenosine diphosphate) entre la matriz y la membrana interna mitocondrial por lo que promueven la generación de O₂⁻ en la ETC mitocondrial (Manna y Jain, 2015). Elevados niveles de lípidos suponen una mayor susceptibilidad a la modificación oxidativa por los ROS en el AT, hígado y músculo esquelético de pacientes con obesidad (Ahmed et al., 2021). A su vez, la exposición crónica a elevados niveles de glucosa y FFA supone el aumento de la producción de ROS en las células β pancreáticas, disminuyendo su capacidad de síntesis de insulina, tal y como hemos mencionado anteriormente. A esto se une que las células β presentan intrínsecamente una baja expresión de enzimas antioxidantes, por lo que serían más vulnerables ante el estrés oxidativo (Manna y Jain, 2015).

- 2) Hiperglucemia: La sobrecarga de glucosa intracelular supone un aumento de la vía glucolítica y del ciclo de Krebs, lo que resulta en el aumento de los sustratos NADH y FADH₂, incremento del potencial de membrana mitocondrial y la consecuente fuga de electrones a través del complejo III, fundamentalmente, generando O₂⁻. Este radical libre inhibe a la enzima GAPDH (del inglés, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) y redirige los metabolitos hacia las siguientes rutas: (1) vía de polioles que aumenta la conversión de glucosa en sorbitol; (2) vía de hexosaminas que inhibe la tiorredoxina; (3) ruta de metilglioal (precursor de los AGE (del inglés, advanced glycosylation products) y (4) ruta diacilglicerol (activación vía PKC [del inglés, protein kinase C]). Estos cuatro mecanismos inducen el estrés oxidativo mediante la formación de ROS y la inhibición de los mecanismos antioxidantes (Manna y Jain, 2015).

En su conjunto, la hiperlipidemia y la activación de rutas alternativas en la hiperglucemia induce el estrés oxidativo/nitrosativo, ya sea por el aumento de la producción de radicales libres o por el deterioro de las defensas antioxidantes.

Producción de ROS y respuesta antioxidante ineficaz

En el contexto de la obesidad, la literatura científica apunta a una mayor detección de biomarcadores de estrés oxidativo (carbonilación de proteínas, peroxidación de lípidos o MDA [del inglés, malondialdehyde]) en pacientes con obesidad (Dandona et al., 2001; Olusi, 2002; Ferretti et al., 2005), de manera dependiente al BMI (Keaney et al., 2003). Por otra parte, centrándonos en las defensas antioxidantes, las actividades de las enzimas antioxidantes SOD y GPX resultaron ser menores en los eritrocitos de los pacientes con obesidad (Olushi, 2002; Čolak et al., 2020), donde a su vez la capacidad antioxidante fue inversamente proporcional con el grado de adiposidad (Chrysohoou et al., 2007). Más concretamente, en los PBMC de pacientes con obesidad se detectó una reducción significativa de las actividades enzimáticas SOD, CAT y GPX, junto con un aumento del ratio glutatión oxidado/reducido (Monzo-Beltran et al., 2017). Se hipotetiza que las modificaciones en el estilo de vida en pacientes con obesidad (ejercicio o intervenciones dietéticas) podrían ofrecer una atenuación del estrés oxidativo al reducir los ROS (Bevilacqua et al., 2004) y/o aumentar las defensas antioxidantes (Shin et al., 2008).

1. TEMÁTICA

Disfunción mitocondrial

La disfunción mitocondrial se define como la incapacidad de las mitocondrias para generar ATP de acuerdo a los requerimientos energéticos celulares. Este término engloba las respuestas maladaptativas de la mitocondria ante alteraciones en el catabolismo de sustratos, mutaciones del mtDNA, producción de mtROS, dinámica y biogénesis mitocondrial y apoptosis (de Mello et al., 2018). Las mitocondrias del adipocito (Yin et al., 2014) y tejido muscular (Sparks et al., 2005) presentan en la obesidad una menor capacidad oxidativa (entendido como la tasa de consumo de O₂) y expresión génica de los complejos de la ETC. Todo esto supone el enlentecimiento de la respiración mitocondrial y aumento de la reserva de NADH, potenciando la generación de mtROS. La liberación de mtROS en los adipocitos interfiere en la oxidación de los ácidos grasos y favorece la acumulación de lípidos en forma de TG (Bournat y Brown, 2010) que a su vez estimula la liberación de citoquinas proinflamatorias, acentuando la disfunción mitocondrial. El estrés oxidativo activa uno de los principales mediadores de la respuesta inflamatoria, el NF-κB. Este factor de transcripción, a su vez, media la liberación de citoquinas inflamatorias en los PBMC de pacientes con obesidad (Muñoz y Costa, 2013) a través de los TLR y la formación del complejo inflamasoma.

1.3.2. Formación del complejo inflamasoma

El sistema inmunitario es el responsable de mantener la homeostasis frente a agresiones tanto externas como internas gracias al reconocimiento de patógenos, células dañadas o desequilibrios metabólicos. Los factores involucrados en la generación de una respuesta inflamatoria se clasifican en PAMP y DAMP (Latz et al., 2013; Zheng et al., 2020).

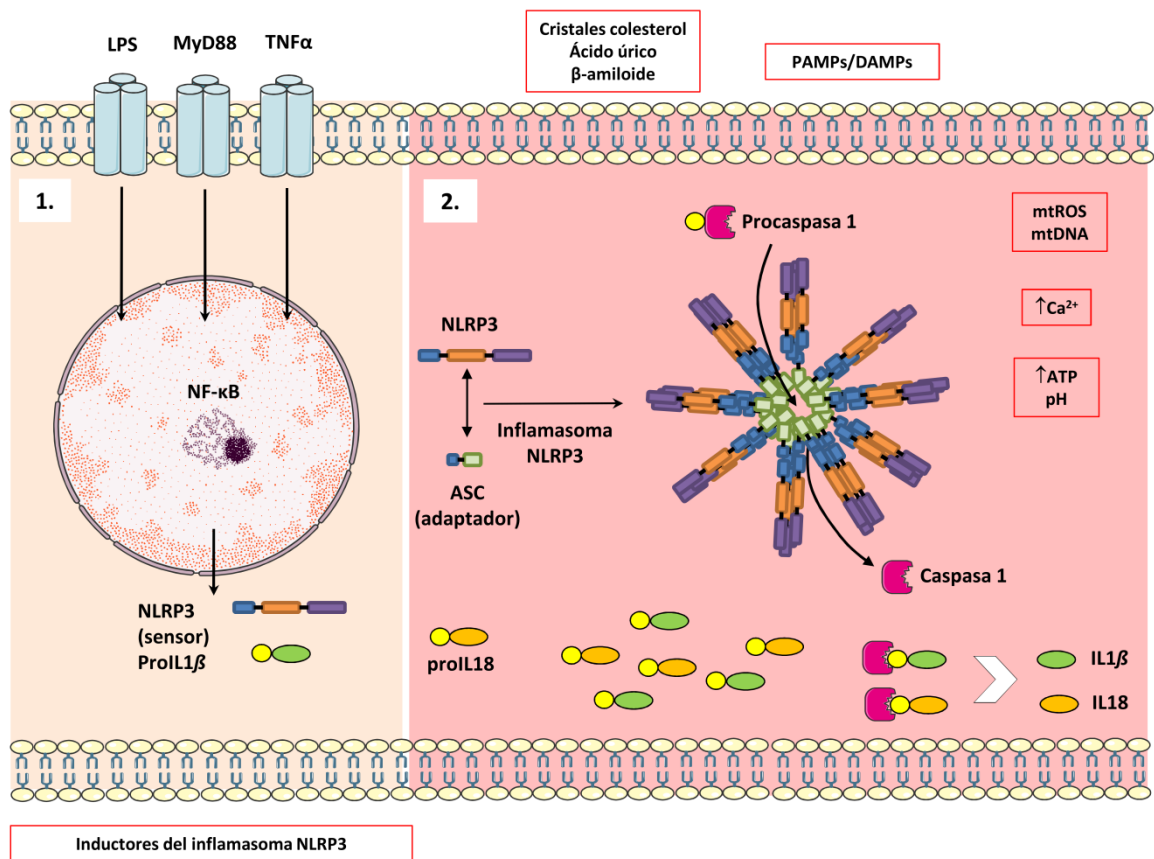
El complejo del inflamasoma es el principal mediador del sistema inmune. Consiste en un complejo multimérico formado por los sensores NLR o ALR, por la proteína adaptadora ASC y el efector de procaspasa-1. La proteína ASC es la encargada de establecer un nexo de unión entre los sensores y el efector de procaspasa-1. Este último sensor activa la caspasa 1, que regula y activa proteolíticamente las citoquinas IL1β e IL18, responsables de generar una actividad proinflamatoria y muerte celular denominada piroptosis. Los precursores de IL1β (pro-IL1β) e IL18 (pro-IL18) se localizan en el citosol y su transcripción es inducida por NF-κB (en el caso de pro-IL1β) o de manera constitutiva (pro-IL18), donde su expresión aumenta tras la activación celular. La permeabilización de la célula por la piroptosis permite liberar señales de peligro

endógenas con el objetivo de reclutar y activar otras células inmunitarias (Latz et al., 2013; Rathinam y Fitzgerald, 2016).

Como hemos mencionado previamente, los PAMP y DAMP activan la respuesta inmunitaria y el inflamasoma. Centrándonos en los PAMP, el inflamasoma NLRP3 puede ser activado por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, a través de la activación del flujo de K^+ , y por multitud de virus y proteínas víricas. Dentro de la categoría de DAMP endógenos, la activación del inflamasoma NLRP3 puede ser inducida por los siguientes estímulos: aumento de la concentración de ATP, alteración del pH extracelular, aumento del flujo de iones (K^+ citosólico y movilización de Ca^{+2}), disfunción mitocondrial (oxidación del mtDNA), degradación de los componentes de la matriz extracelular, ROS y acumulación de fibras de β -amiloide, cristales de ácido úrico o colesterol (Pellegrini et al., 2017; Zheng et al., 2020). Los inductores previamente mencionados de NLRP3 también pueden desencadenar la producción de ROS y se conoce que el uso de antioxidantes inhibe la activación de NLRP3, por lo que el estrés oxidativo parece que podría mediar la activación del complejo inflamasoma.

El sensor NLRP3 es el único de su familia cuya activación se divide en dos pasos: (1) inducción de factores de transcripción y (2) oligomerización de los componentes. A su vez, su activación puede producirse mediante la vía canónica y la vía no canónica. En la activación canónica, el primer paso está mediado principalmente por PAMP a través de las moléculas adaptadoras del TLR-LPS y/o receptores de citoquinas (como $TNF\alpha$) que activan la transcripción nuclear de $NF-\kappa B$ y, éste, induce la expresión génica de *pro-il18*, *pro-il1 β* y *nlrp3*. El paso de la oligomerización del inflamasoma NLRP3 conduce a la activación de la caspasa 1 para la liberación de las citoquinas $IL1\beta$ e $IL18$. La activación no canónica del inflamasoma NLRP3 es dependiente de la caspasa 11. Esta vía se activa por la presencia de bacterias Gram negativas que, además de inducir los factores de transcripción de la vía canónica, provocan la síntesis de factores reguladores de IFN (del inglés, interferon) α/β y caspasa 11 (Pellegrini et al., 2017) (**Figura 4**).

Figura 4. Activación del complejo inflammasoma NLRP3



Activación y regulación del complejo inflammasoma NLRP3. Tras recibir estímulos extracelulares inflamatorios por medio de receptores de membrana, se activa una cascada de señalización que desemboca en 1) activación del factor de transcripción NF-κB, el cual induce la expresión de proteínas NLR y el precursor inactivo de IL1β e IL18. 2) Inducción del ensamblaje de los componentes del inflammasoma NLRP3. Formado por NLRP3 y ASC, el inflammasoma NLRP3 complementa su función al formar un complejo con afinidad a la procaspasa 1. Esta unión permite la escisión a la forma madura de caspasa 1, la cual interviene en la maduración de las citoquinas proinflamatorias IL1β e IL18.

Complejo inflammasoma, obesidad y comorbilidades asociadas

La relación entre la obesidad y la formación del complejo inflammasoma NLRP3 ha sido ampliamente estudiada durante los últimos años. Se postula que el inflammasoma NLRP3 se puede activar por la hiperglucemia, FFA elevados, citoquinas proinflamatorias, hiperleptinemia y oxLDL (Esser et al., 2014; Wani et al., 2021).

Originalmente, se observó una activación del inflammasoma NLRP3 en células β pancreáticas y macrófagos infiltrados en los islotes pancreáticos (Esser et al., 2014). Estas investigaciones se complementaron en los macrófagos infiltrados en el AT de humanos y

ratones, los cuales sintetizan mayores niveles de NLRP3, caspasa 1 e IL1 β respecto a individuos con normopeso. Además, estos aumentos se correlacionaron positivamente con IR, demostrando la implicación del inflammasoma NLRP3 en la detección de señales de peligro asociadas a la obesidad (Vandanmagsar et al., 2011; Esser et al., 2013). También se ha observado que el inflammasoma NLRP3 se asocia con la hipertrofia en el AT de adolescentes con obesidad, donde el aumento en la expresión génica de *caspasa 1* se correlacionó inversamente con la sensibilidad a la insulina en esta población (Kursawe et al., 2016). Asimismo, la evidencia científica apunta que los linfocitos T y B son también capaces de inducir una respuesta mediada por el inflammasoma NLRP3. En primer lugar, se ha observado mayores niveles de mRNA de *nlrp3*, *caspasa 1* e *il1 β* en linfocitos T de pacientes hipertensos frente a sujetos normotensos (Zhu et al., 2017). En individuos con sobrepeso, se detectó mayor proporción de células T CD8⁺ infiltradas en su VAT, que correlaciona positivamente con los niveles de actividad de la caspasa 1 (Koenen et al., 2011). Nishimura *et al.* (2009) concluyeron que la subpoblación de células T CD8⁺ sería esencial para la acumulación y activación de macrófagos durante la disfunción del VAT en ratones alimentados con HFD. En conclusión, los estudios apuntan a una asociación entre el inflammasoma NLRP3 y la obesidad/IR.

1.3.3. Autofagia

La autofagia es un proceso celular catabólico encargado de la degradación y el reciclaje de componentes celulares necesario para mantener la homeostasis celular. La autofagia conlleva al aumento de la disponibilidad de aminoácidos necesarios para la síntesis de nuevas proteínas, contribuye a la eliminación de patógenos y previene el estrés celular (Orenstein y Cuervo, 2010).

La evidencia científica diferencia tres tipos de autofagia: la macroautofagia, la microautofagia y la CMA (del inglés, chaperone-mediated autophagy). En la macroautofagia se crea una estructura inicial formada por una membrana, llamada fagóforo, que se extiende alrededor de una carga a degradar hasta formar una doble membrana, estructura denominada autofagosoma. Posteriormente, se fusiona con los lisosomas, formándose el autofagolisosoma, para degradar el contenido celular. La microautofagia implica la invaginación directa del material citoplasmático al lisosoma. Por último, la CMA consiste en la identificación de proteínas citosólicas que contienen un dominio terminal KQFERQ, transporte al lisosoma mediado por las chaperonas

1. TEMÁTICA

HSC70 (del inglés, heat shock cognate protein of 70 kDa) y, por último, la unión al receptor de membrana lisosomal LAMP (del inglés, lysosome-associated membrane protein) 2 (Glick et al., 2010).

Centrándonos en la macroautofagia, podemos discernir entre los tipos en función de la carga citoplasmática a degradar se encuentra la mitofagia (mitocondria), xenofagia (microorganismos), ribofagia (ribosomas), agrefagia (proteínas agregadas), pexofagia (peroxisomas), crinofagia (fusión directa de vesículas secretoras con lisosomas), reticulofagia (ER). Este proceso se divide en varias fases, las cuales son: iniciación, nucleación, elongación, fusión y degradación (González-Polo et al., 2016) (**Figura 5**).

- (1) La fase de iniciación puede estar inducida por privación de nutrientes, falta de aminoácidos o ácidos grasos o aumento de ratio AMP/ATP. La proteína mTOR es un regulador crítico de la inducción de la autofagia donde su inhibición promueve la autofagia mediante la activación del complejo ULK1. La proteína AMPK induce la autofagia mediante la estimulación de diferentes proteínas intermediarias o por inhibición de mTOR. La iniciación implica la formación de una nueva membrana a partir de otras existentes o de la donación directa de lípidos. Las posibles membranas donadoras son el ER, el aparato de Golgi o las mitocondrias.
- (2) Durante la fase de nucleación, las proteínas BECLIN1, ATG14 y p150 activan la enzima PI3K que media la formación del fosfolípido PI(3)P (del inglés, phosphatidylinositol 3-phosphate) en la membrana original. Esta estructura servirá como punto de ensamblaje del fagóforo.
- (3) Durante la elongación del fagóforo la proteína ATG12 se conjuga con ATG5 en una reacción similar a la conjugación con ubiquitina que requiere ATG7 y ATG10. Este conjugado es necesario para la unión de ATG16 a este complejo, originando ATG12-ATG5-ATG16 el cual se disocia de la membrana al finalizar la formación del autofagosoma. A su vez, en el citosol se localiza LC3 que con la acción LC3I se procesa a LC3II mediante la eliminación de su extremo C-terminal y la conjugación con PE (del inglés, phosphatidylehanolamine) mediante las enzimas ATG7 y ATG4. Las proteínas p62 y NBR1 interaccionan con LC3II

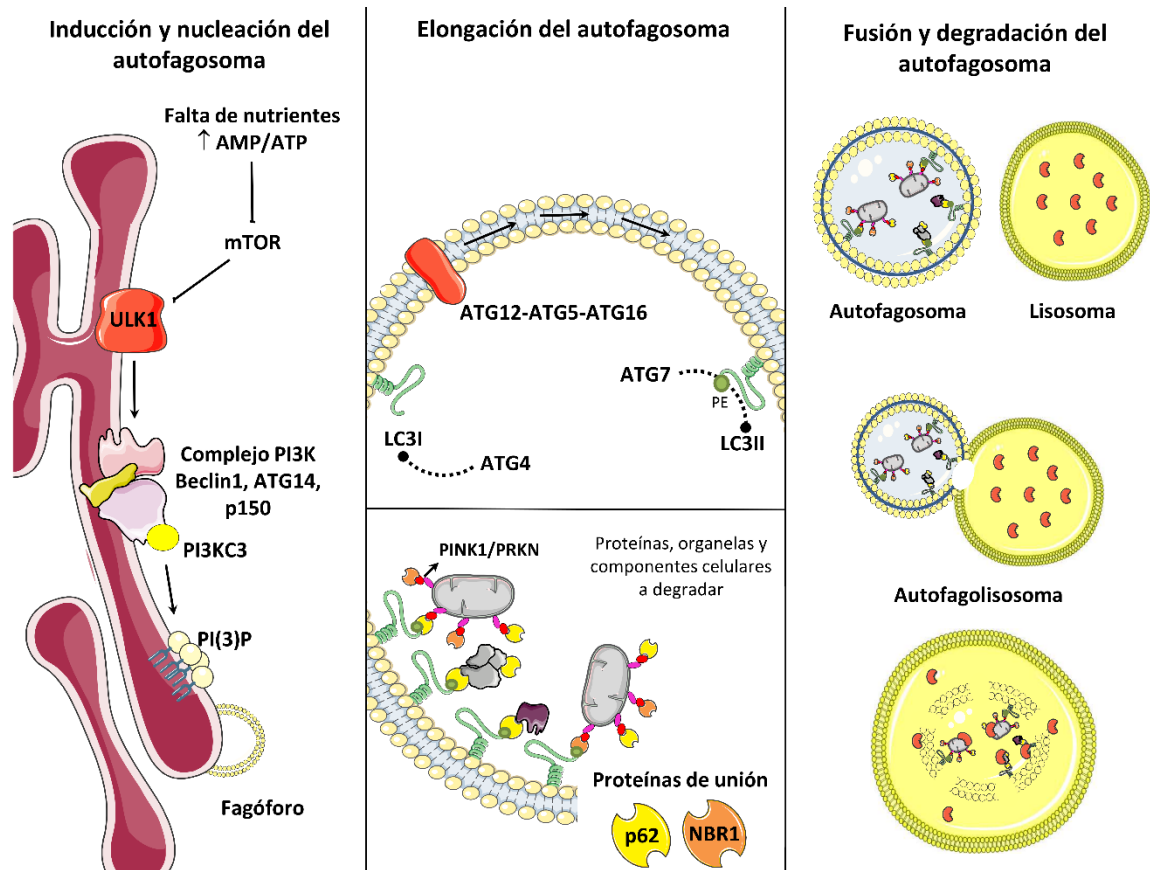
mediante los dominios LIR. Estas proteínas son las encargadas de formar agregados ubiquitinados en los componentes a degradar y unirlos al autofagosoma.

- (4) El proceso de fusión supone la unión del autofagosoma con el lisosoma (autofagolisosoma) para degradar su contenido mediante las enzimas lisosomales y posteriormente liberarlo al medio celular.

(Kirkin et al., 2009; Burman y Ktistakis, 2010; Alers et al., 2012; Codogno et al., 2011; González-Polo et al., 2016).

En el caso concreto de la mitofagia, se procede al reciclaje de las mitocondrias disfuncionales mediante la activación de diferentes rutas de señalización. Por una parte, en respuesta al daño mitocondrial, la proteína MIEAP induce la formación de un poro entre las membranas mitocondriales, permitiendo la acumulación de proteínas lisosomales como LAMP1 o LAMP2 dentro de las mitocondrias. Por lo tanto, MIEAP está involucrado en el mantenimiento de la calidad mitocondrial al ser punto de inicio en la degradación lisosomal de las mitocondrias dañadas (Nakamura y Arakawa, 2017). Por otra parte, la mitofagia puede estar mediada a través de la macroautofagia. Esta ruta de señalización está mediada principalmente por PINK1 y PRKN. Tras la disipación del potencial de la membrana mitocondrial, se acumula PINK1 en la membrana mitocondrial externa y recluta a PRKN. La poliubiquitinación inducida por PRKN sirve de punto de anclaje de p62 y facilita el reconocimiento por LC3, permitiendo así su unión al autofagosoma (Song et al., 2020).

Figura 5. Autofagia y mitofagia



Cascada de señalización involucrada en inducción y formación de autofagosomas. Tras la detección de falta de nutrientes, se induce la formación del autofagosoma a través de las fases de inducción, nucleación, elongación, fusión y degradación del autofagosoma. Durante la elongación, las proteínas p62 y NBR1 son las encargadas de unir el objetivo a degradar en la membrana del autofagosoma. La autofagia selectiva de mitocondrias (mitofagia) se lleva a cabo mediante la señalización por PINK1/PRKN, que garantiza la homeostasis mitocondrial y celular.

Además de los ya mencionados componentes que activan la autofagia, en el contexto de las enfermedades metabólicas existen otras rutas involucradas en su activación y regulación como son la formación del complejo del inflammasoma y el estrés oxidativo. La relación entre la autofagia y el inflammasoma ha sido estudiada durante estos últimos años y se postula que ambos procesos celulares presentan un mecanismo de retroalimentación positiva y negativa. En primer lugar, estudios sobre líneas celulares de macrófagos postulan que la inducción de la autofagia depende de la presencia de los sensores AIM2 (del inglés, absent in melanoma 2) o NLRP3 (no dependiendo de ASC o caspasa 1), observando una colocalización entre ASC, p62 y LAMP1. Estos datos sugieren que la autofagia presenta una regulación positiva con la actividad del inflammasoma (Shi et al.,

2012). Por otra parte, la autofagia puede regular negativamente la activación del inflammasoma NLRP3 eliminando los activadores del complejo inflammasoma, como las mitocondrias disfuncionales, componentes del inflammasoma y/o citoquinas (Biasizzo y Kopitar-Jerala, 2020). Es por ello que se necesitan más estudios para poder esclarecer la posible interrelación entre la autofagia y la activación del complejo del inflammasoma, con el fin de elucidar su posible implicación en enfermedades con base inflamatoria como la obesidad. En cuanto a la posible interrelación entre la autofagia y el estrés oxidativo, se postula que la autofagia se activa en respuesta a situaciones de estrés oxidativo con el fin de prevenir la apoptosis celular, aunque la desregulación de la autofagia puede provocar la acumulación de ROS (debido, por ejemplo, a la incorrecta eliminación de mitocondrias dañadas). Específicamente, el H₂O₂ puede regular la actividad de ATG4 en cultivos celulares, conduciendo a un aumento de la formación de autofagosomas (al conjugar LC3) o la inhibición de la elongación de la membrana (al impedir la lipidación de LC3) (Scherz-Shouval et al., 2007).

Autofagia, obesidad y comorbilidades asociadas

Las evidencias sobre la modulación de la autofagia en la obesidad son controvertidas, ya que la obesidad o la sobrealimentación pueden suprimir o promover la autofagia en función de la naturaleza y la evolución de la obesidad, así como del tipo de tejido o células analizados.

Centrándonos en el AT, varios estudios postulan un aumento de expresión génica y proteica de ATG5, ATG7, ATG12 y LC3II acompañado de un descenso de p62 en tejido omental, VAT y SAT de pacientes con obesidad (Kovsan et al., 2011; Jansen et al., 2012; Xu et al., 2018). Este tipo de perfil se asocia con un fenotipo de obesidad de alto riesgo cardiometabólico al asociarse con una obesidad central y un aumento del índice cintura/cadera. En los estudios centrados en pacientes con obesidad y T2D (Öst et al., 2010; Kosacka et al., 2015), el aumento de la autofagia en ambas poblaciones se asoció con un estado proinflamatorio en el AT. En el SAT de pacientes con obesidad y T2D, se detectó un aumento en la expresión de BECLIN1 y formación de autofagosomas respecto a una cohorte de pacientes sin patologías, situación que revirtió al año de la pérdida de peso (Nuñez et al., 2013). El grupo de Stienstra (Jansen et al., 2012) hipotetiza que la inflamación del AT podría aumentar la autofagia para mitigar y resolver la producción de citoquinas proinflamatorias. En cuanto a la autofagia selectiva de mitocondrias, se

1. TEMÁTICA

investigó el efecto de altas concentraciones de palmitato en adipocitos 3T3-L1. En este sentido, observaron una activación de la vía PINK1-PRKN a bajas concentraciones de palmitato y una inhibición a concentraciones más altas (Cui et al., 2018).

La autofagia presenta también un rol en la polarización de los macrófagos y la inflamación crónica de bajo grado característica de la obesidad. Los macrófagos aislados de médula ósea e hígado de ratones alimentados con una HFD mostraron una disminución del flujo autofágico respecto a ratones con una dieta control. El bloqueo de la elongación del autofagosoma a través de ATG5 supuso una polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M1, altamente inflamatorio, con secreción de TNF α e IL6; y a su vez, un descenso en el fenotipo antiinflamatorio M2 (Liu et al., 2015). Durante la inflamación mediada por LPS, los macrófagos de ratones con obesidad expresaron menores niveles de LC3II con una acumulación de p62 comparado con ratones con normopeso. Tras el bloqueo génico de ATG7 en este modelo murino, se aumentó la proporción de macrófagos M1 proinflamatorios, ROS, infiltración de macrófagos en el AT y deterioro la sensibilidad a la insulina (Kang et al., 2016).

En cuanto a la relación entre la autofagia, la inflamación y el estrés oxidativo, se ha evidenciado un descenso de expresión de *lamp2*, *beclin1*, LC3II y la citoquina antiinflamatoria IL10 en los PBMC de pacientes con T2D. Junto con ello, hubo un aumento de p62, TNF α e IL1 β las cuales correlacionaron negativamente con los niveles de LC3. En su conjunto este estudio concluye que existe una relación entre una autofagia defectuosa y la inflamación en T2D (Alizadeh et al., 2018). El proceso de instauración de T2D en pacientes prediabéticos podría estar mediado a través del descenso progresivo en la mitofagia y autofagia e incremento del estrés oxidativo (Bhansali et al., 2017). En su conjunto, la inducción de la autofagia en los PBMC podría ser un mecanismo de protección frente al ROS y RNS detectado en pacientes con T2D y dislipidemia (Chatterjee et al., 2019).

Teniendo en consideración las evidencias mostradas previamente, la regulación de la autofagia en la obesidad podría ocurrir en respuesta a estímulos inflamatorios o disrupciones metabólicas como mecanismo compensatorio para eliminar las cargas selectivas como mitocondrias, lípidos, agregados de proteínas y orgánulos celulares

dañados; por otra parte, la autofagia disfuncional podría contribuir a la fisiopatogénesis y conducir a la inducción de comorbilidades asociadas a la obesidad.

1.3.4. Metabolismo mitocondrial

Para mantener la homeostasis metabólica, los organismos ajustan la capacidad y la eficiencia de la generación de ATP a los cambios en la demanda de energía celular. La actividad mitocondrial puede regularse principalmente a través de la activación o inhibición de dos rutas metabólicas: biogénesis y dinámica mitocondrial (**Figura 6**).

El principal responsable de la biogénesis mitocondrial es PGC1 α , que puede ser activado a través de AMPK y SIRT1. Tras la restricción calórica y el ayuno, AMPK se activa debido al aumento de la proporción de AMP en relación con el ATP. La activación de AMPK induce un aumento simultáneo de los niveles de NAD activando las rutas catabólicas (como la autofagia al fosforilar y activar el complejo ULK1 en condiciones de ayuno) e inhibiendo los procesos que consumen energía. Por efecto contrario, el exceso calórico inhibe la actividad de la AMPK debido a los altos niveles de ATP intracelular. En el estado basal, PGC1 α está acetilado (inactivando su actividad) y en situación de estrés nutricional, SIRT1 desacetila a PGC1 α , activándolo y desencadenando biogénesis mitocondrial y adaptaciones a largo plazo ante situaciones de estrés celular. PGC1 α induce la expresión de TFAM y NRF1/2, aumentando la transcripción del mtDNA y de las proteínas de la ETC. En el equilibrio entre las tasas de acetilación y desacetilación también intervienen SIRT3 y SIRT5. En este sentido, SIRT3 regula la actividad mitocondrial al ser inducida en situación de ayuno y facilita la oxidación de los ácidos grasos y transferencia de electrones en la ETC, por lo que ofrece protección frente a la generación de mtROS (Kim et al., 2011; Gao et al., 2014; Gureev et al., 2019; Wang et al., 2021).

El segundo proceso del metabolismo mitocondrial es la dinámica mitocondrial y es necesario para el mantenimiento de la forma, distribución y tamaño de las mitocondrias. Los cambios en la arquitectura de la red mitocondrial implican un estrecho equilibrio entre las proteínas que promueven la fusión y fisión mitocondrial. En primer lugar, en la fusión de la membrana externa y la membrana interna intervienen las moléculas MFN1, MFN2 y OPA1. A su vez, la fisión mitocondrial es mediada por DRP1, FIS1, MFF y MiD49/51. En condiciones de equilibrio energético, las mitocondrias permanecen

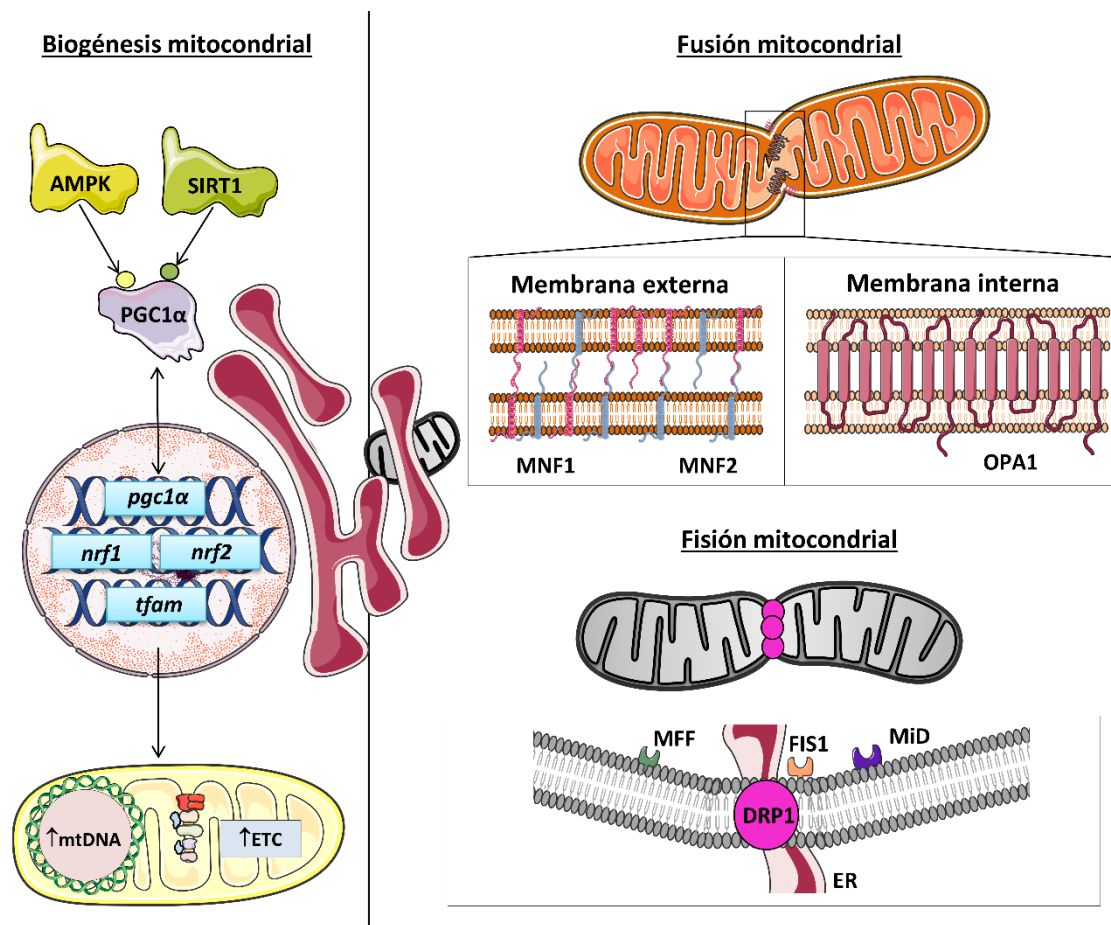
1. TEMÁTICA

distribuidas en el citosol sin formar complejos; en cambio, en condiciones de ayuno tienden a fusionarse formando mitocondrias interconectadas compartiendo estructuras mitocondriales. La fusión mitocondrial se produce en cuatro etapas diferentes: (1) la aproximación de las membranas externas de dos mitocondrias por MFN1/2, (2) actividad de la familia enzimática GTP (del inglés, guanosine triphosphate) para la fusión de las membranas mitocondriales externas, (3) el acoplamiento de dos membranas para incrementar la superficie de contacto y (4) fusión de la membrana mitocondrial interna mediada por OPA1 (Gao et al., 2014; Tilokani et al., 2018).

En cuanto a la división de las mitocondrias, este proceso se compone de diversos pasos: (1) acumulación de mtDNA en la matriz mitocondrial que sitúa el lugar de reclutamiento por parte del ER encargado de la constricción de la membrana interna mitocondrial, (2) señalización del lugar de fisión mediante el reclutamiento de proteínas como FIS1, MFF y MID, que actúan como receptores de DRP1 (3) oligomerización y acumulación de DRP1, (4) polimerización de la actina en los sitios de contacto mitocondria-ER para impulsar la constricción, (5) hidrólisis de GTP que conduce a la constricción mitocondrial preexistente y (6) DNM2 (del inglés, dynamin 2) se recluta en la porción de la constricción mediada por DRP1, donde se ensambla y completa la escisión de la membrana, dando lugar a dos mitocondrias (Gao et al., 2014; Tilokani et al., 2018).

El estado de transición entre la fusión y fisión permite a las mitocondrias reorganizarse y eliminar las mitocondrias dañadas a través de la mitofagia. En particular, cuando los mecanismos de fusión o fisión no funcionan correctamente, se favorece la disfunción mitocondrial.

Figura 6. Metabolismo mitocondrial



Esquematización de la regulación de la biogénesis y dinámica mitocondrial. La activación de la transcripción del mtDNA mediada por TFAM, NRF1/2 y PGC1α garantizan la correcta adaptación de la mitocondria ante el estrés celular. En cuanto a la regulación de la dinámica mitocondrial, la fusión mitocondrial está mediada por MFN1/2 y OPA1, las cuales se localizan en la membrana externa e interna, respectivamente. A su vez, la fisión mitocondrial se lleva a cabo mediante la actividad de DRP1, FIS1, MFF y MiD. Ambos procesos permiten crear una red mitocondrial capaz de modularse en función de las necesidades metabólicas.

Metabolismo mitocondrial, obesidad y comorbilidades asociadas

La alteración de la biogénesis mitocondrial en la obesidad se asocia a alteraciones metabólicas, IR e inflamación crónica de bajo grado. La expresión proteica y génica de *pgc1α* está reducida en los AT de individuos con obesidad (Semple et al., 2004). Por el contrario, se ha constatado que la adiponectina aumenta la expresión de PGC1α (Bournat y Brown, 2010). En su conjunto estos datos sugieren que la reducción en los niveles de PGC1α podría jugar un papel en la disfunción mitocondrial mediado a través de la biogénesis mitocondrial. De manera similar, el tratamiento con TNFα en adipocitos 3T3-L1 indujo un descenso de expresión génica de *pgc1α*, sin cambios en *tfam* o *nrf1* (Chen

1. TEMÁTICA

et al., 2010). En la obesidad, la hipoxia de los adipocitos estimula la liberación de HIF1 α que promueve la polarización de los macrófagos al fenotipo M1, que altera la biogénesis mitocondrial mediante la inhibición de PGC1 α (Wang et al., 2021) lo que podría estar contribuyendo a la inflamación crónica presente en la obesidad. Finalmente, los resultados de un estudio donde se evaluaron mediadores de la transcripción mitocondrial en PBMC de adolescentes con obesidad con y sin IR mostraron menores niveles de TFAM y mtDNA en los pacientes con IR respecto a los que no presentaron IR (Gianotti et al., 2008).

Sobre las consecuencias moleculares de la obesidad en la dinámica mitocondrial, se observa un déficit de proteína de MFN2 en el músculo esquelético de ratas Zucker y sujetos con obesidad y T2D (Zorzano et al., 2009a). De acuerdo con esto, otro estudio constató un descenso de la expresión proteica de MFN1, MFN2 y OPA1 en leucocitos de pacientes con T2D respecto a sujetos control, donde el grupo con peor control glucémico presentó menores niveles de estas proteínas (Diaz-Morales et al., 2016). Estos resultados sugieren una asociación entre la fusión mitocondrial y el control glucémico y apunta a un papel de la MFN2 en la estimulación de la respiración mitocondrial, la oxidación de sustratos y las proteínas de la ETC (Zorzano et al., 2009b). Por otra parte, estudios de la fisión mitocondrial apuntan a un aumento de DRP1 en macrófagos tras la presencia de palmitato (Zezina et al., 2018). Este mismo estudio sugiere que la fisión mitocondrial podría estar relacionada con un posible efecto amortiguador de la respuesta inflamatoria asociada a la sobrecarga por lípidos.

1.3.5. Estrés de retículo endoplasmático y apoptosis celular

El ER es el orgánulo celular encargado de la síntesis y plegamiento de las proteínas. Para realizar su función requiere de ATP, Ca²⁺ y un estado prooxidante que favorezca la formación de los puentes disulfuro para la maduración de determinadas proteínas. En situaciones de estrés oxidativo, se dificulta la posibilidad de plegamientos efectivos de proteínas, lo que da lugar a proteínas disfuncionales y provoca una situación de estrés de ER. Ante este efecto, la célula es capaz de responder a las proteínas mal plegadas mediante la activación de tres proteínas transmembrana: PERK, ATF6 e IRE1 α . Ante el correcto funcionamiento del ER, estas rutas moleculares permanecen inactivadas mediante su asociación con la proteína chaperona GRP78; en cambio, la detección de proteínas mal plegadas desencadena la disociación de GRP78 y se activa la UPR cuyo

objetivo es el restablecimiento de la homeostasis celular. Si este estrés se cronifica y la UPR no es capaz de resolverlo, se activan rutas celulares apoptóticas. Desglosando la primera cascada de señalización celular, la disociación de GRP78 activa PERK y fosforila eIF2 α activándola e inhibiendo la traducción proteica. Aun así, la fosforilación de eIF2 α permite la traducción de algunos genes como ATF4 (del inglés, activating transcription factor 4), un factor de transcripción que induce genes implicados en el metabolismo de los aminoácidos. También promueve la activación del factor de transcripción de CHOP la cual promueve la apoptosis celular. La segunda ruta es ATF6, que para ser activada necesita translocarse al aparato de Golgi. Posteriormente se transloca al núcleo e induce genes de respuesta al estrés de ER, como chaperonas, XBP1 y CHOP (Szegezdi et al., 2006). Un estudio reciente (Yang et al., 2020) ha descrito el papel de ATF6 en las dinámicas de CHOP respecto a las otras rutas de ER mediante modelos de predicción, concluyendo que la ruta ATF6 influye en la inducción temprana del factor proapoptótico CHOP en líneas celulares. Por último, IRE1 α induce, mediante su actividad endonucleasa, el procesamiento del gen XBP1 en su forma activa sXBP1 mediante la eliminación de un intrón. sXBP1 actúa como un factor de transcripción que induce la expresión de chaperonas y genes involucrados en la degradación de proteínas (**Figura 7**). IRE1 α también está involucrado en la activación de cascadas de señalización de quinasas, como JNK, que intervienen en la inducción de cascadas de inflamación y apoptóticas como BAX (del inglés, Bcl-2-associated X protein) (Szegezdi et al., 2006).

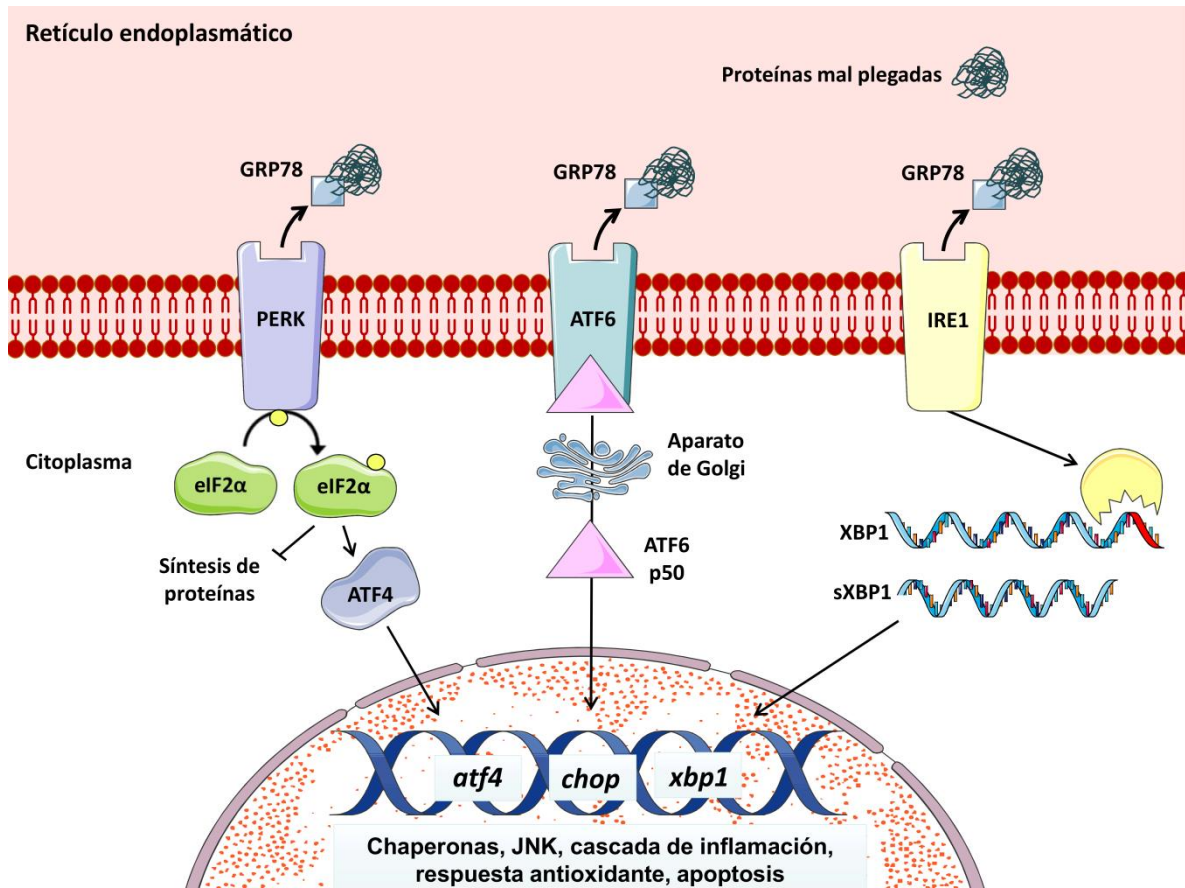
Como se ha mencionado previamente, la apoptosis celular es un evento estrechamente relacionado con el ER. En el contexto del estrés de ER, la principal proteína proapoptótica es CHOP, la cual se induce transcripcionalmente por las tres vías de UPR. La señalización de CHOP y otras proteínas apoptóticas derivan en la activación de las caspasas, unas proteínas con alta capacidad proteolítica, por rutas dependientes e independientes de la mitocondria. En humanos, la familia de las caspasas está compuesta por 11 proteínas y se dividen en proapoptóticas y proinflamatorias. Actúan al interactuar con receptores apoptóticos y son capaces de agruparse formando una estructura conocida como apoptosoma (Szegezdi et al., 2006; Li y Yuan, 2008).

Ante un aumento de carga de plegamiento de proteínas se puede descompensar el equilibrio entre la producción de ROS y la respuesta antioxidante del ER, conduciendo a una situación de estrés de ER que se caracteriza por la liberación de Ca²⁺ que, por una

1. TEMÁTICA

parte, induce la despolarización de la membrana mitocondrial interna y, por otra, aumenta los mtROS al provocar un descenso de ATP. El estrés de ER y el estrés oxidativo se potencian y retroalimentan mutuamente, alterando la homeostasis celular y activando señalizaciones proapoptóticas (Malhotra y Kaufman, 2007; Cao y Kaufman, 2014). El inflamasoma NLRP3 también está implicado en la respuesta inflamatoria inducida por el estrés de ER. De acuerdo con esta premisa, un estudio demostró una relación entre la activación de IRE1 α y el aumento de los niveles de mtROS en los macrófagos de modelos murinos, situación que induce la activación del inflamasoma NLRP3 (Bronner et al., 2015). Además, el aumento de Ca²⁺ liberado al citosol y presencia de CHOP durante el estrés de ER es una señal de activación del inflamasoma NLRP3. La respuesta a proteínas mal plegadas atenúa la traducción de proteínas, lo que lleva a la disociación del complejo NF- κ B y I κ B α (del inglés, inhibitor of nuclear factor kappa B) y a la translocación nuclear de NF- κ B y posterior expresión de genes inflamatorios (Li et al., 2020). Del mismo modo, en cuanto a la relación entre el estrés de ER y autofagia, se especula que cuando la cantidad de proteínas mal plegadas supera la capacidad del sistema de degradación mediado por el proteasoma, se activaría la autofagia para eliminar estas proteínas. PERK, IRE1 y el aumento de la concentración de Ca²⁺ citosólico están implicados como mediadores de la autofagia inducida por el estrés de ER en las células de mamíferos, donde el Ca²⁺ está relacionado con las rutas de la CAMKK β (del inglés, calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase β), AMPK y mTOR (Høyer-Hansen y Jäättelä, 2007).

Figura 7. Estrés de retículo endoplasmático



Activación de la respuesta UPR en el retículo endoplasmático. El aumento de proteínas defectuosas induce la disociación de GRP78 que activa tres rutas de rescate: IRE1 α , PERK y ATF6. Su regulación modula la expresión de factores de transcripción hacia la expresión de genes antioxidantes y otras proteínas que contribuyen al plegamiento proteico. Por contraposición, una respuesta exacerbada de la UPR induce inflamación — al activar JNK — y apoptosis celular — mediada por CHOP —.

Estrés de retículo endoplasmático, apoptosis, obesidad y comorbilidades asociadas

El estrés de ER está causado, entre otros, por condiciones patológicas que favorezcan la acumulación de colesterol y fosfolípidos, debido al poco contenido en colesterol y FFA de la membrana del ER. Una alteración en su composición, causada por la obesidad, origina la salida del Ca²⁺ del ER que favorece el mal plegamiento de las proteínas. Se sabe que el estrés de ER en el hipotálamo, hígado, AT y músculo tiene implicación directa en la fisiopatología de la obesidad. El estrés de ER hipotalámico se asocia con la resistencia a la leptina e IR a través de la activación de TLR4, JNK, NF- κ B, TNF α y elevada fosforilación de PERK. Respecto al efecto del estrés de ER en el hígado, la esteatosis hepática en ratones con obesidad provoca el descenso de eIF2 α fosforilado, la activación de JNK y la alteración en la señalización de la insulina. Asimismo, se induce

1. TEMÁTICA

gluconeogénesis y lipogénesis a través de la activación de JNK (por IRE1 α o PRK [del inglés, protein kinase]) lo que conlleva a la hiperglucemia e hiperlipidemia (Cnop et al., 2012; Tripathi y Pandey, 2012).

El estrés de ER en el AT puede deberse a la sobrecarga de nutrientes ocasionada durante la obesidad, junto con un aumento de la síntesis proteica, IR y disminución de la vascularización. Se conoce que la UPR es una respuesta adaptativa, pero esta situación mantenida en el tiempo o una respuesta exacerbada induce inflamación. Esto puede ser debido en parte a alteraciones en el ensamblaje y la secreción de adipocinas, al disminuir significativamente la expresión del mRNA de adiponectina y aumentar la resistencia a la leptina (Tripathi y Pandey, 2012). En cuanto a su activación, se ha observado un aumento de ATF6, eIF2 α , IRE1 α , JNK y XBP1 en el SAT de pacientes con obesidad respecto a individuos con normopeso (Boden et al., 2008; Sharma et al., 2008). En cambio, en el VAT se detectan mayores niveles de XBP1 respecto al SAT dentro del grupo de pacientes con obesidad severa (Vendrell et al., 2010). Tras inducir estrés de ER en adipocitos 3T3-L1, se observó una menor expresión de receptores de insulina, adiponectina y mayor secreción de IL6 por lo que favorece la IR en los adipocitos (Xu et al., 2010). La señalización de la insulina es muy sensible a las alteraciones de la homeostasis del ER y el estrés oxidativo. Además de la ya mencionada activación de JNK, la glucotoxicidad derivada de la IR induce la UPR a favor de la apoptosis — al inducir CHOP, IRE1 α y JNK — así como estrés oxidativo en células β pancreáticas (Cao y Kaufman, 2014). Por consiguiente, el estrés de ER en los pacientes con obesidad podría afectar a la regulación metabólica y contribuir a las comorbilidades asociadas a la obesidad.

1.4. Abordaje terapéutico de la obesidad

Después de exponer en detalle los mecanismos fisiopatológicos asociados a la obesidad y sus comorbilidades, nos planteamos qué es lo que podemos hacer con el objetivo de reducir la prevalente morbimortalidad mundial de esta enfermedad.

1.4.1. Intervenciones en el estilo de vida

Las intervenciones del estilo de vida engloban programas multifactoriales y selectivos en función del riesgo y necesidades del paciente, incluyendo modificaciones en la dieta y ejercicio físico en los pacientes con obesidad. Este tratamiento debe de estar dividido en

dos partes: una fase de pérdida de peso y una fase de mantenimiento. Tras la realización de modificaciones en el estilo de vida de pacientes con obesidad a medio y largo plazo, se ha observado una reducción del peso corporal y mejora de la dislipidemia, presión arterial, inflamación y estado proaterogénico (Galani y Schneider, 2007; McCafferty et al., 2020).

Atendiendo a cada intervención, en primer lugar, nos referiremos a las modificaciones en la dieta. Se recomienda una pérdida de peso del 5% al 10% en individuos con obesidad o sobrepeso con comorbilidades, ya que se ha demostrado que hay una mejoría significativa en las comorbilidades relacionadas con la obesidad y reducción de la mortalidad. La pérdida de peso se realiza mediante la reducción de la ingesta calórica total, sin modificar las proporciones de carbohidratos, grasas y proteínas en la dieta. Se recomienda una restricción de 500 kcal diarias o una dieta de 1200 kcal para mujeres y 1500 kcal para los hombres, aunque una mejora de la calidad nutricional de los alimentos sin restricción calórica, por ejemplo mediante la dieta mediterránea, también es útil para la pérdida de peso (Wing et al., 2011; Kushner, 2014; Fruh, 2017; González-Muniesa et al., 2017). En cambio, se hace especial hincapié en la obtención de objetivos dietéticos realistas debido al problema de la adherencia al poner altas expectativas (como pérdidas del 20–30% de peso corporal). Otro método mucho más drástico para lograr la pérdida de peso consiste en las VLCD, cuyo aporte calórico se restringe entre 600 kcal y 800 kcal durante varias semanas. En una pequeña cohorte de pacientes con obesidad y T2D se observó que las VLCD fueron eficaces y seguras para restaurar la glucemia a corto plazo (2 semanas) y una remisión de T2D en el 79% de los pacientes a las 12 semanas. En cambio, al año de la intervención, la remisión de T2D se alcanzó en un 30% (Umphonsathien et al., 2019). La reducción calórica es el componente más importante para lograr la pérdida de peso, mientras que el aumento y la continuidad del ejercicio físico son indispensables para mantener el peso perdido (Kushner, 2014).

Otras recomendaciones para la pérdida de peso son el ejercicio físico e intervenciones conductuales. La Sociedad Americana del Corazón (McCafferty et al., 2020) recomienda la actividad física de alto nivel 200-300 minutos por semana para perder peso, mientras que actividad física moderada durante 150 minutos por semana para evitar la ganancia de peso. Recomiendan la complementación con modificaciones dietéticas, puesto que sólo con el ejercicio aeróbico se consigue una pérdida de peso de 3%-5% en pacientes con

1. TEMÁTICA

obesidad. Esta estrategia es beneficiosa para la salud independientemente de la pérdida de peso, puesto que se estipula que niveles moderados de actividad física reducen el riesgo de desarrollar T2D y CVD. El tipo de actividad física (ejercicio aeróbico - resistencia o actividad de alta intensidad - baja intensidad) no parece intervenir en la pérdida de peso global (González-Muniesa et al., 2017). Se ha observado en un estudio prospectivo con 20 años de seguimiento (Hankinson et al., 2010) que el mantenimiento de actividad física mitiga significativamente el aumento de peso, particularmente en mujeres con obesidad. De hecho, las personas activas ganaron menos peso durante el periodo de seguimiento en comparación con las que eran sistemáticamente inactivas.

1.4.2. Tratamiento farmacológico

Una alternativa para el abordaje terapéutico de la obesidad es a través del tratamiento farmacológico. La organización internacional *Endocrine Society* ha estipulado las siguientes directrices para la inclusión de recibir tratamiento: la complementación de farmacoterapia con la dieta, ejercicio y cambios de comportamiento en pacientes con BMI ≥ 30 kg/m² o > 27 kg/m² con al menos una comorbilidad que no pudieran perder y mantener el peso. Si el paciente ha perdido el 5% de su peso inicial en los 3 meses de tratamiento, se procederá a la continuación del tratamiento farmacológico (Yarborough et al., 2018). La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) añade el requerimiento de una reducción de $\geq 10\%$ del peso corporal basal a 1 año, que debe ser al menos un 5% superior a la alcanzada con placebo, para la prescripción del tratamiento farmacológico (EMA, 2016).

La obesidad está altamente regulada por hormonas y neuropéptidos (centrales y periféricos) que actúan sobre el hipotálamo, áreas relacionadas con la memoria y emoción, corteza cerebral y el sistema de recompensa. Actualmente están surgiendo nuevas terapias basadas en disminución del apetito e ingesta, aumento del gasto energético o disminución de la absorción de lípidos. Algunos ejemplos de medicamentos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) son la liraglutida (estimula secreción de insulina y controla el apetito), lorcaserina (disminuye la ingesta y actividad del sistema límbico), fentermina/topiramato (suprime el apetito), naltrexona/bupropión (disminuye la ingesta) y el orlistat (disminuye la cantidad de ácidos grasos absorbidos). Otros medicamentos aprobados para el tratamiento de la T2D que

también originan la pérdida de peso son la metformina y los inhibidores de SGLT2 (del inglés, sodium-glucose co-transporter 2) (Pilitsi et al., 2019).

Además del efecto en la homeostasis de la glucosa, la evidencia científica postula la posible acción de la metformina en el contexto de estrés oxidativo y metabolismo celular. Por una parte, la metformina inhibe el complejo I de la ETC reversiblemente, lo que supone una disminución de la oxidación del sustrato NADH y menor bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna (Foretz et al., 2019). Como resultado, se ha observado una reducción en la producción de ROS y mtROS en PBMC (Hartwig et al., 2021; de Marañón et al., 2022). Por otra parte, la metformina fue capaz de aumentar las defensas antioxidantes y presentar un efecto antiinflamatorio a través del descenso de IL1 y TNF α en PBMC de pacientes sanos estimulados *in vitro* con LPS (Bułdak et al., 2014) y a nivel sistémico en adolescentes con obesidad e IR (Evia-Viscarra et al., 2012) o en pacientes con T2D (de Marañón et al., 2022). En células endoteliales, la metformina inhibió la activación de NF- κ B y CAM inducida por TNF α (Hattori et al., 2006). A nivel mecanístico, se postula que este efecto antiinflamatorio se podría atribuir a la disminución de la actividad de NF- κ B dependiente de la AMPK (Hattori et al., 2006; Foretz et al., 2019). De hecho, se ha demostrado que la metformina induce la activación de AMPK a través de mecanismos que involucran a las mitocondrias y lisosomas (Rena et al., 2017). El uso de los fármacos en la obesidad es a largo plazo y depende de la adherencia al tratamiento del paciente y la heterogeneidad de la enfermedad. Mientras que algunos pacientes pierden peso, otros pueden incrementar su peso y fracasar en el tratamiento. Otro factor a tener en cuenta en la efectividad de los tratamientos es la respuesta individual, donde la elección de la terapia más adecuada para cada paciente es un punto decisivo. Reconocer y dirigir los fenotipos de obesidad en una fase temprana de tratamiento puede condicionar favorablemente la resolución de la enfermedad. Es por ello que la investigación actual se centra en la detección de marcadores predictivos para una respuesta clínica favorable del paciente con obesidad (Bessesen y Van Gaal, 2018; Srivastava y Apovian, 2018).

Con estas premisas, el procedimiento más aceptado para abordar la obesidad es la cirugía bariátrica, donde se induce una mayor pérdida de peso y resultados más estables, además de una mejoría de los parámetros cardiometabólicos (Pilitsi et al., 2019) en comparación con la farmacoterapia.

1. TEMÁTICA

1.4.3. Cirugía metabólica: Bypass gástrico en Y de Roux

La cirugía bariátrica es el conjunto de procedimientos quirúrgicos utilizados para resolver la obesidad como alternativa al tratamiento no quirúrgico. Las guías de recomendación actuales sitúan a los pacientes con $BMI \geq 40 \text{ kg/m}^2$ o $\geq 35\text{-}40 \text{ kg/m}^2$ con comorbilidades asociadas como seleccionables para la cirugía bariátrica (Di Lorenzo et al., 2020). La cirugía bariátrica es el tratamiento más eficaz de la obesidad mórbida ya que no solo consigue la pérdida de peso mantenida en el tiempo, sino que es capaz de revertir las comorbilidades asociadas, por lo que también se le conoce como cirugía metabólica (Li et al., 2016). El estudio *Swedish Obese Subjects* (SOS) muestra que, tras un seguimiento de 20 años, los pacientes que se sometieron a cirugía bariátrica redujeron su peso un 18%, en comparación con un 1% de pérdida a través de tratamiento médico. Estudios observacionales retrospectivos no controlados y ensayos clínicos aleatorios demostraron la superioridad de la cirugía bariátrica en cuanto a la pérdida de peso y comorbilidades comparándolas con intervenciones de estilo de vida (Pucci y Batterham, 2019). Las técnicas de cirugía bariátrica llevadas a cabo mundialmente son la gastrectomía en manga, el RYGB y la banda gástrica ajustable por laparoscopia (Angrisani et al., 2017).

El RYGB representa el procedimiento “gold standard” de las cirugías bariátricas debido a su eficacia y remisión de factores de riesgo cardiovascular (Li et al., 2016). En cuanto al componente del género, un estudio que analiza la prevalencia entre 2002-2011 en Estados Unidos concluye que el 80,7% de los participantes a inclusión fueron mujeres (Young et al., 2016), independientemente de la tasa de obesidad entre los sexos (Aly et al., 2020). A nivel internacional, según el informe de La Federación Internacional para la Cirugía de la Obesidad y los Trastornos Metabólicos (IFSO) se concluye que la proporción de mujeres sometidas a esta técnica quirúrgica fue un 77,1% (IFSO, 2019) durante 2018-2019. El RYGB consiste en la división del estómago generando una bolsa gástrica (de aproximadamente 20-30 ml de capacidad) que se anastomosa con el yeyuno medio, creando el brazo alimentario. La rama biliopancreática también se anastomosa al yeyuno, permitiendo el drenaje de los ácidos biliares y secreciones pancreáticas al yeyuno, que se mezcla con los nutrientes ingeridos. La gastrectomía en manga fue la primera opción en pacientes con $BMI > 50 \text{ kg/m}^2$ y se consideraba un procedimiento puramente restrictivo, aunque también ofrece una pérdida de peso significativa y beneficios metabólicos. La gastrectomía crea un nuevo estómago a partir de la escisión del fondo y el cuerpo gástrico, donde el contenido gástrico pasa directamente al duodeno. En comparación con técnicas no quirúrgicas, el RYGB y la gastrectomía en manga conducen a un aumento de las

hormonas de la saciedad y una mayor secreción de ácidos biliares (Pucci y Batterham, 2019).

Ante la cuestión sobre qué procedimiento de cirugía bariátrica es más eficaz, un metaanálisis apunta a una mayor eficacia del RYGB frente a la gastrectomía en términos de pérdida de peso y resolución de comorbilidades, especialmente la T2D, donde los pacientes que se sometieron a RYGB presentaron una mayor tasa de remisión al año del procedimiento (pero no a partir del segundo año, donde observaron resultados similares entre las dos técnicas quirúrgicas) (Borgeraas et al., 2020). Otros estudios clínicos no detectaron diferencias significativas en pérdida de peso absolutas a los 5 años de la intervención o sólo evidenciaron una mayor pérdida de peso visceral en pacientes RYGB (Pucci y Batterham, 2019). Sin embargo, parece ser más eficaz en la resolución de hipertensión y dislipidemia (Li et al., 2016). En este contexto bibliográfico, sería interesante elucidar los mecanismos moleculares que subyacen a las mejorías en las comorbilidades asociadas a la obesidad.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La obesidad es una enfermedad multifactorial la cual implica una serie de alteraciones metabólicas como la inflamación crónica de bajo grado, el estrés oxidativo y la disfunción endotelial que contribuyen a la instauración de comorbilidades como IR, la alteración en el perfil lipídico y la hipertensión arterial. Se sabe que el AT y el sistema inmunitario juegan un papel fundamental en la fisiopatología de esta enfermedad ya que contribuyen al desarrollo de las comorbilidades asociadas. Concretamente, la hipertrofia del AT induce la excesiva liberación de citoquinas proinflamatorias que perpetúan una inflamación crónica de bajo grado. En paralelo, la sobrecarga de nutrientes induce una alteración en la homeostasis mitocondrial y, como consecuencia, un aumento de fuga de electrones y formación de ROS. Estas alteraciones convergen en una sobreactivación de las células del sistema inmune y alteración de la permeabilidad del endotelio vascular, resultando en un aumento de las interacciones de los leucocitos con el endotelio lo cual contribuye al inicio del proceso aterosclerótico y posterior desarrollo de complicaciones vasculares. A nivel intracelular, existen evidencias que reflejan la implicación de diferentes rutas moleculares como la activación de la autofagia, el estrés de ER y alteraciones de la dinámica mitocondrial en la fisiopatología de la obesidad.

Actualmente, existen diversos tratamientos farmacológicos y quirúrgicos que podrían ayudar a mejorar el estado metabólico de los pacientes con obesidad y comorbilidades asociadas, aunque los mecanismos por los cuales media esta mejoría son todavía poco conocidos. De hecho, la investigación de los mecanismos moleculares implicados en la pérdida de peso podría ser relevante para aumentar el conocimiento de la fisiopatología y centrar los esfuerzos en el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas para combatir la enfermedad. En concreto, el uso de metformina en pacientes con enfermedad metabólica sugiere una mejora en la respuesta inflamatoria y estrés oxidativo. En cambio, se desconocen los mecanismos subyacentes implicados en la respuesta en la obesidad.

Bajo estas premisas nos planteamos la hipótesis de que la pérdida de peso inducida a través de RYGB y el tratamiento farmacológico hipoglucemiante pueden modular varias vías metabólicas en los leucocitos — componentes primordiales del sistema inmunitario — y en el AT — principal tejido afectado en la obesidad —, respectivamente.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Por lo tanto, el objetivo de la presente tesis doctoral es determinar el efecto de la cirugía RYGB en la modulación de la inflamación crónica de bajo grado, estrés oxidativo y disfunción endotelial, profundizando en la implicación del complejo del inflamasoma, la autofagia, la dinámica mitocondrial y el estrés de ER. Además, dado el efecto beneficioso de la metformina sobre la producción de ROS y el metabolismo celular, nos planteamos si este fármaco puede mejorar el estado metabólico del AT a través de la modulación de las vías inflamatorias y de autofagia.

Para ello nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Explorar el efecto de la pérdida de peso inducida por la cirugía de RYGB sobre la activación y el estado oxidativo de los leucocitos de sangre periférica y la disfunción endotelial.
2. Examinar si la pérdida de peso inducida por la cirugía de RYGB modula la actividad de la AMPK, el estrés de ER, la autofagia y la mitofagia en leucocitos de sangre periférica.
3. Evaluar si la pérdida de peso inducida por la cirugía de RYGB en mujeres modula la dinámica mitocondrial en leucocitos de sangre periférica.
4. Determinar si los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos inmunomoduladores de la metformina implican la activación del complejo del inflamasoma NLRP3 y/o la modulación de la autofagia en el VAT de pacientes con obesidad.

3. METODOLOGÍA

3. METODOLOGÍA

3.1. Reclutamiento de la población a estudio

Para la realización de la presente Tesis Doctoral, se reclutaron pacientes con obesidad incluidos en protocolo de cirugía RYGB. Esta población ha sido reclutada entre 2014 y 2019 por el Servicio de Endocrinología y Nutrición, y sometida a RYGB por el Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitario Dr. Peset (Valencia, España). Toda la población de estudio fue informada sobre el objetivo y la metodología, firmando el consentimiento informado por escrito. Todos los datos obtenidos fueron tratados como anónimos, se asignó un número y se gestionaron en función de la ley orgánica de protección de datos (LOPD). El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética Humana del Hospital (código 96/16), en línea con las directrices de la Declaración de Helsinki. Una subcohorte de pacientes evaluados pertenecen a un estudio clínico registrado en <https://clinicaltrials.gov> con el número de estudio NCT05071391 y título: “Autofagia e inflamasona en la obesidad: efecto de la pérdida de peso y posibles implicaciones terapéuticas”.

Los criterios de inclusión estipulados en los artículos fueron pacientes con una edad entre 18 y 65 años, con un BMI ≥ 35 kg/m² seleccionados para someterse a una cirugía RYGB. El embarazo o lactancia, enfermedades severas renales o hepáticas, abuso de drogas crónico, desórdenes psiquiátricos, tumores malignos, historial de CVD, de enfermedad inflamatoria crónica u obesidad secundaria (hipotiroidismo, síndrome de Cushing) fueron considerados criterios de exclusión. Dependiendo del diseño del estudio a realizar (transversal) las variables a analizar se obtuvieron en el momento de la intervención (para el VAT), en una visita previa a la intervención quirúrgica (condición basal) o en una visita a los 12 meses post intervención quirúrgica.

3.2. Recogida de muestras y pruebas de laboratorio

La cohorte de estudio acudió al Servicio de Enfermería de Endocrinología y Nutrición para la extracción de 30 ml de sangre periférica, obtenidos de la vena braquial en condiciones de ayuno (8:00-9:30 horas). Los tubos de recolección de sangre se destinaron al Servicio de Laboratorio de Análisis Clínicos y al Laboratorio de Investigación del Hospital Universitario Dr. Peset para realizar las determinaciones bioquímicas y moleculares, respectivamente.

Antes de obtener la muestra sanguínea, el Servicio de Enfermería evaluó y registró las mediciones referentes al peso, altura, SBD, DBP, circunferencia de cintura y de cadera del paciente. Todas estas variables se obtuvieron durante la exploración física mediante balanzas electrónicas, estadiómetro, esfigmomanómetro automático y cinta métrica, respectivamente. Posteriormente, el BMI se calculó dividiendo el peso por el cuadrado de la altura (kg/m^2), el porcentaje de exceso de pérdida de peso se calculó con la fórmula ($[\text{peso preoperatorio} - \text{peso actual}] / [\text{peso preoperatorio} - \text{peso ideal de BMI} = 25 \text{ kg}/\text{m}^2]$) $\times 100$ y, por último, el índice cintura/cadera al dividir el valor registrado de la cintura dividido entre el valor de la cadera.

La metodología empleada por el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital fue la siguiente: niveles séricos de glucosa, colesterol total, TG y HDLc se determinaron mediante ensayos enzimáticos por el analizador Beckman LX20 (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, EEUU); el LDLc mediante la fórmula de Friedewald (si los niveles de TG eran $< 300 \text{ mg}/\text{dl}$). El porcentaje de HbA1c se obtuvo con un analizador de glicohemoglobina (Arkay Inc., Kyoto, Japón). La insulina se determinó mediante un ensayo de inmunoquimioluminiscencia (Abbott, Chicago, IL, EEUU) y se calculó el HOMA-IR con la fórmula ($[\text{insulina en ayunas} (\mu\text{UI}/\text{ml}) \times \text{glucosa en ayunas} (\text{mg}/\text{dl})] / 405$). Los niveles sistémicos CRP y C3c se analizaron mediante un ensayo inmunonefelométrico (Behring Nephelometer II, Dade Behring, Inc., Newark, DE, EEUU) con un coeficiente de variación intraensayo $< 5,5\%$. Para finalizar, los leucocitos totales se cuantificaron mediante el analizador COULTER® LH 500 (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, EEUU).

El suero y el plasma fueron obtenidos de los tubos de recolección sin anticoagulante o recubiertos de EDTA, respectivamente. Se aislaron mediante una centrifugación durante 10 minutos a $1500g$ y 4°C . Las alícuotas de suero y plasma restantes se almacenaron inmediatamente a -80°C para los análisis de inmunoensayos o las subfracciones de LDL y HDL.

3.3. Inmunoensayos

En cuanto a la determinación de las variables que se obtienen a través de análisis inmunoquímicos, en primer lugar se realizó la técnica de ensayo ELISA para la cuantificación de SOD y carbonilación de proteínas. La actividad de la SOD sérica se

3. METODOLOGÍA

evaluó con un kit comercial (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EEUU) y la concentración de grupos carbonilo se determinó con el kit OxiSelect™ Protein Carbonyl (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, EEUU) siguiendo las recomendaciones y el protocolo del fabricante.

Por otra parte, mediante el sistema analizador Luminex® 200 (Luminex Corporation, Austin, TX, EEUU), se cuantificó los niveles séricos de las moléculas proinflamatorias IL6, IL1 β , IL18, TNF α , ICAM1, P-selectina y MPO. En todos los casos, se siguieron los procedimientos del fabricante del kit Milliplex® (Millipore Corporation, Billerica, MA, EEUU). Los analitos se determinaron por duplicado con coeficientes de variación intraserie e interserie de < 5,0% y < 15,0%, respectivamente.

3.4. Análisis de las subfracciones de LDLc y HDLc

Las subfracciones de LDLc y HDLc se identificaron y cuantificaron utilizando el sistema computarizado de Quantimetrix Lipoprint® (Quantimetrix Corporation, Redondo Beach, CA, EEUU) junto con el programa NIH versión 1.62 (NIH, Bethesda, MD, EEUU). Como control de calidad se utilizó el kit Liposure® (Quantimetrix Corporation, Redondo Beach, CA, EEUU). A través de una electroforesis en gel de poliacrilamida, este ensayo *in vitro* separa las distintas subfracciones de lipoproteínas en función de su tamaño. Para las LDL, el perfil electroforético se clasifica según el tamaño de la partícula como patrón A (diámetro de corte ≥ 268 Å) caracterizado por las partículas de LDL grandes; patrón intermedio (diámetro de corte > 265 y ≤ 268 Å); y patrón B (diámetro de corte ≤ 265 Å), con predominio de partículas de LDL pequeñas y densas. En cuanto al análisis cualitativo de las HDL, el sistema diferencia 10 subfracciones: 1-3 representaban partículas HDL grandes, 4-7 indicaban partículas HDL medianas y 8-10 representaban partículas HDL pequeñas.

3.5. Aislamiento de leucocitos y tejido adiposo visceral

El siguiente paso fue aislar las poblaciones leucocitarias de PBMC y PMN. Para ello, la sangre total extraída y recogida en tubos con citrato (BD Vacutainer®) se mezcló e incubó con dextrano al 3% durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el sobrenadante resultante se colocó sobre Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y se centrifugó a 650g durante 25 minutos a temperatura ambiente. Tras la

centrifugación, se visualizó un halo que contenía las PBMC que se recogió y se centrifugó durante 10 minutos a 650g y un sedimento o pellet de PMN el cual se incubó con un tampón de lisis eritrocitaria específico (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EEUU) durante 5 min. El siguiente paso fue el lavado de las PBMC y PMN en HBSS (Capricorn, Ebsdorfergrund, Alemania). Por último, se procedió a cuantificar las PBMC y los PMN con un contador de células Scepter 2.0 (Millipore Corporation, Burlington, MA, EEUU) para realizar las alícuotas con la concentración determinada para los posteriores análisis.

En cuanto al aislamiento del VAT, durante la cirugía RYGB se extrajeron biopsias de aproximadamente 1,5-2,0 gr de tejido de la región del epiplón (abdominal), que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

3.6. Extracción de proteína y electrotransferencia

En primer lugar, la proteína se extrajo de las PBMC previamente almacenadas a -80°C resuspendiendo el pellet en un tampón de lisis celular y en hielo durante 15 minutos. Este tampón de lisis estaba compuesto por 20 mM HEPES pH 7,5, 400 mM NaCl, 20% glicerol, 0,1 mM EDTA, 10 µM Na₂MoO₄, 0,5% NP-40 y 1 mM ditiotreititol en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (10 mM NaF, 1 mM NaVO₃, 10 mM PNP, 10 mM β-glicerolfosfato) o por el tampón de lisis comercial RIPA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

En cuanto a la extracción de proteínas del VAT, se pesó y lavó aproximadamente 150 mg con PBS (del inglés, phosphate buffered saline) para posteriormente retirar con pinzas el posible tejido cauterizado. Tras este paso, se homogenizó con la Ultra-Turrax® y el tampón de lisis del kit Ne-Per® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). Siguiendo el protocolo del fabricante, las muestras se centrifugaron dos veces a 15000g durante 20 minutos a 4°C para poder purificar la proteína y eliminar los lípidos. A continuación, tanto para las PBMC como para el VAT, se recogió el sobrenadante y se cuantificó la proteína total mediante el método BCA (del inglés, bicinchoninic acid) siguiendo las indicaciones del fabricante (Pierce ® BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

3. METODOLOGÍA

Un total de 25 µg de proteína previamente desnaturalizada se resolvió en geles de SDS-poliacrilamida de gradiente 8-16% o 4-20% según el tamaño de la proteína de interés (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) junto con un marcador de peso molecular “Precision plus protein Kaleidoscope Standard” (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU). Tras la electroforesis, las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. El tiempo de transferencia establecido varió en función de la composición del gel (60 a 70 minutos) a 400A. Con el colorante rojo ponceau (Abcam, Cambridge, UK) se confirmó que el proceso de transferencia se había realizado correctamente. Dependiendo de la proteína de interés, se realizaron diversos cortes longitudinales a la membrana y se bloquearon con leche desnatada al 5% en TBS-T (del inglés, tris-buffered saline with tween) 1X o BSA (del inglés, bovine serum albumin) al 5%, durante una hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubaron los anticuerpos primarios específicos diluidos en el tampón de bloqueo correspondiente a 4°C durante toda la noche. Los anticuerpos primarios utilizados en la presente Tesis Doctoral están especificados en la Tabla 1.

Al día siguiente, se añadieron los anticuerpos secundarios específicos tras 3 lavados en agitación suave con TBS-T 1X y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, tras otros 3 lavados con TBS-T 1X, la señal de quimioluminiscencia se detectó añadiendo el reactivo ECL Plus (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), SuperSignal™ West Pico plus o SuperSignal™ West Femto (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) a las membranas. La visualización se llevó a cabo con un sistema de adquisición Fusion FX5 y la cuantificación de la expresión de proteínas se realizó mediante un análisis densitométrico con el software Bio1D v15.03a (Vilber Lourmat, Marne-La Vallée, Francia).

Tabla 1. Anticuerpos primarios, diluciones y especificaciones empleadas

Anticuerpos primarios			
Objetivo	Dilución	Fuente	Proveedor
Actin	1/2000	Rabbit	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EEUU
	1/2000	Mouse	Cell Signaling Tech, Danvers, MA, EEUU
AMPK	1/1000	Mouse	Abcam, Cambridge, Reino Unido

pAMPK	1/1000	Rabbit	Abcam, Cambridge, Reino Unido
ASC	1/1000	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EEUU
ATF6	1/1000	Mouse	Abcam, Cambridge, Reino Unido
ATG5	1/1000	Rabbit	Cell Signaling Tech, Danvers, MA, EEUU
BECLIN1	1/1000	Rabbit	Abcam, Cambridge, Reino Unido
CHOP	1/1000	Mouse	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU
pDRP1	1/1000	Rabbit	Cell Signaling Tech, Danvers, MA, EEUU
FIS1	1/500	Rabbit	Merck-Millipore, Burlington, MA, EEUU
GPX1	1/1000	Rabbit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU
LC3	1/1000	Rabbit	Cell Signaling Tech, Danvers, MA, EEUU
MCP1	1/1000	Rabbit	Abcam, Cambridge, Reino Unido
MFN1	1/1000	Rabbit	Merck-Millipore, Burlington, MA, EEUU
MFN2	1/1000	Rabbit	Merck-Millipore, Burlington, MA, EEUU
MIEAP	1/1000	Rabbit	Abcam, Cambridge, Reino Unido
TFAM	1/500	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EEUU
NBR1	1/1000	Rabbit	Proteintech, Rosemont, IL, EEUU
NF- κ B	1/1000	Mouse Mouse	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU
NLRP3	1/1000	Rabbit	Cell Signaling Tech, Danvers, MA, EEUU
OPA1	1/1000	Mouse	Merck-Millipore, Burlington, MA, EEUU
OXPHOS	1/1000	Mouse	Abcam, Cambridge, Reino Unido
p62	1/1000	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EEUU

3. METODOLOGÍA

PGC1 α	1/1000	Rabbit	Abcam, Cambridge, Reino Unido
PINK1	1/1000	Rabbit	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EEUU
VDAC	1/1000	Mouse	Abcam, Cambridge, Reino Unido
Anticuerpos secundarios			
Rabbit	1/2000	Goat	Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU Millipore Ibérica, Madrid, España
Mouse	1/2000	Goat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU

3.7. Citometría estática

En los resultados de la presente Tesis Doctoral, se ha determinado la cuantificación de mtROS, producción de O_2^- y potencial de membrana mitocondrial mediante citometría estática utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus IX81 acoplado al software de citometría estática ScanR versión 2.03.2 (Olympus, Hamburgo, Alemania). En primer lugar, para detectar mtROS, se sembraron leucocitos en una placa de 48 pocillos (Merck-Millipore, Burlington, MA, EEUU), y se incubaron durante 30 minutos ($1,5 \times 10^5$ células/pocillo) a 37°C con la sonda MitoSOX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) preparado a 5 μ M en HBSS. En segundo lugar, para determinar el O_2^- intracelular se incubaron los leucocitos con la sonda DHE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) y, por último, para el potencial de la membrana mitocondria se utilizó la sonda TMRM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). En todos los casos, los núcleos se visualizaron con la tinción nuclear Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) y se analizaron un total de 16 imágenes por pocillo de la placa.

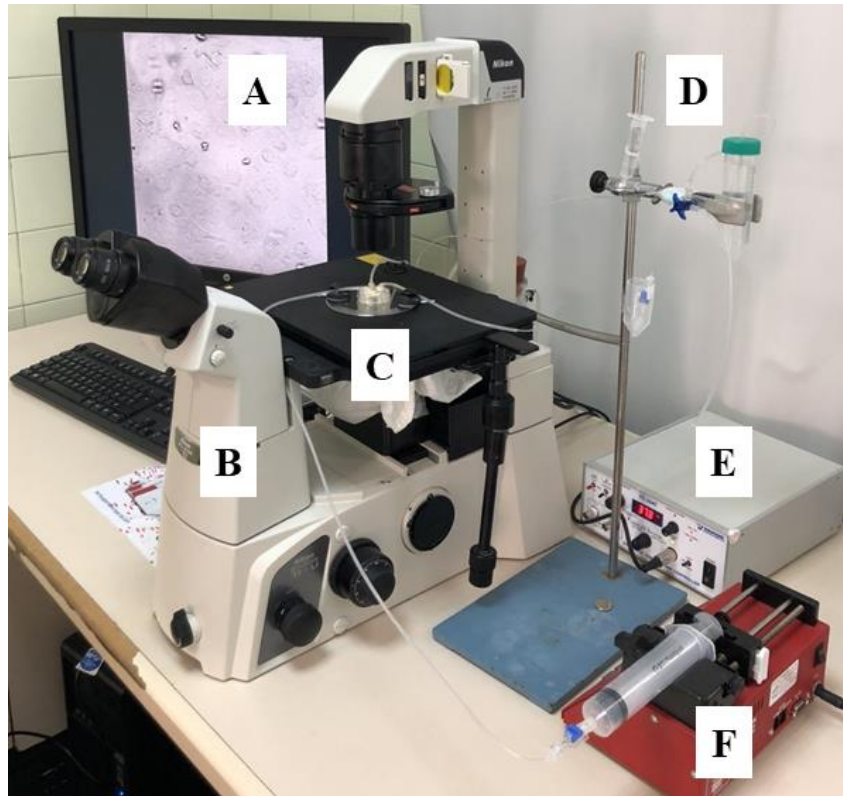
3.8. Extracción de células endoteliales y análisis de las interacciones leucocito-endotelio

Para evaluar la interacción entre las células inmunitarias y la monocapa de células endoteliales, se utilizó un modelo de ensayo de adhesión *in vitro*. Este modelo se basa en el uso de una cámara de flujo acoplada a un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE2000-S, Nikon Instruments Inc, Amstelveen, Países Bajos) conectado a una cámara de vídeo (Sony Exwave HAD, Koeln, Alemania) (Imagen 1). La cámara se montó encajada

en un cubreobjetos con células HUVEC confluentes. Las células endoteliales se habían aislado previamente de los cordones umbilicales mediante digestión con colagenasa tipo II (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) a 1 mg/ml en PBS durante 17 minutos a 37°C. El contenido se recogió, se le añadió medio de cultivo RPMI (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) y se centrifugó a 700g durante 10 minutos. Luego, las células se cultivaron sobre placas de petri de plástico recubiertas de fibronectina en un medio completo EGM-2 (del inglés, endothelial growth medium) (Lonza, Basilea, Suiza) suplementado con el kit SingleQuots® (Lonza, Basilea, Suiza) compuesto por FBS (del inglés, fetal bovine serum) 2% v/v, hidrocortisona 0,4% v/v, hFGF-B (del inglés, human basic fibroblast growth factor) 0,4% v/v, VEGF (del inglés, vascular endothelial growth factor) 0,1% v/v, rhEGF (del inglés, recombinant human epidermal growth factor) 0,1% v/v, gentamicina 0,1% v/v, heparina 0,1% v/v, penicilina 50 unidades/ml, estreptomina 50 µg/ml y fungizona 2,5 µg/ml. Se ajustaron las condiciones de cultivo a 5% CO₂, humedad y temperatura constante de 37°C. Se comprobó el crecimiento y grado de confluencia en un microscopio invertido (Nikon eclipse Ti-S) diariamente, donde el medio de cultivo se cambiaba cada 48h. El día del experimento, la cámara de flujo se purgaba de posibles burbujas de aire y se hizo pasar una suspensión de 1 millón de leucocitos en 1 ml de medio a través de la monocapa de HUVEC a 0,36 ml/min mientras se grababa una porción de 5×25 mm del cultivo celular durante 5 minutos. Durante el análisis de vídeo se evaluaron los siguientes parámetros: El flujo de rodamiento de los leucocitos se calculó contando el número de leucocitos que rodaban sobre 100 µm² de HUVEC en 1 minuto; la velocidad de rodamiento se midió como el tiempo promedio que tardaron 20 leucocitos consecutivos en rodar a lo largo de 100 µm de la monocapa endotelial; y la adhesión se evaluó contando el número de leucocitos que mantenían un contacto firme con el endotelio durante, al menos, 30 segundos.

3. METODOLOGÍA

Imagen 1. Montaje del sistema de cámara de flujo en microscopio.



A. Monitor de ordenador, B. Microscopio y videocámara, C. Cubreobjetos con HUVEC, D. Alícuota de PMN, E. Regulador de temperatura, F. Bomba de perfusión.

3.9. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el programa informático SPSS 20.0 (IBM SPSS Statistic, Chicago, IL, EEUU). Los datos paramétricos mostrados en las tablas se expresan como media \pm desviación estándar, mientras que los datos no paramétricos se muestran como mediana y rango intercuartil (percentiles 25% y 75%). Los datos cualitativos se expresan como porcentajes. Los gráficos de barras de las figuras muestran la media + error estándar de la media. Se comprobó la normalidad de la distribución de la población empleando la prueba de Shapiro-Wilk debido al tamaño de la muestra.

Los datos de las variables a comparar se analizaron con una prueba t de Student y prueba U de Mann-Whitney para las variables paramétricas; y t de Student pareada o prueba de Wilcoxon para las variables no paramétricas. Se empleó el coeficiente de correlación de Pearson para determinar el grado de relación entre las variables del estudio en el estudio longitudinal. Se utilizó una prueba X^2 para comparar proporciones. En este estudio, las

posibles variables de confusión, como la edad, se utilizaron como covariables para generar un modelo lineal general univariante para analizar los parámetros bioquímicos. En todos los artículos, se utilizó un intervalo de confianza del 95% para todas las pruebas y las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La obesidad representa una enfermedad que conlleva diferentes complicaciones metabólicas y está asociada a una elevada mortalidad, por lo que el preocupante aumento de su prevalencia a nivel mundial cobra especial interés. El cambio en los hábitos de vida de la sociedad actual, el sedentarismo y el intenso ritmo de vida en muchas ocasiones imposibilitan la adopción de un estilo de vida saludable. Por lo tanto, en la actualidad, existe un gran interés en el abordaje de nuevas estrategias para revertir la obesidad y las comorbilidades asociadas, con el objetivo de poder frenar el avance de la enfermedad. En este contexto, la comunidad científica y los profesionales de la salud han avanzado hacia el conocimiento de esta enfermedad desde un punto de vista fisiológico tanto a nivel básico como clínico, para poder abordar el problema a un nivel de prevención y promoción de la salud.

La presente Tesis Doctoral se enfoca en el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la etiología de la obesidad y comorbilidades a través de las diversas cascadas de señalización celulares en leucocitos y AT, abordando también si el enfoque terapéutico podría modular estas rutas y proteger frente a las alteraciones metabólicas. Para ello, se han llevado a cabo estudios observacionales y se han analizado distintas cohortes de pacientes con obesidad sometidos a RYGB que fueron atendidos en la Sección de Endocrinología y Nutrición en colaboración con el Departamento de Cirugía General y del Aparato Digestivo (ambos en el Hospital Universitario Dr. Peset), donde se realizó el reclutamiento, seguimiento y la intervención quirúrgica.

En cuanto a la distribución de los resultados a presentar en la Tesis Doctoral, en primer lugar, se procederá a exponer la información y objetivos alcanzados de los estudios de cohortes que evalúan el efecto de la pérdida de peso asociada a RYGB para posteriormente, finalizar con el estudio transversal realizado en el VAT de pacientes obtenido en el momento de la intervención quirúrgica.

ESTUDIO DE COHORTES: PÉRDIDA DE PESO ASOCIADA A RYGB

De manera general, la población con obesidad sometida a la pérdida de peso inducida por RYGB estaba compuesta por 57 pacientes con una edad media de 45 años, donde las mujeres formaban, aproximadamente, el 84%. En cuanto al BMI, el grupo de pacientes sometidos a RYGB presentaba de media 40 kg/m², donde al año de RYGB el BMI descendió significativamente hasta 29 kg/m².

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido al riesgo elevado de desarrollar comorbilidades, observamos que algunos pacientes presentaban hipertensión, dislipidemia y T2D. Aproximadamente el 37%, 23% y 30% de los pacientes con obesidad tenían prescritos fármacos antihipertensivos, hipolipemiantes y antidiabéticos, respectivamente. Tras el seguimiento de un año, el diagnóstico y tratamiento de estas comorbilidades se redujo hasta un 16%, 9% y 4%, respectivamente. Esto implica un porcentaje de remisión del 57% en hipertensión, 62% para la dislipidemia y un 88% en el caso de la T2D. De hecho, la tasa de remisión de T2D tras el RYGB de esta cohorte resultó ser superior que la propuesta por otros estudios (Puzziferri et al., 2014; Zhang et al., 2017) al año de RYGB.

En paralelo a la pérdida de peso inducida por RYGB, la circunferencia de cintura se redujo significativamente al año de la intervención. Estos resultados se interpretan como una reducción de la grasa visceral, ya que la circunferencia de cintura se correlaciona con la acumulación de adiposidad abdominal y, junto con el BMI, son potentes predictores de la misma (Cho et al., 2018). La circunferencia de cintura también presenta una asociación positiva con la mortalidad por todas las causas (Cerhan et al., 2014), por lo que la cirugía RYGB podría estar reduciendo el riesgo de mortalidad en nuestra población estudiada.

En cuanto a la necesidad de cuantificar y buscar una predicción de resultados clínicos post cirugía, un valor utilizado es el porcentaje de exceso de peso corporal, el cual describe el porcentaje de pérdida de peso en relación con la obtención de un BMI "ideal" de 25 kg/m² (Dixon et al., 2005). A este respecto, la literatura señala que pérdidas de exceso de peso entre un 50%-75% son consideradas como buenos resultados tras la cirugía y 75%-90% como muy buenos mientras que un porcentaje menor que 50% supondría unos resultados no satisfactorios (Barhouch et al., 2016). En este sentido, hubo una media de 80% de pérdida de exceso de peso corporal con valores entre el 51% y 109%. Estos resultados están en la línea con otros estudios de cohortes retrospectivos donde se observaron medias de 69% de cambio con características de pacientes similares a nuestra cohorte (Torquati et al., 2007) y un rango de cambio entre 15%-155% en grandes cohortes al año de RYGB (Ma et al., 2006; Barhouch et al., 2016), lo que indica una amplia variación entre los resultados. Relacionando este porcentaje de reducción con las mejoras clínicas que puede ofrecer el RYGB, Buchwald *et al.* (2004) concluyen que una pérdida media del 61% del exceso de peso corporal en pacientes sometidos a RYGB se acompañaba de una mejoría en pacientes con hipertensión, dislipidemia, T2D y apnea del

sueño. En línea con estas premisas, los resultados post operatorios de nuestras cohortes se han clasificado como buenos y muy buenos, con un mayor porcentaje de pérdida de peso respecto a los artículos previos y una tasa de remisión de comorbilidades elevada, asociada también con la pérdida de peso.

Se considera que la pérdida de peso representa un mecanismo eficaz no farmacológico para la prevención primaria de la hipertensión (Stevens, 2001), por este motivo, el siguiente paso fue evaluar el efecto de la pérdida de peso sobre la presión arterial en nuestra cohorte pacientes. En general, hemos observado una disminución significativa de SBP y DBP respecto a sus valores basales, concretamente hubo una bajada media de 9mmHg y 7 mmHg, respectivamente. Estos parámetros también han sido evaluados en un estudio llevado a cabo por Ahmed *et al.* (2009), los cuales observaron una reducción de 15 mmHg en SBP y 9 mmHg en la DBP al año de RYGB aunque en este estudio el 58% de pacientes eran hipertensos antes de la operación. Por su parte, Carson *et al.* (1994) registraron reducciones de 10 y 9 mmHg en la SBP y DBP, respectivamente, en pacientes con obesidad e hipertensión 1 año después de RYGB. Nuestro estudio está en la línea con Carson *et al.* ya que aproximadamente un tercio de la población de estudio tenía prescrito antihipertensivos mientras que las mayores reducciones de SBP y DBP se constatan en pacientes con unos valores más elevados previos a la cirugía, tal como estipula el estudio de Ferstrom *et al.* (2006). Por lo tanto, el RYGB podría reducir el riesgo cardiovascular mediante la resolución o la mejoría del mecanismo a través del cual se produce la hipertensión.

Analizando el perfil bioquímico, el RYGB mejoró claramente los parámetros del metabolismo hidrocarbonado al reducir significativamente los niveles de glucemia, insulina y HbA1c. Tal y como era de esperar, estos resultados se asociaron con una mejoría en la IR, que se corroboró al disminuir el HOMA-IR al año de la intervención. Estos resultados concuerdan con los presentados por Cazzo *et al.* (2014) que observaron una disminución de glucosa, HbA1c y HOMA-IR al año de seguimiento tras el RYGB. Esta disminución fue también constatada por Camastra *et al.* (2011), quienes observaron que los pacientes intervenidos presentaron mayor sensibilidad a la insulina que los pacientes de peso similar sin haber sido sometidos a la cirugía independientemente de la T2D. Es de destacar que un trabajo llevado a cabo por Wolfrum *et al.* (2004) sugieren que la hiperinsulinemia promueve la inhibición de FOXA2 (del inglés, forkhead box

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

protein A2), un regulador de la oxidación de los ácidos grasos, conduciendo a la acumulación de lípidos en el hígado, a la resistencia hepática a la insulina y, en última instancia, a T2D. Por lo tanto, el descenso observado en la insulina podría mejorar la oxidación de ácidos grasos libres y disminuir los FFA en la cohorte de pacientes.

A su vez, hemos demostrado que el perfil lipídico mejoró cuantitativamente al reducir los niveles de colesterol total, LDL y TG, con un aumento de las HDL. Estas consecuencias bioquímicas están en concordancia con la bibliografía publicada al año de la intervención (Asztalos et al., 2010; Minervino et al., 2015). Por ejemplo, Garcia-Marirrodrga *et al.* (2012) mostraron una correlación positiva entre el porcentaje de exceso de peso corporal perdido y la reducción de colesterol total, LDL y TG por lo que podría estar en línea con nuestros resultados. Por otra parte, el RYGB también indujo un descenso en el riesgo de aterosclerosis asociado al cambio cualitativo de las lipoproteínas que transportan colesterol. En este sentido, además de evidenciar un descenso del LDLc tras la operación RYGB, hay un descenso significativo en el patrón más aterogénico (LDL pequeñas y densas) y un aumento significativo en las partículas menos aterogénicas (patrón intermedio), sin cambios detectables en las partículas LDL de mayor tamaño (Ivanova et al., 2017). En cuanto al aumento significativo del HDLc, a nivel cualitativo se observa un aumento significativo de las partículas HDL grandes (las cuales se relacionan inversamente con riesgo cardiovascular) y descenso significativo en las intermedias y pequeñas, subfracciones más proaterogénicas (Kontush, 2015). Sin embargo, existe cierta controversia en cuanto al efecto de RYGB sobre el perfil cualitativo lipídico de los pacientes. En un estudio prospectivo de cohortes, Kjellmo *et al.* (2018) reportaron un descenso en las partículas LDL y aumento de las HDL grandes mientras que no encontraron diferencias en las LDL pequeñas y densas o HDL pequeñas, si bien el 21% de los participantes fueron sometidos a una cirugía distinta a RYGB. En cambio, Coimbra *et al.* (2019) mostraron un aumento en las partículas HDL grandes, intermedias y pequeñas pero no evidenciaron cambios en las subfracciones de LDL. Aunque evidenciaron un descenso de los niveles de oxLDL, lo que asociaron a una mejora de la función endotelial y un descenso del estrés oxidativo.

Por último, centrándonos en los marcadores inflamatorios agudos, cabe señalar que la inflamación es el principal factor que relaciona la obesidad con las alteraciones metabólicas asociadas (Ellulu et al., 2017), mejorando tras la pérdida de peso. Nuestros

resultados mostraron una disminución sistémica significativa de la CRP, el C3c, la IL6, el TNF α y los leucocitos totales tras la pérdida de peso. La CRP es capaz de inducir la secreción de IL6 y TNF α por macrófagos y adipocitos (Badimon et al., 2018), correlacionándose a su vez con los niveles de C3c (Gómez-Abril et al., 2016) y con un aumento del recuento de leucocitos (Hanusch-Enserer et al., 2003). El descenso colectivo de estos mediadores inflamatorios también se ha constatado por otros autores. Entre ellos Kopp *et al.* (2003) demostraron una reducción de CRP e IL6 tras el RYGB además de la reducción de HOMA-IR, aunque no observaron cambios significativos en TNF α . En otros estudios (Dallal et al., 2012; Viana et al., 2013) sí que detectan un descenso sistémico significativo de TNF α e IL6 y concentración de leucocitos, respectivamente, lo que está en línea con nuestros resultados, incluso a los 6 meses de la RYGB y manga gástrica (Villarreal-Calderon et al., 2021). Se sabe que los niveles elevados de citoquinas inflamatorias circulantes, y en particular la CRP, se consideran predictores independientes de eventos cardiovasculares (Badimon et al., 2018), incluso más que los niveles de LDL (Ridker et al., 2002). Por último, la cantidad total de leucocitos se correlaciona positivamente con la grasa visceral, esteatosis hepática (Ryder et al., 2014) y BMI (García-Prieto et al., 2019), revirtiéndose su aumento significativamente al año de intervención. Por lo tanto, el descenso significativo de leucocitos en nuestras cohortes podría estar reflejando esta mejora metabólica asociada a la pérdida de peso por RYGB. Se ha demostrado que los procedimientos de cirugía bariátrica, incluido el RYGB, alcanzan objetivos de pérdida de peso y la reducción de comorbilidades metabólicas, incluida la incidencia de eventos cardiovasculares (Benotti et al., 2017). Como era de esperar, nuestros pacientes se beneficiaron de una pérdida de peso sustancial, junto con una disminución de la circunferencia abdominal, una reducción de la presión arterial y de la IR, y mejoras significativas en el perfil lipídico e inflamatorio al año de la intervención.

Una vez abordados los cambios en los marcadores inflamatorios sistémicos y, sobre todo, en el perfil lipídico tras la RYGB, se procedió a la evaluación de la implicación del estrés oxidativo sobre la activación de los leucocitos y su papel sobre la disfunción endotelial y los marcadores subrogados de aterosclerosis.

Como se ha comentado previamente, el estrés oxidativo es uno de los principales mecanismos que subyacen a la obesidad, la disfunción endotelial y el desarrollo de la aterosclerosis. Aunque el AT adquiere un papel relevante como generador de estrés

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

oxidativo asociado a la obesidad, los leucocitos también están involucrados debido al aumento significativo en la producción de O_2^- en función del BMI, siendo mayores los niveles cuando el BMI $> 40 \text{ kg/m}^2$ (López-Domènech et al., 2018). En este sentido, la reducción del daño oxidativo en pacientes con obesidad podría contribuir a la reducción del riesgo de desarrollo y progresión de la aterosclerosis.

El efecto de la cirugía bariátrica sobre los marcadores de estrés oxidativo a nivel sistémico ha sido evaluado previamente en varios artículos. En nuestro caso, la pérdida de peso asociada a RYGB supuso una disminución significativa de la producción de O_2^- en los leucocitos junto con una menor detección de carbonilación de proteínas y MPO a nivel sérico. Sin embargo, son escasos los estudios que han explorado los cambios en la producción de ROS en leucocitos tras RYGB. El estudio llevado a cabo por Roberts *et al.* (2018) coincide con nuestros resultados al detectar una disminución de la producción de O_2^- por parte de células inmunitarias pero, a diferencia, los pacientes fueron operados con banda gástrica. Además, en un estudio que evaluó el efecto de RYGB en modelo de ratones con obesidad, también detectaron una menor producción de ROS en los hepatocitos, sin cambios en la capacidad antioxidante (Sacks et al., 2018).

En concordancia con nuestros datos, se ha detectado una reducción significativa de carbonilación de proteínas y peroxidación lipídica a los 3 (Xu et al., 2015) 6 y 12 meses tras RYGB, alcanzando niveles similares a pacientes con normopeso (Schmatz et al., 2017). Además, los niveles séricos de MPO descendieron tras 6 meses (Roberts et al., 2018) y un año de la intervención, llevada a cabo mediante RYGB (da Silva et al., 2012) y banda gástrica (Roberts et al., 2018), lo que coincide con los resultados obtenidos en nuestro estudio. La MPO participa en el proceso de degranulación de los neutrófilos, oxidación de las partículas de LDL y en el deterioro de la función de la NOS (Carr et al., 2000), asociándose a un mayor riesgo de enfermedad arterial coronaria y mortalidad general (Brennan y Hazen, 2003; Ndrepepa, 2019).

Por otra parte, otro componente alterado en la obesidad y que condiciona notablemente el estrés oxidativo es el déficit de defensas antioxidantes. En nuestro estudio hemos constatado un aumento significativo de la actividad sérica de SOD y la expresión proteica de GXP1 en PBMC, siendo evidente un aumento de defensas antioxidantes tras la intervención. Estos resultados son similares a los publicados por Schmatz *et al.* (2017)

quienes evidenciaron un aumento de la actividad de SOD y CAT a los 6 y 12 meses tras RYGB. En este contexto, Monzo-Beltrán *et al.* (2017) también evidenciaron una respuesta antioxidante adaptativa de los leucocitos a través de una mayor actividad de GPX, SOD y CAT, aunque en este caso en la gastrectomía en banda. A su vez, la pérdida de peso mediada a través de una dieta hipocalórica también logró aumentar las defensas antioxidantes — glutatión y CAT —, disminuir la producción de O_2^- en sus leucocitos y la actividad sérica de MPO (López-Domènech *et al.*, 2019b).

La mejoría del perfil lipídico y de los marcadores de estrés oxidativo de los leucocitos tras la cirugía bariátrica podría trasladarse a una menor presencia de oxLDL, tal y como mostraron en un estudio reciente el grupo de Peinado-Onsurbe *et al.* al postular un descenso del 49% de las oxLDL respecto a los valores previos a la intervención (Carmona-Maurici *et al.*, 2020). Estos resultados sugieren una recuperación parcial del equilibrio redox mediado por una disminución de la señalización prooxidante a favor de las respuestas antioxidantes, tanto en los leucocitos como en el suero y, en consecuencia, la reducción del riesgo de desarrollo y progresión de enfermedades cardiovasculares. La evidencia científica acumulada sugiere una asociación entre la disfunción endotelial, el estado prooxidante de los leucocitos y su fenotipo adherente en pacientes con obesidad y T2D (Hernandez-Mijares *et al.*, 2013; López-Domènech *et al.*, 2018). La excesiva liberación de O_2^- por parte de las células inmunitarias provoca un aumento de la permeabilidad vascular y favorece su reclutamiento y migración a través del endotelio (Csányi *et al.*, 2009). Además, este proceso se ve facilitado por la MPO que promueve la atracción de los leucocitos al endotelio (Klinke *et al.*, 2011). Por lo tanto, en el siguiente apartado abordaremos el estudio de la función endotelial mediante el análisis de las interacciones del leucocito al endotelio y las moléculas de adhesión solubles secretadas al torrente sanguíneo.

En primer lugar, aunque no se produjeron cambios en la velocidad de rodamiento de los PMN, sí se observó una disminución significativa del número de leucocitos que interaccionaron y se adhirieron al endotelio al año de la intervención. En cuanto a la bibliografía disponible, existen pocos artículos que evalúen la implicación de la pérdida de peso sobre estos marcadores. En el contexto de la obesidad, previamente hemos publicado un trabajo en el que evaluamos las interacciones leucocito-endotelio en una población en función del BMI y adiposidad. Los resultados mostraron un descenso de la

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

velocidad de rolling, un aumento del número de PMN que interaccionan con el endotelio junto con una mayor adhesión en los pacientes con obesidad (López-Domènech et al., 2018). En línea con nuestros resultados, López-Domènech *et al.* (2019b) analizaron la influencia de la pérdida de peso, mediada a través de VLCD, en pacientes con obesidad mórbida sobre las interacciones leucocito-endotelio, concluyendo que la dieta hipocalórica fue capaz de disminuir significativamente el número de PMN adheridos al endotelio.

Una molécula estrechamente relacionada con la inducción del rodamiento y adhesión firme de los leucocitos al endotelio es la proteína MCP1 (Gerszten et al., 1999). De hecho, es capaz de promover la infiltración de macrófagos en los tejidos, ampliar y exacerbar la respuesta inflamatoria, contribuyendo así a mantener la IR (Monteiro y Azevedo, 2010). También presenta relación con la patogénesis del MetS, puesto que se ha encontrado un aumento significativo de la concentración de MCP1 en suero en los pacientes con MetS respecto a con participantes sanos, correlacionándose positivamente con el perímetro de cintura (Savaş et al., 2020). En este contexto, observamos un descenso en la expresión proteica de MCP1 por parte de los PBMC al año de la intervención. En línea con este resultado, un estudio concluyó también una reducción significativa de la expresión génica de *mcp1* en el VAT de pacientes a los 3 meses post RYGB (Canello et al., 2005), y a los 6 meses (Monte et al., 2012) y al año a nivel sistémico (Billeter et al., 2017). Por lo tanto, se podría pensar que hay una menor inducción de señales proinflamatorias que promueven la infiltración endotelial de los leucocitos, asociándose a las reducciones en las interacciones leucocito-endotelio que hemos constatado.

Una vez analizada la activación leucocitaria, el siguiente paso fue analizar marcadores de disfunción endotelial mediados a través de las CAM. En general, los niveles circulantes elevados de CAM (resultantes de la activación de las células inmunitarias y endoteliales) revelan disfunción endotelial y son pronósticos de CVD (Bielinski et al., 2015), ya que participan en el reclutamiento de leucocitos por parte de la pared vascular. De hecho, transcurrido un año de la cirugía, observamos un descenso significativo de los niveles séricos de ICAM1 y P-selectina, los cuales forman parte de los primeros estadios de captación e interacción del leucocito al lecho vascular. En concordancia con nuestros resultados, estudios previos longitudinales postulan una disminución del 60% en los niveles de ICAM1 tras los 6 meses (Netto et al., 2015) y 1 año post RYGB en una cohorte

de mujeres con obesidad severa (Swarbrick et al., 2008). A este respecto, una revisión sistemática que agrupa las distintas técnicas realizadas en la cirugía bariátrica concluye una reducción de la concentración circulante de ICAM1 y E-selectina, sin detectar cambios significativos en VCAM1 (Seyyedi y Alizadeh, 2020), lo cual está en línea con nuestros resultados. En este sentido, se sabe que los productos liberados durante la activación de las plaquetas pueden afectar a la función tanto de los macrófagos como de las células endoteliales, pudiendo regular la expresión génica de *icam1* (Gidlöf et al., 2013). Por lo tanto, la secreción de P-selectina podría estar relacionada con los niveles de ICAM1. En nuestro contexto, la reducción evidenciada de P-selectina asociada a RYGB ha sido constatada también por Heffron *et al.* (2019) con un descenso significativo a los 6 meses de intervención, aunque el diseño de investigación fue realizado en mujeres con obesidad sometidas a gastrectomía en manga.

Por lo tanto, es probable que la atenuación del fenotipo prooxidante de los leucocitos tras la cirugía bariátrica contribuya a mejorar la disfunción endotelial y reducir el reclutamiento de leucocitos, protegiendo así del desarrollo de la aterosclerosis. En este escenario, se hace necesario evaluar diferentes rutas moleculares como la autofagia, la formación del complejo del inflammasoma, el estrés de ER y la disfunción mitocondrial en los leucocitos, ya que estas cascadas de señalización están estrechamente relacionadas con el estrés oxidativo.

Como hemos discutido previamente, la cirugía de RYGB promovió una acusada pérdida de peso, acompañada de una mejora en los parámetros metabólicos e inflamatorios. En este sentido, la AMPK es capaz de actuar como sensor de las alteraciones del equilibrio energético causadas por el metabolismo a nivel celular y sistémico. En los pacientes con obesidad, la disminución de la actividad de AMPK se ha asociado a un aumento de IR sistémica, donde la actividad de AMPK era menor en el AT de pacientes con IR respecto a pacientes con una adecuada sensibilidad a la insulina (Gauthier et al., 2011). En cuanto al efecto de la pérdida de peso, la restricción calórica indujo una activación de AMPK y un descenso de TG e IR (Fritzen et al., 2015). Del mismo modo, se ha observado un aumento de la actividad de AMPK en los PBMC un año después de la cirugía bariátrica — mediante bypass laparoscópico o gastrectomía en manga — (Angelini et al., 2019; García-Prieto et al., 2019). Igualmente, se detectó una correlación negativa entre una mayor activación de AMPK, proteínas carboniladas y BMI. Estos antecedentes están en

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

concordancia con nuestros resultados, donde los leucocitos expresaron un aumento del contenido proteico de AMPK total y su forma fosforilada al año de RYGB.

En cuanto a la relación de AMPK con el estrés oxidativo y la regulación de la inflamación, se constató un aumento en la expresión y actividad de AMPK en el SAT entre 3 y 6 meses después de RYGB, acompañándose de una reducción del estrés oxidativo y los marcadores inflamatorios (Xu et al., 2015; Ferraz-Bannitz et al., 2021). Se postula que AMPK podría estar modulando el estrés oxidativo a través de la disminución de la actividad de NOS y NADPH oxidasa; interfiriendo también en la actividad de MCP1 de los macrófagos y modulando la expresión de las CAM (Salt y Palmer, 2012). AMPK también es capaz de modular la inflamación al inhibir cascadas de señalización promovidas por $TNF\alpha$, IL6 e IL1 β , las cuales inducen la activación de NF- κ B (Mancini et al., 2017) en macrófagos (Sag et al., 2008), de tal manera que la supresión de la expresión de AMPK fue capaz de inducir la expresión génica de *il6* y *tnfa*. En células endoteliales, se ha observado que la activación de AMPK mediada por agonistas de PPAR α (del inglés, peroxisome proliferator-activated receptor α) inhibió la activación de NF- κ B inducida por citoquinas (Okayasu et al., 2008). En este sentido, los leucocitos de nuestra cohorte también experimentaron un descenso significativo de NF- κ B — factor de transcripción involucrado en las primeras etapas de activación del complejo inflamasoma NLRP3 — y una reducción sistémica de IL1 β al año de la intervención. Sobre la base de todos estos hallazgos, podríamos sugerir que las estrategias que activan AMPK parecen ser eficaces para reducir las vías proinflamatorias, las cuales, a su vez, se asocian con estrés oxidativo y con la activación del complejo inflamasoma NLRP3.

Por otra parte, existe una estrecha relación entre la activación de rutas inflamatorias y la activación del estrés de ER. En este contexto, previas investigaciones han asociado la obesidad con un aumento significativo de los marcadores de estrés de ER — eIF2 α y ATF6 — en adipocitos sometidos a elevadas concentraciones de FFA, LPS y glucosa, condiciones fisiopatológicas que mimetizan la obesidad y sus comorbilidades (Alhusaini et al., 2010). La expresión de ATF6 α y sXBP1 en adipocitos se correlacionaron significativamente con el BMI y el porcentaje de grasa corporal (Sharma et al., 2008). Uno de los primeros estudios en abordar el efecto de RYGB sobre los marcadores de estrés de ER al año de la cirugía, constató una reducción de los marcadores GRP78, sXBP1, CHOP y eIF2 α fosforilado hepáticos (Gregor et al., 2009). Nuestros resultados

son coherentes con los estudios mencionados anteriormente, además de corroborar una asociación entre la pérdida de peso y la disminución significativa de ATF6 y CHOP en leucocitos al año de la RYGB. La activación de AMPK también puede intervenir en el metabolismo del ER ya que se ha descrito que los activadores de AMPK previenen la inflamación inducida por FFA a través del alivio del estrés de ER en macrófagos (Boß et al., 2016). En conjunto, estos datos demuestran una posible regulación del estrés de ER en la pérdida de peso inducida por la RYGB.

Cada vez existen más evidencias sobre el papel de AMPK en la fisiopatología de la obesidad y su relación con procesos catabólicos como la glucólisis y la autofagia (Garcia y Shaw, 2017) tanto en el AT (Ha et al., 2015) como en células leucocitarias (Diaz-Morales et al., 2018). En relación a este último, AMPK reduce la actividad de mTOR en condiciones de estrés energético (Kim et al., 2011) y, de forma directa, AMPK puede fosforilar directamente a ULK1, activando la autofagia y la eliminación selectiva de las mitocondrias dañadas (Egan et al., 2011). Centrándonos en el efecto de la pérdida de peso sobre los marcadores de autofagia, nuestros resultados evidenciaron un aumento significativo en la expresión proteica de BECLIN1, complejo ATG5-ATG12, LC3I, LC3II y NBR1 tras 1 año de RYGB. Estos marcadores representan los pasos de nucleación, elongación y reclutamiento del contenido a degradar. Investigaciones previas en hepatocitos han demostrado que en la obesidad inducida por HFD, hay un defecto en la autofagia, promoviendo el estrés de ER e IR (Yang et al., 2010; Soltis et al., 2017) mientras que la RYGB mejoró el metabolismo lipídico a través del aumento de LC3II/LC3I y descenso de mTOR en ratas con obesidad y diabetes (Ma et al., 2020). En el caso de los preadipocitos 3T3-L1, los trabajos publicados por Zhang *et al.* (2020) y Yin *et al.* (2015) señalan a la autofagia como la efectora molecular que restablece la acumulación de lípidos y las vías del estrés de ER-NF- κ B inducidas por el palmitato mediante la activación de la macroautofagia y la autofagia mediada por chaperonas. En conjunto, estos hallazgos implican la activación de las vías autofágicas en la mejora de las consecuencias metabólicas de la obesidad.

Junto con la inducción de la macroautofagia en los leucocitos, observamos un aumento significativo de las proteínas MIEAP y PINK1 y descenso significativo en el potencial de membrana mitocondrial (medido a través del TMRM) al año de RYGB, posiblemente como mecanismo de eliminación y reciclaje de las mitocondrias dañadas (Sarparanta et

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

al., 2017). Como se mencionó previamente, la mitofagia no sólo está regulada por AMPK, sino también por la eliminación de las mitocondrias despolarizadas mediada por PINK1 y PRKN (Nguyen et al., 2016). Tal y como hemos discutido previamente, el estrés oxidativo daña irreversiblemente las mitocondrias por lo que un descenso significativo en la producción de O_2^- después de RYGB favorecería el aclaramiento mitocondrial a través de la mitofagia y mejoraría la función mitocondrial después de la intervención. En cuanto al efecto de la pérdida de peso en el potencial de membrana mitocondrial, de acuerdo con nuestros hallazgos López-Domènech *et al.* (2019a) evidenció un descenso del potencial de membrana mitocondrial y mtROS en leucocitos tras 6 meses de restricción calórica, en este caso mediada por VLCD.

Simultáneamente al proceso de mitofagia y para una correcta eliminación de las mitocondrias dañadas, la célula posee una maquinaria molecular encargada de escindir y aislar (fisión) y, por otra parte, unir las mitocondrias que sean funcionales (fusión). Además, estos procesos requieren de la activación de factores transcripcionales nucleares para poder sintetizar nuevas mitocondrias y, de esta manera, reducir la disfunción mitocondrial. Así, en su conjunto, la autofagia se encuentra estrechamente relacionada con el metabolismo mitocondrial (Palikaras y Tavernarakis, 2014), el cual incluye procesos de biogénesis y dinámica mitocondrial.

A este respecto, en la presente Tesis Doctoral hemos constatado que un año después de la intervención de RYGB, observamos un aumento significativo de la expresión proteica de PGC1 α y TFAM en los leucocitos, lo que sugiere un aumento de la biogénesis mitocondrial. En el contexto de la obesidad, la inflamación crónica de bajo grado y el estrés oxidativo provoca un descenso en la biogénesis y una disfunción mitocondrial, lo que se relaciona con IR y desarrollo de T2D (Liu et al., 2009). Concretamente, se sabe que la expresión génica de *pgc1 α* está reducida en el AT de pacientes con obesidad (Semple et al., 2004) y que la pérdida de peso asociada a la RYGB es capaz de revertir significativamente esta condición en el músculo esquelético (Gastaldi et al., 2007) a partir de los 3 meses post intervención. Concretamente, los pacientes con sobrepeso experimentaron un aumento de expresión génica de *pgc1 α* y *tfam* tras la pérdida de peso inducida por una restricción calórica, además de aumentar significativamente el contenido de mtDNA (Civitarese et al., 2007). Se sugiere que TFAM es capaz de prevenir la IR inducida por una HFD en el músculo de ratones y, por lo tanto, su depleción podría

inducir obesidad y diabetes (Koh et al., 2021), probablemente debido a una remodelación de la cadena respiratoria y el descenso de múltiples proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa. Las alteraciones del contenido y la actividad metabólica mitocondrial han surgido como características de la obesidad a través de su estudio en el AT y músculo esquelético en humanos (Antoun et al., 2015; Heinonen et al., 2015). De hecho, el defecto en la fosforilación oxidativa puede conducir a la sobreproducción de ROS y acumulación de mitocondrias dañadas (Bhatti et al., 2017), que deben ser reparadas o eliminadas para preservar la funcionalidad celular (Shadel y Horvath, 2015). En nuestra cohorte de estudio, la RYGB indujo un aumento significativo de los complejos involucrados en la fosforilación oxidativa del complejo I y ATPasa, con una tendencia marcada al aumento en el complejo IV. Por el contrario, no se detectaron cambios en los complejos II y III al año de seguimiento. Nuestros resultados sugieren que RYGB promueve un aumento en los niveles de las proteínas involucradas en la fosforilación oxidativa (complejo inicial de la cadena de transporte de electrones y la ATPasa). Previos estudios llevados a cabo en diferentes tejidos diana (hígado, adiposo o músculo) y modelos (celulares o animales) han puesto de manifiesto el aumento de la expresión génica de los complejos mitocondriales tras la restricción calórica (Ghosh et al., 2011) o post RYGB (Coen et al., 2015; Hansen et al., 2015). Centrándonos en los PBMC, Nijhawan *et al.* (2013) observaron un aumento significativo de las tasas de respiración mitocondrial basal y máxima después de la cirugía, mientras que en el músculo esquelético permanecieron inalterados.

Es importante señalar que el control de la calidad mitocondrial está modulado por la coordinación de la biogénesis mitocondrial y los mecanismos de fusión y fisión (Picca et al., 2018), los cuales constituyen mecanismos de la homeostasis mitocondrial que regulan la eficiencia bioenergética. En nuestra cohorte, el estudio de marcadores de fusión mitocondrial mostró un ligero aumento en la expresión proteica de MNF2 y OPA1 que se acompañó de un aumento significativo del contenido proteico de MFN1 en los leucocitos al año de seguimiento de RYGB. En cambio, las proteínas de fisión mitocondrial FIS1 y DRP1 fosforilado permanecieron inalteradas. En consonancia con estos hallazgos, estudios previos llevados a cabo en pacientes con obesidad, han revelado una asociación directa entre la dinámica mitocondrial y el equilibrio bioenergético, lo que sugiere que la remodelación de la dinámica mitocondrial podría constituir una adaptación a las alteraciones metabólicas (Zorzano et al., 2009b; Liesa y Shirihai, 2013). Se postula

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

que el aumento en la fusión mitocondrial podría contribuir positivamente a la ampliación y funcionalidad de la red mitocondrial al estimular la expresión de los complejos mitocondriales, como se ha comprobado en el hígado de ratas con obesidad (Sacks et al., 2018). En particular, varios investigadores han argumentado que la obesidad se caracteriza por una expresión génica reducida de los marcadores de fusión, los cuales podrían contribuir a la disfunción mitocondrial (Putti et al., 2015). Aunque cada vez existen más evidencias de que la RYGB podría mejorar la fusión mitocondrial (Peng y Murr, 2013; Verbeek et al., 2015), los datos aún son limitados y controvertidos. Recientemente, Kugler *et al.* (2020) no encontraron cambios en estas proteínas en miotubos de pacientes con obesidad 7 meses después del RYGB. En el caso de las proteínas de fisión mitocondrial, existe una controversia en torno a los efectos del RYGB sobre los niveles de las proteínas FIS1 y DRP1 (Putti et al., 2015; Kristensen et al., 2018; Kugler et al., 2020).

Para concluir, nuestros resultados profundizan en la comprensión de los mecanismos subyacentes a la relación entre la obesidad y la pérdida de peso. En este sentido, la cirugía de RYGB promovió una pérdida de peso pronunciada en nuestros pacientes, y se acompañó de una mejoría de los parámetros antropométricos y bioquímicos al año de seguimiento. Los pacientes sometidos a RYGB mostraron una disminución de los factores proaterogénicos sistémicos, como la inflamación sistémica (CRP, C3c, IL6, TNF α e IL1 β), la producción de ROS (MPO y carbonilación de proteínas) y el perfil de dislipidemia aterogénica, y un aumento de las defensas antioxidantes (SOD). En conjunto, estas mejoras pueden contribuir a mejorar la disfunción endotelial a través de una reducción en la expresión de CAM (ICAM1 y P-selectina), el rodamiento de leucocitos y la adhesión al endotelio. A la luz de estos resultados, exploramos la modulación de las respuestas de estrés intracelular en los leucocitos después de la pérdida de peso y observamos una producción disminuida de ROS intracelular ($O_2^{\cdot-}$), mediadores inflamatorios (MCP1, NF- κ B), estrés ER (ATF6 y CHOP) y potencial de membrana mitocondrial asociado con un aumento en la defensa antioxidante (GPX1) y una expresión mejorada de AMPK, AMPK fosforilada, marcadores de autofagia/mitofagia (ATG5, BECLIN1, LC3, NBR1, PINK1 y MIEAP) y metabolismo mitocondrial (PGC1 α , TFAM, complejos mitocondriales y MFN1). En conjunto, estos resultados arrojan luz sobre los posibles mecanismos subyacentes al papel beneficioso de la pérdida de peso con respecto al control metabólico y la homeostasis celular.

ESTUDIO TRANSVERSAL: OBESIDAD METABÓLICAMENTE SANA Y T2D

Con el objetivo de poder evaluar el estrés oxidativo, inflamación y autofagia en el VAT de pacientes con obesidad y T2D tratados con metformina, se diseñó un estudio transversal compuesto por 68 pacientes divididos en los dos grupos: obesidad metabólicamente sana (definida como la ausencia de diagnóstico ni tratamiento de comorbilidades asociadas a la obesidad, excepto la circunferencia de cintura) y pacientes con T2D (definida en función de las directrices de la Asociación Americana de Diabetes [(American Diabetes Association, 2018)]). Ambos grupos de participantes estuvieron compuestos por el mismo número de pacientes (34), donde las mujeres representaron el 85% y 71%, respectivamente.

En este estudio se detectaron diferencias significativas entre los grupos de edad puesto que el grupo metabólicamente sano presentaba una media de 38 años y el grupo con T2D, 52 años. Para poder minimizar la posible implicación de la edad sobre los parámetros antropométricos y bioquímicos, se generó un modelo lineal general univariante tratando a la edad como una variable de confusión o modificadora. En cuanto a los parámetros antropométricos, no se detectaron diferencias en el BMI, aunque el grupo de pacientes con T2D presentó mayor circunferencia de cintura, índice cintura-cadera, SBP y DBP. Mientras que el grupo con obesidad metabólicamente sana no tenían ningún fármaco prescrito para comorbilidades asociadas a la obesidad, el 62% de pacientes con T2D tomaba hipotensivos, un 67% hipolipemiantes y el 100% metformina como tratamiento de elección hipoglucemiante.

Como era de esperar, los pacientes con T2D mostraron diferencias significativas en los parámetros del metabolismo de la glucosa, incluyendo niveles elevados de glucosa, insulina, HOMA-IR y HbA1c con respecto al grupo con obesidad metabólicamente sana. En este estudio, no se detectaron diferencias en el colesterol total, HDL o LDL. En cambio, el grupo con T2D presentó mayores niveles de TG respecto a pacientes metabólicamente sanos. Se conoce que el BMI y porcentaje de grasa se asocia significativamente con la CRP (Forouhi et al., 2001). En nuestro estudio, ambos grupos presentaron unos niveles similares de CRP, posiblemente debido a que presentan el mismo BMI. No obstante, llama la atención los niveles elevados en ambos grupos (>3mg/l) por lo que podría asociarse con mayor riesgo cardiovascular (Pearson et al., 2003). Además, una serie de estudios prospectivos han demostrado que los niveles de

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CRP predicen el desarrollo de T2D independientemente del grado de adiposidad, distribución de la grasa e IR (Esser et al., 2014). Por lo tanto, el grupo de obesidad metabólicamente sana podría tener un riesgo subclínico de inflamación crónica y desarrollo de T2D respecto a pacientes con normopeso, tal y como ha sido descrito recientemente (Blüher, 2020; Wu et al., 2022). Por último, la cantidad de leucocitos totales fue similar entre los dos grupos de estudio. El recuento de leucocitos puede estar asociado con la patogénesis de las complicaciones macrovasculares en pacientes con T2D (Tsai et al., 2007). Al no detectar diferencias entre ambos grupos del estudio, se podría asociar a un mismo nivel de riesgo de sufrir complicaciones vasculares. Una vez discutidas las características antropométricas y bioquímicas, el siguiente paso fue determinar si los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos inmunomoduladores de la metformina implican la activación del complejo del inflammasoma NLRP3 y/o la modulación de la autofagia en el VAT de pacientes con obesidad.

En primer lugar, se procedió a evaluar parámetros de estrés oxidativo e inflamatorios a nivel sistémico, ya que como hemos ido mencionando a lo largo de esta Tesis Doctoral, los leucocitos son uno de los principales mediadores de la respuesta inflamatoria. A este respecto, por una parte, observamos un descenso significativo en la producción leucocitaria de mtROS y una reducción en los niveles de MPO y, por otra parte, menores niveles séricos de TNF α e IL6 en los pacientes con T2D tratados con metformina respecto a los pacientes con obesidad metabólicamente sana. La metformina es capaz de reducir el consumo celular de oxígeno tanto en WAT, BAT y en el músculo esquelético (Breining et al., 2018; Kulkarni et al., 2018). El mecanismo a través del cual media estos efectos parece estar influenciado por la inhibición del complejo I mitocondrial y la reducción de la oxidación del sustrato. Esto supone la disminución de la oxidación del NADH, gradiente de protones y tasa de consumo de O₂ (Pernicova y Korbonits, 2014; Vial et al., 2019). Estudios llevados a cabo por nuestro grupo (Diaz-Morales et al., 2017) concluyen que la metformina redujo significativamente la producción de mtROS en PMN de pacientes con T2D respecto a pacientes T2D sin metformina. Además, Bułdak *et al.* (2014) postulan una disminución de ROS y un aumento de las defensas antioxidantes en monocitos y macrófagos de pacientes sanos tratados con metformina, lo que sugiere que este fármaco podría ser el responsable de la modulación de la respuesta observada en los leucocitos de los pacientes con T2D.

Simultáneamente, se sabe que la MPO almacenada en los neutrófilos también contribuye al estrés oxidativo (Sena et al., 2018) y se relaciona con el daño vascular. En base a esto, hemos observado una correlación positiva entre la actividad MPO sérica y la producción de mtROS. Pocos estudios han evaluado el efecto de la metformina sobre la actividad de la MPO en pacientes con T2D, aunque se han constatado descensos significativos de la MPO en modelos de ratones con sepsis (Ghavimi et al., 2018), con inflamación miocárdica inducida por LPS (Liu et al., 2017) y con lesiones hepática inducidas por endotoxina (Yuan et al., 2012). En nuestro estudio, al presentar ambos grupos de pacientes el mismo BMI, se postula que el estrés oxidativo mediado por la obesidad no estaría contribuyendo a la formación de ROS, sino que la metformina podría estar reduciendo una de las fuentes principales de estrés oxidativo, como es la mitocondrial. Esto sugiere una posible mejoría sobre la oxidación de las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, componentes alterados en la obesidad y la T2D.

En cuanto a las citoquinas proinflamatorias circulantes, estudios previos han demostrado la asociación de metformina con la reducción de TNF α e IL6 en pacientes con obesidad y T2D. En una población de adolescentes con obesidad e IR, se observó un descenso significativo en niveles de TNF α tras 3 meses de tratamiento aunque no se detectaron diferencias significativas en el HOMA-IR (Evia-Viscarra et al., 2012). Estos resultados también se corroboraron mediante otro estudio junto con la detección de menores niveles significativos de IL6 (Fidan et al., 2011), tal y como sucede en nuestra cohorte de pacientes. A nivel de la polarización de los macrófagos, la metformina mejoró el estado inflamatorio *in vivo* e *in vitro* mediado por una polarización hacia la M2, reduciendo la secreción de TNF α e IL6 en macrófagos de ratones con HFD (Jing et al., 2018). Estos resultados sugieren que la metformina podría presentar efectos subclínicos en la reducción de la inflamación crónica mediada por el mtROS y las citoquinas proinflamatorias.

Tras la evaluación de ROS en leucocitos y citoquinas proinflamatorias, nos propusimos evaluar la ruta de formación del complejo inflamasoma, cuya activación está estrechamente relacionada con una inflamación crónica de bajo grado. En primer lugar, encontramos un descenso significativo en la expresión proteica de NF- κ B, NLRP3 y ASC, tres componentes esenciales de la formación del complejo inflamasoma, en

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

leucocitos de pacientes con T2D tratados con metformina en comparación a pacientes con obesidad metabólicamente sana. Como se ha mencionado anteriormente, el NF- κ B es el principal mediador de la señal del inflamasoma NLRP3, al inducir la transcripción de proteínas fundamentales en la formación de este complejo multiproteico. Por lo tanto, la inhibición de la expresión de NF- κ B podría estar implicada en la reducción significativa de la proteína NLRP3 (Liu et al., 2017) y ASC, la cual es una mediadora de la activación de NF- κ B (Masumoto et al., 2003). Además, esta respuesta se confirma al encontrar correlaciones significativas y positivas entre NF- κ B, NLRP3 y ASC. A su vez, esta respuesta en los leucocitos de pacientes con T2D tratados con metformina podría estar inducida por la reducción de ROS debido a su estrecha relación (Abais et al., 2015).

En cuanto al posible factor causal de esta respuesta, se sabe que la metformina es capaz de aliviar la activación de NF- κ B y marcadores de apoptosis en fibroblastos sometidos a elevadas concentraciones de glucosa (Soydas et al., 2018). Este fármaco también es capaz de modular la expresión de NLRP3 en leucocitos y AT, tal y como han postulado en varios artículos. En primer lugar, los leucocitos de pacientes con T2D tratados con metformina mostraron una menor expresión proteica de NLRP3 respecto a pacientes no diabéticos (Iannantuoni et al., 2019). Otro estudio constata un descenso de la expresión génica y proteica de NLRP3 mediado por metformina en macrófagos de pacientes con CVD estimulados con oxLDL, posiblemente a través de la activación de AMPK (Zhang et al., 2019). En modelos murinos, el tratamiento con elevadas concentraciones de glucosa mostró un aumento significativo de NLRP3 en el AT respecto a ratones sanos, mientras que esta situación se revirtió significativamente tras el tratamiento con metformina (Li et al., 2016). Sin embargo, Esser *et al.* (2013) encontraron una mayor expresión génica de *nlrp3* y activación del inflamasoma en el VAT y SAT de pacientes con MetS, respecto a pacientes sin MetS. El 35% de los pacientes tenían diagnóstico de T2D, con la insulina como tratamiento antidiabético, lo que parece reforzar el hecho que la metformina es capaz de modular la expresión del inflamasoma NLRP3 en pacientes con T2D y que este efecto no se observa si el tratamiento antidiabético es la insulina.

Como se mencionó previamente, la MCP1 es una adipocitoquina involucrada en la infiltración y reclutamiento de macrófagos hacia los sitios de lesión o inflamación del tejido que se sobreexpresa en la obesidad. En un modelo de adipocitos hipertrofiados con

palmitato, se demostró que MCP1 se inhibía de forma significativa mediante el tratamiento con metformina por un mecanismo que implicaba la vía del NF- κ B (Morita et al., 2018). A su vez, estos resultados concuerdan con lo observado en nuestros pacientes, al haber menor expresión proteica de NF- κ B y MCP1 conjuntamente en el VAT de pacientes tratados con metformina. Además, esta respuesta se produjo tanto en VAT como en SAT aunque la liberación de MCP1 es mayor en el VAT en comparación con el SAT (Bruun et al., 2005). Los efectos de la metformina en la polarización de macrófagos hacia el M2 también podrían estar contribuyendo a la menor liberación de MCP1, ya que se considera una proteína clave en la polarización de los macrófagos en el VAT (Rajasekaran et al., 2019). En conjunto, estas evidencias están en consonancia con nuestros resultados y sugieren un papel de la metformina en la reducción de la inflamación sistémica y formación del complejo inflamasoma, con una acción específica sobre el AT, donde reduce la expresión de MCP1 y NF- κ B, por una parte, y NLRP3 y ASC por otra. Además, evidenciamos una correlación positiva y significativa entre la expresión proteica de NLRP3 y MCP1, por lo que ambos marcadores podrían estar asociados.

Por último, en cuanto al análisis de las citoquinas resultantes de la activación del complejo del inflamasoma NLRP3, encontramos un descenso significativo en los niveles sistémicos de IL1 β en pacientes con T2D tratados con metformina, con tendencia estadística a la reducción en los niveles de IL18. Previamente se ha publicado que los leucocitos de pacientes tratados con metformina presentan una menor expresión sistémica y génica de IL1 β e IL18 en comparación con pacientes no diabéticos (Iannantuoni et al., 2019), lo que está en línea con nuestros resultados. Es más, la metformina fue capaz de reducir los niveles de transcripción y expresión génica de *il1 β* en macrófagos tratados con LPS (Postler et al., 2021).

Centrando la atención en la evaluación de la expresión de marcadores relacionados con la autofagia en el VAT, se observó una reducción general de esta vía en los pacientes tratados con metformina; en particular, se detectaron menores niveles de expresión proteica de ATG5 y BECLIN1 y niveles de p62 significativamente mayores en comparación con los pacientes con obesidad metabólicamente sana. Se sabe que ATG5 y BECLIN1 están regulados por la metformina, a través de la inducción de la autofagia mediada por AMPK (Lu et al., 2021). En cambio, se conoce que la autofagia puede

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

desempeñar distintos papeles en función de la célula a estudiar. Por una parte, en los PBMC de pacientes con T2D tratados con metformina se detecta un descenso de *beclin1* y *atg7* respecto a pacientes sin tratamiento con metformina (Diaz-Morales et al., 2018). Por otra parte, en un modelo de ratón alimentado con HFD, la metformina indujo un aumento de LC3 y AMPK en el hígado, mientras que LC3 descendió en el AT del epidídimo (Li et al., 2017).

Varios estudios han constatado una disonancia entre la autofagia y la activación del inflammasoma en los macrófagos, lo que sugiere que la primera ruta acompaña a la segunda como mecanismo autorregulador para frenar su función proinflamatoria (Shi et al., 2012; Zhong et al., 2016). En este sentido, observamos asociaciones entre distintos marcadores de estas rutas, donde NF- κ B, NLRP3, ASC, y MCP1 se correlacionaron positivamente con ATG5 y BECLIN1, mientras que la IL1 β sistémica mostró una asociación positiva con ATG5 y una asociación negativa con p62, que se degrada constantemente durante el proceso autofágico (Bjørkøy et al., 2009). Este hecho avala una asociación positiva entre mediadores inflamatorios, la activación del complejo del inflammasoma y la autofagia.

Por último, también se evaluó el marcador proapoptótico CHOP, que mostró un descenso significativo en el grupo de pacientes tratados con metformina, en consonancia con una mejor funcionalidad del AT. La metformina es capaz de inhibir la respuesta al estrés de ER en células hepáticas tratadas con palmitato a través de la reducción de la expresión de CHOP (Kim et al., 2010). En células de islotes pancreáticos humanos cultivadas con palmitato, la metformina mejoró la disfunción de las células β inducida por glucotoxicidad y lipotoxicidad a través del descenso significativo de CHOP (Cen et al., 2018). Cuando evaluamos la expresión de esta proteína en nuestra cohorte de pacientes, observamos una correlación positiva con ATG5, BECLIN1 y los mediadores del complejo del inflammasoma NF- κ B, NLRP3 e IL1 β sérica.

En el presente estudio, se demuestra que los pacientes con obesidad y T2D tratados con metformina presentan un estado inmunoinflamatorio más favorable que los pacientes con obesidad metabólicamente sana: a saber, una reducción de la producción de ROS de los leucocitos, MPO, citoquinas y mediadores inflamatorios sistémicos (CRP, TNF α , IL6, IL1 β , IL18), activación del complejo inflammasoma (NF- κ B, NLRP3, ASC, MCP1), autofagia (ATG5, BECLIN1) y el marcador de apoptosis CHOP, y en el aumento de la

expresión de la proteína p62 en el VAT. Se podría considerar que los pacientes con obesidad metabólicamente sana, a pesar de no presentar factores de riesgo cardiovascular, experimentan un mayor nivel de estrés oxidativo, liberación de citoquinas y activación de rutas inflamatorias, que finalmente activan y exacerbaban la inducción de marcadores de autofagia y proapoptóticos.

5. CONCLUSIONES

1. La pérdida de peso inducida por RYGB se asocia con una reducción en los parámetros de estrés oxidativo en leucocitos de pacientes con obesidad y con una mejoría de la disfunción endotelial. Estas respuestas están mediadas por un descenso de especies prooxidantes y un aumento de las defensas antioxidantes, además de una reducción de las interacciones leucocito-endotelio, moléculas de adhesión y una mejora del perfil lipídico proaterogénico. Estos hallazgos profundizan en el entendimiento de los mecanismos que subyacen a la reducción del riesgo cardiovascular asociado al desarrollo de aterosclerosis en los pacientes que se someten a la cirugía de RYGB.
2. La cirugía de RYGB induce un aumento del contenido y activación de AMPK que se asocia a la atenuación de la activación inflamatoria, del estrés de ER crónico y de los marcadores de apoptosis en los PBMC de los pacientes al año de la intervención. Además, evidenciamos una activación de los mecanismos de reciclaje celular a través del aumento de marcadores de autofagia y mitofagia. Estos resultados sugieren que la RYGB podría ser capaz de inducir respuestas adaptativas orientadas hacia la recuperación parcial de la homeostasis celular en los leucocitos, con potenciales efectos sistémicos sobre la inflamación y la IR.
3. Considerando exclusivamente al género femenino, la cirugía de RYGB induce una mejoría de la función mitocondrial además de una reducción de los parámetros inflamatorios y un aumento de marcadores de biogénesis y dinámica mitocondrial en los PBMC de las pacientes al año de la intervención. La regulación del metabolismo mitocondrial asociado a la pérdida de peso mediada por RYGB podría contribuir a la mejoría de los parámetros clínicos y de la IR.
4. La metformina modula la activación del complejo del inflamasoma NLRP3 y la autofagia en el VAT de pacientes con obesidad y T2D. Además, estos pacientes presentan un mejor perfil inflamatorio sistémico y una reducción de mtROS en los PBMC respecto a los pacientes con obesidad metabólicamente sana. Por lo tanto, se postula que en los pacientes con obesidad metabólicamente sana podría subyacer un riesgo cardiometabólico a pesar del fenotipo protector que evidencia su perfil clínico.

CONCLUSIONS

1. RYGB-induced weight loss is associated with a reduction in oxidative stress parameters in leukocytes from obese patients and with an improvement in endothelial dysfunction. These responses are mediated by a decrease in prooxidant species and an increase in antioxidant defenses, in addition to a reduction in leukocyte-endothelium interactions, adhesion molecules and an improvement in the proatherogenic lipid profile. These findings deepen the understanding of the mechanisms underlying the reduction of cardiovascular risk associated with the development of atherosclerosis in patients undergoing RYGB surgery.
2. RYGB surgery induces an increase in AMPK content and activation that is associated with attenuation of inflammatory activation, chronic ER stress and apoptosis markers in patients' PBMCs at one year post intervention. In addition, we observe an activation of cellular recycling mechanisms through increased markers of autophagy and mitophagy. These results suggest that RYGB induces adaptive responses oriented towards partial recovery of cellular homeostasis in leukocytes, having the potential to exert systemic effects on inflammation and IR.
3. When we consider female gender exclusively, RYGB surgery induces an improvement of mitochondrial function in addition to a reduction of inflammatory parameters and an increase of markers of biogenesis and mitochondrial dynamics in PBMCs one year after the intervention. The regulation of mitochondrial metabolism associated with RYGB-mediated weight loss may contribute to the improvement of clinical parameters and IR.
4. Metformin modulates NLRP3 inflammasome complex activation and autophagy in the VAT of subjects with obesity and T2D. Furthermore, these patients present a better systemic inflammatory profile and a reduction of mtROS in PBMCs compared to metabolically healthy patients with obesity. Therefore, we postulate that there is a cardiometabolic risk in metabolically healthy obese subjects despite the protective phenotype related with their clinical profile.

BIBLIOGRAFÍA

- Abais JM, Xia M, Zhang Y, Boini KM, Li PL. Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector?. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22:1111–29. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5994>.
- Abdelaal M, le Roux CW, Docherty NG. Morbidity and mortality associated with obesity. *Ann Transl Med*. 2017;5(7):161. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.03.107>.
- Ahmed AR, Rickards G, Coniglio D, Xia Y, Johnson J, Boss T, et al. Laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and its early effect on blood pressure. *Obes Surg*. 2009;19(7):845–9. <https://doi.org/10.1007/s11695-008-9671-z>.
- Ahmed B, Sultana R, Greene MW. Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomed Pharmacother*. 2021;137:111315. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111315>.
- Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation task force on epidemiology and prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120(16):1640–5. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644>.
- Alers S, Loffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol*. 2012;32(1):2–11. <https://doi.org/10.1128/MCB.06159-11>.
- Algoblan A, Alalfi M, Khan M. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2014;7:587-91. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S67400>.
- Alhusaini S, McGee K, Schisano B, Harte A, McTernan P, Kumar S, et al. Lipopolysaccharide, high glucose and saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress in cultured primary human adipocytes: Salicylate alleviates this stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;397(3):472–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.05.138>.
- Alizadeh S, Mazloom H, Sadeghi A, Emamgholipour S, Golestani A, Noorbakhsh F, et al. Evidence for the link between defective autophagy and inflammation in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetic patients. *J Physiol Biochem*. 2018;74(3):369–79. <https://doi.org/10.1007/s13105-018-0624-2>.
- Aly S, Hachey K, Pernar LIM. Gender disparities in weight loss surgery. *Mini-invasive Surg*. 2020;4:21. <https://doi.org/10.20517/2574-1225.2019.57>.
- American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: *standards of medical care in diabetes—2018*. *Diabetes Care*. 2018;41:S13–27.
- Anderson NR, Buffone A, Hammer DA. T lymphocytes migrate upstream after completing the leukocyte adhesion cascade. *Cell Adh Migr*. 2019;13(1):163–8. <https://doi.org/10.1080/19336918.2019.1587269>.

BIBLIOGRAFÍA

- Andolfi C, Fisichella PM. Epidemiology of obesity and associated comorbidities. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2018;28(8):919–24. <https://doi.org/10.1089/lap.2018.0380>.
- Angelini G, Castagneto Gissey L, Del Corpo G, Giordano C, Cerbelli B, Severino A, et al. New insight into the mechanisms of ectopic fat deposition improvement after bariatric surgery. *Sci Rep*. 2019;9(1):17315. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53702-4>.
- Angrisani L, Santonicola A, Iovino P, Vitiello A, Zundel N, Buchwald H, et al. Bariatric surgery and endoluminal procedures: IFSO worldwide survey 2014. *Obes Surg*. 2017;27(9):2279–89. <https://doi.org/10.1007/s11695-017-2666-x>.
- Antoun G, McMurray F, Thrush AB, Patten DA, Peixoto AC, Slack RS, et al. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation and supercomplex assembly in rectus abdominis muscle of diabetic obese individuals. *Diabetologia*. 2015;58(12):2861–6. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3772-8>.
- Asztalos BF, Swarbrick MM, Schaefer EJ, Dallal GE, Horvath KV, Ai M, et al. Effects of weight loss, induced by gastric bypass surgery, on HDL remodeling in obese women. *J Lipid Res*. 2010;51(8):2405–12. <https://doi.org/10.1194/jlr.P900015>.
- Azekoshi Y, Yasu T, Watanabe S, Tagawa T, Abe S, Yamakawa K, et al. Free fatty acid causes leukocyte activation and resultant endothelial dysfunction through enhanced angiotensin II production in mononuclear and polymorphonuclear cells. *Hypertension*. 2010;56(1):136–42. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.153056>.
- Badimon L, Peña E, Arderiu G, Padró T, Slevin M, Vilahur G, et al. C-reactive protein in atherothrombosis and angiogenesis. *Front Immunol*. 2018;9:430. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00430>.
- Barhouch AS, Padoin AV, Casagrande DS, Chatkin R, Süssenbach SP, Pufal MA, et al. Predictors of excess weight loss in obese patients after gastric bypass: a 60-month follow-up. *Obes Surg*. 2016;26(6):1178–85. <https://doi.org/10.1007/s11695-015-1911-4>.
- Benigni A, Cassis P, Remuzzi G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol Med*. 2010;2(7):247–57. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000080>.
- Benotti PN, Wood GC, Carey DJ, Mehra VC, Mirshahi T, Lent MR, et al. Gastric bypass surgery produces a durable reduction in cardiovascular disease risk factors and reduces the long-term risks of congestive heart failure. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(5):e005126. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.005126>.
- Bessesen DH, Van Gaal LF. Progress and challenges in anti-obesity pharmacotherapy. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6(3):237–48. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(17\)30236-X](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(17)30236-X).

- Bevilacqua L, Ramsey JJ, Hagopian K, Weindruch R, Harper M-E. Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;286(5):E852–61. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00367.2003>.
- Bhansali S, Bhansali A, Walia R, Saikia UN, Dhawan V. Alterations in mitochondrial oxidative stress and mitophagy in subjects with prediabetes and type 2 diabetes mellitus. *Front Endocrinol.* 2017;8:347. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00347>.
- Bhaskaran K, dos-Santos-Silva I, Leon DA, Douglas IJ, Smeeth L. Association of BMI with overall and cause-specific mortality: a population-based cohort study of 3·6 million adults in the UK. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6(12):944–53. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(18\)30288-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(18)30288-2).
- Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(5):1066–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010>.
- Biasizzo M, Kopitar-Jerala N. Interplay between NLRP3 inflammasome and autophagy. *Front Immunol.* 2020;11:591803. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.591803>.
- Bielinski SJ, Berardi C, Decker PA, Kirsch PS, Larson NB, Pankow JS, et al. P-selectin and subclinical and clinical atherosclerosis: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis.* 2015;240(1):3–9. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.02.036>.
- Billeter AT, Vittas S, Israel B, Scheurlen KM, Hidmark A, Fleming TH, et al. Gastric bypass simultaneously improves adipose tissue function and insulin-dependent type 2 diabetes mellitus. *Langenbecks Arch Surg.* 2017;402(6):901–10. <https://doi.org/10.1007/s00423-017-1601-x>.
- Bjørkøy G, Lamark T, Pankiv S, Øvervatn A, Brech A, Johansen T. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol.* 2009;452:181–97. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03612-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03612-4).
- Bleier L, Wittig I, Heide H, Steger M, Brandt U, Dröse S. Generator-specific targets of mitochondrial reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2015;78:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.511>.
- Blüher M. Metabolically healthy obesity. *Endocr Rev.* 2020;41(3):bnaa004. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa004>.
- Boden G, Duan X, Homko C, Molina EJ, Song W, Perez O, et al. Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes.* 2008;57(9):2438–44. <https://doi.org/10.2337/db08-0604>.

BIBLIOGRAFÍA

- Borgeraas H, Hofsø D, Hertel JK, Hjelmesæth J. Comparison of the effect of Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy on remission of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Obes Rev.* 2020;21(6):e13011. <https://doi.org/10.1111/obr.13011>.
- Bories G, Caiazzo R, Derudas B, Copin C, Raverdy V, Pigeyre M, et al. Impaired alternative macrophage differentiation of peripheral blood mononuclear cells from obese subjects. *Diab Vasc Dis Res.* 2012;9(3):189–95. <https://doi.org/10.1177/1479164111430242>.
- Bošanská L, Michalský D, Lacinová Z, Dostálová I, Bártlová M, Haluzíková D, et al. The influence of obesity and different fat depots on adipose tissue gene expression and protein levels of cell adhesion molecules. *Physiol Res.* 2010;59(1):79–88. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931705>.
- Boß M, Newbatt Y, Gupta S, Collins I, Brüne B, Namgaladze D. AMPK-independent inhibition of human macrophage ER stress response by AICAR. *Sci Rep.* 2016;6:32111. <https://doi.org/10.1038/srep32111>.
- Bournat JC, Brown CW. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010;17(5):446–52. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e32833c3026>.
- Breining P, Jensen JB, Sundelin EI, Gormsen LC, Jakobsen S, Busk M, et al. Metformin targets brown adipose tissue in vivo and reduces oxygen consumption in vitro. *Diabetes Obes Metab.* 2018;20(9):2264–73. <https://doi.org/10.1111/dom.13362>.
- Brennan M-L, Hazen SL. Emerging role of myeloperoxidase and oxidant stress markers in cardiovascular risk assessment. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14(4):353–9. <https://doi.org/10.1097/00041433-200308000-00003>.
- Bronner DN, Abuaita BH, Chen X, Fitzgerald KA, Nuñez G, He Y, et al. Endoplasmic reticulum stress activates the inflammasome via NLRP3- and caspase-2-driven mitochondrial damage. *Immunity.* 2015;43(3):451–62. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.008>.
- Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(4):2282–9. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1696>.
- Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrback K, 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>.
- Bułdak Ł, Łabuzek K, Bułdak RJ, Kozłowski M, Machnik G, Liber S, et al. Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human

- monocytes/macrophages. *Pharmacol Rep.* 2014;66(3):418–29. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2013.11.008>.
- Burman C, Ktistakis NT. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Lett.* 2010;584(7):1302–12. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.011>.
- Caixàs A, Villaró M, Arraiza C, Montalvá J-C, Lecube A, Fernández-García J-M, et al. SEEDO-SEMERGEN consensus document on continuous care of obesity between primary care and specialist Hospital units 2019. *Med Clin (Barc.)*. 2020;155(6):267.e1-267.e11. <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2019.10.010>.
- Camastra S, Gastaldelli A, Mari A, Bonuccelli S, Scartabelli G, Frascerra S, et al. Early and longer term effects of gastric bypass surgery on tissue-specific insulin sensitivity and beta cell function in morbidly obese patients with and without type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2011;54(8):2093–102. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2193-6>.
- Campia U, Tesauro M, Cardillo C. Human obesity and endothelium-dependent responsiveness: obesity and endothelium. *Br J Pharmacol.* 2012;165(3):561–73. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01661.x>.
- Canello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes.* 2005;54(8):2277–86. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.8.2277>.
- Cao H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *J Endocrinol.* 2014;220(2):T47–59. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0339>.
- Cao SS, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxid Redox Signal.* 2014;21(3):396–413. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5851>.
- Carmona-Maurici J, Amigó N, Cuello E, Bermúdez M, Baena-Fusteguerras JA, Peinado-Onsurbe J, et al. Bariatric surgery decreases oxidative stress and protein glycosylation in patients with morbid obesity. *Eur J Clin Invest.* 2020;50(11):e13320. <https://doi.org/10.1111/eci.13320>.
- Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(7):1716–23. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.7.1716>.
- Carson JL, Ruddy ME, Duff AE, Holmes NJ, Cody RP, Brolin RE. The effect of gastric bypass surgery on hypertension in morbidly obese patients. *Arch Intern Med.* 1994;154(2):193–200. <https://doi.org/10.1001/archinte.1994.00420020107012>.
- Castoldi A, Naffah de Souza C, Câmara NOS, Moraes-Vieira PM. The macrophage switch in obesity development. *Front Immunol.* 2016;6:637. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00637>.

BIBLIOGRAFÍA

- Cazzo E, Gestic MA, Utrini MP, Machado RR, Geloneze B, Pareja JC, et al. Impact of Roux-en-Y gastric bypass on metabolic syndrome and insulin resistance parameters. *Diabetes Technol Ther.* 2014;16(4):262–5. <https://doi.org/10.1089/dia.2013.0249>.
- Cen J, Sargsyan E, Forslund A, Bergsten P. Mechanisms of beneficial effects of metformin on fatty acid-treated human islets. *J Mol Endocrinol.* 2018;61(3):91–9. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0304>.
- Cerf ME. Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Front Endocrinol.* 2013;4:37. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00037>.
- Cerhan JR, Moore SC, Jacobs EJ, Kitahara CM, Rosenberg PS, Adami H-O, et al. A pooled analysis of waist circumference and mortality in 650,000 adults. *Mayo Clin Proc* 2014;89(3):335–45. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.11.011>.
- Chait A, den Hartigh LJ. Adipose tissue distribution, inflammation and its metabolic consequences, including diabetes and cardiovascular disease. *Front Cardiovasc Med.* 2020;7:22. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00022>.
- Chatterjee T, Pattanayak R, Ukil A, Chowdhury S, Bhattacharyya M. Autophagy protects peripheral blood mononuclear cells against inflammation, oxidative and nitrosative stress in diabetic dyslipidemia. *Free Radic Biol Med.* 2019;143:309–23. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.07.034>.
- Chatzigeorgiou A, Karalis KP, Bornstein SR, Chavakis T. Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation. *Diabetologia.* 2012;55(10):2583–92. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2607-0>.
- Chen X-H, Zhao Y-P, Xue M, Ji C-B, Gao C-L, Zhu J-G, et al. TNF-alpha induces mitochondrial dysfunction in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;328(1-2):63–9. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.07.005>.
- Cho GJ, Yoo HJ, Hwang SY, Choi J, Lee K-M, Choi KM, et al. Differential relationship between waist circumference and mortality according to age, sex, and body mass index in Koreans with age of 30–90 years; a nationwide health insurance database study. *BMC Med.* 2018;16(1):131. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1114-7>.
- Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front Endocrinol.* 2016;7:30. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00030>.
- Choi SH, Ginsberg HN. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab.* 2011;22(9):353–63. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.04.007>.
- Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Skoumas I, Papademetriou L, Economou M, et al. The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: The ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007;17(8):590–7. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2006.05.007>.

- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.* 2005;46(11):2347–55. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500294-JLR200>.
- Civitarese AE, Carling S, Heilbronn LK, Hulver MH, Ukropcova B, Deutsch WA, et al. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med.* 2007;4(3):e76. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040076>.
- Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mo Med.* 2012;18(1):59–68. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.07.010>.
- Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T. Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;13(1):7–12. <https://doi.org/10.1038/nrm3249>.
- Coen PM, Menshikova EV, Distefano G, Zheng D, Tanner CJ, Standley RA, et al. Exercise and weight loss improve muscle mitochondrial respiration, lipid partitioning, and insulin sensitivity after gastric bypass surgery. *Diabetes.* 2015;64(11):3737–50. <https://doi.org/10.2337/db15-0809>.
- Coimbra S, Reis F, Ferreira C, Nunes S, Viana S, Catarino A, et al. Weight loss achieved by bariatric surgery modifies high-density lipoprotein subfractions and low-density lipoprotein oxidation towards atheroprotection. *Clin Biochem.* 2019;63:46–53. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.10.007>.
- Čolak E, Pap D, Nikolić L, Vicković S. The impact of obesity to antioxidant defense parameters in adolescents with increased cardiovascular risk. *J Med Biochem.* 2020;0. <https://doi.org/10.2478/jomb-2019-0051>.
- Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(6):1607–38. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3522>.
- Costa A, Reynés B, Konieczna J, Martín M, Fiol M, Palou A, et al. Use of human PBMC to analyse the impact of obesity on lipid metabolism and metabolic status: a proof-of-concept pilot study. *Sci Rep.* 2021;11(1):18329. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96981-6>.
- Couillard C, Ruel G, Archer WR, Pomerleau S, Bergeron J, Couture P, et al. Circulating levels of oxidative stress markers and endothelial adhesion molecules in men with abdominal obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(12):6454–9. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-2438>.
- Csányi G, Taylor WR, Pagano PJ. NOX and inflammation in the vascular adventitia. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(9):1254–66. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.022>.

BIBLIOGRAFÍA

- Cui C, Chen S, Qiao J, Qing L, Wang L, He T, et al. PINK1-Parkin alleviates metabolic stress induced by obesity in adipose tissue and in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;498(3):445–52. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.199>.
- Dallal RM, Leighton J, Trang A. Analysis of leukopenia and anemia after gastric bypass surgery. *Surg Obes Relat Dis.* 2012;8(2):164–8. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2011.02.006>.
- Dandona P, Mohanty P, Ghanim H, Aljada A, Browne R, Hamouda W, et al. The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(1):355–62. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.1.7150>.
- Delves PJ, Roitt IM, editors. *Roitt's essential immunology*. 11. ed., 3. [Reprint]. Malden, Mass: Blackwell Science; 2008.
- Di Gregorio GB, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, Lu T, Miles LM, et al. Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues. *Diabetes.* 2005;54(8):2305–13. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.8.2305>.
- Di Lorenzo N, Antoniou SA, Batterham RL, Busetto L, Godoroja D, Iossa A, et al. Clinical practice guidelines of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES) on bariatric surgery: update 2020 endorsed by IFSO-EC, EASO and ESPCOP. *Surg Endosc.* 2020;34(6):2332–58. <https://doi.org/10.1007/s00464-020-07555-y>.
- Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1–44. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>.
- Diaz-Morales N, Iannantuoni F, Escribano-Lopez I, Bañuls C, Rovira-Llopis S, Sola E, et al. Does metformin modulate endoplasmic reticulum stress and autophagy in type 2 diabetic peripheral blood mononuclear cells? *Antioxid Redox Signal.* 2018;28(17):1562–9. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7409>.
- Diaz-Morales N, Rovira-Llopis S, Bañuls C, Escribano-Lopez I, de Marañon AM, Lopez-Domenech S, et al. Are mitochondrial fusion and fission impaired in leukocytes of type 2 diabetic patients? *Antioxid Redox Signal.* 2016;25(2):108–15. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6707>.
- Diaz-Morales N, Rovira-Llopis S, Bañuls C, Lopez-Domenech S, Escribano-Lopez I, Veses S, et al. Does metformin protect diabetic patients from oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions? *Antioxid Redox Signal.* 2017;27(17):1439–45. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7122>.
- Díaz-Rodríguez M, Pérez-Muñoz C, Carretero-Bravo J, Ruíz-Ruíz C, Serrano-Santamaría M, Ferriz-Mas BC. Early risk factors for obesity in the first 1000

- days—relationship with body fat and BMI at 2 years. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(15):8179. <https://doi.org/10.3390/ijerph18158179>.
- Dixon JB, McPhail T, O'Brien PE. Minimal reporting requirements for weight loss: current methods not ideal. *Obes Surg*. 2005;15(7):1034–9. <https://doi.org/10.1381/0960892054621053>.
- Donath MY, Størling J, Berchtold LA, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T. Cytokines and β -cell biology: from concept to clinical translation. *Endocr Rev*. 2008;29(3):334–50. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0033>.
- Duffaut C, Zakaroff-Girard A, Bourlier V, Decaunes P, Maumus M, Chiotasso P, et al. Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(10):1608–14. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.192583>.
- Eckel RH, Alberti K, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2010;375(9710):181–3. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61794-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61794-3).
- Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*. 2011;331(6016):456–61. <https://doi.org/10.1126/science.1196371>.
- Ellulu MS, Patimah I, Khaza'ai H, Rahmat A, Abed Y. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Arch Med Sci*. 2017;13(4):851–63. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58928>.
- Espallardo O, Busutil R, Torres A, Zozaya N, Villoro R, Hidalgo-Vega Á. The impact of severe obesity on healthcare resource utilisation in Spain. *Obes Surg*. 2017;27(8):2058–66. <https://doi.org/10.1007/s11695-017-2596-7>.
- Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;105(2):141–50. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.04.006>.
- Esser N, L'homme L, De Roover A, Kohnen L, Scheen AJ, Moutschen M, et al. Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue. *Diabetologia*. 2013;56(11):2487–97. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-3023-9>.
- European Medicines Agency. Guideline on clinical evaluation of medicinal products used in weight management. EMA 2016 [cited 2022 Jun 30]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-evaluation-medicinal-products-used-weight-management-revision-1_en.pdf.
- Evia-Viscarra ML, Rodea-Montero ER, Apolinar-Jiménez E, Muñoz-Noriega N, García-Morales LM, Leños-Pérez C, et al. The effects of metformin on inflammatory

BIBLIOGRAFÍA

- mediators in obese adolescents with insulin resistance: controlled randomized clinical trial. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2012;25(1-2):41–9. <https://doi.org/10.1515/jpem-2011-0469>.
- Feingold KR. Introduction to lipids and lipoproteins. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, et al., editors. *Endotext*, South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
- Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci.* 2011;12(5):3117–32. <https://doi.org/10.3390/ijms12053117>.
- Fernstrom JD. Long-term changes in blood pressure in extremely obese patients who have undergone bariatric surgery. *Arch Surg.* 2006;141(3):276–83. <https://doi.org/10.1001/archsurg.141.3.276>.
- Ferraz-Bannitz R, Welendorf CR, Coelho PO, Salgado W, Nonino CB, Beraldo RA, et al. Bariatric surgery can acutely modulate ER-stress and inflammation on subcutaneous adipose tissue in non-diabetic patients with obesity. *Diabetol Metab Syndr.* 2021;13(1):19. <https://doi.org/10.1186/s13098-021-00623-w>.
- Ferretti G, Bacchetti T, Moroni C, Savino S, Liuzzi A, Balzola F, et al. Paraoxonase activity in high-density lipoproteins: a comparison between healthy and obese females. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(3):1728–33. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0486>.
- Fidan E, Onder Ersoz H, Yilmaz M, Yilmaz H, Kocak M, Karahan C, et al. The effects of rosiglitazone and metformin on inflammation and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* 2011;48(4):297–302. <https://doi.org/10.1007/s00592-011-0276-y>.
- Foretz M, Guigas B, Viollet B. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2019;15(10):569–89. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0242-2>.
- Forouhi N, Sattar N, McKeigue P. Relation of C-reactive protein to body fat distribution and features of the metabolic syndrome in Europeans and South Asians. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25(9):1327–31. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801723>.
- Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature.* 2014;505(7483):335–43. <https://doi.org/10.1038/nature12985>.
- Fritzen AM, Lundsgaard A-M, Jordy AB, Poulsen SK, Stender S, Pilegaard H, et al. New nordic diet-induced weight loss is accompanied by changes in metabolism and AMPK signaling in adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(9):3509–19. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2079>.

- Fruh SM. Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. *J Am Assoc Nurse Pract.* 2017;29(S1):S3–14. <https://doi.org/10.1002/2327-6924.12510>.
- Galani C, Schneider H. Prevention and treatment of obesity with lifestyle interventions: review and meta-analysis. *Int J Public Health.* 2007;52(6):348–59. <https://doi.org/10.1007/s00038-007-7015-8>.
- Gao AW, Cantó C, Houtkooper RH. Mitochondrial response to nutrient availability and its role in metabolic disease. *EMBO Mol Med.* 2014;6(5):580–9. <https://doi.org/10.1002/emmm.201303782>.
- Garcia D, Shaw RJ. AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance. *Mol Cell.* 2017;66(6):789–800. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.032>.
- García-Marirrodiga I, Amaya-Romero C, Ruiz-Díaz GP, Fernández S, Ballesta-López C, Pou JM, et al. Evolution of lipid profiles after bariatric surgery. *Obes Surg.* 2012;22(4):609–16. <https://doi.org/10.1007/s11695-011-0534-7>.
- García-Prieto CF, Gil-Ortega M, Vega-Martín E, Ramiro-Cortijo D, Martín-Ramos M, Bordiú E, et al. Beneficial effect of bariatric surgery on abnormal MMP-9 and AMPK activities: potential markers of obesity-related CV risk. *Front Physiol.* 2019;10:553. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00553>.
- Gastaldi G, Russell A, Golay A, Giacobino J-P, Habicht F, Barthassat V, et al. Upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator gene (PGC1A) during weight loss is related to insulin sensitivity but not to energy expenditure. *Diabetologia.* 2007;50(11):2348–55. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0782-1>.
- Gauthier M-S, O'Brien EL, Bigornia S, Mott M, Cacicedo JM, Xu XJ, et al. Decreased AMP-activated protein kinase activity is associated with increased inflammation in visceral adipose tissue and with whole-body insulin resistance in morbidly obese humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;404(1):382–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.127>.
- Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim Y-C, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature.* 1999;398(6729):718–23. <https://doi.org/10.1038/19546>.
- Ghavimi H, Sheidaei S, Vaez H, Zolali E, Asgharian P, Hamishehkar H. Metformin-attenuated sepsis-induced oxidative damages: a novel role for metformin. *Iran J Basic Med Sci.* 2018;21(5):469–75. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2018.24610.6126>.
- Ghosh S, Dent R, Harper ME, Stuart J, McPherson R. Blood gene expression reveal pathway differences between diet-sensitive and resistant obese subjects prior to

BIBLIOGRAFÍA

- caloric restriction. *Obesity*. 2011;19(2):457–63. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.209>.
- Gianotti TF, Sookoian S, Dieuzeide G, García SI, Gemma C, González CD, et al. A decreased mitochondrial DNA content is related to insulin resistance in adolescents. *Obesity*. 2008;16(7):1591–5. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.253>.
- Gidlöf O, van der Brug M, Öhman J, Gilje P, Olde B, Wahlestedt C, et al. Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression. *Blood*. 2013;121(19):3908–17. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-461798>.
- Ginsberg HN, MacCallum PR. The obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus pandemic: part I. increased cardiovascular disease risk and the importance of atherogenic dyslipidemia in persons with the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *J Cardiometab Syndr*. 2009;4(2):113–9. <https://doi.org/10.1111/j.1559-4572.2008.00044.x>.
- Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010;221(1):3–12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>.
- Gómez-Abril SÁ, Morillas-Ariño C, Ponce-Marco JL, Torres-Sánchez T, Delgado-Gomis F, Hernández-Mijares A, et al. Short- and long-term effects of weight loss on the complement component C3 after laparoscopic gastric bypass in obese patients. *Obes Surg*. 2016;26(11):2756–63. <https://doi.org/10.1007/s11695-016-2195-z>.
- González-Muniesa P, Martínez-González M-A, Hu FB, Després J-P, Matsuzawa Y, Loos RJF, et al. Obesity. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17034. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.34>.
- González-Polo RA, Pizarro-Estrella E, Yakhine-Diop SMS, Rodríguez-Arribas M, Gómez-Sánchez R, Casado-Naranjo I, et al. The Basics of Autophagy. In: Maiuri MC, De Stefano D, editors. *Autophagy Networks in Inflammation*, Cham: Springer International Publishing; 2016, p. 3–20. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30079-5_1.
- Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:415–45. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101322>.
- Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS, et al. Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes*. 2009;58(3):693–700. <https://doi.org/10.2337/db08-1220>.
- Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: A systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 2009;9:88. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-9-88>.

- Gureev AP, Shaforostova EA, Popov VN. Regulation of mitochondrial biogenesis as a way for active longevity: interaction between the Nrf2 and PGC-1 α signaling pathways. *Front Genet.* 2019;10:435. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00435>.
- Ha J, Guan K-L, Kim J. AMPK and autophagy in glucose/glycogen metabolism. *Mol Aspects Med.* 2015;46:46–62. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2015.08.002>.
- Hahn WS, Kuzmicic J, Burrill JS, Donoghue MA, Foncea R, Jensen MD, et al. Proinflammatory cytokines differentially regulate adipocyte mitochondrial metabolism, oxidative stress, and dynamics. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;306(9):E1033–45. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00422.2013>.
- Hammarstedt A, Gogg S, Hedjazifar S, Nerstedt A, Smith U. Impaired adipogenesis and dysfunctional adipose tissue in human hypertrophic obesity. *Physiol Rev.* 2018;98(4):1911–41. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2017>.
- Hankinson AL, Daviglius ML, Bouchard C, Carnethon M, Lewis CE, Schreiner PJ, et al. Maintaining a high physical activity level over 20 years and weight gain. *JAMA.* 2010;304(23):2603–10. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1843>.
- Hansen M, Lund MT, Gregers E, Kraunsøe R, Van Hall G, Helge JW, et al. Adipose tissue mitochondrial respiration and lipolysis before and after a weight loss by diet and RYGB: adipose tissue respiration in obesity and T2DM. *Obesity.* 2015;23(10):2022–9. <https://doi.org/10.1002/oby.21223>.
- Hanusch-Enserer U, Cauza E, Spak M, Dunky A, Rosen HR, Wolf H, et al. Acute-phase response and immunological markers in morbid obese patients and patients following adjustable gastric banding. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27(3):355–61. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802240>.
- Hartwig J, Loebel M, Steiner S, Bauer S, Karadeniz Z, Roeger C, et al. Metformin attenuates ROS via FOXO3 activation in immune cells. *Front Immunol.* 2021;12:581799. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.581799>.
- Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, Kasai K. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor κ B activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension.* 2006;47(6):1183–8. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000221429.94591.72>.
- Heffron SP, Marier C, Parikh M, Fisher EA, Berger JS. Severe obesity and bariatric surgery alter the platelet mRNA profile. *Platelets.* 2019;30(8):967–74. <https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1536261>.
- Heinonen S, Buzkova J, Muniandy M, Kaksonen R, Ollikainen M, Ismail K, et al. Impaired mitochondrial biogenesis in adipose tissue in acquired obesity. *Diabetes.* 2015;64(9):3135–45. <https://doi.org/10.2337/db14-1937>.
- Henrichot E, Juge-Aubry CE, Pernin A, Pache J-C, Velebit V, Dayer J-M, et al. Production of chemokines by perivascular adipose tissue: a role in the

BIBLIOGRAFÍA

- pathogenesis of atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(12):2594–9. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000188508.40052.35>.
- de Heredia FP, Gómez-Martínez S, Marcos A. Obesity, inflammation and the immune system. *Proc Nutr Soc.* 2012;71(2):332–8. <https://doi.org/10.1017/S0029665112000092>.
- Herishanu Y, Rogowski O, Polliack A, Marilus R. Leukocytosis in obese individuals: possible link in patients with unexplained persistent neutrophilia. *Eur J Haematol.* 2006;76(6):516–20. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2006.00658.x>.
- Hernandez-Mijares A, Rocha M, Rovira-Llopis S, Bañuls C, Bellod L, de Pablo C, et al. Human leukocyte/endothelial cell interactions and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic patients and their association with silent myocardial ischemia. *Diabetes Care.* 2013;36(6):1695–702. <https://doi.org/10.2337/dc12-1224>.
- Høyer-Hansen M, Jäättelä M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ.* 2007;14(9):1576–82. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402200>.
- Hruby A, Hu FB. The epidemiology of obesity: a big picture. *Pharmacoeconomics.* 2015;33(7):673–89. <https://doi.org/10.1007/s40273-014-0243-x>.
- Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(9):1379–86. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00223-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00223-9).
- Iannantuoni F, Diaz-Morales N, Escribano-Lopez I, Sola E, Roldan-Torres I, Apostolova N, et al. Does glycemic control modulate the impairment of NLRP3 inflammasome activation in type 2 diabetes? *Antioxidants Redox Signal.* 2019;30(2):232–40. <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7582>.
- Ivanova EA, Myasoedova VA, Melnichenko AA, Grechko AV, Orekhov AN. Small dense low-density lipoprotein as biomarker for atherosclerotic diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:1–10. <https://doi.org/10.1155/2017/1273042>.
- Jain RK, Munn LL, Fukumura D. Measuring leukocyte-endothelial interactions in mice. *Cold Spring Harb Protoc.* 2013;2013(6):561–3. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot075085>.
- Jansen HJ, van Essen P, Koenen T, Joosten L a. B, Netea MG, Tack CJ, et al. Autophagy activity is up-regulated in adipose tissue of obese individuals and modulates proinflammatory cytokine expression. *Endocrinology.* 2012;153(12):5866–74. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1625>.
- Jing Y, Wu F, Li D, Yang L, Li Q, Li R. Metformin improves obesity-associated inflammation by altering macrophages polarization. *Mol Cell Endocrinol.* 2018;461:256–64. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.09.025>.

- Kang Y-H, Cho M-H, Kim J-Y, Kwon M-S, Peak J-J, Kang S-W, et al. Impaired macrophage autophagy induces systemic insulin resistance in obesity. *Oncotarget*. 2016;7(24):35577–91. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9590>.
- Karkhaneh M, Qorbani M, Mohajeri-Tehrani MR, Hoseini S. Association of serum complement C3 with metabolic syndrome components in normal weight obese women. *J Diabetes Metab Disord*. 2017;16:49. <https://doi.org/10.1186/s40200-017-0330-6>.
- Keaney JF, Larson MG, Vasani RS, Wilson PWF, Lipinska I, Corey D, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(3):434–9. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000058402.34138.11>.
- Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *A J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280(5):E745–51. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.5.E745>.
- Khan A, Alsahtani M, Rahmani A. Myeloperoxidase as an active disease biomarker: recent biochemical and pathological perspectives. *Med Sci*. 2018;6(2):33. <https://doi.org/10.3390/medsci6020033>.
- Kim D-S, Jeong S-K, Kim H-R, Kim Dal-Sik, Chae S-W, Chae H-J. Metformin regulates palmitate-induced apoptosis and ER stress response in HepG2 liver cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2010;32(2):251–7. <https://doi.org/10.3109/08923970903252220>.
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011;13(2):132–41. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>.
- Kirkin V, Lamark T, Sou Y-S, Bjørkøy G, Nunn JL, Bruun J-A, et al. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell*. 2009;33(4):505–16. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.020>.
- Kjellmo CA, Karlsson H, Nestvold TK, Ljunggren S, Cederbrant K, Marcusson-Ståhl M, et al. Bariatric surgery improves lipoprotein profile in morbidly obese patients by reducing LDL cholesterol, apoB, and SAA/PON1 ratio, increasing HDL cholesterol, but has no effect on cholesterol efflux capacity. *J Clin Lipidol*. 2018;12(1):193–202. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2017.10.007>.
- Klinke A, Nussbaum C, Kubala L, Friedrichs K, Rudolph TK, Rudolph V, et al. Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood*. 2011;117(4):1350–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-284513>.
- Klop B, Elte J, Cabezas M. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*. 2013;5(4):1218–40. <https://doi.org/10.3390/nu5041218>.

BIBLIOGRAFÍA

- Koenen TB, Stienstra R, van Tits LJ, Joosten LAB, van Velzen JF, Hijmans A, et al. The inflammasome and caspase-1 activation: a new mechanism underlying increased inflammatory activity in human visceral adipose tissue. *Endocrinology*. 2011;152(10):3769–78. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1480>.
- Koh J-H, Kim Y-W, Seo D-Y, Sohn T-S. Mitochondrial TFAM as a signaling regulator between cellular organelles: a perspective on metabolic diseases. *Diabetes Metab J*. 2021;45(6):853–65. <https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0138>.
- Kontush A. HDL particle number and size as predictors of cardiovascular disease. *Front Pharmacol*. 2015;6:218. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00218>.
- Kopp HP, Kopp CW, Festa A, Krzyzanowska K, Kriwanek S, Minar E, et al. Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(6):1042–7. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000073313.16135.21>.
- Korac B, Kalezic A, Pekovic-Vaughan V, Korac A, Jankovic A. Redox changes in obesity, metabolic syndrome, and diabetes. *Redox Biol*. 2021;42:101887. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101887>.
- Kosacka J, Kern M, Klötting N, Paeschke S, Rudich A, Haim Y, et al. Autophagy in adipose tissue of patients with obesity and type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;409:21–32. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.03.015>.
- Kovsan J, Blüher M, Tarnovscki T, Klötting N, Kirshtein B, Madar L, et al. Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(2):E268-277. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1681>.
- Kristensen MD, Petersen SM, Møller KE, Lund MT, Hansen M, Hansen CN, et al. Obesity leads to impairments in the morphology and organization of human skeletal muscle lipid droplets and mitochondrial networks, which are resolved with gastric bypass surgery-induced improvements in insulin sensitivity. *Acta Physiol*. 2018;224(4):e13100. <https://doi.org/10.1111/apha.13100>.
- Kugler BA, Gundersen AE, Li J, Deng W, Eugene N, Gona PN, et al. Roux-en-Y gastric bypass surgery restores insulin-mediated glucose partitioning and mitochondrial dynamics in primary myotubes from severely obese humans. *Int J Obes*. 2020;44(3):684–96. <https://doi.org/10.1038/s41366-019-0469-y>.
- Kulkarni AS, Brutsaert EF, Anghel V, Zhang K, Bloomgarden N, Pollak M, et al. Metformin regulates metabolic and nonmetabolic pathways in skeletal muscle and subcutaneous adipose tissues of older adults. *Aging Cell*. 2018;17(2):e12723. <https://doi.org/10.1111/acel.12723>.
- Kursawe R, Dixit VD, Scherer PE, Santoro N, Narayan D, Gordillo R, et al. A role of the inflammasome in the low storage capacity of the abdominal subcutaneous adipose tissue in obese adolescents. *Diabetes*. 2016;65(3):610–8. <https://doi.org/10.2337/db15-1478>.

- Kushner RF. Weight loss strategies for treatment of obesity. *Prog Cardiovasc Dis*. 2014;56(4):465–72. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2013.09.005>.
- Kwaifa IK, Bahari H, Yong YK, Noor SM. Endothelial dysfunction in obesity-induced inflammation: molecular mechanisms and clinical implications. *Biomolecules*. 2020;10(2):291. <https://doi.org/10.3390/biom10020291>.
- Lapice E, Maione S, Patti L, Cipriano P, Rivellese AA, Riccardi G, et al. Abdominal adiposity is associated with elevated c-reactive protein independent of BMI in healthy nonobese people. *Diabetes Care*. 2009;32(9):1734–6. <https://doi.org/10.2337/dc09-0176>.
- Larabee CM, Neely OC, Domingos AI. Obesity: a neuroimmunometabolic perspective. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16(1):30–43. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0283-6>.
- Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(6):397–411. <https://doi.org/10.1038/nri3452>.
- Lau DCW, Dhillon B, Yan H, Szmitko 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>.
- Lechner K, McKenzie AL, Kränkel N, Von Schacky C, Worm N, Nixdorff U, et al. High-risk atherosclerosis and metabolic phenotype: the roles of ectopic adiposity, atherogenic dyslipidemia, and inflammation. *Metab Syndr Relat Disord*. 2020;18(4):176–85. <https://doi.org/10.1089/met.2019.0115>.
- Lee M-J, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med*. 2013;34(1):1–11. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.001>.
- Li A, Zhang S, Li J, Liu K, Huang F, Liu B. Metformin and resveratrol inhibit Drp1-mediated mitochondrial fission and prevent ER stress-associated NLRP3 inflammasome activation in the adipose tissue of diabetic mice. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;434:36–47. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.06.008>.
- Li J, Lai D, Wu D. Laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass versus laparoscopic sleeve gastrectomy to treat morbid obesity-related comorbidities: a systematic review and meta-analysis. *Obes Surg*. 2016;26(2):429–42. <https://doi.org/10.1007/s11695-015-1996-9>.
- Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 2008;27(48):6194–206. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.297>.
- Li M, Sharma A, Yin C, Tan X, Xiao Y. Metformin ameliorates hepatic steatosis and improves the induction of autophagy in HFD-induced obese mice. *Mol Med Rep*. 2017;16(1):680–6. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6637>.

BIBLIOGRAFÍA

- Li W, Cao T, Luo C, Cai J, Zhou X, Xiao X, et al. Crosstalk between ER stress, NLRP3 inflammasome, and inflammation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(14):6129–40. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10614-y>.
- Liesa M, Shirihai OS. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab.* 2013;17(4):491–506. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.002>.
- Lin X, Xu Y, Xu J, Pan X, Song X, Shan L, et al. Global burden of noncommunicable disease attributable to high body mass index in 195 countries and territories, 1990–2017. *Endocrine.* 2020;69(2):310–20. <https://doi.org/10.1007/s12020-020-02352-y>.
- Lindhorst A, Raulien N, Wieghofer P, Eilers J, Rossi FMV, Bechmann I, et al. Adipocyte death triggers a pro-inflammatory response and induces metabolic activation of resident macrophages. *Cell Death Dis.* 2021;12(6):579. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03872-9>.
- Liu G, Wu K, Zhang L, Dai J, Huang W, Lin L, et al. Metformin attenuated endotoxin-induced acute myocarditis via activating AMPK. *Int Immunopharmacol.* 2017;47:166–72. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.04.002>.
- Liu J, Shen W, Zhao B, Wang Y, Wertz K, Weber P, et al. Targeting mitochondrial biogenesis for preventing and treating insulin resistance in diabetes and obesity: Hope from natural mitochondrial nutrients. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(14):1343–52. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.06.007>.
- Liu K, Zhao E, Ilyas G, Lalazar G, Lin Y, Haseeb M, et al. Impaired macrophage autophagy increases the immune response in obese mice by promoting proinflammatory macrophage polarization. *Autophagy.* 2015;11(2):271–84. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1009787>.
- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2:17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010;4(8):118-26. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>.
- López-Domènech S, Abad-Jiménez Z, Iannantuoni F, de Marañón AM, Rovira-Llopis S, Morillas C, et al. Moderate weight loss attenuates chronic endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in human obesity. *Mol Metab.* 2019a;19:24–33. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.10.005>.
- López-Domènech S, Bañuls C, Díaz-Morales N, Escribano-López I, Morillas C, Veses S, et al. Obesity impairs leukocyte-endothelium cell interactions and oxidative stress in humans. *Eur J Clin Invest.* 2018;48(8):e12985. <https://doi.org/10.1111/eci.12985>.

- López-Domènech S, Martínez-Herrera M, Abad-Jiménez Z, Morillas C, Escribano-López I, Díaz-Morales N, et al. Dietary weight loss intervention improves subclinical atherosclerosis and oxidative stress markers in leukocytes of obese humans. *Int J Obes*. 2019b;43(11):2200–9. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0309-5>.
- Lu G, Wu Z, Shang J, Xie Z, Chen C, Zhang C. The effects of metformin on autophagy. *Biomed Pharmacother*. 2021;137:111286. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111286>.
- Ma N, Ma R, Tang K, Li X, He B. Roux-en-Y gastric bypass in obese diabetic rats promotes autophagy to improve lipid metabolism through mTOR/p70S6K signaling pathway. *J Diabetes Res*. 2020;2020:1–14. <https://doi.org/10.1155/2020/4326549>.
- Ma Y, Pagoto S, Olendzki B, Hafner A, Perugini R, Mason R, et al. Predictors of weight status following laparoscopic gastric bypass. *Obes Surg*. 2006;16(9):1227–31. <https://doi.org/10.1381/096089206778392284>.
- Magkos F, Mohammed BS, Mittendorfer B. Effect of obesity on the plasma lipoprotein subclass profile in normoglycemic and normolipidemic men and women. *Int J Obes*. 2008;32(11):1655–64. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.164>.
- Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(12):2277–93. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1782>.
- Mancini SJ, White AD, Bijland S, Rutherford C, Graham D, Richter EA, et al. Activation of AMP-activated protein kinase rapidly suppresses multiple pro-inflammatory pathways in adipocytes including IL-1 receptor-associated kinase-4 phosphorylation. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;440:44–56. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.11.010>.
- Manna P, Jain SK. Obesity, oxidative stress, adipose tissue dysfunction, and the associated health risks: causes and therapeutic strategies. *Metab Syndr Relat Disord*. 2015;13(10):423–44. <https://doi.org/10.1089/met.2015.0095>.
- de Marañón AM, Díaz-Pozo P, Canet F, Díaz-Morales N, Abad-Jiménez Z, López-Domènech S, et al. Metformin modulates mitochondrial function and mitophagy in peripheral blood mononuclear cells from type 2 diabetic patients. *Redox Biol*. 2022;53:102342. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102342>.
- Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2018;14:49. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>.
- März W, Kleber ME, Scharnagl H, Speer T, Zewinger S, Ritsch A, et al. HDL cholesterol: reappraisal of its clinical relevance. *Clin Res Cardiol* 2017;106(9):663–75. <https://doi.org/10.1007/s00392-017-1106-1>.

BIBLIOGRAFÍA

- Masumoto J, Dowds TA, Schaner P, Chen FF, Ogura Y, Li M, et al. ASC is an activating adaptor for NF- κ B and caspase-8-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;303(1):69–73. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00309-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00309-7).
- McCafferty BJ, Hill JO, Gunn AJ. Obesity: scope, lifestyle interventions, and medical management. *Tech Vasc Interv Radiol.* 2020;23(1):100653. <https://doi.org/10.1016/j.tvir.2020.100653>.
- de Mello AH, Costa AB, Engel JDG, Rezin GT. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Life Sci.* 2018;192:26–32. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.11.019>.
- Miller MA, Cappuccio FP. Cellular adhesion molecules and their relationship with measures of obesity and metabolic syndrome in a multiethnic population. *Int J Obes.* 2006;30(8):1176–82. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803264>.
- Minervino D, Gumiero D, Nicolazzi MA, Carnicelli A, Fuorlo M, Guidone C, et al. Leukocyte activation in obese patients: effect of bariatric surgery. *Medicine.* 2015;94(40):e1382. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001382>.
- Monte SV, Caruana JA, Ghanim H, Sia CL, Korzeniewski K, Schentag JJ, et al. Reduction in endotoxemia, oxidative and inflammatory stress, and insulin resistance after Roux-en-Y gastric bypass surgery in patients with morbid obesity and type 2 diabetes mellitus. *Surgery.* 2012;151(4):587–93. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2011.09.038>.
- Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators of Inflamm.* 2010;2010:1–10. <https://doi.org/10.1155/2010/289645>.
- Monzo-Beltran L, Vazquez-Tarragón A, Cerdà C, Garcia-Perez P, Iradi A, Sánchez C, et al. One-year follow-up of clinical, metabolic and oxidative stress profile of morbid obese patients after laparoscopic sleeve gastrectomy. 8-oxo-dG as a clinical marker. *Redox Biol.* 2017;12:389–402. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.02.003>.
- Morita N, Hosaka T, Kitahara A, Murashima T, Onuma H, Sumitani Y, et al. Novel mechanisms modulating palmitate-induced inflammatory factors in hypertrophied 3T3-L1 adipocytes by AMPK. *J Diabetes Res.* 2018;2018:9256482. <https://doi.org/10.1155/2018/9256482>.
- Muñoz A, Costa M. Nutritionally mediated oxidative stress and inflammation. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/610950>.
- Nakamura Y, Arakawa H. Discovery of MIEAP-regulated mitochondrial quality control as a new function of tumor suppressor p53. *Cancer Sci.* 2017;108(5):809–17. <https://doi.org/10.1111/cas.13208>.
- Natsis M, Antza C, Doundoulakis I, Stabouli S, Kotsis V. Hypertension in obesity: novel insights. *Curr Hypertens Rev.* 2020;16(1):30–6. <https://doi.org/10.2174/1573402115666190415154603>.

- NCD Risk Factor Collaboration. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet*. 2016;387(10026):1377–96. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30054-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30054-X).
- Ndrepepa G. Myeloperoxidase – A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. *Clin Chim Acta*. 2019;493:36–51. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.02.022>.
- Netto BDM, Bettini SC, Clemente APG, de Carvalho Ferreira JP, Boritza K, de Fátima Souza S, et al. Roux-en-Y gastric bypass decreases pro-inflammatory and thrombotic biomarkers in individuals with extreme obesity. *Obes Surg*. 2015;25(6):1010–8. <https://doi.org/10.1007/s11695-014-1484-7>.
- Nguyen TN, Padman BS, Lazarou M. Deciphering the molecular signals of PINK1/Parkin mitophagy. *Trends Cell Biol*. 2016;26(10):733–44. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.008>.
- Nijhawan S, Richards W, O’Hea MF, Audia JP, Alvarez DF. Bariatric surgery rapidly improves mitochondrial respiration in morbidly obese patients. *Surg Endosc*. 2013;27(12):4569–73. <https://doi.org/10.1007/s00464-013-3125-y>.
- Nikolic D, Katsiki N, Montalto G, Isenovic E, Mikhailidis D, Rizzo M. Lipoprotein subfractions in metabolic syndrome and obesity: clinical significance and therapeutic approaches. *Nutrients*. 2013;5(3):928–48. <https://doi.org/10.3390/nu5030928>.
- Nimptsch K, Konigorski S, Pischon T. Diagnosis of obesity and use of obesity biomarkers in science and clinical medicine. *Metabolism*. 2019;92:61–70. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.12.006>.
- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*. 2009;15(8):914–20. <https://doi.org/10.1038/nm.1964>.
- Nosalski R, Guzik TJ. Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease: PVAT inflammation in vascular disease. *Br J Pharmacol*. 2017;174(20):3496–513. <https://doi.org/10.1111/bph.13705>.
- Nourshargh S, Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*. 2014;41(5):694–707. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008>.
- Núñez CE, Rodrigues VS, Gomes FS, de Moura RF, Victorio SC, Bombassaro B, et al. Defective regulation of adipose tissue autophagy in obesity. *Int J Obes*. 2013;37(11):1473–80. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.27>.
- Ohashi N, Yamamoto H, Horiguchi J, Kitagawa T, Kunita E, Utsunomiya H, et al. Association between visceral adipose tissue area and coronary plaque morphology assessed by CT angiography. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2010;3(9):908–17. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2010.06.014>.

BIBLIOGRAFÍA

- Okayasu T, Tomizawa A, Suzuki K, Manaka K, Hattori Y. PPAR α activators upregulate eNOS activity and inhibit cytokine-induced NF- κ B activation through AMP-activated protein kinase activation. *Life Sci.* 2008;82(15-16):884–91. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.02.002>.
- Oliver P, Reynés B, Caimari A, Palou A. Peripheral blood mononuclear cells: a potential source of homeostatic imbalance markers associated with obesity development. *Pflugers Arch.* 2013;465(4):459–68. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1246-8>.
- Olusi S. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26(9):1159–64. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802066>.
- Orenstein SJ, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin Cell Dev Biol.* 2010;21(7):719–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.02.005>.
- Öst A, Svensson K, Ruishalme I, Brännmark C, Franck N, Krook H, et al. Attenuated mTOR signaling and enhanced autophagy in adipocytes from obese patients with type 2 diabetes. *Mol Med.* 2010;16(7-8):235–46. <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00023>.
- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):85–97. <https://doi.org/10.1038/nri2921>.
- Paccaud F, Schlüter-Fasmeyer V, Wietlisbach V, Bovet P. Dyslipidemia and abdominal obesity. *J Clin Epidemiol.* 2000;53(4):393–400. [https://doi.org/10.1016/S0895-4356\(99\)00184-5](https://doi.org/10.1016/S0895-4356(99)00184-5).
- Palikaras K, Tavernarakis N. Mitochondrial homeostasis: The interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp Gerontol.* 2014;56:182–8. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.01.021>.
- Pan Y, Choi J-H, Shi H, Zhang L, Su S, Wang X. Discovery and validation of a novel neutrophil activation marker associated with obesity. *Sci Rep.* 2019;9(1):3433. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39764-4>.
- Park HS, Park JY, Yu R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF- α and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005;69(1):29–35. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2004.11.007>.
- Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, 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. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000052939.59093.45>.
- Pellegrini C, Antonioli L, Lopez-Castejon G, Blandizzi C, Fornai M. Canonical and non-canonical activation of NLRP3 inflammasome at the crossroad between immune

- tolerance and intestinal inflammation. *Front Immunol.* 2017;8:36. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00036>.
- Peng Y, Murr MM. Roux-en-Y gastric bypass improves hepatic mitochondrial function in obese rats. *Surg Obes Relat Dis.* 2013;9(3):429–35. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2011.06.012>.
- Pernicova I, Korbonits M. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(3):143–56. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.256>.
- Picca A, Mankowski RT, Burman JL, Donisi L, Kim J-S, Marzetti E, et al. Mitochondrial quality control mechanisms as molecular targets in cardiac ageing. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(9):543–54. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0059-z>.
- Pilitsi E, Farr OM, Polyzos SA, Perakakis N, Nolen-Doerr E, Papathanasiou A-E, et al. Pharmacotherapy of obesity: Available medications and drugs under investigation. *Metabolism.* 2019;92:170–92. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.10.010>.
- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:1–13. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>.
- Poitou C, Dalmas E, Renovato M, Benhamo V, Hajduch F, Abdenmour M, et al. CD14^{dim} CD16⁺ and CD14⁺ CD16⁺ monocytes in obesity and during weight loss: Relationships With fat mass and subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(10):2322–30. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.230979>.
- Ponziani FR, Pecere S, Gasbarrini A, Ojetti V. Physiology and pathophysiology of liver lipid metabolism. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;9(8):1055–67. <https://doi.org/10.1586/17474124.2015.1056156>.
- Postler TS, Peng V, Bhatt DM, Ghosh S. Metformin selectively dampens the acute inflammatory response through an AMPK-dependent mechanism. *Sci Rep.* 2021;11(1):18721. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97441-x>.
- Pucci A, Batterham RL. Mechanisms underlying the weight loss effects of RYGB and SG: similar, yet different. *J Endocrinol Invest.* 2019;42(2):117–28. <https://doi.org/10.1007/s40618-018-0892-2>.
- Putti R, Sica R, Migliaccio V, Lionetti L. Diet impact on mitochondrial bioenergetics and dynamics. *Front Physiol.* 2015;6:109. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00109>.
- Puzziferri N, Roshek TB, Mayo HG, Gallagher R, Belle SH, Livingston EH. Long-term follow-up after bariatric surgery: a systematic review. *JAMA.* 2014;312(9):934–42. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.10706>.

BIBLIOGRAFÍA

- Rajasekaran M, Sul O-J, Choi E-K, Kim J-E, Suh J-H, Choi H-S. MCP-1 deficiency enhances browning of adipose tissue via increased M2 polarization. *J Endocrinol*. 2019;242(2):91–101. <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0190>.
- Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasiah U, et al. Antioxidants and human diseases. *Clin Chim Acta*. 2014;436:332–47. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>.
- Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*. 2013;9(10):1057–69. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7502>.
- Rasouli N, Kern PA. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(11):s64–73. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1613>.
- Rathinam VAK, Fitzgerald KA. Inflammasome complexes: emerging mechanisms and effector functions. *Cell*. 2016;165(4):792–800. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.046>.
- Redinger RN. The pathophysiology of obesity and its clinical manifestations. *Gastroenterol Hepatol (NY)*. 2007;3:856–63.
- Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017;60(9):1577–85. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>.
- Reyes-Farias M, Fos-Domenech J, Serra D, Herrero L, Sánchez-Infantes D. White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. *Biochem Pharmacol*. 2021a;192:114723. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114723>.
- Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2002;347(20):1557–65. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021993>.
- Roberts HM, Grant MM, Hubber N, Super P, Singhal R, Chapple ILC. Impact of bariatric surgical intervention on peripheral blood neutrophil (PBN) function in obesity. *Obes Surg*. 2018;28(6):1611–21. <https://doi.org/10.1007/s11695-017-3063-1>.
- Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6(6):399–409. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2009.55>.
- Ross R, Neeland IJ, Yamashita S, Shai I, Seidell J, Magni P, et al. Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a consensus statement from the IAS and ICCR working group on visceral obesity. *Nat Rev Endocrinol* 2020;16(3):177–89. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0310-7>.
- Roy J, Galano J, Durand T, Le Guennec J, Chung-Yung Lee J. Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses. *FASEB J*. 2017;31(9):3729–45. <https://doi.org/10.1096/fj.201700170R>.

- Ryder E, Diez-Ewald M, Mosquera J, Fernández E, Pedrañez A, Vargas R, et al. Association of obesity with leukocyte count in obese individuals without metabolic syndrome. *Diabetes Metab Syndr*. 2014;8(4):197–204. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2014.09.002>.
- Sacks J, Mulya A, Fealy CE, Huang H, Mosinski JD, Pagadala MR, et al. Effect of Roux-en-Y gastric bypass on liver mitochondrial dynamics in a rat model of obesity. *Physiol Rep*. 2018;6(4):e13600. <https://doi.org/10.14814/phy2.13600>.
- Sag D, Carling D, Stout RD, Suttles J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *J Immunol*. 2008;181(12):8633–41. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8633>.
- Salt IP, Palmer TM. Exploiting the anti-inflammatory effects of AMP-activated protein kinase activation. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012;21(8):1155–67. <https://doi.org/10.1517/13543784.2012.696609>.
- Sarparanta J, García-Macia M, Singh R. Autophagy and mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2017;13(4):352–369. <https://doi.org/10.2174/1573399812666160217122530>.
- Savaş EM, Oğuz SH, Samadi A, Yılmaz Işıkhan S, Ünlütürk U, Lay İ, et al. Apoptosis inhibitor of macrophage, monocyte chemoattractant protein-1, and C-reactive protein levels are increased in patients with metabolic syndrome: a pilot study. *Metab Syndr Relat Disord*. 2020;18(4):197–205. <https://doi.org/10.1089/met.2019.0074>.
- Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J*. 2007;26(7):1749–60. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601623>.
- Schmatz R, Bitencourt MR, Patias LD, Beck M, da C. Alvarez G, Zanini D, 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. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.12.012>.
- Scialò F, Fernández-Ayala DJ, Sanz A. Role of mitochondrial reverse electron transport in ROS signaling: potential roles in health and disease. *Front Physiol*. 2017;8:428. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00428>.
- Semple RK, Crowley VC, Sewter CP, Laudes M, Christodoulides C, Considine RV, et al. Expression of the thermogenic nuclear hormone receptor coactivator PGC-1 α is reduced in the adipose tissue of morbidly obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;28(1):176–9. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802482>.
- Sena CM, Leandro A, Azul L, Seiça R, Perry G. Vascular oxidative stress: impact and therapeutic approaches. *Front Physiol*. 2018;9:1668. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01668>.

BIBLIOGRAFÍA

- Seyyedi J, Alizadeh S. Effect of surgically induced weight loss on biomarkers of endothelial dysfunction: a systematic review and meta-analysis. *Obes Surg.* 2020;30(9):3549–60. <https://doi.org/10.1007/s11695-020-04710-1>.
- Shadel GS, Horvath TL. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell.* 2015;163(3):560–9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.001>.
- Shapiro H, Pecht T, Shaco-Levy R, Harman-Boehm I, Kirshtein B, Kuperman Y, et al. Adipose tissue foam cells are present in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(3):1173–81. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-2745>.
- Sharma NK, Das SK, Mondal AK, Hackney OG, Chu WS, Kern PA, et al. Endoplasmic reticulum stress markers are associated with obesity in nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11):4532–41. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1001>.
- Sharma V, Coleman S, Nixon J, Sharples L, Hamilton-Shield J, Rutter H, et al. A systematic review and meta-analysis estimating the population prevalence of comorbidities in children and adolescents aged 5 to 18 years. *Obes Rev.* 2019;20(10):1341–9. <https://doi.org/10.1111/obr.12904>.
- Shi C-S, Shenderov K, Huang N-N, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol.* 2012;13(3):255–63. <https://doi.org/10.1038/ni.2215>.
- Shin Y-A, Lee J-H, Song W, Jun T-W. Exercise training improves the antioxidant enzyme activity with no changes of telomere length. *Mech Ageing Dev.* 2008;129(5):254–60. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.01.001>.
- da Silva VRG, Moreira EAM, Wilhelm-Filho D, de Miranda JX, Benincá JP, Vigil SVG, et al. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients submitted to Roux-en-Y gastric bypass after 1 year of follow-up. *Eur J Clin Nutr.* 2012;66(8):891–9. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2012.17>.
- Smith GI, Mittendorfer B, Klein S. Metabolically healthy obesity: facts and fantasies. *J Clin Investigat.* 2019;129(10):3978–89. <https://doi.org/10.1172/JCI129186>.
- Soltis AR, Kennedy NJ, Xin X, Zhou F, Ficarro SB, Yap YS, et al. Hepatic dysfunction caused by consumption of a high-fat diet. *Cell Rep.* 2017;21(11):3317–28. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.059>.
- Song Y, Zhou Y, Zhou X. The role of mitophagy in innate immune responses triggered by mitochondrial stress. *Cell Commun Signal.* 2020;18(1):186. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00659-x>.
- Soriguer F, Gutiérrez-Repiso C, Rubio-Martín E, García-Fuentes E, Almaraz MC, Colomo N, et al. Metabolically healthy but obese, a matter of time? findings from the prospective Pizarra study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(6):2318–25. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-4253>.

- Soydas T, Yaprak Sarac E, Cinar S, Dogan S, Solakoglu S, Tuncdemir M, et al. The protective effects of metformin in an in vitro model of aging 3T3 fibroblast under the high glucose conditions. *J Physiol Biochem.* 2018;74(2):273–81. <https://doi.org/10.1007/s13105-018-0613-5>.
- Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA, et al. A High-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes.* 2005;54(7):1926–33. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.7.1926>.
- Srivastava G, Apovian CM. Current pharmacotherapy for obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(1):12–24. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.122>.
- Stefan N, Birkenfeld AL, Schulze MB. Global pandemics interconnected — obesity, impaired metabolic health and COVID-19. *Nat Rev Endocrinol.* 2021;17(3):135–49. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-00462-1>.
- Stevens VJ. Long-term weight loss and changes in blood pressure: results of the trials of hypertension prevention, phase II. *Ann Intern Med.* 2001;134(1):1-11. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-134-1-200101020-00007>.
- Swarbrick MM, Stanhope KL, Austrheim-Smith IT, Van Loan MD, Ali MR, Wolfe BM, et al. Longitudinal changes in pancreatic and adipocyte hormones following Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Diabetologia* 2008;51(10):1901–11. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1118-5>.
- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 2006;7(9):880–5. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400779>.
- Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem.* 2018;62(3):341–60. <https://doi.org/10.1042/EBC20170104>.
- Torquati A, Wright K, Melvin W, Richards W. Effect of gastric bypass operation on framingham and actual risk of cardiovascular events in class II to III obesity. *J Am Coll Surg.* 2007;204(5):776–82. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2006.12.038>.
- Tóth PP, Potter D, Ming EE. Prevalence of lipid abnormalities in the United States: The National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2006. *J Clin Lipidol.* 2012;6(4):325–30. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2012.05.002>.
- Tripathi YB, Pandey V. Obesity and endoplasmic reticulum (ER) stresses. *Front Immunol.* 2012;3:240. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00240>.
- Tsai JC-R, Sheu S-H, Chiu H-C, Chung F-M, Chang D-M, Chen M-P, et al. Association of peripheral total and differential leukocyte counts with metabolic syndrome and risk of ischemic cardiovascular diseases in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007;23(2):111–8. <https://doi.org/10.1002/dmrr.647>.

BIBLIOGRAFÍA

- The International Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders. 5th IFSO Global Registry Report 2019. IFSO 2019. [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://www.ifso.com/pdf/5th-ifso-global-registry-report-september-2019.pdf>
- Umphonsathien M, Prutanopajai P, Aiam-O-Ran J, Thararoop T, Karin A, Kanjanapha C, et al. Immediate and long-term effects of a very-low-calorie diet on diabetes remission and glycemic control in obese Thai patients with type 2 diabetes mellitus. *Food Sci Nutr* 2019;7(3):1113–22. <https://doi.org/10.1002/fsn3.956>.
- Vandanmagsar B, Youm Y-H, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature Medicine* 2011;17:179–88. <https://doi.org/10.1038/nm.2279>.
- Vendrell J, Maymó-Masip E, Tinahones F, García-España A, Megia A, Caubet E, et al. Tumor necrosis-like weak inducer of apoptosis as a proinflammatory cytokine in human adipocyte cells: up-regulation in severe obesity is mediated by inflammation but not hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(6):2983–92. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-2481>.
- Verbeek J, Lannoo M, Pirinen E, Ryu D, Spincemaille P, Vander Elst I, et al. Roux-en-y gastric bypass attenuates hepatic mitochondrial dysfunction in mice with non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2015;64(4):673–83. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306748>.
- Vial G, Detaille D, Guigas B. Role of mitochondria in the mechanism(s) of action of metformin. *Front Endocrinol*. 2019;10:294. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00294>.
- Viana EC, Araujo-Dasilio KL, Miguel GPS, Bressan J, Lemos EM, Moyses MR, et al. Gastric bypass and sleeve gastrectomy: the same impact on IL-6 and TNF- α . *Prospective Clinical Trial. Obes Surg*. 2013;23(8):1252–61. <https://doi.org/10.1007/s11695-013-0894-2>.
- Villarreal-Calderon JR, Cuellar-Tamez R, Castillo EC, Luna-Ceron E, García-Rivas G, Elizondo-Montemayor L. Metabolic shift precedes the resolution of inflammation in a cohort of patients undergoing bariatric and metabolic surgery. *Sci Rep*. 2021;11(1):12127. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91393-y>.
- Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes*. 2006;30(3):400–18. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803177>.
- Virdis A. Endothelial Dysfunction in Obesity: Role of Inflammation. *High Blood Press Cardiovasc Prev* 2016;23:83–5. <https://doi.org/10.1007/s40292-016-0133-8>.
- Vita JA. Endothelial function. *Circulation*. 2011;124(25):e906-12. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.078824>.
- Wang B, Trayhurn P. Acute and prolonged effects of TNF- α on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated

- in culture. *Pflugers Arch.* 2006;452(4):418–27. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0055-8>.
- Wang L, Hu J, Zhou H. Macrophage and adipocyte mitochondrial dysfunction in obesity-induced metabolic diseases. *World J Mens Health.* 2021;39(4):606-14. <https://doi.org/10.5534/wjmh.200163>.
- Wani K, AlHarthi H, Alghamdi A, Sabico S, Al-Daghri NM. Role of NLRP3 inflammasome activation in obesity-mediated metabolic disorders. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(2):511. <https://doi.org/10.3390/ijerph18020511>.
- Wing RR, Lang W, Wadden TA, Safford M, Knowler WC, Bertoni AG, et al. Benefits of modest weight loss in improving cardiovascular risk factors in overweight and obese individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2011;34(7):1481–6. <https://doi.org/10.2337/dc10-2415>.
- Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M. Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature* 2004;432:1027–32. <https://doi.org/10.1038/nature03047>.
- World Health Organization. A healthy lifestyle - WHO recommendations [internet]. 2010 [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/a-healthy-lifestyle---who-recommendations>.
- World Health Organization. Obesity and overweight [internet]. 2021a [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
- World Health Organization. Hypertension [internet]. 2021b [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>.
- Wu Q, Xia M-F, Gao X. Metabolically healthy obesity: Is it really healthy for type 2 diabetes mellitus?. *World J Diabetes.* 2022;13(2):70–84. <https://doi.org/10.4239/wjd.v13.i2.70>.
- Xu H, Cupples LA, Stokes A, Liu C-T. Association of obesity with mortality over 24 years of weight history: findings from the Framingham Heart Study. *JAMA Netw Open.* 2018;1(7):e184587. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2018.4587>.
- Xu L, Spinass GA, Niessen M. ER Stress in adipocytes inhibits insulin signaling, represses lipolysis, and alters the secretion of adipokines without inhibiting glucose transport. *Horm Metab Res.* 2010;42(9):643–51. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1255034>.
- Xu Q, Mariman ECM, Roumans NJT, Vink RG, Goossens GH, Blaak EE, et al. Adipose tissue autophagy related gene expression is associated with glucometabolic status in human obesity. *Adipocyte.* 2018;7(1):12–9. <https://doi.org/10.1080/21623945.2017.1394537>.

BIBLIOGRAFÍA

- Xu X, Su S, Wang X, Barnes V, De Miguel C, Ownby D, et al. Obesity is associated with more activated neutrophils in African American male youth. *Int J Obes.* 2015;39(1):26–32. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.194>.
- Xu XJ, Apovian C, Hess D, Carmine B, Saha A, Ruderman N. Improved insulin sensitivity 3 months after RYGB surgery is associated with increased subcutaneous adipose tissue AMPK activity and decreased oxidative stress. *Diabetes.* 2015;64(9):3155–9. <https://doi.org/10.2337/db14-1765>.
- Yamagishi S, Edelstein D, Du X, Kaneda Y, Guzmán M, Brownlee M. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem.* 2001;276(27):25096–100. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007383200>.
- Yang H, Niemeijer M, van de Water B, Beltman JB. ATF6 is a critical determinant of CHOP dynamics during the unfolded protein response. *IScience.* 2020;23(2):100860. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100860>.
- Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab.* 2010;11(6):467–78. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.04.005>.
- Yarborough CM, Brethauer S, Burton WN, Fabius RJ, Hymel P, Kothari S, et al. Obesity in the workplace: impact, outcomes, and recommendations. *J Occup Environ Med.* 2018;60(1):97–107. <https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000001220>.
- Yin J, Gu L, Wang Y, Fan N, Ma Y, Peng Y. Rapamycin improves palmitate-induced ER stress/NF κ B pathways associated with stimulating autophagy in adipocytes. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/272313>.
- Yin X, Lanza IR, Swain JM, Sarr MG, Nair KS, Jensen MD. Adipocyte mitochondrial function is reduced in human obesity independent of fat cell size. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(2):E209–16. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-3042>.
- Ying W, Fu W, Lee YS, Olefsky JM. The role of macrophages in obesity-associated islet inflammation and β -cell abnormalities. *Nat Rev Endocrinol.* 2020;16(2):81–90. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0286-3>.
- Young MT, Phelan MJ, Nguyen NT. A decade analysis of trends and outcomes of male vs female patients who underwent bariatric surgery. *J Am Coll Surg.* 2016;222(3):226–31. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2015.11.033>.
- Yuan H, Li L, Zheng W, Wan J, Ge P, Li H, et al. Antidiabetic drug metformin alleviates endotoxin-induced fulminant liver injury in mice. *Int Immunopharmacol.* 2012;12(4):682–8. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.01.015>.
- Zeina E, Snodgrass RG, Schreiber Y, Zukunft S, Schürmann C, Heringdorf DM zu, et al. Mitochondrial fragmentation in human macrophages attenuates palmitate-induced inflammatory responses. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2018;1863(4):433–46. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.01.009>.

- Zhang H, Han X, Yu H, Di J, Zhang P, Jia W. Effect of Roux-en-Y gastric bypass on remission of T2D: medium-term follow-up in chinese patients with different BMI obesity class. *Obes Surg.* 2017;27(1):134–42. <https://doi.org/10.1007/s11695-016-2262-5>.
- Zhang L, Lu L, Zhong X, Yue Y, Hong Y, Li Y, et al. Metformin reduced NLRP3 inflammasome activity in Ox-LDL stimulated macrophages through adenosine monophosphate activated protein kinase and protein phosphatase 2A. *Eur J Pharmacol.* 2019;852:99–106. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.03.006>.
- Zhang L, Wang X, Cueto R, Effi C, Zhang Y, Tan H, et al. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biol.* 2019;26:101284. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101284>.
- Zhang T, Liu J, Tong Q, Lin L. SIRT3 acts as a positive autophagy regulator to promote lipid mobilization in adipocytes via activating AMPK. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2):372. <https://doi.org/10.3390/ijms21020372>.
- Zhang X, Chen A, De Leon D, Li H, Noiri E, Moy VT, et al. Atomic force microscopy measurement of leukocyte-endothelial interaction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(1):H359–67. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00491.2003>.
- Zhao R, Jiang S, Zhang L, Yu Z. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med.* 2019;44(1):3-15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>.
- Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discov.* 2020;6:36. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0167-x>.
- Zhong Z, Umemura A, Sanchez-Lopez E, Liang S, Shalpour S, Wong J, et al. NF- κ B restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria. *Cell.* 2016;164(5):896–910. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.057>.
- Zhu J, Yang Y, Hu S-G, Zhang Q-B, Yu J, Zhang Y-M. T-lymphocyte Kv1.3 channel activation triggers the NLRP3 inflammasome signaling pathway in hypertensive patients. *Exp Ther Med.* 2017;14(1):147–54. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4490>.
- Zorzano A, Liesa M, Palacín M. Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009a;41(10):1846–54. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.02.004>.
- Zorzano A, Liesa M, Palacín M. Mitochondrial dynamics as a bridge between mitochondrial dysfunction and insulin resistance. *Arc Physiol Biochem.* 2009b;115(1):1–12. <https://doi.org/10.1080/13813450802676335>.

ANEXO I. PUBLICACIONES



Article

Effect of Roux-en-Y Bariatric Bypass Surgery on Subclinical Atherosclerosis and Oxidative Stress Markers in Leukocytes of Obese Patients: A One-Year Follow-Up Study

Zaida Abad-Jiménez ^{1,†}, Sandra López-Domènech ^{1,†} , Segundo Ángel Gómez-Abril ^{2,3}, Dolores Periañez-Gómez ², Aranzazu M. de Marañón ¹ , Celia Bañuls ¹ , Carlos Morillas ¹ , Víctor M. Víctor ^{1,4,5,*} and Milagros Rocha ^{1,4,*}

¹ Department of Endocrinology and Nutrition, University Hospital Doctor Peset, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), 46017 Valencia, Spain; zaiaji@alumni.uv.es (Z.A.-J.); sandra.lopez@uv.es (S.L.-D.); amardema@alumni.uv.es (A.M.d.M.); celia.banuls@uv.es (C.B.); carlos.morillas@uv.es (C.M.)

² Department of General and Digestive System Surgery, University Hospital Doctor Peset, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), 46017 Valencia, Spain; gomez_seg@gva.es (S.Á.G.-A.); perianyez_dol@gva.es (D.P.-G.)

³ Department of Surgery, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia, Av Blasco Ibáñez 13, 46010 Valencia, Spain

⁴ CIBERehd-Department of Pharmacology, University of Valencia, Av Blasco Ibáñez 13, 46010 Valencia, Spain

⁵ Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain

* Correspondence: victor.victor@uv.es (V.M.V.); milagros.rocha@uv.es (M.R.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 24 July 2020; Accepted: 8 August 2020; Published: 11 August 2020



Abstract: Little is known about the mechanisms underlying the cardioprotective effect of Roux en-Y gastric bypass (RYGB) surgery. Therefore, the aim of the present study was to investigate whether weight loss associated with RYGB improves the oxidative status of leukocytes and ameliorates subclinical atherosclerotic markers. This is an interventional study of 57 obese subjects who underwent RYGB surgery. We determined biochemical parameters and qualitative analysis of cholesterol, leukocyte and systemic oxidative stress markers—superoxide production, glutathione peroxidase 1 (GPX1), superoxide dismutase (SOD) activity and protein carbonylation—, soluble cellular adhesion molecules—sICAM-1 and sP-selectin—, myeloperoxidase (MPO) and leukocyte-endothelium cell interactions—rolling flux, velocity and adhesion. RYGB induced an improvement in metabolic parameters, including hsCRP and leukocyte count ($p < 0.001$, for both). This was associated with an amelioration in oxidative stress, since superoxide production and protein carbonylation were reduced ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) and antioxidant systems were enhanced (GPX1; $p < 0.05$ and SOD; $p < 0.01$). In addition, a significant reduction of the following parameters was observed one year after RYGB: MPO and sICAM ($p < 0.05$, for both), sPselectin and pattern B of LDL particles ($p < 0.001$, for both), and rolling flux and adhesion of leukocytes ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). Our results suggest that patients undergoing RYGB benefit from an amelioration of the prooxidant status of leukocytes, metabolic outcomes, and subclinical markers of atherosclerosis.

Keywords: obesity; bariatric surgery; oxidative stress; atherosclerosis; leukocyte-endothelium interactions

1. Introduction

Obesity is an endocrine disease with an important inflammatory component [1] that underlies the development of clinical complications such as type 2 diabetes (T2D), arterial hypertension, dyslipidemia and metabolic syndrome, all of which are considered major risk factors for cardiovascular disease (CVD) [2]. Indeed, excess weight and, particularly, accumulation of abdominal fat have also been epidemiologically associated with increased cardiovascular morbidity and mortality [3,4]. Vascular health is impaired in several ways during obesity, including arterial stiffening, endothelial dysfunction and atherosclerosis, which are primary phases in the development of major cardiovascular complications including stroke and coronary diseases. In this context, proinflammatory status, insulin resistance (IR), and oxidative stress are recognized as major inducers of vascular damage and endothelial dysfunction [5–7].

Oxidative stress is a hallmark of obesity caused by undermined antioxidant capacity in conjunction with increased levels of reactive oxygen species (ROS) production. In this sense, excess ROS is detected in adipose tissue and immune cells of obese patients and is closely related with alterations in mitochondrial function due to excess nutrient supply [8,9]. Previous studies have reported an impairment of the main antioxidant systems in morbid obesity, including superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase (GPX) [10,11], which are considered the front line of enzymatic ROS scavenging. The resulting accumulation of ROS leads to oxidation of macromolecules including lipids, proteins and DNA, eventually affecting cellular homeostasis and function. In particular, oxidizing species cause injury in the vascular wall by interrupting NO bioavailability and oxidizing LDL particles [7].

At the onset of the atherosclerotic process, the exposure of the intimal endothelium to damaging stimuli such as circulating proinflammatory cytokines, activated leukocytes and oxidized LDL (oxLDL) particles triggers the activation of endothelial cells following leukocyte recruitment and transmigration across the endothelial barrier, a process initiated by selectin-dependent adhesion molecules (E-selectin and P-selectin) and mediated by vascular cellular adhesion molecules (VCAM) and intercellular adhesion molecules (ICAM) [12,13]. Once in the subendothelial space, leukocytes scavenge oxLDL particles and transform into foam cells, largely perpetuating the oxidative and inflammatory response and contributing to vascular remodelling. In this regard, our group and others have reported that circulating leukocytes of patients with IR-disorders including obesity, T2D, and polycystic ovary syndrome (PCOS) are in a proinflammatory and prooxidant state, and are associated with the extent of the vascular injury [8,14–16]. This accumulating evidence supports a relevant role of immune cells in the pathogenesis of atherosclerosis.

Bariatric surgery has become the most effective therapeutic approach for the treatment of obesity. In particular, the Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) offers consistent short- and long-term effects on weight loss maintenance and overall resolution of obesity-associated metabolic comorbidities, resulting in reduced total mortality and incidence of cardiovascular events [17,18]. Accumulating evidence suggests an improvement of vascular function, systemic oxidative stress, and inflammation after bariatric surgery [19,20]. However, little is known about the modulation of immune cell response after surgery-mediated weight loss and the role it plays in the cardioprotective effect of the intervention. In the present study, we aimed to explore the effect of weight loss induced by RYGB surgery on the activation and oxidative status of leukocytes and the endothelial dysfunction associated to obesity. Hence, the primary end-point was to evaluate potential changes in leukocyte-endothelial cell interactions one year after the RYGB. Secondly, we aimed to clarify whether the intervention was associated with changes in subclinical mechanisms of atherosclerosis, including systemic and intracellular oxidative stress, inflammation, and atherogenic dyslipidemia.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

For this interventional study, a cohort of fifty-seven obese patients with body mass index (BMI) $\geq 35 \text{ kg/m}^2$ and scheduled for RYGB surgery were recruited between January 2014 and September 2019 from the Outpatient's Clinic of the Department of Endocrinology and Nutrition, and the Department of General and Digestive System Surgery of the University Hospital Dr. Peset (Valencia, Spain). The study protocol was approved by the hospital's Human Ethics Committee (code 96/16) and conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. All the participants were informed about the objective and methodology of the study and signed a written informed consent.

The inclusion criteria were age 18–65 years, BMI > 40 or $> 35 \text{ kg/m}^2$ with comorbidities, and assignment of RYGB surgery. Exclusion criteria were pregnancy or lactation, active infectious disease, thromboembolism, stroke or documented history of CVD, severe disease including malignancies, severe renal or hepatic disease, drug abuse, chronic inflammatory disease, and secondary obesity (hypothyroidism, Cushing's syndrome).

All the patients were examined and the study variables recorded at baseline and 12 months after the surgical intervention.

2.2. Clinical and Biochemical Determinations

Anthropometric measurements including weight, height, systolic and diastolic blood pressure, and waist circumference were obtained during a physical exploration by means of electronic scales, stadiometer, sphygmomanometer, and metric measuring tape, respectively. BMI was calculated by dividing weight by the square of height. The percentage of excess weight loss (EWL) was calculated with the formula $[(\text{preoperative weight} - \text{current weight}) / (\text{preoperative weight} - \text{ideal weight (considering BMI} = 25 \text{ kg/m}^2))] \times 100$.

Blood samples were collected from the antecubital vein in fasting conditions at 8:00–9:30 a.m. at baseline and one year after RYGB surgery. Biochemical determinations were performed at the Hospital's Clinical Analysis Service as follows: Glucose, total cholesterol (TC), and triglycerides (TG) serum levels were determined by the enzymatic assay; HDL cholesterol (HDLc) concentration was measured using a Beckman LX20 analyser (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA); and LDL cholesterol (LDLc) was calculated by Friedewald's formula when circulating levels of TG did not exceed 300 mg/dL. The percentage of glycated haemoglobin (HbA1c) was obtained with a glycohaemoglobin analyser (Arkray Inc., Kyoto, Japan). Insulin was determined by an immunochemiluminescence assay and the Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance index (HOMA-IR) calculated with the formula $([\text{fasting insulin (}\mu\text{UI/mL)} \times \text{fasting glucose (mg/dL)}] / 405)$. Systemic levels of high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and C3 fraction of the complement (C3c) were analysed using an immunonephelometric assay (Behring Nephelometer II, Dade Behring, Inc., Newark, DE, USA) with an intra-assay coefficient of variation $< 5.5\%$. Total leukocytes were determined in a COULTER[®] LH 500 hematology blood analyser (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). The remaining serum aliquots were immediately stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ for subsequent analysis.

2.3. Evaluation of Cellular Adhesion Molecules (CAMs) and Myeloperoxidase (MPO)

Levels of soluble CAMs—sICAM-1 and sP-selectin—and MPO were measured in serum with a Luminex 200 analyser system (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) following the Milliplex[®] MAP Kit manufacturer's procedure (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). All samples were analysed in duplicate. For all determinations, the intra-serial and inter-serial variation coefficients were $< 5.0\%$ and $< 15.0\%$, respectively.

2.4. SOD Activity Assay and Carbonylation of Serum Protein

Activity of serum SOD was evaluated with a commercial kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) and the amounts of carbonyl groups in serum proteins were determined with the OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA Kit (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's protocol.

2.5. Isolation of Leukocytes from Blood Samples

Blood samples from BD Vacutainer® citrated tubes were mixed and incubated with dextran 3% for 45 min at room temperature (RT) and the resulting supernatant was then layered over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and centrifuged at 650× g for 25 min at RT. After lysing the remaining erythrocytes with a specific lysis buffer (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) the pellet was washed and resuspended in HBSS (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany).

2.6. Fluorescence Imaging of Superoxide Production

Determination of superoxide production was assessed by fluorometry using an IX81 Olympus fluorescence microscope coupled with the static cytometry software ScanR version 2.03.2 (Olympus, Hamburg, Germany). Leukocytes were seeded in a 48-well plaque and incubated for 30 min at 37 °C with a Dihydroethidium (DHE) probe for intracellular superoxide determination and with Hoechst 33342 to visualize cell nuclei. Both fluorescent dyes were purchased from Life Technologies (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.7. Western Blotting

For protein extraction leukocytes were lysed on ice for 15 min with a cell lysis buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 400 mM NaCl, 20% glycerol, 0.1 mM EDTA, 10 μM Na₂MoO₄, 0.5% NP-40, 1 mM dithiothreitol) in the presence of a protease inhibitor mix (10 mM NaF, 1 mM NaVO₃, 10 mM PNP, 10 mM β-glycerolphosphate). The protein concentration was estimated with a BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Twenty five μg of protein was resolved by electrophoresis in a SDS-polyacrylamide gel and then transferred onto a nitrocellulose membrane. The membranes were blocked for 1 h with 5% skimmed milk in TBS-T and then incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies anti-GPX1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and anti-Actin (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA). The chemiluminescence signal was detected with the ECL plus reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) following a proper binding step with the HRP-goat anti-rabbit secondary antibody (Millipore Iberica, Madrid, Spain). The Fusion FX5 Acquisition System permitted visualization and the software Bio1D version 15.03a (Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, France) was employed to quantify the signal by densitometry.

2.8. Dynamic Flow-Chamber-Based Adhesion Assay

To evaluate the interaction between immune cells and the endothelium an in vitro model of adhesion assay was used. This model is based on the use of a dynamic parallel-plate flow chamber coupled to an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 2000-S, Amstelveen, The Netherlands) connected to a video recorder camera (Sony Exwave HAD, Koeln, Germany). The chamber was assembled with a coverslip of confluent Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). Endothelial cells had been previously isolated from umbilical cords by collagenase digestion (1 mg/mL in PBS for 17 min) and then cultured over fibronectin-coated plastic small petri dishes in a complete EGM-2 medium (Lonza, Basel, Switzerland). After assembling the chamber, a suspension of 1 million leukocytes in 1 mL of a RPMI medium (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was drawn across the HUVEC monolayer at 0.36 mL/min while a 5 × 25 mm portion of the cell culture was recorded for 5 min. During the video analysis the following parameters were evaluated: Leukocyte rolling flux was calculated by counting the number of leukocytes rolling over 100 μm² of HUVEC in 1 min; rolling velocity was

measured as the mean time it took 20 consecutive leukocytes to move along 100 μm of the endothelial monolayer; and adhesion was evaluated by counting the number of leukocytes maintaining a firm contact with endothelium for 30 s.

2.9. LDL and HDL Subfractions

LDLc and HDLc subfractions were identified using the Quantimetrix Lipoprint[®] system and quantified by the computerized method of the Quantimetrix Lipoprint[®] system (Quantimetrix Corporation, Redondo Beach, CA, USA) and NIH program version 1.62 (NIH, Bethesda, MD, USA). The Liposure[®] kit (Quantimetrix Corporation, Redondo Beach, CA, USA) was used for quality control. The LDL electrophoretic profile showed three patterns: Pattern A (cut-off diameter $\geq 268 \text{ \AA}$) with predominance of large and buoyant LDL particles; Intermediate Pattern (cut-off diameter > 265 and $\leq 268 \text{ \AA}$); and Pattern B (cut-off diameter $\leq 265 \text{ \AA}$), with a predominance of small and dense LDL (sdLDL) particles. The qualitative HDL size analysis divided HDL into 10 subfractions: 1–3 represented large HDL particles, 4–7 indicated medium HDL particles, and 8–10 represented small HDL particles.

2.10. Statistical Analysis

This study was primarily designed to achieve a power of 80% and to detect differences in relation to the primary efficacy criterion—i.e., leukocyte adhesion ≥ 5 cells/ mm^2 —assuming a common SD of eight units. Under these considerations, a minimum of 21 subjects were required. SPSS 20.0 (IBM SPSS Statistic, Chicago, IL, USA) was used to carry out the statistical analysis. Parametric data are expressed as the mean \pm SD or mean + SE and non-parametric data as the median and interquartile range (25% and 75% percentile). Differences between parametric variables were compared with a paired Student's *t*-test and a Wilcoxon test was used for comparisons of non-parametric data. An X^2 test was used to compare proportions. Statistically significant differences were considered when $p < 0.05$.

3. Results

This study evaluated a total of 57 obese patients (7 men and 50 women) undergoing RYGB with an average BMI of 39.8 and an age of 45.4 years old at the beginning of the study. Anthropometric and metabolic parameters of the study cohort before and after the intervention are shown in Table 1.

One year after RYGB patient EWL was 80.4% and their BMI and waist circumference decreased significantly ($p < 0.001$), indicating the efficacy of RYGB in terms of body weight reduction. In addition, patients experienced a drop in systolic and diastolic blood pressure ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively) and an improvement of parameters of glucose metabolism, including fasting glucose levels, insulin, HOMA-IR, and HbA1c with respect to the basal condition ($p < 0.001$). The lipid profile was improved by rising HDLc levels ($p < 0.001$) and decreasing levels of TG ($p < 0.001$), TC ($p < 0.001$), and LDLc ($p < 0.001$). Furthermore, there was a reduction in blood leukocyte count ($p < 0.001$) and a significant decrease in levels of the acute phase inflammation reactants hsCRP and C3c ($p < 0.001$), thus suggesting an amelioration of the systemic inflammatory response. Following these clinical changes, the prevalence of metabolic comorbidities associated with obesity—hypertension, hyperlipidemia, and T2D—within the study population fell from 37%, 23%, and 30%, respectively at the beginning of the study to 16%, 9%, and 4%, respectively one year after the surgical intervention, thus confirming the successful remission of obesity-associated metabolic diseases mediated by RYGB.

Table 1. Anthropometric and biochemical parameters of the cohort population before and after Roux en-Y gastric bypass (RYGB) intervention.

Parameters	Before	After
<i>n</i> (females %)	57 (84.5)	
Age (years)	45.39 ± 10.49	
Weight (kg)	109.3 ± 16.1	78.6 ± 13.0 ***
BMI (kg/m ²)	39.8 ± 5.3	28.9 ± 4.3 ***
Waist (cm)	115.5 ± 11.2	89.0 ± 11.8 ***
EWL (%)	-	80.4 ± 29.0
SBP (mmHg)	131.8 ± 15.9	122.4 ± 17.6 ***
DBP (mmHg)	81.3 ± 10.3	74.1 ± 10.6 **
Glucose (mg/dL)	98.6 ± 23.6	85.8 ± 11.4 ***
Insulin (μU/mL)	14.7 ± 7.6	6.9 ± 3.0 ***
HOMA-IR	3.8 ± 3.2	1.45 ± 0.7 ***
HbA1c (%)	5.5 ± 0.7	5.2 ± 0.4 ***
TC (mg/dL)	187.7 ± 34.5	166.6 ± 26.4 ***
HDLc (mg/dL)	46.5 ± 8.8	55.0 ± 9.6 ***
LDLc (mg/dL)	122.0 ± 39.7	95.9 ± 21.0 ***
TG (mg/dL)	98.5 (77, 144)	75 (55, 100) ***
hsCRP (mg/L)	3.7 (2.0, 5.5)	0.6 (0.2, 1.2) ***
C3c (mg/L)	126.7 ± 22.9	95.6 ± 17.6 ***
Leukocytes (cells × 10 ³ /μL)	7.6 ± 2.3	6.3 ± 1.9 ***
Treatment		
Hypertension % (<i>n</i>)	37 (21)	16 (9)
Hyperlipidemia % (<i>n</i>)	23 (13)	9 (5)
T2D % (<i>n</i>)	30 (17)	4 (2)

Data are expressed as the mean ± SD or percentage (*n*). TG and hsCRP are represented as the median and IQ range (25% and 75% percentile). Values were statistically compared with a paired Student's *t*-test or Wilcoxon test and were considered significant when ** *p* < 0.01, and *** *p* < 0.001. BMI: Body mass index; EWL: Excess weight loss; SBP: Systolic blood pressure; DBP: Diastolic blood pressure; HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance index; HbA1c: Glycated haemoglobin; TC: Total cholesterol; LDLc: LDL cholesterol; HDLc: HDL cholesterol; TG: Triglycerides; hsCRP: High sensitive C-reactive protein; C3c: Complement component 3; T2D: Type 2 diabetes.

3.1. Systemic and Leukocyte Oxidative Stress Parameters

To explore whether the RYGB surgery resulted in amelioration of the oxidative stress status, we analysed several parameters in leukocytes and serum from patients in our study population before and after the intervention (Figure 1).

We observed a diminished leukocyte superoxide production (*p* < 0.05, Figure 1A) and upregulation of the protein expression of the antioxidant enzyme GPX1 (*p* < 0.05, Figure 1B) after the gastric bypass. Moreover, these intracellular changes were accompanied by a drop in systemic levels of MPO (*p* < 0.05, Figure 1C) and an increase in antioxidant SOD activity (*p* < 0.01, Figure 1D), resulting in a significant reduction of the number of carbonyl groups in serum proteins (*p* < 0.01, Figure 1E). Altogether, these results suggest a partial recovery of the redox balance supported by a decrease in prooxidant signalling in favour of antioxidant responses in both leukocytes and serum.

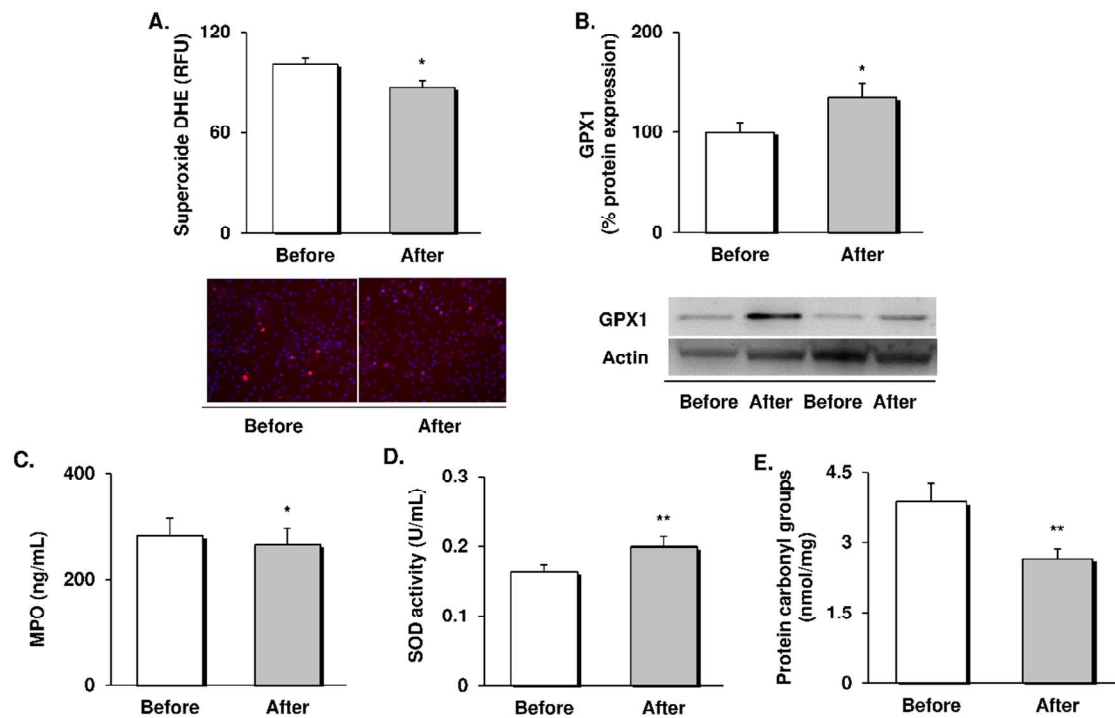


Figure 1. Evaluation of prooxidant/antioxidant responses and oxidative stress markers in obese patients before and 12 months after RYGB intervention. (A) Superoxide production in leukocytes, measured as arbitrary units of DHE fluorescence and their representative fluorescence microscopy 100× images ($n = 17$). (B) Levels of GPX1 protein expression in leukocytes and representative Western blot images ($n = 20$). (C) MPO levels ($n = 46$) and (D) SOD activity in serum. (E) Carbonyl groups in serum proteins ($n = 14$). Data are represented as the mean + SE. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ when compared using a paired Student's t-test. RYGB: Roux-en-Y gastric bypass; DHE: Dihydroethidium; RFU: Relative fluorescence units; GPX1: Glutathione peroxidase 1; MPO: Myeloperoxidase; SOD: Superoxide dismutase.

3.2. Leukocyte-Endothelial Cell Interactions and CAMs

To address the effect of RYGB-induced weight loss on leukocyte activation and endothelial dysfunction, we analysed leukocyte-endothelial cell interactions and the levels of CAMs released into the serum (Figure 2).

Although there were no changes in leukocyte rolling velocity (Figure 2A), we did notice a significant decrease in the number of leukocytes rolling along ($p < 0.05$, Figure 2B) and adhering to the endothelium ($p < 0.01$, Figure 2C) one year after the intervention. Accordingly, we observed a significant drop of sICAM-1 ($p < 0.05$, Figure 2D) and sP-selectin ($p < 0.001$, Figure 2E) serum levels. These data suggest that the weight loss induced by RYGB reduced the interactions between leukocytes and the vascular wall and diminished endothelial dysfunction.

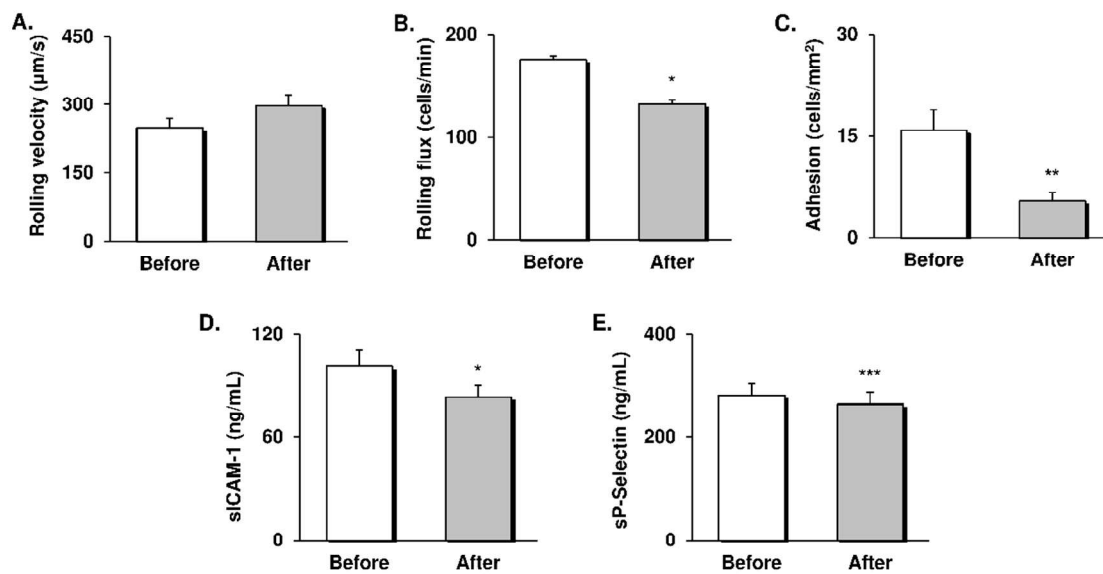


Figure 2. Evaluation of leukocyte-endothelial cell interactions and serum levels of CAMs in obese patients before and 12 months after RYGB intervention. (A) Rolling flux, measured as cells per minute ($n = 24$). (B) Leukocyte rolling velocity, expressed as $\mu\text{m/s}$ ($n = 24$). (C) Leukocyte adhesion, expressed as cells/mm^2 ($n = 24$). Serum levels of (D) sICAM-1 ($n = 46$) and (E) sP-selectin ($n = 46$). Data are represented as the mean + SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ when compared using a paired Student's t-test. CAMs: Cellular adhesion molecules; RYGB: Roux-en-Y gastric bypass; sICAM-1: Soluble intracellular adhesion molecule; sP-selectin: Soluble platelet selectin.

3.3. LDL and HDL Subfractions

To better understand the modifications in our subjects' clinical lipid profile after the RYGB intervention we performed a more profound analysis of the circulating cholesterol subfractions (Figure 3).

Beyond the reduction of LDLc levels after the intervention (see Table 1), the evaluation of LDL patterns showed a substantial decrease in the percentage of the more atherogenic sdLDL particles (Pattern B), and an increase in the less atherogenic particles (Intermediate Pattern) ($p < 0.001$), with no significant changes observed with respect to the large LDL particles (Pattern A) (Figure 3A). Further analysis of HDL subfractions revealed a significant increase in the percentage of the considerably antiatherogenic large HDL particles at the expense of a reduction in that of intermediate and small particles ($p < 0.001$, Figure 3B). These observations indicate that patients benefit not only from a quantitative change in cholesterol levels after an RYGB, but also from a parallel qualitative improvement of circulating LDL and HDL subfractions, thus reflecting a less proatherogenic profile.

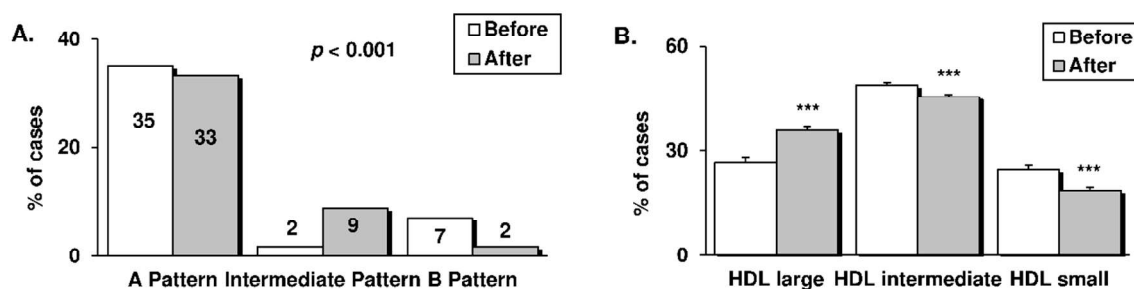


Figure 3. Cholesterol subfractions in obese patients before and 12 months after RYGB intervention, determined by the Quantimetrix Lipoprint® system. (A) LDL electrophoretic profiles are expressed as the percentage of patients ($n = 25$) displaying a particular LDL pattern. Patterns refer to the size of LDL particles, as follows: Pattern A (cut-off diameter ≥ 268 Å); Intermediate Pattern (cut-off diameter 264–267 Å) and Pattern B (cut-off diameter ≤ 265 Å). (B) HDL profile, expressed as the percentage of patients ($n = 25$) displaying a particular HDL pattern: Large, intermediate, or small. Data are represented as a percentage of LDL patterns or mean + SE. *** $p < 0.001$ when proportions were compared using a χ^2 test or a paired Student's t -test. RYGB: Roux-en-Y gastric bypass; LDL: Low-density lipoprotein; HDL: High-density lipoprotein.

4. Discussion

In our cohort of middle-aged obese subjects, RYGB surgery induced a substantial weight loss one year after the intervention, and this was accompanied by improvements in blood pressure, glycaemic control, inflammation, and lipoprotein particles profile. Beyond these clinical changes, the patients also exhibited a shift from a prooxidant status by which their antioxidant mechanisms were bolstered. In this sense, we observed a drop in superoxide production within leukocytes and systemic MPO levels, while expression of the antioxidant GPX1 enzyme and SOD activity were increased, resulting in lower serum carbonylated proteins. In parallel, we observed an improvement of endothelial function, manifested by a reduction of sICAM-1 and sP-selectin levels and fewer interactions of leukocytes with the vascular wall. As a whole, the present results provide novel and valuable evidence about the molecular mechanisms underlying the protective effects of bariatric surgery against cardiovascular risk and development of atherosclerosis.

Endemic rates of obesity worldwide have fuelled efforts to develop weight loss strategies. Metabolic surgery procedures, including RYGB, have been shown to accomplish, not only weight loss targets, but also recovery from metabolic comorbidities, including the incidence of cardiovascular events. As expected, our patients benefitted from substantial EWL, together with a decrease in BMI and abdominal circumference, reduced blood pressure and IR, and significant improvements in lipid profile one year after the intervention. These gains were reflected in remission rates for hypertension, T2D, and hyperlipidemia of 57.1%, 88.2%, and 61.5%, respectively, which are higher than those reported by other studies [21] and represent a diminished risk of CVD in our obese population.

Atherogenic dyslipidemia is a major contributor to the increased cardiovascular risk currently seen in the general population [22]; it results from a combination of elevated levels of TG and highly atherogenic sdLDL particles together with a decrease in circulating antiatherogenic HDL molecules. As we and other groups have shown, patients after RYGB surgery benefit, not only from quantitative reduction of clinical LDLc and TG levels and an increase in HDLc [23–25], but from a complementary qualitative improvement of lipoprotein particles, including a reduction in the percentage of sdLDL and an increased presence of larger HDL [26], which frequently display inverse relationships with cardiovascular risk in epidemiological studies [27]. Furthermore, elevated levels of circulating inflammatory cytokines, and particularly hsCRP, are considered independent predictors of cardiovascular events, even more so than LDLc levels [28]. Indeed, hsCRP is known to rise with the degree of adiposity [8] and is directly involved in the development of atherosclerosis through complement system activation and endothelial dysfunction [29]. In the present study, we

report a significant decrease in serum levels of hsCRP, C3c, and total leukocyte count after weight loss induced by RYGB, which is in accordance with previous studies [20,23,24]. Such evidence endorses the long-lasting therapeutic value of bariatric surgery against inflammatory and lipid-related cardiovascular risk [25]. However, few studies have explored the modulation of immune cells response after RYGB. We have gone one step further by focusing on leukocytes as key mediators of inflammation and oxidative stress in the early stages of the atherosclerotic process in obesity.

Oxidative stress is a major mechanism linking obesity, endothelial dysfunction, and the development of atherosclerosis. Although adipose tissue is the main contributor to the oxidative imbalance, other sources of ROS have been implicated in the alteration of NO availability and vascular homeostasis, including excess ROS release by the endothelial NADPH enzyme [30], and mitochondrial dysfunction and subsequent overproduction of superoxide in peripheral leukocytes [8,15,16]. Herein, we report a decrease in superoxide production in the leukocytes of obese patients after RYGB that was associated with upregulation of the expression of antioxidant GPX1, a major scavenger of mitochondrial ROS. Only two previous studies have explored changes in the prooxidant state of leukocytes after bariatric surgery. While Roberts et al. reported diminished superoxide production by immune cells under stimulation [31], Monzo-Beltran et al. observed an adaptive antioxidant response of leukocytes after bariatric surgery in terms of higher intracellular GPX, SOD, and catalase activity [32], which is in line with the present findings. Furthermore, the contribution of rising circulating levels of MPO enzyme to the role of immune cells in endothelial dysfunction is also worthy of mention. This prooxidant enzyme, resulting from the degranulation process of neutrophils, participates in the oxidation of LDL particles and the impairment of eNOS function, and has been associated with an increased risk of coronary artery disease [33–35]. In line with this, we have recently demonstrated an association between MPO and sdLDL/sP-selectin levels [36]. In the present study, we detected a drop in MPO serum levels one year after the RYGB intervention, which is in line with previous reports [31]. Additionally, our results revealed a strengthening of systemic antioxidant responses one year after RYGB surgery, since patients showed higher activity of serum SOD and a marked drop in the amount of carbonyl groups in circulating proteins, which is considered a clear biomarker of systemic oxidative stress. In line with these findings, some previous studies have reported a reduction in serum indicators of oxidative stress, including carbonyl proteins, lipid peroxidation, and 8-oxo-dG, which has been associated with an increase in SOD and catalase activity after bariatric surgery [20,32,37]. Considered together, the available evidence endorses RYGB surgery an effective strategy to reduce oxidative damage in patients with obesity by modulating systemic prooxidant and antioxidant responses.

It is generally accepted that elevated circulating levels of CAMs (resulting from immune and endothelial cells activation) reveal endothelial dysfunction and are prognostic of CVD [38], since they are involved in the recruitment of leukocytes by the vascular wall. In the present study, downregulation of MPO and systemic and leukocyte oxidative stress was accompanied by a drop in levels of the adhesion molecules sICAM and sP-selectin, resulting in a marked reduction in the number of leukocytes rolling and firmly adhering to the endothelium after the intervention. Accumulating evidence suggests an association between endothelial dysfunction, the prooxidant state of leukocytes, and their adherent phenotype in patients with obesity and T2D [8,15], since excess superoxide release from immune cells triggers vascular permeability and favours their recruitment and migration [30]. In addition, MPO derived from neutrophils promotes their attraction to the endothelium through physical forces [39]. Conversely, targeting excess ROS production within leukocytes seems to reduce their interaction with the endothelium and the extent of the vascular injury produced [40,41]. Hence, it is likely that an attenuation of the prooxidant phenotype of leukocytes after bariatric surgery contributes to the amelioration of endothelial dysfunction and recruitment of leukocytes, thus protecting against the development of atherosclerosis.

To our knowledge, this is the first time that a decrease in leukocyte activation and endothelial dysfunction after bariatric surgery has been demonstrated by means of a dynamic system in which an *in vivo* blood flow is simulated and interaction with endothelial cells can be visualised. Previous studies

investigating classic functional and structural markers of early atherosclerosis, such as flow-mediated dilation and carotid artery intima-media thickness, have provided inconsistent results concerning the effects of bariatric surgery on endothelial function [19,42]. Indeed, the mechanisms involved in the early asymptomatic stages of atherosclerosis can be triggered many years before clinical signs are manifested [7], thus suggesting that a leukocyte-endothelial cell interaction-based approach would be useful for early detection of subclinical atherosclerosis risk. In this sense, our findings provide more reliable and valuable data on immune response modulation, contributing to a better understanding of the mechanisms underlying the protective effect of bariatric surgery on CVD and atherosclerosis. However, the present study has some limitations, including the relatively small size of the study population, though we would like to point out that it was supported by a sample size calculation. In addition, modifications of functional endothelial markers or the atherosclerotic plaque have not been assessed; however, as commented on above, the evaluation of leukocyte-endothelial cell interactions would allow the early detection of changes in the atherosclerotic process. On the other hand, the scale of the changes studied after RYGB would be more precisely defined by comparison with a control healthy group. Finally, the effect of bariatric surgery on subclinical atherosclerotic mechanisms from a gender perspective is an aspect yet to be explored.

5. Conclusions

To conclude, bariatric surgery is an effective strategy for body weight reduction and recovery from metabolic diseases in obese subjects. In addition to confirming these clinical effects, we go a step further by describing the effects of surgically-induced weight loss on the underlying mechanisms of atherosclerosis, including oxidative stress, leukocyte activation, and recruitment to the vessel wall, and atherogenic lipid profile. These novel findings endorse the therapeutic value of bariatric surgery as a way of reducing cardiovascular risk in an obese population.

Author Contributions: Conceptualization, V.M.V. and M.R.; data curation, Z.A.-J., S.L.-D., V.M.V., and M.R.; formal analysis, Z.A.-J., S.L.-D., V.M.V., and M.R.; funding acquisition, V.M.V. and M.R.; methodology, Z.A.-J., S.L.-D., A.M.d.M., and C.B.; project administration, V.M.V. and M.R.; resources, S.Á.G.-A., D.P.-G., and C.M.; writing—original draft, Z.A.-J. and S.L.-D.; writing—review and editing, V.M.V. and M.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by grants PI19/00437, PI18/00932, and PI19/00838 by Carlos III Health Institute and co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF “A way to build Europe”) and by PROMETEO/2019/027 by the Ministry of Education of the Valencian Regional Government. Z.A.-J. and A.M.d.M. are recipients of PFIS contracts from Carlos III Health Institute (FI17/00144 and FI17/00126, respectively). S.L.-D. is a recipient of APOSTD/2020/145 from the Ministry of Innovation, University, Science and Digital Society from Valencian Regional Government. C.B. is a recipient of CP19/00077 from Carlos III Health Institute. V.M.V. is a recipient of CES/10/030 from the Ministry of Health of the Valencian Regional Government. An unrestricted grant is from Menarini S.A.

Acknowledgments: The authors thank Brian Normanly (University of Valencia/CIBERehd) for his editorial assistance, and Rosa Falcón (PTA2017-14355-I/FISABIO) and Begoña Zaragoza (University Hospital Doctor Peset) for their technical assistance. The Servier Medical ART (SMART) resources were used to produce the images in the graphical abstract.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ferrante, A.W., Jr. Obesity-induced inflammation: A metabolic dialogue in the language of inflammation. *J. Intern. Med.* **2007**, *262*, 408–414. [[CrossRef](#)]
2. Grundy, S.M. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *89*, 2595–2600. [[CrossRef](#)]
3. Prospective Studies Collaboration; Whitlock, G.; Lewington, S.; Sherliker, P.; Clarke, R.; Emberson, J.; Halsey, J.; Qizilbash, N.; Collins, R.; Peto, R. Body-mass index and cause-specific mortality in 900,000 adults: Collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet* **2009**, *373*, 1083–1096. [[CrossRef](#)]

4. Despres, J.P. Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: An update. *Circulation* **2012**, *126*, 1301–1313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Guzik, T.J.; Mangalat, D.; Korbut, R. Adipocytokines—Novel link between inflammation and vascular function? *J. Physiol. Pharmacol.* **2006**, *57*, 505–528. [[PubMed](#)]
6. Fontana, L.; Eagon, J.C.; Trujillo, M.E.; Scherer, P.E.; Klein, S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* **2007**, *56*, 1010–1013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Reho, J.J.; Rahmouni, K. Oxidative and inflammatory signals in obesity-associated vascular abnormalities. *Clin. Sci.* **2017**, *131*, 1689–1700. [[CrossRef](#)]
8. Lopez-Domenech, S.; Bañuls, C.; Diaz-Morales, N.; Escribano-Lopez, I.; Morillas, C.; Veses, S.; Orden, S.; Alvarez, A.; Victor, V.M.; Hernandez-Mijares, A.; et al. Obesity impairs leukocyte-endothelium cell interactions and oxidative stress in humans. *Eur. J. Clin. Investig.* **2018**, *48*, e12985. [[CrossRef](#)]
9. Chattopadhyay, M.; Khemka, V.K.; Chatterjee, G.; Ganguly, A.; Mukhopadhyay, S.; Chakrabarti, S. Enhanced ROS production and oxidative damage in subcutaneous white adipose tissue mitochondria in obese and type 2 diabetes subjects. *Mol. Cell. Biochem.* **2015**, *399*, 95–103. [[CrossRef](#)]
10. Olusi, S.O. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **2002**, *26*, 1159–1164. [[CrossRef](#)]
11. Ozata, M.; Mergen, M.; Oktenli, C.; Aydin, A.; Sanisoglu, S.Y.; Bolu, E.; Yilmaz, M.I.; Sayal, A.; Isimer, A.; Ozdemir, I.C. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin. Biochem.* **2002**, *35*, 627–631. [[CrossRef](#)]
12. Wu, M.Y.; Li, C.J.; Hou, M.F.; Chu, P.Y. New Insights into the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Nguyen, M.T.; Fernando, S.; Schwarz, N.; Tan, J.T.; Bursill, C.A.; Psaltis, P.J. Inflammation as a Therapeutic Target in Atherosclerosis. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ghanim, H.; Aljada, A.; Hofmeyer, D.; Syed, T.; Mohanty, P.; Dandona, P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation* **2004**, *110*, 1564–1571. [[CrossRef](#)]
15. Hernandez-Mijares, A.; Rocha, M.; Rovira-Llopis, S.; Banuls, C.; Bellod, L.; de Pablo, C.; Alvarez, A.; Roldan-Torres, I.; Sola-Izquierdo, E.; Victor, V.M. Human leukocyte/endothelial cell interactions and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic patients and their association with silent myocardial ischemia. *Diabetes Care* **2013**, *36*, 1695–1702. [[CrossRef](#)]
16. Bañuls, C.; Rovira-Llopis, S.; Marañón, A.M.d.; Veses, S.; Jover, A.; Gomez, M.; Rocha, M.; Hernandez-Mijares, A.; Victor, V.M. Metabolic syndrome enhances endoplasmic reticulum, oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions in PCOS. *Metab. Clin. Exp.* **2017**, *71*, 153. [[CrossRef](#)]
17. Ikramuddin, S.; Korner, J.; Lee, W.J.; Connett, J.E.; Inabnet, W.B.; Billington, C.J.; Thomas, A.J.; Leslie, D.B.; Chong, K.; Jeffery, R.W.; et al. Roux-en-Y gastric bypass vs intensive medical management for the control of type 2 diabetes, hypertension, and hyperlipidemia: The Diabetes Surgery Study randomized clinical trial. *JAMA* **2013**, *309*, 2240–2249. [[CrossRef](#)]
18. Sjostrom, L.; Peltonen, M.; Jacobson, P.; Sjostrom, C.D.; Karason, K.; Wedel, H.; Ahlin, S.; Anveden, A.; Bengtsson, C.; Bergmark, G.; et al. Bariatric surgery and long-term cardiovascular events. *JAMA* **2012**, *307*, 56–65. [[CrossRef](#)]
19. Lupoli, R.; Di Minno, M.N.; Guidone, C.; Cefalo, C.; Capaldo, B.; Riccardi, G.; Mingrone, G. Effects of bariatric surgery on markers of subclinical atherosclerosis and endothelial function: A meta-analysis of literature studies. *Int. J. Obes.* **2016**, *40*, 395–402. [[CrossRef](#)]
20. Joao Cabrera, E.; Valezi, A.C.; Delfino, V.D.; Lavado, E.L.; Barbosa, D.S. Reduction in plasma levels of inflammatory and oxidative stress indicators after Roux-en-Y gastric bypass. *Obes. Surg.* **2010**, *20*, 42–49. [[CrossRef](#)]
21. Puzifferri, N.; Roshek, T.B., 3rd; Mayo, H.G.; Gallagher, R.; Belle, S.H.; Livingston, E.H. Long-term follow-up after bariatric surgery: A systematic review. *JAMA* **2014**, *312*, 934–942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Franssen, R.; Monajemi, H.; Stroes, E.S.; Kastelein, J.J. Obesity and dyslipidemia. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* **2008**, *37*, 623–633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Minervino, D.; Gumiero, D.; Nicolazzi, M.A.; Carnicelli, A.; Fuorlo, M.; Guidone, C.; Di Gennaro, L.; Fattorossi, A.; Mingrone, G.; Landolfi, R. Leukocyte Activation in Obese Patients: Effect of Bariatric Surgery. *Medicine* **2015**, *94*, e1382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Gomez-Abril, S.A.; Morillas-Ariño, C.; Ponce-Marco, J.L.; Torres-Sanchez, T.; Delgado-Gomis, F.; Hernandez-Mijares, A.; Rocha, M. Short- and Long-Term Effects of Weight Loss on the Complement Component C3 After Laparoscopic Gastric Bypass in Obese Patients. *Obes. Surg.* **2016**, *26*, 2756–2763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Al-Zoairy, R.; Melmer, A.; Ress, C.; Laimer, M.; Kaser, S.; Ebenbichler, C. Lipid profile changes after pronounced weight loss induced by bariatric surgery. *Clin. Lipidol.* **2012**, *7*, 163–175. [[CrossRef](#)]
26. Kjellmo, C.A.; Karlsson, H.; Nestvold, T.K.; Ljunggren, S.; Cederbrant, K.; Marcusson-Stahl, M.; Mathisen, M.; Lappegard, K.T.; Hovland, A. Bariatric surgery improves lipoprotein profile in morbidly obese patients by reducing LDL cholesterol, apoB, and SAA/PON1 ratio, increasing HDL cholesterol, but has no effect on cholesterol efflux capacity. *J. Clin. Lipidol.* **2018**, *12*, 193–202. [[CrossRef](#)]
27. Kontush, A. HDL particle number and size as predictors of cardiovascular disease. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 218. [[CrossRef](#)]
28. Ridker, P.M.; Rifai, N.; Rose, L.; Buring, J.E.; Cook, N.R. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *347*, 1557–1565. [[CrossRef](#)]
29. Badimon, L.; Pena, E.; Arderiu, G.; Padro, T.; Slevin, M.; Vilahur, G.; Chiva-Blanch, G. C-Reactive Protein in Atherothrombosis and Angiogenesis. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 430. [[CrossRef](#)]
30. Csanyi, G.; Taylor, W.R.; Pagano, P.J. NOX and inflammation in the vascular adventitia. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *47*, 1254–1266. [[CrossRef](#)]
31. Roberts, H.M.; Grant, M.M.; Hubber, N.; Super, P.; Singhal, R.; Chapple, I.L.C. Impact of Bariatric Surgical Intervention on Peripheral Blood Neutrophil (PBN) Function in Obesity. *Obes. Surg.* **2018**, *28*, 1611–1621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Monzo-Beltran, L.; Vazquez-Tarragon, A.; Cerda, C.; Garcia-Perez, P.; Iradi, A.; Sanchez, C.; Climent, B.; Tormos, C.; Vazquez-Prado, A.; Girbes, J.; et al. One-year follow-up of clinical, metabolic and oxidative stress profile of morbid obese patients after laparoscopic sleeve gastrectomy. 8-oxo-dG as a clinical marker. *Redox Biol.* **2017**, *12*, 389–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Carr, A.C.; McCall, M.R.; Frei, B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: Reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.* **2000**, *20*, 1716–1723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Brennan, M.L.; Hazen, S.L. Emerging role of myeloperoxidase and oxidant stress markers in cardiovascular risk assessment. *Curr. Opin. Lipidol.* **2003**, *14*, 353–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Lau, D.; Baldus, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *111*, 16–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lopez-Domenech, S.; Martinez-Herrera, M.; Abad-Jimenez, Z.; Morillas, C.; Escribano-Lopez, I.; Diaz-Morales, N.; Banuls, C.; Victor, V.M.; Rocha, M. Dietary weight loss intervention improves subclinical atherosclerosis and oxidative stress markers in leukocytes of obese humans. *Int. J. Obes (Lond)* **2019**, *43*, 2200–2209. [[CrossRef](#)]
37. Da Silva, V.R.; Moreira, E.A.; Wilhelm-Filho, D.; de Miranda, J.X.; Beninca, J.P.; Vigil, S.V.; Moratelli, A.M.; Garlet, T.R.; de Souza Meirelles, M.S.; Vannucchi, H.; et al. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients submitted to Roux-en-Y gastric bypass after 1 year of follow-up. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2012**, *66*, 891–899. [[CrossRef](#)]
38. Bielinski, S.J.; Berardi, C.; Decker, P.A.; Kirsch, P.S.; Larson, N.B.; Pankow, J.S.; Sale, M.; de Andrade, M.; Sicotte, H.; Tang, W.; et al. P-selectin and subclinical and clinical atherosclerosis: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* **2015**, *240*, 3–9. [[CrossRef](#)]
39. Klinke, A.; Nussbaum, C.; Kubala, L.; Friedrichs, K.; Rudolph, T.K.; Rudolph, V.; Paust, H.J.; Schroder, C.; Benten, D.; Lau, D.; et al. Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood* **2011**, *117*, 1350–1358. [[CrossRef](#)]
40. Garg, R.; Kumbkarni, Y.; Aljada, A.; Mohanty, P.; Ghanim, H.; Hamouda, W.; Dandona, P. Troglitazone reduces reactive oxygen species generation by leukocytes and lipid peroxidation and improves flow-mediated vasodilatation in obese subjects. *Hypertension* **2000**, *36*, 430–435. [[CrossRef](#)]

41. Escribano-Lopez, I.; Diaz-Morales, N.; Iannantuoni, F.; Lopez-Domenech, S.; de Maranon, A.M.; Abad-Jimenez, Z.; Banuls, C.; Rovira-Llopis, S.; Herance, J.R.; Rocha, M.; et al. The mitochondrial antioxidant SS-31 increases SIRT1 levels and ameliorates inflammation, oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions in type 2 diabetes. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 15862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Borzi, A.M.; Buscemi, C.; Corleo, D.; Randazzo, C.; Rosafio, G.; Pantuso, G.; Buscemi, S. Endothelial Function in Obese Patients Treated with Bariatric Surgery. *Diabetes Metab. Syndr. Obes* **2020**, *13*, 247–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Article

Roux-en-Y Gastric Bypass Modulates AMPK, Autophagy and Inflammatory Response in Leukocytes of Obese Patients

Zaida Abad-Jiménez¹, Sandra López-Domènech^{1,*}, Celia García-Gargallo¹, Teresa Vezza¹, Segundo Ángel Gómez-Abril^{2,3}, Carlos Morillas¹, Pedro Díaz-Pozo¹, Rosa Falcón¹, Celia Bañuls¹, Víctor M. Víctor^{1,4,5,*} and Milagros Rocha^{1,4,*}

- ¹ Department of Endocrinology and Nutrition, University Hospital Doctor Peset, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), 46017 Valencia, Spain; zaiaji@alumni.uv.es (Z.A.-J.); cegarga3@alumni.uv.es (C.G.-G.); vezzateresa@gmail.com (T.V.); carlos.morillas@uv.es (C.M.); pedrodipas2@gmail.com (P.D.-P.); rosafalcon16@gmail.com (R.F.); celia.banuls@uv.es (C.B.)
- ² Department of General and Digestive System Surgery, University Hospital Doctor Peset, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), 46017 Valencia, Spain; sean99cartu@yahoo.com
- ³ Department of Surgery, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia, Av Blasco Ibáñez 13, 46010 Valencia, Spain
- ⁴ CIBERehd-Department of Pharmacology, University of Valencia, Av Blasco Ibáñez 15, 46010 Valencia, Spain
- ⁵ Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia, Av Blasco Ibáñez 13, 46010 Valencia, Spain
- * Correspondence: sandra.lopez@uv.es (S.L.-D.); victor.victor@uv.es (V.M.V.); milagros.rocha@uv.es (M.R.); Tel.: +34-96-318-91-32 (M.R.)



Citation: Abad-Jiménez, Z.;

López-Domènech, S.; García-Gargallo, C.; Vezza, T.; Gómez-Abril, S.Á.; Morillas, C.; Díaz-Pozo, P.; Falcón, R.; Bañuls, C.; Víctor, V.M.; et al. Roux-en-Y Gastric Bypass Modulates AMPK, Autophagy and Inflammatory Response in Leukocytes of Obese Patients.

Biomedicines **2022**, *10*, 430. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020430>

Academic Editors: Alexander N. Orekhov, Alexei Gratchev and Evgeny E. Bezsonov

Received: 13 January 2022

Accepted: 8 February 2022

Published: 12 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Obesity is characterized by low-grade chronic inflammation, metabolic overload, and impaired endothelial and cardiovascular function. Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) results in amelioration of the pro-oxidant status of leukocytes and the metabolic profile. Nevertheless, little is known about the precise mechanism that drives systemic and metabolic improvements following bariatric surgery. In this cohort study, we investigated the effect of RYGB on molecular pathways involving energy homeostasis in leukocytes in 43 obese subjects one year after surgery. In addition to clinical and biochemical parameters, we determined protein expression of systemic proinflammatory cytokines by Luminex[®], different markers of inflammation, endoplasmic reticulum (ER) stress, autophagy/mitophagy by western blot, and mitochondrial membrane potential by fluorescence imaging. Bariatric surgery induced an improvement in metabolic outcomes that was accompanied by a systemic drop in hsCRP, IL6, and IL1 β levels, and a slowing down of intracellular inflammatory pathways in leukocytes (NF- κ B and MCP-1), an increase in AMPK content, a reduction of ER stress (ATF6 and CHOP), augmented autophagy/mitophagy markers (Beclin 1, ATG5, LC3-I, LC3-II, NBR1, and PINK1), and a decrease of mitochondrial membrane potential. These findings shed light on the specific molecular mechanisms by which RYGB facilitates metabolic improvements, highlighting the relevance of pathways involving energy homeostasis as key mediators of these outcomes. In addition, since leukocytes are particularly exposed to physiological changes, they could be used in routine clinical practice as a good sensor of the whole body's responses.

Keywords: autophagy; inflammation; leukocytes; obesity; RYGB

1. Introduction

Obesity is a chronic low-grade inflammatory disease characterized by an imbalance between excessive intake and low expenditure of energy, which leads to metabolic overload. Obesity, per se, is associated with lower life expectancy, mainly due to related comorbidities, including metabolic (insulin resistance (IR), type 2 diabetes (T2D), and dyslipidemia)

and cardiovascular disorders (hypertension, stroke, and endothelial dysfunction), musculoskeletal complications, physical disabilities and limitations, diverse mental illnesses, and cancer [1]. Strategies to treat obesity, including lifestyle interventions and pharmacotherapy, often produce unsatisfactory results [2]. In contrast, Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) is a weight loss surgical technique that has been shown to bring clear health benefits to obese patients [3], including improvement of classic metabolic syndrome outcomes as well as inflammatory and subclinical atherosclerotic parameters [4–6]. However, the underlying molecular mechanisms mediating these clinical improvements are poorly understood.

Chronic low-grade inflammation is an intrinsic characteristic of obesity involving adipose tissue and leukocytes. Ectopic storage of fat stimulates the secretion of proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin 1 β (IL1 β), and interleukin 6 (IL6), which initiates an inflammatory cascade in leukocytes through Toll-like receptors (TLR) and nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) signalling, resulting in the release of several chemokines, including monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). In turn, MCP-1 promotes macrophage infiltration in metabolic tissues and prolongs and exacerbates the inflammatory response, thus helping to maintain IR [7].

Considering the metabolic role of AMP-activated protein kinase (AMPK) in insulin signalling and inflammatory pathways, it has also been proposed as a key pathogenic factor involved in obesity. Genetic ablation of the hematopoietic AMPK β 1 subunit has been shown to increase adipose tissue macrophage infiltration and inflammatory markers and to reduce rates of fatty acid oxidation [8], while increased AMPK activity enhances lipid metabolism and anti-inflammatory actions in the liver and macrophages, offering protection against diet-induced obesity and the insulin resistant phenotype [9–11].

On the other hand, AMPK—one of the main metabolic sensors involved in energy homeostasis—enables cellular metabolism to adapt in response to nutritional challenges. In particular, AMPK is activated by physiological or pathological inputs involving ATP depletion, thereby inducing catabolic cellular processes [12]. Thus, under caloric restriction, AMPK activation promotes glucose uptake and glycolysis and activates lipolysis and oxidation. These changes are associated with a significant up-regulation of mitochondrial metabolism, mitophagy and autophagy and the attenuation of protein translation, resulting in the alleviation of endoplasmic reticulum (ER) stress [13,14].

In response to ER stress, the unfolded protein response (UPR) is activated through three different branches—inositol-requiring 1 α (IRE1 α), double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase (PERK) and activating transcription factor 6 (ATF6)—to prevent a rise in misfolded proteins and to activate the ER-associated degradation (ERAD) system and/or autophagy. However, persistent activation of UPR pathways during metabolic overload can lead to pathological events, including impairment of insulin signaling, initiation of inflammatory cascades [15], or even expression of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein (CHOP), a transcription factor involved in the modulation of numerous pro-apoptotic factors [16,17]. In this context, it has been reported that ER stress is reduced in the adipose tissue of obese subjects after bariatric surgery, suggesting an association between ER stress relief and metabolic improvements in these patients [18,19].

For its part, autophagy is a catabolic process with an important role, not only in the recycling of cytosolic macromolecules and damaged cellular organelles, but also as an energy sensor for cell survival [20]. This process involves the formation and elongation of an isolation membrane driven by Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3 (PI3KC3)/Phosphatidylinositol 3-kinase (VPS34)/Beclin 1 complex and different autophagy-related enzymes (ATGs proteins), catalysing the conjugation and lipidation of microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3)-I to LC3-II, which acts as a bridge between the ubiquitinated cargo and autophagosome. Similarly, the selective engulfment of damaged mitochondria by autophagosomes—referred to as mitophagy—is driven principally by parkin RBR E3 ubiquitin ligase (PRKN) and serine/threonine kinase

phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced putative kinase 1 (PINK1). When mitochondrial membrane potential is disrupted, PINK1 accumulates on the outer mitochondrial membrane and initiates a signalling cascade through mitochondrial clearance, thereby controlling mitochondrial quality and integrity [21]. Previous studies have described increased expression of autophagy markers in adipose tissue of obese subjects [22–24], that decreased after body mass reduction following bariatric surgery [23]. In contrast, reduced autophagic flux has been reported in isolated subcutaneous adipocytes from obese patients compared with non-obese controls, and weight loss after bariatric surgery was found to partially ameliorate autophagy of adipocytes [25]. However, studies of autophagy pathways in leukocytes are scarce [26,27] and, as far as we are aware, none of them has addressed this issue after weight loss induced by bariatric surgery.

Given the well-known role of AMPK as a metabolic sensor and its involvement in the inflammatory response and IR in obesity, it is possible that the improvement of these metabolic outcomes after RYGB is mediated by alterations in AMPK activity and downstream molecular pathways. Therefore, the aim of the present study was to explore whether RYGB-induced weight loss modulates AMPK activity and, following UPR, autophagy and mitophagy in leukocytes of obese patients.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

The present study was conducted in a sub-cohort of patients selected from a larger study of patients with obesity who underwent RYGB [6], registered in clinicaltrials.gov (accessed on 12 January 2022) under study number NCT05071391. All the study subjects were recruited between January 2017 and September 2019 from the Outpatients Clinic of the Endocrinology and Nutrition Service and the Department of General and Digestive System Surgery of the University Hospital Doctor Peset in Valencia (Spain). This prospective cohort study was carried out using 43 patients with a body mass index (BMI) ≥ 30 kg/m² who were prescribed bariatric surgery to treat their obesity and related comorbidities. Patients aged 18 or older were eligible for inclusion. Exclusion criteria were pregnancy or lactation, severe renal or hepatic disease, history of drug abuse, previous history of cardiovascular or inflammatory diseases, and secondary obesity (hypothyroidism, Cushing's syndrome).

The study complied with the Declaration of Helsinki. The hospital's Ethics Committee approved all the procedures involving patients (code 96/16; October, 2016). Written informed consent was obtained from all the participants.

2.2. Clinical and Biochemical Determinations

All variables were determined at baseline and one year after the RYGB intervention. Systolic and diastolic blood pressure, weight, height, and waist circumference were recorded and BMI was calculated. Percentage of excess weight loss (EWL) was determined by the formula $[(\text{preoperative weight} - \text{current weight})/(\text{preoperative weight} - \text{ideal weight (considering BMI} = 25 \text{ kg/m}^2))] \times 100$.

Serum levels of glucose, total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL) cholesterol and triglycerides (TG) were measured by an enzymatic method, using a Beckman LX-20 analyser (Beckman Coulter, La Brea, CA, USA), and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol was measured by Friedewald's formula. Glycated haemoglobin (HbA1c) was measured with a glycohaemoglobin analyser (Arkray Inc., Kyoto, Japan). Insulin levels were determined by an immunochemiluminescent assay and IR status by the Homeostatic Model Assessment for IR index (HOMA-IR) formula $((\text{fasting glucose in mg/dL} \times \text{fasting insulin in } \mu\text{UI/mL})/405)$. Systemic levels of high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) were analysed by means of an immunonephelometric assay (Behring Nephelometer II, Dade Behring, Inc., Newark, DE, USA) (intra-assay coefficient variation (CV) < 5.5%).

2.3. Evaluation of Systemic Cytokines IL6 and IL1 β

Plasma samples were obtained by centrifuging (1500 \times g, 10 min, 4 °C) blood that was collected in EDTA-coated tubes and immediately stored at -80 °C. Levels of the proinflammatory cytokines IL6 and IL1 β were then evaluated with a Luminex[®] 200 analyser system (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) according to the MILLIPLEX[®] Kit manufacturer's procedure (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). All samples were evaluated twice, resulting in intra- and inter-serial CV of < 5.0% and < 15.0%, respectively.

2.4. Isolation of Leukocytes from Blood Samples

In order to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and polymorphonuclear leukocytes (PMNs), citrated blood samples were incubated with dextran 3% at room temperature (RT) for 45 min. The supernatant was then placed over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and then centrifuged for 25 min at 650 \times g. The resulting halo of PBMC was collected and centrifuged for 10 min at 650 \times g. The PMN pellet was incubated with Red Blood Cell Lysis Buffer (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA). PBMCs and PMNs were washed and resuspended in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Capricorn, Ebsdorfergrund, Germany) for subsequent analysis.

2.5. Fluorescence Imaging of Mitochondrial Membrane Potential

Mitochondrial membrane potential was determined by fluorescence static cytometry, using an IX81 Olympus microscope and ScanR version 2.03.2v software (Olympus, Hamburg, Germany). In short, PMNs were seeded in duplicate in 48-well plates and then incubated (30 min, 37 °C) with tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) and Hoechst 33,342 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for nuclei visualization. A total of 16 images per well were analysed.

2.6. Immunoblotting

Leukocytes were lysed for 15 min on ice with a buffer containing 20 mM HEPES pH 7.5, 0.4 M NaCl, 20% glycerol, 0.1 mM EDTA, 10 μ M Na₂MoO₄, 0.5% NP-40, 1 mM dithiothreitol and a protease inhibitor mix constituted by 10 mM NaF, 1 mM NaVO₃, 10 mM PNP and 10 mM β -glycerolphosphate. Next, samples were vortexed for 30 s and centrifuged at 16,100 \times g for 15 min at 4 °C. Total protein was then estimated by BCA assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A total of 25 μ g of protein was resolved in SDS-polyacrylamide gel by electrophoresis and then transferred onto a nitrocellulose membrane. After blocking the membranes for 1 h with 5% skimmed milk in TBS-T, the proteins of interest were detected by overnight blotting at 4 °C with the following antibodies: monoclonal anti-autophagy related protein 5 (ATG5) and polyclonal anti-LC3A/B (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), monoclonal anti-Beclin 1, monoclonal anti-AMPK α 1 α 2, monoclonal anti-AMPK α 1 (phospho T183) α 2 (phospho T172), monoclonal anti-ATF6, and polyclonal anti-MCP-1 (Abcam, Cambridge, UK), monoclonal anti-CHOP and monoclonal anti-NF- κ B (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), polyclonal anti-PINK1 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA), and polyclonal anti-neighbour of BRCA1 gene 1 (NBR1) (Proteintech, Rosemont, IL, USA). Monoclonal anti-actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was incubated as a protein loading control. Secondary antibodies HRP-goat anti-rabbit (Millipore Iberica, Madrid, Spain) or HRP-goat anti-mouse (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were then incubated for 1 h at RT and the chemiluminescence signal was detected by adding ECL Plus reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) or SuperSignal[™] West Femto (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) to the membranes. Visualization was carried out using a Fusion FX5 Acquisition System, and the software Bio1D version 15.03a (Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, France) was used to quantify the signal by a densitometry method.

2.7. Statistical Analysis

This study was designed to achieve a power of 80% and to detect significant ($p < 0.05$) differences of 20% in relation to the primary efficacy criterion—protein detection by western blot—assuming a common SD of 25 units. Accordingly, a minimum of 13 patients was required, as a loss to follow-up rate of 0% was estimated. For the statistical analysis of variables before and after the surgical intervention, we employed the statistics program SPSS 20.0 software (SPSS Statistics Inc., Chicago, IL, USA). Normal distribution was assessed by the Shapiro-Wilk test. In the case of parametric data, variables are represented as mean \pm standard deviation (SD) (in table) or mean + standard error (SE) (in figures), and as median and 25th to 75th percentiles for non-parametric data; qualitative results are expressed as percentages. All data were analysed using a paired Student's t-test (parametric data) or Wilcoxon test (non-parametric data) to compare variables at baseline and at one year follow-up. The confidence interval was 95% for all tests, and variables were considered significantly different when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Anthropometric and Biochemical Parameters following RYGB Surgery

This study was carried out in an obese cohort of 43 patients undergoing RYGB surgery (mean age 45.1 ± 11.4 years). Women constituted 84% of the total population (Table 1).

Table 1. Anthropometric parameters before and after RYGB.

Parameters	Before	After
<i>n</i> (females %)	43 (83.7)	
Age (years)	45.1 ± 11.4	
Weight (kg)	108.7 ± 15.6	79.2 ± 13.0 ***
BMI (kg/m ²)	39.6 ± 4.9	29.2 ± 4.4 ***
Waist (cm)	115.0 ± 10.2	88.6 ± 11.5 ***
EWL (%)		79.1 ± 30.6
SBP (mmHg)	133.2 ± 15.6	123.8 ± 17.3 **
DBP (mmHg)	81.4 ± 10.7	73.9 ± 9.8 **
Glucose (mg/dL)	98.7 ± 26.3	86.0 ± 12.3 ***
Insulin (μ U/mL)	14.6 ± 7.8	7.1 ± 3.2 ***
HOMA-IR	3.8 ± 3.5	1.5 ± 0.7 ***
HbA1c (%)	5.5 ± 0.7	5.2 ± 0.5 ***
TC (mg/dL)	187.0 ± 33.6	166.9 ± 27.7 **
HDLc (mg/dL)	47.0 ± 8.9	55.1 ± 10.0 ***
LDLc (mg/dL)	122.6 ± 41.4	96.4 ± 21.4 ***
TG (mg/dL)	96 (74, 143)	78 (55, 100) **
hsCRP (mg/L)	3.7 (1.7, 6.3)	0.6 (0.3, 1.2) ***
IL6 (pg/mL)	4.0 ± 3.0	3.3 ± 2.3 *
IL1 β (pg/mL)	1.2 ± 0.9	1.0 ± 0.7 *
Treatment		
Hypertension % (<i>n</i>)	34.8 (15)	9.3 (4)
Hyperlipidemia % (<i>n</i>)	23.3 (10)	9.3 (4)
T2D % (<i>n</i>)	30.2 (13)	4.6 (2)

Data are expressed as mean \pm SD or percentage (*n*). TG and hsCRP are represented as median and IQ range (25th and 75th percentile). Values were statistically compared using a paired Student's t-test or Wilcoxon test and were considered significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. BMI, body mass index; DBP, diastolic blood pressure; EWL, excess weight loss; HbA1c, glycated haemoglobin; HDLc, HDL cholesterol; HOMA-IR, Homeostatic Model Assessment for IR index; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; IL1 β , interleukin 1 β ; IL6, interleukin 6; LDLc, LDL cholesterol; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass; SBP, systolic blood pressure; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; T2D, type 2 diabetes.

Patients undergone RYGB surgery showed a significant reduction in their BMI ($p < 0.001$), waist circumference ($p < 0.001$), systolic blood pressure (SBP), and diastolic blood pressure (DBP) ($p < 0.01$), which were accompanied by an improvement in glucose metabolism parameters—glucose, insulin, HOMA-IR, and HbA1c ($p < 0.001$ for all). Lipid

profiles showed a significant decrease in TC content ($p < 0.01$), LDL cholesterol ($p < 0.001$), TG ($p < 0.01$), and a rise in HDL cholesterol levels ($p < 0.001$). When we focused on an acute phase inflammatory reactant—hsCRP ($p < 0.001$)—and systemic cytokines—IL6 and IL1 β ($p < 0.05$, for both)—we observed a significant decline in these inflammatory mediators.

As a whole, we observed a marked reduction in cardiovascular disease risk factors and systemic inflammatory parameters in obese patients one year after RYGB.

3.2. Inflammatory Response, AMPK Activation and ER Stress Markers in Leukocytes following RYGB Surgery

To determine the impact of RYGB on intracellular inflammatory pathways, activation of AMPK and ER stress markers, we evaluated different protein mediators in leukocytes before and after surgery (Figure 1).

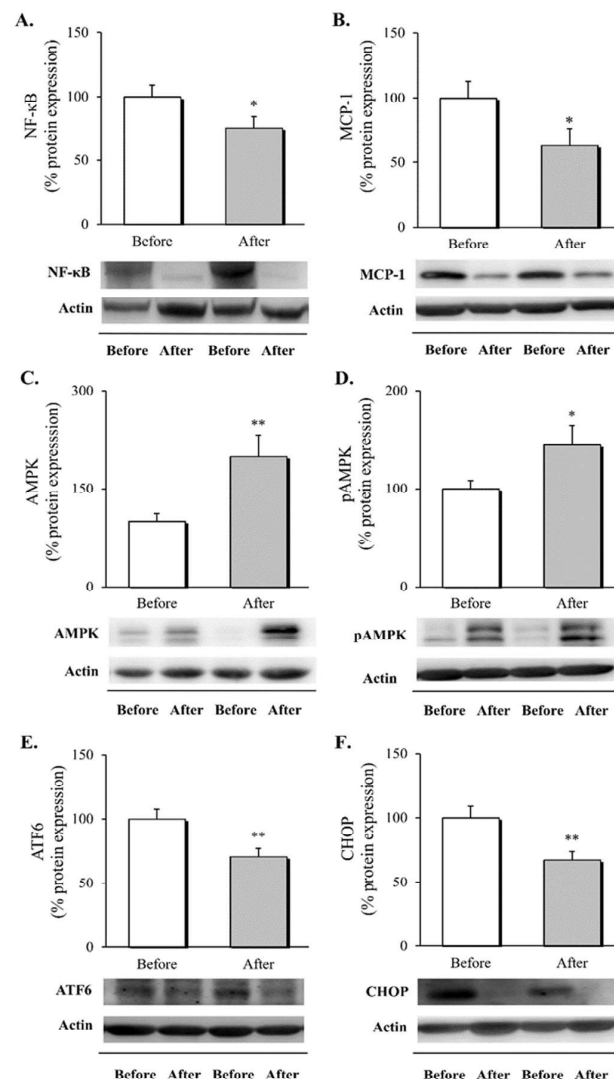


Figure 1. Evaluation of markers related to inflammation, AMPK expression, and ER stress in leukocytes of obese patients at one year follow-up. Protein expression and representative western blot images of (A) the transcription factor NF- κ B ($n = 22$), (B) MCP-1 ($n = 14$), (C) AMPK ($n = 18$), (D) pAMPK ($n = 18$), ER components (E) ATF6 ($n = 30$) and (F) CHOP ($n = 29$). Data are expressed as mean + standard error, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ when compared using a two-sided paired Student's t-test. (p)AMPK, (phosphorylated)AMP-activated protein kinase; ATF6, activating transcription factor 6; CHOP, CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein; ER, endoplasmic reticulum; NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1.

The results show a decrease in NF- κ B, which plays a central role in inflammation through its ability to induce transcription of proinflammatory genes, including MCP-1 (Figure 1A,B, $p < 0.05$ for both), one year after surgery. The effect of the surgical procedure on the activation of AMPK was assessed in leukocytes by quantifying total AMPK protein expression and its activation through T183 and T172 phosphorylation. We observed a significant rise in total and activated AMPK (Figure 1C,D, $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively), one year after the intervention. Finally, given the link between AMPK and the attenuation of protein translation, we evaluated changes in ATF6 and CHOP, markers involved in the UPR and apoptosis in response to chronic cellular stress, observing a drop in the protein expression levels of these mediators (Figure 1E,F, $p < 0.01$ for both).

Overall, these results suggest that RYGB leads to an improvement in the inflammatory response, manifested by a down-regulation of leukocyte activation and chronic stress, that would seem to be mediated by AMPK activation.

3.3. Autophagy and Mitophagy in Leukocytes following RYGB Surgery

After analysing the impact of RYGB surgery on the inflammatory status and UPR of leukocytes, the next step was to specifically evaluate autophagy and mitophagy pathways in these cells (Figure 2).

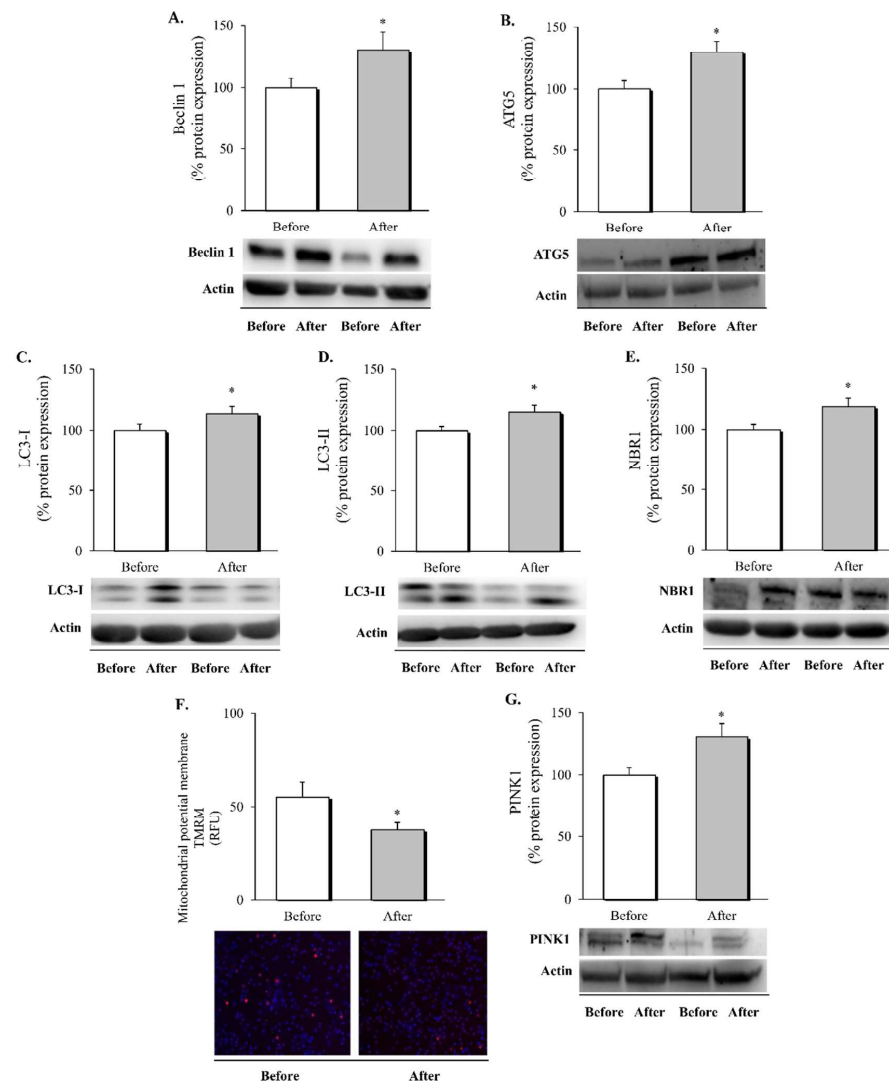


Figure 2. Autophagy and mitophagy markers evaluated in leukocytes of obese patients at one year follow-up. Protein expression and representative western blot images of (A) Beclin 1 ($n = 21$), (B) ATG5 ($n = 21$), (C) LC3-I ($n = 19$), (D) LC3-II ($n = 19$), (E) NBR1 ($n = 16$) and mitophagy marker (G) PINK1

($n = 20$). Fluorescence microscopy images ($100\times$) of (F) TMRM ($n = 26$) as an indicator of mitochondrial membrane potential. Data are expressed as mean + standard error, * $p < 0.05$ when compared using a two-sided paired Student's *t*-test. ATG5, autophagy related 5; LC3, microtubule-associated protein light chain 3; NBR1, neighbour of Brca1; RFU, relative fluorescence units; TMRM, tetramethylrhodamine methyl ester; PINK1, serine/threonine kinase phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced putative kinase 1.

We observed a significant increase in the expression of all the autophagy markers evaluated—Beclin 1, ATG5, LC3-I, LC3-II, and NBR1, including autophagy nucleation, elongation and, maturation of autophagosome (Figure 2A–E, respectively, $p < 0.05$ in all cases). In addition to the up-regulation of autophagy, we also sought to evaluate potential changes in mitophagy. Alteration of the mitochondrial membrane potential is considered the first signal of mitochondrion clearance. In this respect, we detected a decrease in the TMRM fluorescence signal (Figure 2F, $p < 0.05$) that was accompanied by an increase in PINK1 (Figure 2G, $p < 0.05$), suggesting a restoration of mitochondrial homeostasis following the surgical intervention.

These results provide evidence that RYGB induces intracellular clearance through the regulation of autophagy in leukocytes, improving mitochondrial turnover as a consequence.

4. Discussion

In the present study we demonstrated that, in our cohort of middle-aged obese subjects, RYGB surgery promoted pronounced weight loss, accompanied by an improvement in metabolic and inflammatory parameters one year later. We observed an up-regulation of AMPK in circulating leukocytes after the intervention, and this was accompanied by an amelioration of proinflammatory signalling, ER stress and proapoptotic markers and the activation of cell clearance mechanisms through autophagy/mitophagy. Considering the essential role of AMPK as a metabolic regulator in obesity, our results suggest that RYGB stimulates adaptive responses in leukocytes that may facilitate the partial recovery of cellular homeostasis, with potential systemic effects on inflammation and IR. In sum, the present results represent novel and valuable evidence about the molecular mechanisms that seem to underlie the protective effects of bariatric surgery against metabolic comorbidities in obesity.

There is accumulating evidence that RYGB produces an improvement in lipid profile, loss of excess BMI and a lower risk of cardiovascular events, all of which are maintained one year after surgery [28] and remain for six [29] to eight years [30], thus having a durable impact on cardiovascular health. Clinical and metabolic parameters had improved considerably in our study population one year after surgery, with relevant decreases observed in blood pressure and systemic inflammation, and improvements in glucose homeostasis and lipid profile, all of which is in the line with the findings of previous studies.

Moreover, weight loss induced by surgical intervention may modify regulators that control catabolic and anabolic cellular processes. We used leukocytes to evaluate these cellular pathways because they are particularly exposed to physiological changes and act as a sensor of the whole body's responses to disease [31]. Specifically, it has been reported that the mitochondrial physiology of lymphocytes in response to the nutritional state is related to that of other cell types [32]. In addition, dysregulation of the immune cell response is a major contributor to chronic systemic inflammation in obesity, with deleterious consequences for insulin sensitivity and endothelial function [33].

Growing evidence has highlighted an important role for AMPK in the pathophysiology of obesity, particularly in the organs involved in energy metabolism, such as white adipose tissue, skeletal muscle and liver [9,34]. Focusing on adipose tissue, Luo et al. [35] observed that metformin-induced activation of AMPK reversed fat fibrosis and IR in obese mice, while suppression of AMPK contributed to a persistent aberrant extracellular matrix in human visceral adipose tissue. In obese patients, decreased AMPK activity has been associated with increased expression of inflammatory genes in adipose tissue and

systemic IR [36], whereas weight loss intervention (caloric restriction) has been found to induce increased metabolic capacity and enhanced AMPK activation [37]. However, only a few studies have evaluated the effect of bariatric surgery on AMPK in humans. Increased expression and activity of AMPK was reported in subcutaneous adipose tissue 3–6 months after RYGB, and was accompanied by a reduction in oxidative stress, ER stress and inflammatory markers [19,38]. Similarly, AMPK activity was found to be increased in PBMCs one year after bariatric surgery—via laparoscopic bypass or sleeve gastrectomy—inducing chaperone-mediated autophagy, a reduction in protein oxidative damage and hsCRP [39,40]. In accordance with these results, our study highlights an increase in AMPK activity associated with a reduction in systemic inflammatory markers—IL6, IL1 β , and hsCRP—and intracellular proinflammatory mediators—NF- κ B and MCP-1—in leukocytes. Interestingly, AMPK inhibits the acute proinflammatory response by targeting the NF- κ B signalling pathway in leukocytes [41], and AMPK activators relieve ER stress and MCP-1 in human monocytes/macrophages treated with palmitate or lipopolysaccharide (LPS) [42,43], which is also in line with our results. On the basis of all these findings, strategies that activate AMPK should be harnessed for ameliorating inflammatory pathways.

Pathological conditions involving inflammation have been implicated in the activation of ER stress. In this context, previous research has associated obesity with an increase in ER stress markers in subcutaneous adipose tissue that correlates with adiposity [44,45]. Moreover, Gregor et al. [18] reported reduced expression of ER stress markers in the liver (glucose-regulated protein 78 kDa (GRP78), phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 2A (p-EIF2 α)), subcutaneous adipose tissue (X-box binding protein 1 (sXBP1), GRP78, CHOP and p-EIF2 α) one year after RYGB intervention. In line with this, Ferraz Bannitz et al. [19] observed a drop in ER stress expression (PERK and calreticulin(CALR)) in subcutaneous adipose tissue 3–6 months after surgery. Both studies described changes mainly in transcripts in subcutaneous adipose tissue; as far as we are aware, we are the first group to describe the effects of RYGB on ER stress protein markers in leukocytes. Our results are not only in accordance with those of the aforementioned reports but are also in line with our previous study describing the amelioration of chronic ER stress in leukocytes of obese patients after diet-induced weight loss, revealed by a diminished ATF6 and CHOP expression [46]. As a whole, these data demonstrate a significant regulation of ER stress in the weight loss provided by RYGB, and a possible link with amelioration of the inflammatory response [15].

Another important role of the AMPK pathway is the regulation of different phases of autophagy. On the one hand, AMPK reduces mechanistic target of rapamycin (mTOR) activity under conditions of energy stress [47]. Alternatively, AMPK may directly phosphorylate unc-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1) which is important, not only for autophagy, but also for the selective removal of damaged mitochondria [48], ATG9 [49], VPS34 and Beclin 1 [50]. However, few studies have evaluated the possible interaction between autophagy and weight loss in obese models. Previous research has shown that the downregulation of hepatic autophagy in high-fat diet-induced obesity promotes ER stress and IR [51,52], whereas RYGB is reported to improve hepatic lipid metabolism through an increase in the LC3-II/LC3-I ratio and the down-regulation of mTOR [53]. In the case of 3T3-L1 preadipocytes, the recent report published by Zhang et al. [54] points to autophagy as the molecular effector that restores lipid accumulation in adipocytes through activation of autophagy and chaperone-mediated autophagy. In accordance with these previous studies, we have detected an up-regulation of the autophagy markers involved in the nucleation, elongation, and formation of autophagosomes and cargo receptors—Beclin 1, ATG5-ATG12 complex, LC3, and NBR1, respectively—in leukocytes after RYGB. Altogether, these findings implicate the activation of autophagic pathways in the amelioration of obesity-associated comorbidities in metabolic tissues, whereas, in leukocytes, autophagy has an immunological function involving the control of inflammation (see [55] for review). In line with this, previous studies have shown that B cells present a skewed profile and lose the function by which they facilitate T cell inflammation after RYGB, which results

in a significantly elevated frequency of anti-inflammatory IL10-producing cells and a reduced frequency of IL6-producing cells [56], in line with the systemic reduction of IL6 we report herein.

Mitophagy is not only regulated by AMPK through ULK phosphorylation [57], but also by PINK1/PRKN-mediated removal of depolarized mitochondria [58]. In the present study, we have shown that an increase in AMPK expression after RYGB is associated with a reduction in mitochondrial membrane potential and an increase in the mitophagy mediator PINK1. Furthermore, we have previously demonstrated in a larger cohort of obese patients that leukocytes undergo a drop in superoxide levels after RYGB [6], thus suggesting that mitochondrial clearance through mitophagy improves mitochondrial function after the intervention. In accordance with our findings, Kirwan and colleagues reported increased expression of the mitochondrial fusion protein mitofusin 1 (MFN1) and the mitophagy marker Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein (BNIP3) in the liver of obese rats following RYGB [59].

The principal strength of our study is that we have evaluated the molecular pathways that involve inflammation, autophagy, and stress sensors in the leukocytes of obese patients one year after RYGB. In addition, as far as we know, this is the first study that has evaluated these markers in human obese patients, and our results suggest an interconnection between AMPK activation, inflammation, autophagy, mitochondrial function, and ER markers. However, since causality cannot be inferred from our data, further analyses are required to determine how these intracellular signalling pathways are interrelated. Furthermore, our findings need to be corroborated over a long-term period. Finally, further prospective research employing direct and functional methods (e.g., confocal and electron microscopy) to assess autophagy flux and mitochondrial dynamics would help to reinforce the validity of our findings.

5. Conclusions

In summary, the results of the present study extend our understanding of the molecular mechanisms underlying the metabolic improvements that obese patients display when weight loss is achieved by RYGB. Interestingly, we show that the improvements in systemic inflammation and metabolic outcomes are mirrored by an increase in AMPK content, the attenuation of inflammatory markers and chronic ER stress, and the activation of cell clearance mechanisms through autophagy/mitophagy. Our findings highlight the relevance of restoration of leukocyte homeostasis—including different cellular signaling pathways—as a potential target in the treatment of metabolic complications of obesity. Therefore, since AMPK plays a central role in energy homeostasis, future research should be focused on development of strategies that activate this molecular pathway.

Author Contributions: Conceptualization, M.R. and V.M.V.; methodology, S.L.-D., T.V., C.B., M.R. and V.M.V.; validation, S.L.-D., T.V., V.M.V. and M.R.; formal analysis, Z.A.-J., S.L.-D., V.M.V. and M.R.; investigation, Z.A.-J., S.L.-D., C.G.-G., T.V., R.F. and P.D.-P.; resources, S.Á.G.-A., C.M., M.R. and V.M.V.; data curation, Z.A.-J., S.L.-D., V.M.V. and M.R.; writing—original draft preparation, Z.A.-J., S.L.-D. and M.R.; writing—review and editing, S.L.-D., M.R. and V.M.V.; visualization, Z.A.-J. and C.G.-G.; supervision, S.L.-D., T.V., V.M.V. and M.R.; project administration, S.L.-D., M.R. and V.M.V.; funding acquisition, M.R. and V.M.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Carlos III Health Institute (ISCIII), co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF “A way to build Europe”), grant number PI19/00437 (M.R.), PI19/00838 (V.M.V.), FI17/00144 (Z.A.-J.), CD19/00180 (T.V.), PI18/00932 (C.B.) and CP19/00077 (C.B.); by the Ministry of Education of Generalitat Valenciana, grant number PROMETEO/2019/027 (V.M.V.); by the Ministry of Innovation, University, Science and Digital Society of Generalitat Valenciana, grant number APOSTD/2020/145 (S.L.-D.), ACIF/2020/371 (C.G.-G.), and ACIF/2020/370 (P.D.-P.); by the Ministry of Economy and Competitiveness, grant number PTA2017-14355-I (R.F.); by FISABIO, grant number UGP-20-132 (C.B.)

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by Ethics Committee of University Hospital Doctor Peset (protocol code 96/16; October 2016).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding authors. The data are not publicly available due to ethical reasons.

Acknowledgments: The authors thank Brian Normanly (University of Valencia/CIBERehd) for his editorial assistance and Begoña Zaragoza (University Hospital Doctor Peset) for her technical assistance. Servier Medical ART (SMART) resources were used to produce the images in the graphical abstract.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Blüher, M. Obesity: Global Epidemiology and Pathogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2019**, *15*, 288–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Lorenzo, A.D. New Obesity Classification Criteria as a Tool for Bariatric Surgery Indication. *WJG* **2016**, *22*, 681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Sjöström, L.; Narbro, K.; Sjöström, C.D.; Karason, K.; Larsson, B.; Wedel, H.; Lystig, T.; Sullivan, M.; Bouchard, C.; Carlsson, B.; et al. Effects of Bariatric Surgery on Mortality in Swedish Obese Subjects. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 741–752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Rega-Kaun, G.; Kaun, C.; Jaegersberger, G.; Prager, M.; Hackl, M.; Demyanets, S.; Wojta, J.; Hohensinner, P.J. Roux-En-Y-Bariatric Surgery Reduces Markers of Metabolic Syndrome in Morbidly Obese Patients. *Obes. Surg.* **2020**, *30*, 391–400. [[CrossRef](#)]
5. Farias, G.; Netto, B.D.M.; Boritza, K.; Bettini, S.C.; Vilela, R.M.; Dâmaso, A.R. Impact of Weight Loss on Inflammation State and Endothelial Markers Among Individuals with Extreme Obesity After Gastric Bypass Surgery: A 2-Year Follow-up Study. *Obes. Surg.* **2020**, *30*, 1881–1890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Abad-Jiménez, Z.; López-Domènech, S.; Gómez-Abril, S.Á.; Periañez-Gómez, D.; de Marañón, A.M.; Bañuls, C.; Morillas, C.; Víctor, V.M.; Rocha, M. Effect of Roux-En-Y Bariatric Bypass Surgery on Subclinical Atherosclerosis and Oxidative Stress Markers in Leukocytes of Obese Patients: A One-Year Follow-Up Study. *Antioxidants* **2020**, *9*, 734. [[CrossRef](#)]
7. Monteiro, R.; Azevedo, I. Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome. *Mediat. Inflamm.* **2010**, *2010*, 1–10. [[CrossRef](#)]
8. Galic, S.; Fullerton, M.D.; Schertzer, J.D.; Sikkema, S.; Marcinko, K.; Walkley, C.R.; Izon, D.; Honeyman, J.; Chen, Z.-P.; van Denderen, B.J.; et al. Hematopoietic AMPK B1 Reduces Mouse Adipose Tissue Macrophage Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *J. Clin. Investig.* **2011**, *121*, 4903–4915. [[CrossRef](#)]
9. Garcia, D.; Hellberg, K.; Chaix, A.; Wallace, M.; Herzig, S.; Badur, M.G.; Lin, T.; Shokhirev, M.N.; Pinto, A.F.M.; Ross, D.S.; et al. Genetic Liver-Specific AMPK Activation Protects against Diet-Induced Obesity and NAFLD. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 192–208. [[CrossRef](#)]
10. Li, Y.; Xu, S.; Mihaylova, M.M.; Zheng, B.; Hou, X.; Jiang, B.; Park, O.; Luo, Z.; Lefai, E.; Shyy, J.Y.-J.; et al. AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-Induced Insulin-Resistant Mice. *Cell Metab.* **2011**, *13*, 376–388. [[CrossRef](#)]
11. Chan, K.L.; Pilon, N.J.; Sivaloganathan, D.M.; Costford, S.R.; Liu, Z.; Thérêt, M.; Chazaud, B.; Klip, A. Palmitoleate Reverses High Fat-Induced Proinflammatory Macrophage Polarization via AMP-Activated Protein Kinase (AMPK). *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 16979–16988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Xue, B.; Kahn, B.B. AMPK Integrates Nutrient and Hormonal Signals to Regulate Food Intake and Energy Balance through Effects in the Hypothalamus and Peripheral Tissues: AMPK Regulates Food Intake and Energy Balance. *J. Physiol.* **2006**, *574*, 73–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Mihaylova, M.M.; Shaw, R.J. The AMPK Signalling Pathway Coordinates Cell Growth, Autophagy and Metabolism. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 1016–1023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kim, H.; Moon, S.Y.; Kim, J.-S.; Baek, C.H.; Kim, M.; Min, J.Y.; Lee, S.K. Activation of AMP-Activated Protein Kinase Inhibits ER Stress and Renal Fibrosis. *Am. J. Physiol. -Ren. Physiol.* **2015**, *308*, F226–F236. [[CrossRef](#)]
15. Hotamisligil, G.S. Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell* **2010**, *140*, 900–917. [[CrossRef](#)]
16. Zhang, K.; Kaufman, R.J. From Endoplasmic-Reticulum Stress to the Inflammatory Response. *Nature* **2008**, *454*, 455–462. [[CrossRef](#)]
17. Adams, C.J.; Kopp, M.C.; Larburu, N.; Nowak, P.R.; Ali, M.M.U. Structure and Molecular Mechanism of ER Stress Signaling by the Unfolded Protein Response Signal Activator IRE1. *Front. Mol. Biosci.* **2019**, *6*, 11. [[CrossRef](#)]

18. Gregor, M.F.; Yang, L.; Fabbrini, E.; Mohammed, B.S.; Eagon, J.C.; Hotamisligil, G.S.; Klein, S. Endoplasmic Reticulum Stress Is Reduced in Tissues of Obese Subjects After Weight Loss. *Diabetes* **2009**, *58*, 693–700. [[CrossRef](#)]
19. Ferraz-Bannitz, R.; Welendorf, C.R.; Coelho, P.O.; Salgado, W.; Nonino, C.B.; Beraldo, R.A.; Foss-Freitas, M.C. Bariatric Surgery Can Acutely Modulate ER-Stress and Inflammation on Subcutaneous Adipose Tissue in Non-Diabetic Patients with Obesity. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2021**, *13*, 19. [[CrossRef](#)]
20. Ohsumi, Y. Historical Landmarks of Autophagy Research. *Cell Res.* **2014**, *24*, 9–23. [[CrossRef](#)]
21. Jin, S.M.; Lazarou, M.; Wang, C.; Kane, L.A.; Narendra, D.P.; Youle, R.J. Mitochondrial Membrane Potential Regulates PINK1 Import and Proteolytic Destabilization by PARL. *J. Cell Biol.* **2010**, *191*, 933–942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kovsan, J.; Blüher, M.; Tarnowski, T.; Klötting, N.; Kirshtein, B.; Madar, L.; Shai, I.; Golan, R.; Harman-Boehm, I.; Schön, M.R.; et al. Altered Autophagy in Human Adipose Tissues in Obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, E268–E277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Nuñez, C.E.; Rodrigues, V.S.; Gomes, F.S.; de Moura, R.F.; Victorio, S.C.; Bombassaro, B.; Chaim, E.A.; Pareja, J.C.; Geloneze, B.; Velloso, L.A.; et al. Defective Regulation of Adipose Tissue Autophagy in Obesity. *Int. J. Obes.* **2013**, *37*, 1473–1480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Öst, A.; Svensson, K.; Ruishalme, I.; Brännmark, C.; Franck, N.; Krook, H.; Sandström, P.; Kjølhede, P.; Strålfors, P. Attenuated MTOR Signaling and Enhanced Autophagy in Adipocytes from Obese Patients with Type 2 Diabetes. *Mol. Med.* **2010**, *16*, 235–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Soussi, H.; Reggio, S.; Alili, R.; Prado, C.; Mutel, S.; Pini, M.; Rouault, C.; Clément, K.; Dugail, I. DAPK2 Downregulation Associates With Attenuated Adipocyte Autophagic Clearance in Human Obesity. *Diabetes* **2015**, *64*, 3452–3463. [[CrossRef](#)]
26. Chatterjee, T.; Pattanayak, R.; Ukil, A.; Chowdhury, S.; Bhattacharyya, M. Autophagy Protects Peripheral Blood Mononuclear Cells against Inflammation, Oxidative and Nitrosative Stress in Diabetic Dyslipidemia. *Free. Radic. Biol. Med.* **2019**, *143*, 309–323. [[CrossRef](#)]
27. Rovira-Llopis, S.; Díaz-Morales, N.; Bañuls, C.; Blas-García, A.; Polo, M.; López-Domenech, S.; Jover, A.; Rocha, M.; Hernández-Mijares, A.; Víctor, V.M. Is Autophagy Altered in the Leukocytes of Type 2 Diabetic Patients? *Antioxid. Redox Signal.* **2015**, *23*, 1050–1056. [[CrossRef](#)]
28. Gero, D.; Favre, L.; Allemann, P.; Fournier, P.; Demartines, N.; Suter, M. Laparoscopic Roux-En-Y Gastric Bypass Improves Lipid Profile and Decreases Cardiovascular Risk: A 5-Year Longitudinal Cohort Study of 1048 Patients. *Obes. Surg.* **2018**, *28*, 805–811. [[CrossRef](#)]
29. Adams, T.D.; Davidson, L.E.; Litwin, S.E.; Kolotkin, R.L.; LaMonte, M.J.; Pendleton, R.C.; Strong, M.B.; Vinik, R.; Wanner, N.A.; Hopkins, P.N.; et al. Health Benefits of Gastric Bypass Surgery After 6 Years. *JAMA* **2012**, *308*, 1122. [[CrossRef](#)]
30. Benotti, P.N.; Wood, G.C.; Carey, D.J.; Mehra, V.C.; Mirshahi, T.; Lent, M.R.; Petrick, A.T.; Still, C.; Gerhard, G.S.; Hirsch, A.G. Gastric Bypass Surgery Produces a Durable Reduction in Cardiovascular Disease Risk Factors and Reduces the Long-Term Risks of Congestive Heart Failure. *JAMA* **2017**, *6*. [[CrossRef](#)]
31. Mosallaei, M.; Ehteshami, N.; Rahimirad, S.; Saghi, M.; Vatandoost, N.; Khosravi, S. PBMCs: A New Source of Diagnostic and Prognostic Biomarkers. *Arch. Physiol. Biochem.* **2020**, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Cortez, E.; Neves, F.A.; Bernardo, A.F.; Stumbo, A.C.; Carvalho, L.; Garcia-Souza, É.; Sichieri, R.; Moura, A.S. Lymphocytes Mitochondrial Physiology as Biomarker of Energy Metabolism during Fasted and Fed Conditions. *Sci. World J.* **2012**, *2012*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Asghar, A.; Sheikh, N. Role of Immune Cells in Obesity Induced Low Grade Inflammation and Insulin Resistance. *Cell. Immunol.* **2017**, *315*, 18–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kjøbsted, R.; Pedersen, A.J.T.; Hingst, J.R.; Sabaratnam, R.; Birk, J.B.; Kristensen, J.M.; Højlund, K.; Wojtaszewski, J.F.P. Intact Regulation of the AMPK Signaling Network in Response to Exercise and Insulin in Skeletal Muscle of Male Patients with Type 2 Diabetes: Illumination of AMPK Activation in Recovery from Exercise. *Diabetes* **2016**, *65*, 1219–1230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Luo, T.; Nocon, A.; Fry, J.; Sherban, A.; Rui, X.; Jiang, B.; Xu, X.J.; Han, J.; Yan, Y.; Yang, Q.; et al. AMPK Activation by Metformin Suppresses Abnormal Extracellular Matrix Remodeling in Adipose Tissue and Ameliorates Insulin Resistance in Obesity. *Diabetes* **2016**, *65*, 2295–2310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Gauthier, M.-S.; O'Brien, E.L.; Bigornia, S.; Mott, M.; Cacicedo, J.M.; Xu, X.J.; Gokce, N.; Apovian, C.; Ruderman, N. Decreased AMP-Activated Protein Kinase Activity Is Associated with Increased Inflammation in Visceral Adipose Tissue and with Whole-Body Insulin Resistance in Morbidly Obese Humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *404*, 382–387. [[CrossRef](#)]
37. Fritzen, A.M.; Lundsgaard, A.-M.; Jordy, A.B.; Poulsen, S.K.; Stender, S.; Pilegaard, H.; Astrup, A.; Larsen, T.M.; Wojtaszewski, J.F.P.; Richter, E.A.; et al. New Nordic Diet-Induced Weight Loss Is Accompanied by Changes in Metabolism and AMPK Signaling in Adipose Tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2015**, *100*, 3509–3519. [[CrossRef](#)]
38. Xu, X.J.; Apovian, C.; Hess, D.; Carmine, B.; Saha, A.; Ruderman, N. Improved Insulin Sensitivity 3 Months After RYGB Surgery Is Associated With Increased Subcutaneous Adipose Tissue AMPK Activity and Decreased Oxidative Stress. *Diabetes* **2015**, *64*, 3155–3159. [[CrossRef](#)]
39. Angelini, G.; Castagneto Gisser, L.; Del Corpo, G.; Giordano, C.; Cerbelli, B.; Severino, A.; Manco, M.; Basso, N.; Birkenfeld, A.L.; Bornstein, S.R.; et al. New Insight into the Mechanisms of Ectopic Fat Deposition Improvement after Bariatric Surgery. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 17315. [[CrossRef](#)]

40. García-Prieto, C.F.; Gil-Ortega, M.; Vega-Martín, E.; Ramiro-Cortijo, D.; Martín-Ramos, M.; Bordiú, E.; Sanchez-Pernaute, A.; Torres, A.; Aránguez, I.; Fernández-Alfonso, M.; et al. Beneficial Effect of Bariatric Surgery on Abnormal MMP-9 and AMPK Activities: Potential Markers of Obesity-Related CV Risk. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 553. [[CrossRef](#)]
41. Yang, Z.; Kahn, B.B.; Shi, H.; Xue, B. Macrophage A1 AMP-Activated Protein Kinase (A1AMPK) Antagonizes Fatty Acid-Induced Inflammation through SIRT1. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 19051–19059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Bułdak, Ł.; Machnik, G.; Bułdak, R.J.; Łabuzek, K.; Bołdys, A.; Okopień, B. Exenatide and Metformin Express Their Anti-Inflammatory Effects on Human Monocytes/Macrophages by the Attenuation of MAPKs and NFκB Signaling. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2016**, *389*, 1103–1115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Boß, M.; Newbatt, Y.; Gupta, S.; Collins, I.; Brüne, B.; Namgaladze, D. AMPK-Independent Inhibition of Human Macrophage ER Stress Response by AICAR. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Alhusaini, S.; McGee, K.; Schisano, B.; Harte, A.; McTernan, P.; Kumar, S.; Tripathi, G. Lipopolysaccharide, High Glucose and Saturated Fatty Acids Induce Endoplasmic Reticulum Stress in Cultured Primary Human Adipocytes: Salicylate Alleviates This Stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *397*, 472–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Sharma, N.K.; Das, S.K.; Mondal, A.K.; Hackney, O.G.; Chu, W.S.; Kern, P.A.; Rasouli, N.; Spencer, H.J.; Yao-Borengasser, A.; Elbein, S.C. Endoplasmic Reticulum Stress Markers Are Associated with Obesity in Nondiabetic Subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *93*, 4532–4541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. López-Domènech, S.; Abad-Jiménez, Z.; Iannantuoni, F.; de Marañón, A.M.; Rovira-Llopiés, S.; Morillas, C.; Bañuls, C.; Víctor, V.M.; Rocha, M. Moderate Weight Loss Attenuates Chronic Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial Dysfunction in Human Obesity. *Mol. Metab.* **2019**, *19*, 24–33. [[CrossRef](#)]
47. Kim, J.; Kundu, M.; Viollet, B.; Guan, K.-L. AMPK and MTOR Regulate Autophagy through Direct Phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 132–141. [[CrossRef](#)]
48. Egan, D.F.; Shackelford, D.B.; Mihaylova, M.M.; Gelino, S.; Kohnz, R.A.; Mair, W.; Vasquez, D.S.; Joshi, A.; Gwinn, D.M.; Taylor, R.; et al. Phosphorylation of ULK1 (HATG1) by AMP-Activated Protein Kinase Connects Energy Sensing to Mitophagy. *Science* **2011**, *331*, 456–461. [[CrossRef](#)]
49. Weerasekara, V.K.; Panek, D.J.; Broadbent, D.G.; Mortenson, J.B.; Mathis, A.D.; Logan, G.N.; Prince, J.T.; Thomson, D.M.; Thompson, J.W.; Andersen, J.L. Metabolic-Stress-Induced Rearrangement of the 14-3-3ζ Interactome Promotes Autophagy via a ULK1- and AMPK-Regulated 14-3-3ζ Interaction with Phosphorylated Atg9. *Mol. Cell Biol.* **2014**, *34*, 4379–4388. [[CrossRef](#)]
50. Kim, J.; Kim, Y.C.; Fang, C.; Russell, R.C.; Kim, J.H.; Fan, W.; Liu, R.; Zhong, Q.; Guan, K.-L. Differential Regulation of Distinct Vps34 Complexes by AMPK in Nutrient Stress and Autophagy. *Cell* **2013**, *152*, 290–303. [[CrossRef](#)]
51. Soltis, A.R.; Kennedy, N.J.; Xin, X.; Zhou, F.; Ficarro, S.B.; Yap, Y.S.; Matthews, B.J.; Lauffenburger, D.A.; White, F.M.; Marto, J.A.; et al. Hepatic Dysfunction Caused by Consumption of a High-Fat Diet. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 3317–3328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Yang, L.; Li, P.; Fu, S.; Calay, E.S.; Hotamisligil, G.S. Defective Hepatic Autophagy in Obesity Promotes ER Stress and Causes Insulin Resistance. *Cell Metab.* **2010**, *11*, 467–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ma, N.; Ma, R.; Tang, K.; Li, X.; He, B. Roux-En-Y Gastric Bypass in Obese Diabetic Rats Promotes Autophagy to Improve Lipid Metabolism through MTOR/P70S6K Signaling Pathway. *J. Diabetes Res.* **2020**, *2020*, 4326549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Zhang, T.; Liu, J.; Tong, Q.; Lin, L. SIRT3 Acts as a Positive Autophagy Regulator to Promote Lipid Mobilization in Adipocytes via Activating AMPK. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Deretic, V.; Saitoh, T.; Akira, S. Autophagy in Infection, Inflammation and Immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 722–737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Dai, X.; Zhao, W.; Zhan, J.; Zeng, S.; Ran, D.; Zhang, H.; Song, Z.; Song, K.H.; Wu, L. B Cells Present Skewed Profile and Lose the Function of Supporting T Cell Inflammation after Roux-En-Y Gastric Bypass. *Int. Immunopharmacol.* **2017**, *43*, 16–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Laker, R.C.; Drake, J.C.; Wilson, R.J.; Lira, V.A.; Lewellen, B.M.; Ryall, K.A.; Fisher, C.C.; Zhang, M.; Saucerman, J.J.; Goodyear, L.J.; et al. Ampk Phosphorylation of Ulk1 Is Required for Targeting of Mitochondria to Lysosomes in Exercise-Induced Mitophagy. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 548. [[CrossRef](#)]
58. Nguyen, T.N.; Padman, B.S.; Lazarou, M. Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy. *Trends Cell Biol.* **2016**, *26*, 733–744. [[CrossRef](#)]
59. Sacks, J.; Mulya, A.; Fealy, C.E.; Huang, H.; Mosinski, J.D.; Pagadala, M.R.; Shimizu, H.; Batayyah, E.; Schauer, P.R.; Brethauer, S.A.; et al. Effect of Roux-En-Y Gastric Bypass on Liver Mitochondrial Dynamics in a Rat Model of Obesity. *Physiol. Rep.* **2018**, *6*, e13600. [[CrossRef](#)]



Article

Impact of Roux-en-Y Gastric Bypass on Mitochondrial Biogenesis and Dynamics in Leukocytes of Obese Women

Zaida Abad-Jiménez ^{1,†}, Teresa Vezza ^{1,†}, Sandra López-Domènech ¹, Meylin Fernández-Reyes ¹, Francisco Canet ¹, Carlos Morillas ¹, Segundo Ángel Gómez-Abril ^{2,3}, Celia Bañuls ¹, Víctor M. Víctor ^{1,4,5,*} and Milagros Rocha ^{1,4,*}

¹ Department of Endocrinology and Nutrition, University Hospital Doctor Peset, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), 46017 Valencia, Spain; zaiaji@alumni.uv.es (Z.A.-J.); vezza_ter@gva.es (T.V.); sandra.lopez@uv.es (S.L.-D.); meyllyam05@gmail.com (M.F.-R.); francasu@alumni.uv.es (F.C.); carlos.morillas@uv.es (C.M.); celia.banuls@uv.es (C.B.)

² Department of General and Digestive System Surgery, University Hospital Doctor Peset, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), 46017 Valencia, Spain; sean99cartu@yahoo.com

³ Department of Surgery, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia, Av. Blasco Ibáñez 13, 46010 Valencia, Spain

⁴ CIBERehd-Department of Pharmacology, University of Valencia, Av. Blasco Ibáñez 13, 46010 Valencia, Spain

⁵ Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain

* Correspondence: victor.victor@uv.es (V.M.V.); milagros.rocha@uv.es (M.R.); Tel.: +34-96-318-91-32 (M.R.)

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Abad-Jiménez, Z.; Vezza, T.; López-Domènech, S.; Fernández-Reyes, M.; Canet, F.; Morillas, C.; Gómez-Abril, S.Á.; Bañuls, C.; Víctor, V.M.; Rocha, M. Impact of Roux-en-Y Gastric Bypass on Mitochondrial Biogenesis and Dynamics in Leukocytes of Obese Women. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1302. <https://doi.org/10.3390/antiox11071302>

Academic Editor: Stanley Omaye

Received: 16 May 2022

Accepted: 27 June 2022

Published: 29 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The chronic low-grade inflammation widely associated with obesity can lead to a prooxidant status that triggers mitochondrial dysfunction. To date, Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) is considered the most effective strategy for obese patients. However, little is known about its molecular mechanisms. This interventional study aimed to investigate whether RYGB modulates oxidative stress, inflammation and mitochondrial dynamics in the leukocytes of 47 obese women at one year follow-up. We evaluated biochemical parameters and serum inflammatory cytokines -TNF α , IL6 and IL1 β - to assess systemic status. Total superoxide production -dHe-, mitochondrial membrane potential -TMRM-, leucocyte protein expression of inflammation mediators -MCP1 and NF-kB-, antioxidant defence -GPX1-, mitochondrial regulation—PGC1 α , TFAM, OXPHOS and MIEAP- and dynamics -MFN2, MNF1, OPA1, FIS1 and p-DRP1- were also determined. After RYGB, a significant reduction in superoxide and mitochondrial membrane potential was evident, while GPX1 content was significantly increased. Likewise, a marked upregulation of the transcription factors PGC1 α and TFAM, complexes of the oxidative phosphorylation chain (I–V) and MIEAP and MFN1 was observed. We conclude that women undergoing RYGB benefit from an amelioration of their prooxidant and inflammatory status and an improvement in mitochondrial dynamics of their leukocytes, which is likely to have a positive effect on clinical outcome.

Keywords: bariatric surgery; obesity; mitochondrial dynamics; oxidative stress; inflammation

1. Introduction

Obesity is a complex and multifactorial disease currently affecting 650 million people worldwide and represents one of the largest problems facing public health in modern societies. Similar to other chronic diseases, it has been linked to several health complications, including dyslipidemia, hypertension, insulin resistance (IR), type 2 diabetes (T2D), heart disease and strokes, sleep apnoea and cancer, which are responsible for the significant morbidity and mortality associated with this global epidemic [1].

Lifestyle and pharmacological approaches are the most prescribed interventions to overcome this disease [2,3]. However, poor patient adherence can render these strategies

ineffective insofar as achieving long-lasting benefits. In this sense, Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) is a surgical weight loss treatment for morbidly and severely obese patients [4] that has consistent short- and long-term effects on many obesity hallmarks. [5,6]. Recent data indicate that, despite similar obesity rates among men and women, there is substantial gender disparity in the use of bariatric surgery, with women comprising 80% of the patients undergoing the procedure [7]. These differences may, in part, be due to gender-based differences in perceptions of obesity-related quality of life and body weight, which may affect the motivation for seeking surgery interventions and treatments.

Previous studies have highlighted the importance of reducing the inflammatory response and oxidative stress—mediated by increased antioxidant capacity and diminished levels of reactive oxygen species (ROS) production—as underlying mechanisms of the cardiometabolic changes associated with RYGB [6,8]. Mitochondria are known to play a key role in these processes, since not only are they the primary sources of cellular ROS, but their functions include ATP production by oxidative phosphorylation (OXPHOS), as well as regulation of calcium homeostasis and programmed cell death [9]. To deal with these challenges, mitochondria are amazingly plastic organelles that mediate a series of dynamic processes, such as mitochondrial fusion and fission, mitophagy and mitochondrial biogenesis, which determine mitochondrial morphology, quality and abundance.

There is growing evidence of an intriguing direct connection between mitochondrial dynamics and nutrient availability status [10], suggesting that modifications in mitochondrial architecture and networks are a mechanism of bioenergetic adaptation to metabolic demands. Interestingly, a reduction in the mitochondrial proteins mitofusin (MNF)1, MNF2, optic atrophy 1 (OPA1) and the dynamin-related protein 1 (DRP1) has been associated with an impairment of OXPHOS capacity, as well as defects in energy production in several metabolic diseases, including type 2 diabetes and obesity [11–13]. In line with this, a recent study reported that sedentary—and not active—subjects displayed an age-associated downregulation in MNF1, MNF2, DRP1 and OPA1, a process related to weight gain, muscle loss and inflammation [14].

In terms of metabolic demands, cellular starvation has been linked to the elongation of mitochondria through upregulated fusion [15] and increased ATP synthesis capacity [16], while a rich-nutrient environment tends to generate mitochondrial fragmentation [16,17] and apoptotic function via increased fission [18]. For its part, fragmentation probably reduces the mitochondrial oxidative metabolism, as displayed in the adipocytes of obese animal models and humans [19–21].

Despite enormous interest in the management of obesity, relatively little is known about the effects of RYGB surgery on the intricate biogenesis and function of mitochondria. RYGB has been reported to provide beneficial effects on the liver mitochondrial dynamics of diet-induced obese rats [22]; an increase in mitochondrial complexes I–V have been observed after surgery, as well as modifications in the expression of several mitochondrial proteins involved in mitophagy, mitochondrial biogenesis, fusion and fission. Moreover, consistent with previous studies performed on human adipose tissue [23] and skeletal muscle [24], RYGB showed an increase in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1 α) [22], a key transcription factor regulating energy efficiency, as well as mitochondrial quality control and fatty acid oxidation [25]. Among the downstream mediators of PGC1 α , the transcription factor A mitochondria (TFAM) is a transcription factor for mitochondrial DNA (mtDNA) implicated in mitochondrial-encoded gene transcription and mtDNA replication, whose expression is downregulated in the adipose tissue of obese patients [26]. In this line, myocytes derived from severely obese subjects undergoing RYGB show improved mitochondrial function in association with reduced Drp1 phosphorylation [27], while mitochondrial basal and maximal respiration rates in peripheral blood monocytes have been shown to increase rapidly after surgery [28].

However, to date, no studies have highlighted the effects of this surgical procedure on mitochondrial dynamics in human leukocytes. Therefore, based on the importance of reducing the obesity-associated inflammatory and prooxidative status, the present study

aimed to explore whether RYGB-induced weight loss modulates fission and fusion proteins as well as overall mitochondrial quality control mechanisms in the leukocytes of obese women.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

The study cohort was composed of forty-seven obese patients undergoing RYGB, recruited at the Endocrinology and Nutrition Outpatient's Department and the Department of General and Digestive System Surgery of the University Hospital Doctor Peset, Valencia (Spain). Recruitment was carried out from May 2017 to September 2019. All subjects agreed with the objectives and methodology of the study and gave their written informed consent to participate. The hospital's Ethics Committee for Clinical Investigation approved the study (code 96/16), which was in line with the World Medical Association's Declaration of Helsinki.

It is important to note that this study has arisen as part of a wider project, registered in clinicaltrials.gov under the study number NCT05071391. During the course of this project, we have revealed the implication of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of obesity and its comorbidities and have explored in depth the mechanisms associated with RYGB-induced weight loss [6,29].

Women aged from 18 to 65 years, with a body mass index (BMI) of ≥ 35 kg/m² and assigned to RYGB intervention were eligible to be included in the study. Pregnancy or lactation, active infectious disease, thromboembolism, stroke or documented history of cardiovascular diseases, malignancies, severe renal or hepatic disease, drug abuse, chronic inflammatory disease and secondary obesity (hypothyroidism, Cushing's syndrome) were established as exclusion criteria. We only targeted the female population to reduce potential bias due to gender confounding and interindividual variations.

2.2. Sample Collection, Anthropometric and Biochemical Determinations

The study cohort was composed of forty-seven obese patients undergoing RYGB, recruited at baseline and post-surgical (12 months after RYGB) appointments attended by subjects, during which blood samples were collected from the brachial vein under fasting conditions (10–12 h) between 8:00 and 9:30 a.m. Several anthropometric parameters were then measured as follows: systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were measured twice consecutively by an automatic sphygmomanometer; weight and height were measured with an electronic scale and stadiometer, respectively; BMI was calculated as weight (kg)/(height (m))², and waist circumference was measured at the 10th rib and the iliac crest using a measuring tape. The percentage of excess weight loss (EWL) was calculated according to the formula [(preoperative weight – current weight)/(preoperative weight – ideal weight (considering BMI = 25 kg/m²))] × 100.

Levels of fasting glucose, total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides were obtained with a Beckman LX20 analyzer (Beckman Corp., Brea, CA, USA). Friedwald's formula was employed to calculate LDL cholesterol. Insulin was measured with an immunoassay using the Architect Insulin Reagent Kit, and insulin resistance was estimated using the Homeostasis Model of Assessment (HOMA-IR = (fasting insulin (μU/mL) × fasting glucose (mg/dL)/405)). Glycated haemoglobin (HbA1c) was analysed employing an automated glycohemoglobin analyser (Arkray Inc., Kyoto, Japan). Serum levels of high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) were analysed using an immunonephelometric assay (Behring Nephelometer II, Dade Behring, Inc., Newark, DE, USA) with an intra-assay coefficient of variation < 5.5%. Total leukocytes and neutrophils were determined in a COULTER[®] LH 500 haematology blood analyser (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA).

2.3. Isolation of Leukocytes

Blood collected in BD Vacutainer[®] citrated tubes (approximately 15 mL) was mixed and incubated with dextran 3% for 45 min at room temperature (RT). The supernatant

was placed over Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and centrifuged at $650 \times g$ for 25 min at RT. The resulting halo of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was collected and centrifuged for 10 min at $650 \times g$. The pellet of polymorphonuclear leukocytes (PMN) was incubated with a specific erythrocyte lysis buffer (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) for 5 min. Finally, PBMCs and PMN pellets were washed twice in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Capricorn, Ebsdorfergrund, Germany) prior to the following experiments.

2.4. Protein Expression Analysis

PBMCs were lysed on ice for 15 min with RIPA Lysis Buffer supplemented with protease plus phosphatase inhibitors, and total protein concentration was quantified using the BCA assay (all reagents from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Aliquots of 25 μ g of protein were resolved on 8–16% or 4–20% gradient SDS-polyacrylamide gels (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and then transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were then blocked with 5% BSA or 5% skimmed milk in TBS-T for 1 h at RT with soft shaking. Proteins of interest were detected by incubating membranes overnight at 4 °C with the following primary antibodies: mouse monoclonal anti-OPA-1 (Ref. MABN737), rabbit polyclonal anti-MFN1 (Ref. ABC41), rabbit polyclonal anti-MFN2 (Ref. ABC42) and rabbit polyclonal anti-FIS-1 (Ref. ABC67) from Merck-Millipore (Burlington, MA, USA); mouse monoclonal anti-OXPHOS (Ref. ab110411), rabbit monoclonal anti-MIEAP (Ref. ab180154), rabbit polyclonal anti-PGC1 α (Ref. ab54481) and rabbit polyclonal anti-MCP-1 (Ref. ab73866) from Abcam (Cambridge, UK); rabbit monoclonal phospho-DRP1 (Ser⁶¹⁶) from (Ref. 4494s) Cell Signalling Technology (Danvers, MA, USA); mouse monoclonal anti-mtTFA (Ref. sc-376672) from Santa Cruz (Dallas, TX, USA); mouse monoclonal anti-NF- κ B (Ref. 33-9900) and rabbit polyclonal anti-GPX1 (Ref. PA5-30593) from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Mouse monoclonal anti-actin (Ref. 3700T) from Cell Signalling Technology (Danvers, MA, USA), rabbit polyclonal anti-actin (Ref. A5060) from Sigma-Aldrich (San Luis, MO, USA) and mouse monoclonal anti-VDAC (Ref. ab14734) from Abcam (Cambridge, UK) were used as protein loading controls. The following day, membranes were incubated for 60 min at RT with the following secondary antibodies: goat anti-rabbit from Vector Laboratories (Ref. PI-1000-1) (Burlingame, CA, USA) and goat anti-mouse (Ref. 31430) from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). A summarised table (Table S1) of all antibodies used has been included as supplementary material. The chemiluminescence signal was detected with SuperSignal West Pico Plus or Femto from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) using the Fusion FX5 (Vilber Lourmat, Marne-La Vallée, France) imaging system. The quantification of protein levels was performed by densitometric analysis with Bio1D software v15.03a (Vilber Lourmat, Marne-La Vallée, France).

2.5. Evaluation of Systemic Cytokines TNF α , IL6 and IL1 β

Blood in EDTA-coated tubes was used to obtain plasma samples by centrifugation (1500 g, 10 min, 4 °C). Serum concentrations of TNF α , IL6 and IL1 β were analysed in duplicate with a Luminex[®] 200 analyser system (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) according to the Milliplex-Kit manufacturer's procedure (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Validation settings were intra- and inter-serial coefficient variations (CV) of <5.0% and <15.0%, respectively.

2.6. Superoxide Production and Mitochondrial Membrane Potential

The determination of superoxide production and mitochondrial membrane potential was assessed by static fluorometry using an IX81 Olympus fluorescence microscope coupled with the static cytometry software ScanR v2.03.2 (Olympus, Hamburg, Germany). In brief, 1.5×10^5 PMN/wells were seeded in a 48-well plaque and incubated for 30 min at 37 °C with Dihydroethidium (DHE) and tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) probes for intracellular superoxide and mitochondrial membrane potential determination, respectively.

Hoechst 33,342 was used to visualise cell nuclei. All fluorescent dyes were purchased from Life Technologies (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.7. Statistical Analysis

This study was designed to achieve a power of 80% and detect significant ($p < 0.05$) differences of 20% in relation to the primary efficacy criterion—protein detection by Western blot—assuming a common SD of 25 units. Based on these premises, a minimum of 13 patients were required, as a loss-to-follow-up rate of 0% was estimated. SPSS 20.0 (IBM SPSS Statistic, Chicago, IL, USA) was employed to conduct the statistical analysis. Normality was checked by employing the Shapiro—Wilk test due to sample size. Parametric values are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) and non-parametric values as the median and interquartile range (25th–75th percentile). Qualitative data are expressed as percentages. Bar graphs were represented by the mean + standard error (SE). The paired Student's *t*-test and Wilcoxon test were used to compare parametric and non-parametric data, respectively. Statistical significance was considered when $p < 0.05$ in all comparisons, with a confidence interval of 95%.

3. Results

This study was carried out on a cohort of 47 obese female patients with a mean age of 45.5 ± 10.2 years and a BMI of 40.3 ± 5.3 kg/m². As expected, after RYGB surgery patients showed a considerable decrease in waist circumference ($p < 0.001$), BMI ($p < 0.001$), SBP and DBP ($p < 0.01$ for both) (Table 1).

Table 1. Clinical features of the study population before and after RYGB.

Parameters	Before	After
n (females %)	47 (100)	
Age (years)	45.5 \pm 10.2	
Weight (kg)	107.1 \pm 15.6	76.3 \pm 12.0 ***
BMI (kg/m ²)	40.3 \pm 5.3	29.0 \pm 4.3 ***
EWL (%)		81.1 \pm 29.7
Waist (cm)	114.3 \pm 10.5	88.8 \pm 12.0 ***
SBP (mmHg)	130.6 \pm 16.1	121.6 \pm 18.3 **
DBP (mmHg)	80.6 \pm 10.2	73.5 \pm 11.0 **
Glucose (mg/dL)	96.4 \pm 12.5	84.0 \pm 6.9 ***
Insulin (μ U/mL)	14.4 \pm 7.6	7.0 \pm 3.1 ***
HOMA-IR	3.52 \pm 2.18	1.44 \pm 0.72 ***
HbA1c (%)	5.47 \pm 0.54	5.16 \pm 0.35 ***
TC (mg/dL)	190.0 \pm 32.6	169.8 \pm 26.2 ***
HDLc (mg/dL)	48.1 \pm 8.1	59.5 \pm 9.6 ***
LDLc (mg/dL)	125.1 \pm 40.2	97.2 \pm 21.0 ***
TG (mg/dL)	95.5 (73.8, 136.5)	76.0 (56.0, 100.5) ***
hsCRP (mg/L)	4.69 (2.08, 8.29)	0.79 (0.28, 1.48) ***
Leukocytes (10 ³ / μ L)	7.74 \pm 2.41	6.39 \pm 1.98 *
Treatment		
Hypertension % (n)	36.2 (17)	14.9 (7)
Hyperlipidemia % (n)	21.3 (10)	10.6 (5)
T2D % (n)	27.7 (13)	0 (0)

Data are expressed as mean \pm SD or percentage (n). TG and hsCRP are represented as median and IQ range (25% and 75% percentile). Values were statistically compared with a paired Student's *t*-test or Wilcoxon test and were considered significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. BMI, Body mass index; DBP, Diastolic blood pressure; EWL, Excess weight loss; HbA1c, Glycated haemoglobin; HDLc, HDL cholesterol; hsCRP, High sensitive C-reactive protein; IL1 β , Interleukin 1 β ; IL6, Interleukin 6; LDLc, LDL cholesterol; SBP, Systolic blood pressure; TC, Total cholesterol; TG, Triglycerides; T2D, Type 2 diabetes.

Glucose metabolism parameters, such as HbA1c, insulin, glucose, and HOMA-IR ($p < 0.001$ for all), also improved. Similarly, triglycerides ($p < 0.001$), LDL cholesterol ($p < 0.001$) and total cholesterol ($p < 0.001$) showed a significant decrease, while HDL cholesterol levels ($p < 0.001$) had fallen one year after the intervention. Acute phase reactant

hsCRP ($p < 0.001$) and total leukocyte count ($p < 0.05$) were lower after the intervention (Table 1).

These changes were accompanied by reductions in systemic proinflammatory cytokines—TNF α (Figure 1A, $p < 0.05$), IL6 (Figure 1B, $p < 0.05$) and IL1 β (Figure 1C, $p < 0.001$)—and were mirrored by a decline in intracellular mediators of inflammatory response in leukocytes—MCP1 and NF- κ B proteins (Figure 1D,E, $p < 0.05$ for both).

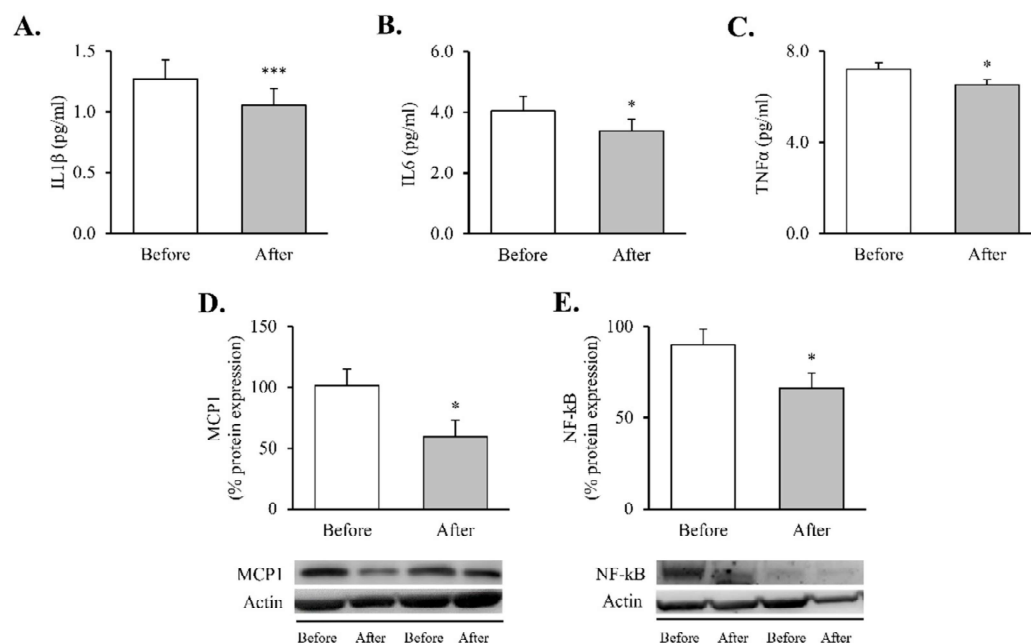


Figure 1. Proinflammatory markers in obese patients before and after RYGB. Serum levels of (A) TNF α ($n = 32$), (B) IL6 ($n = 36$) and (C) IL1 β ($n = 35$). Leukocyte protein expression of inflammatory mediators and representative Western blot images of (D) MCP1 ($n = 13$) and (E) NF- κ B ($n = 21$). Data are represented as the mean + SE. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ when compared using a paired Student's t -test. IL1 β , interleukin 1 β ; IL6, interleukin 6; MCP1, monocyte chemoattractant protein 1; NF- κ B, nuclear factor κ B; RYGB: Roux-en-Y gastric bypass; TNF α , tumor necrosis factor alpha.

Since obesity-related inflammatory status has been closely linked to cell oxidative stress, we also aimed to analyse superoxide production, antioxidant defences and mitochondrial membrane potential (Figure 2) in leukocytes, widely known to be sensors of the whole-body's responses to disease [30].

Our findings showed a significant decrease in total superoxide (Figure 2A, $p < 0.01$) and mitochondrial membrane potential (Figure 2B, $p < 0.05$) and a restoration of the antioxidant enzyme GPX1 (Figure 2C, $p < 0.05$). Taken together, these results suggest a partial recovery of redox balance thanks to a decrease in ROS production and an increase in the antioxidant response. In line with these findings, and given the close relationship between obesity, oxidative stress and processes of mitochondrial dynamics, we decided to determine the impact of RYGB on several regulators and transcriptional coactivators of mitochondrial biogenesis in leukocytes of obese subjects before and after surgery (Figure 3). One year after the intervention, we observed a significant increase in the transcriptional coactivator PGC1 α (Figure 3A, $p < 0.05$) and its downstream mediator TFAM (Figure 3B, $p < 0.05$), suggesting a mitochondrial network turnover.

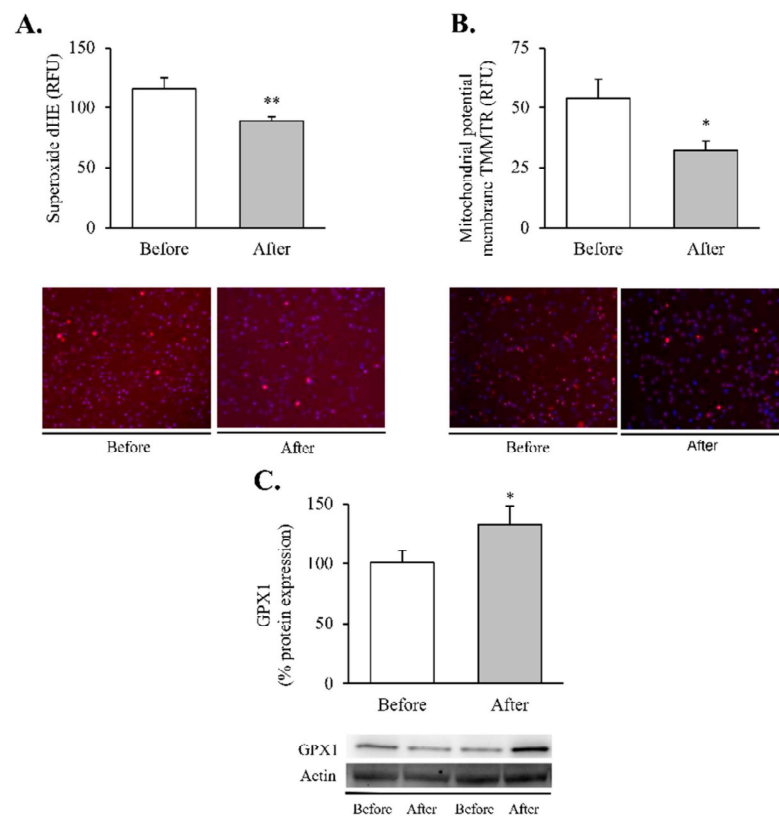


Figure 2. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction markers in leukocytes of obese patients before and after RYGB. Evaluation of (A) total superoxide ($n = 20$) and (B) mitochondrial membrane potential ($n = 21$), expressed as arbitrary units of fluorescence and with representative images stained respectively with dHE (red) and TMRM (red), and Hoechst 33,342 for nuclei (blue). (C) Leukocyte protein expression of GPX1 and representative western blot images ($n = 19$). Data are represented as the mean + SE. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ when compared using a paired Student's t -test. dHE, Dihydroethidium; TMRM, ethyl ester of tetramethylrhodamine; GPX1, Glutathione peroxidase 1.

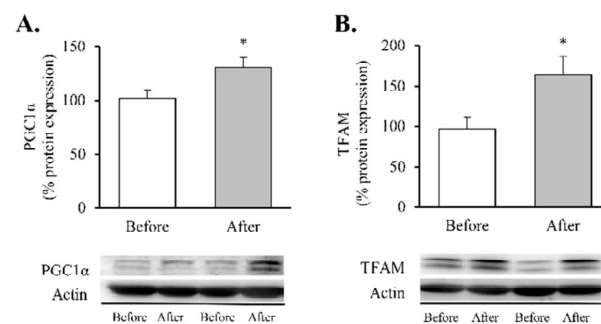


Figure 3. Transcription factors of mitochondrial biogenesis in leukocytes of obese patients before and after RYGB. Protein expression and representative Western blot images of (A) PGC1 α ($n = 10$) and (B) TFAM ($n = 16$). Data are represented as the mean + SE. * $p < 0.05$ when compared using a paired Student's t -test. PGC1 α , Peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α ; TFAM, Transcription Factor A Mitochondrial.

Our next step was to determine changes in the protein expression of the five mitochondrial OXPHOS complexes (Figure 4).

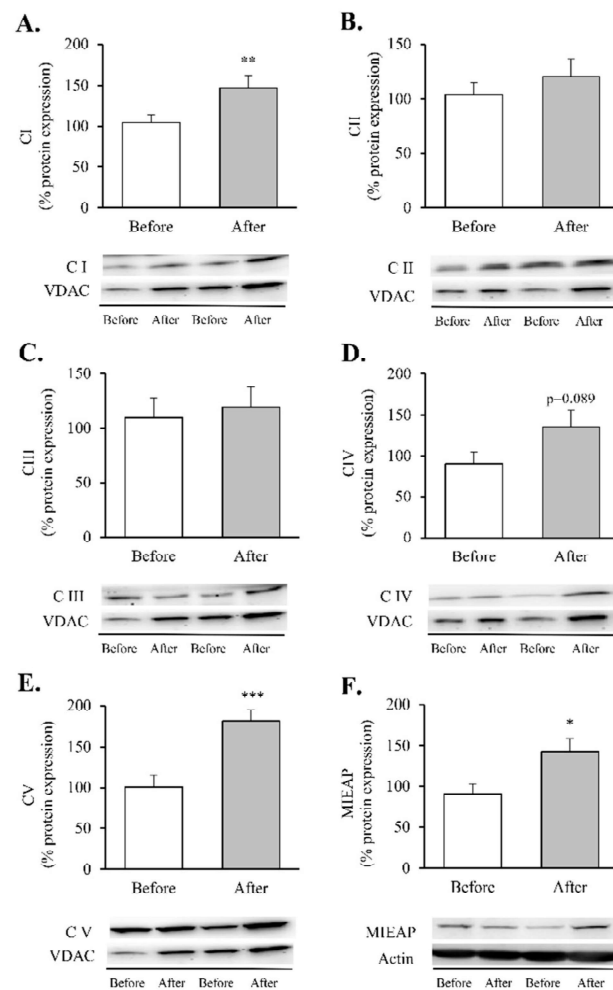


Figure 4. Mitochondrial complexes involved in the electron transport chain and MIEAP in leukocytes of obese patients before and after RYGB. Protein expression and representative Western blot images of (A) Mitochondrial complex I ($n = 15$), (B) Mitochondrial complex II ($n = 15$), (C) Mitochondrial complex III ($n = 13$), (D) Mitochondrial complex IV ($n = 14$), (E) Mitochondrial complex V ($n = 14$) and (F) MIEAP ($n = 9$). Data are represented as the mean + SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ when compared using a paired Student's t -test. MIEAP, mitochondria-eating protein.

These assemblies provide most of the energy required for cellular function through an electrochemical proton gradient (or a proton motive force) between the mitochondrial matrix and the intermembrane space. After RYGB, our patients showed an increase in complexes I and V (Figure 4A,E, $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively) and an upward trend in complex IV (Figure 4D, $p = 0.089$), which was also accompanied by a substantial upregulation of MIEAP (Figure 4F, $p < 0.05$).

Finally, associated with these changes, we detected intriguing alterations in mitochondrial dynamics post-surgery (Figure 5).

Although the increase in MNF2 (Figure 5A) and OPA1 did not reach statistical significance (Figure 5C), a significant increase in MFN1 protein content (Figure 5B, $p < 0.05$) was observed in leukocytes after RYGB. In contrast, the fission proteins FIS1 and p-DRP1 (Ser⁶¹⁶) remained unchanged (Figure 5D,E, respectively). As a whole, these results lead us to hypothesise that RYGB restores mitochondrial homeostasis by reducing the inflammatory response and oxidative stress parameters and by modulating mitochondrial dynamics through activation of transcriptional factors involved in the synthesis and degradation of mitochondrial components, OXPHOS complexes and fusion and fission processes, though this requires further confirmation.

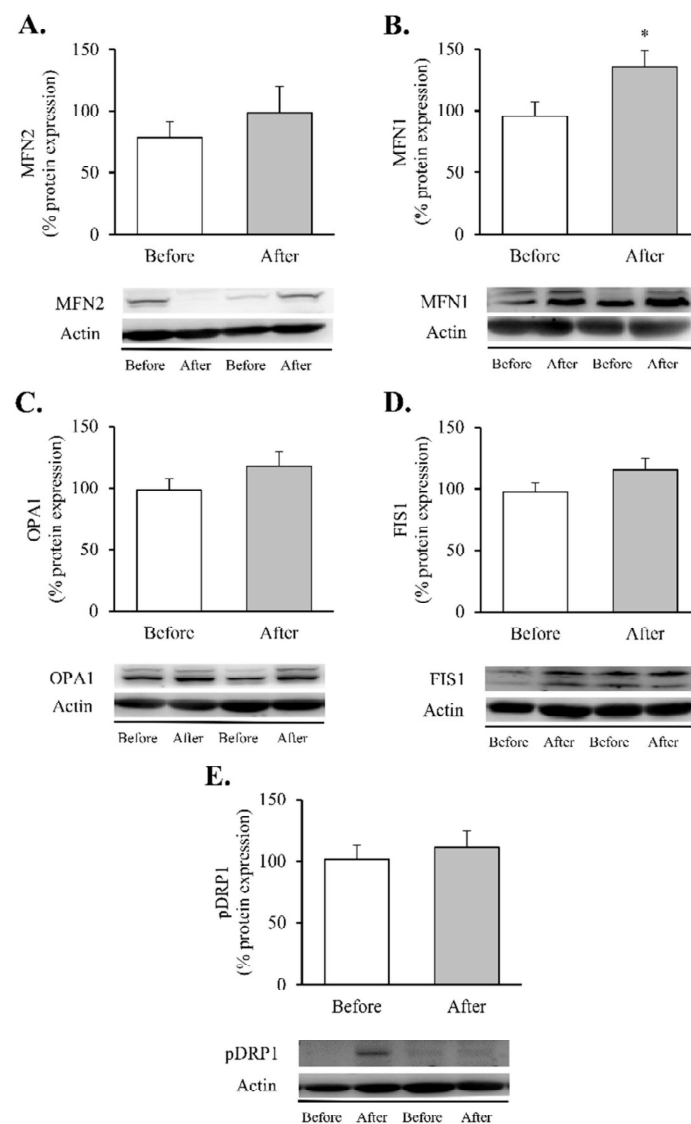


Figure 5. Mitochondrial fusion and fission markers in leukocytes of obese patients before and after RYGB. Leukocyte protein expression and representative Western blot images of (A) MFN2 ($n = 12$), (B) MNF1 ($n = 13$), (C) OPA1 ($n = 14$), (D) FIS1 ($n = 16$) and (E) p-DRP1 ($n = 14$). Data are represented as the mean + SE. * $p < 0.05$ when compared using a paired Student's t -test. FIS1, mitochondrial fission 1; MNF1, mitofusin 1; MFN2, mitofusin 2; OPA1, optic atrophy protein 1; p-DRP1, dynamin-related protein 1.

4. Discussion

In the present study, we have seen how obese women undergoing RYGB exhibited improvements in several clinical and metabolic outcomes, including sustained weight loss, enhanced glucose homeostasis and lipid profile, as well as a reduction in systemic inflammatory parameters. These improvements were accompanied by a reduction in intracellular inflammatory pathways in leukocytes and a slowing down of oxidative stress. Interestingly, our findings revealed that RYGB regulates several processes of mitochondrial dynamics, including fusion/fission, the repair or removal of dysfunctional organelles and mechanisms of mitochondrial biogenesis. Altogether, these findings represent novel and relevant evidence of the physiological and molecular mechanisms involved in the beneficial effects of this surgical procedure in obesity and its associated metabolic comorbidities.

The pathophysiological mechanisms underlying the relationship between obesity and metabolic dysfunction are likely to be multifactorial. Over the last few years, bariatric surgery has proven to be successful in treating morbid/severe obesity, improving patient

quality of life and providing durable and effective results with respect to various metabolic parameters—namely, weight loss, improvement of lipid profile, reduction of cardiovascular risk and glycaemic control [31–35], which our findings affirm. It is worth noting that inflammation is reported to be the main player linking obesity with its related metabolic perturbations [36] and is ameliorated after weight loss. A significant reduction in systemic cytokines—TNF α , IL6 and IL1 β —and decreased MCP1 and NF- κ B protein expression were detected in the leukocytes of our patients after RYGB, which is in line with previous reports of an overall reduction in inflammatory markers in leukocytes [37] and adipose tissue [23]. The complex inflammatory network that characterises obesity is mostly activated by an oxidative stress status. Indeed, we have previously reported that increasing fat accumulation leads to both excessive ROS release and mitochondrial dysfunction in peripheral leukocytes [38]. Of note, and consistent with our previous study carried out in both sexes [6], an amelioration of oxidative stress parameters was observed after bariatric surgery. In this sense, Monzo-Beltran et al. also reported an adaptive antioxidant response of leukocytes after RYGB, manifested by higher intracellular SOD1, GPX1 and catalase activity [39].

Mitochondrial biogenesis is a self-renewal route by which new mitochondria originate from those that already exist in order to reduce mitochondrial dysfunction, which is regulated by AMP-activated protein kinase (AMPK), a major energy sensor of the cell [40]. Specifically, alterations in cellular energy consumption, energy production and AMP/ATP ratio can lead to the activation of this Ser/Thr kinase. In such a scenario, AMPK shuts down energy-consuming anabolic systems while switching on catabolic pathways to generate ATP [40]. Simultaneously, the kinase downregulates the expression of lipid synthesis genes while enhancing the expression of genes associated with glycolysis, glucose transport and mitochondrial activity [41–43]. Regarding this last point, it is important to note that the expression of genes involved in either mitochondrial activity or lipid oxidation in skeletal muscle was induced in transgenic mice overexpressing an activated form of the AMPK- γ -3 subunit. [44,45]. In contrast, increased mitochondrial respiration and biogenesis in response to energy deprivation was not observed in mice expressing a dominant negative form of AMPK [46]. In this way, these studies, and others [47], have identified AMPK as an essential regulator of mitochondrial biogenesis. Interestingly, evidence suggests that AMPK activity is reduced in obesity, suggesting it may be a therapeutic target [48]. In this regard, we have recently reported an upregulation of this kinase after RYGB surgery [29]. This tightly coordinated process implicates several transcriptional regulators (mainly PGC1 α , NRF1 and NRF2) that activate TFAM [49], thus, leading to mitochondrial transcription and mitochondrial genome replication and, in turn, to the generation of new organelles. Among these intricate transcriptional regulators, PGC1 α has attracted great attention within the field of obesity research due to its essential role in regulating the efficiency of energy metabolism, as well as in mitochondrial quality control and fatty acid oxidation [25,50]. Its expression has been found to be reduced in the adipose tissue of obese humans [26,51], while it is upregulated after weight loss induced by RYGB [23,24], thus, explaining the increase in PGC1 α we observed in leukocytes at one-year follow-up. Studies have suggested that these changes were associated with a significant increase in TFAM, a key regulator of mtDNA replication. TFAM deletion in mutant mice induces obesity and diabetes [52], probably due to a remodelling of the respiratory chain through the downregulation of multiple proteins involved in oxidative phosphorylation.

Alterations of mitochondrial content and activity have emerged as critical features of obese in rodents [53] and humans [54,55]. In fact, OXPHOS failure can lead to ROS overproduction and accumulation of unhealthy mitochondria [56], which need to be repaired or eliminated to preserve the stability and health of cells [57]. Recently, a novel mechanism has been proposed for mitochondrial quality control, in which the regulator MIEAP induces intramitochondrial structures that engulf and degrade damaged mitochondria by the accumulation of lysosomes [58].

Our results suggest that RYGB drives an upregulation of levels of the OXPHOS proteins CI and CV (initial and final complexes in the electron transport chain), along with an increase in MIEAP. This points to a post-surgical amelioration of mitochondrial activity and function that could be associated with the improvement in metabolic outcomes observed in our cohort. Previous studies focused on different target tissues (liver, adipose or muscle) and models (cellular or animal) have highlighted the upregulation of OXPHOS complex expression upon caloric restriction [59] or RYGB [22,60–62]. In accordance with Nijhawan et al., who reported that mitochondrial basal and maximal respiration rates in peripheral blood monocytes increased rapidly after surgery [28], we highlight the effects of this surgical procedure on the mitochondrial dynamics of human leukocytes from obese women. It is relevant to note that mitochondrial quality control also implies events of fusion and fission, by which cells mediate morphological plasticity and regulate energy expenditure and bioenergetic efficiency. These processes are in turn mediated by large guanosine triphosphatases (GTPases), including MNF1, MTF2, OPA1, DRP1 and FIS1 [63,64], which help to balance the fusion and division of the two lipid bilayers that surround mitochondria. In line with these findings, previous studies performed on obese humans have revealed a direct relationship between mitochondrial dynamics and the balance of nutrient supply/energy demand, suggesting that the remodelling of mitochondrial morphology and networks constitutes bioenergetic adaptation to metabolic requests [18,65]. In particular, several authors have argued that obesity is characterised by a reduced gene expression of OPA1 and MFN1 in rat liver and skeletal muscle, which may contribute to mitochondrial dysfunction [66]. Decreased MFN1 and MFN2 and increased DRP1 have also been reported in the skeletal muscle of obese patients [65,67–69].

Although there is increasing evidence that RYGB can improve mitochondrial fusion [70,71], data are limited and controversial. Saks et al. observed significant increases in the expression of hepatic MFN1 and OPA1 in the liver of obese rats following RYGB surgery [22], while, more recently, Kugler et al. found no changes in these proteins when analysed in myotubes derived from severely obese individuals seven months after RYGB [27]. In the case of mitochondrial fission proteins, there is controversy surrounding the effects of RYGB on FIS1 and DRP1 protein levels [22,27,69], which calls for future investigation. Our findings bring the knowledge a step further by illustrating how bariatric surgery influences mitochondrial dynamics in leukocytes of obese humans through an increase in MFN1. In contrast, the changes we observed in MNF2, OPA1, DRP1 or FIS1 did not reach statistical significance, which points to a tissue-specific regulation. This boosted mitochondrial fusion might contribute positively to the enlargement and functionality of the mitochondrial network by stimulating OXPHOS expression and respiration, as reported in the liver of obese rats [22].

The strengths of our study include its design, based on a population of women with obesity, which allows an accurate comparison of the implications of weight loss. We have evaluated intracellular responses to weight loss following RYGB, thus, representing, as far as we know, the first study to address changes in mitochondrial dynamics in the leukocytes of obese women. However, the present study has some limitations, including the relatively small size of the study population, though we would like to point out that our data are supported by sample size calculation. Additionally, we notice the impossibility of demonstrating a causal relationship between the improvement in metabolic outcomes induced by RYGB and the modulation of mitochondrial dynamics processes. Therefore, future randomised investigations are needed to determine the mechanism underlying the metabolic improvement detected in women after RYGB-induced weight loss. Such studies will undoubtedly constitute an important step toward developing strategies for preventing and treating obesity.

5. Conclusions

The present study endorses bariatric surgery as a novel strategy that improves the clinical hallmarks of obesity and its related comorbidities. Our findings suggest that women

undergoing RYGB benefit from an amelioration of their prooxidant and inflammatory status and enhanced mitochondrial dynamics in their leukocytes, which could be responsible for the overall improvement in anthropometric and clinical features reported after surgery.

Given the essential role of mitochondria in energy metabolism, a better understanding of the molecular mechanisms that underlie mitochondrial dynamics may help to identify therapeutic targets to prevent and treat numerous diseases based on mitochondrial dysfunction, such as obesity and its associated comorbidities.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox11071302/s1>, Table S1: Detailed information of all the antibodies used.

Author Contributions: Conceptualization, V.M.V. and M.R.; methodology, Z.A.-J., T.V., S.L.-D., M.F.-R., F.C. and C.B.; validation, Z.A.-J., T.V., S.L.-D., V.M.V. and M.R.; formal analysis, Z.A.-J., T.V., V.M.V. and M.R.; investigation, Z.A.-J., T.V., S.L.-D., M.F.-R., F.C. and C.B.; resources, S.Á.G.-A., C.M., V.M.V. and M.R.; data curation, Z.A.-J., T.V., V.M.V. and M.R.; writing—original draft preparation, Z.A.-J., T.V. and M.R.; writing—review and editing, T.V., S.L.-D., V.M.V. and M.R.; visualization, Z.A.-J. and M.R.; supervision, T.V., S.L.-D., V.M.V. and M.R.; project administration, S.L.-D., V.M.V. and M.R.; funding acquisition, V.M.V. and M.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Carlos III Health Institute (ISCIII), co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF “A way to build Europe”), grant number PI19/00437 (M.R.), PI19/00838 (V.M.V.), PI18/00932 (C.B.), FI17/00144 (Z.A.-J.), CD19/00180 (T.V.) and CP19/00077 (C.B.); by the Ministry of Innovation, University, Science and Digital Society of Generalitat Valenciana, grant number PROMETEO/2019/027 (V.M.V.), APOSTD/2020/145 (S.L.-D.), GRISOLIAP/2019/091 (F.C.); by FISABIO, grant number UGP-20-132 (C.B.).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by Ethics Committee of the University Hospital Doctor Peset (protocol code 96/16; October 2016).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available upon request from the corresponding authors. The data are not publicly available due to ethical reasons.

Acknowledgments: The authors thank Rosa Falcón (FISABIO) and Begoña Zaragoza (University Hospital Doctor Peset) for their technical assistance and Brian Normanly (University of Valencia/CIBERehd) for his editorial assistance. The Servier Medical ART (SMART) resources were used to create the high-quality images of the graphical abstract.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Jehan, S.; Zizi, F.; Pandi-Perumal, S.R.; McFarlane, S.I.; Jean-Louis, G.; Myers, A.K. Energy imbalance: Obesity, associated comorbidities, prevention, management and public health implications. *Adv. Obes. Weight. Manag. Control.* **2020**, *10*, 146. [CrossRef]
2. Wadden, T.A.; Tronieri, J.S.; Butryn, M.L. Lifestyle modification approaches for the treatment of obesity in adults. *Am. Psychol.* **2020**, *75*, 235–251. [CrossRef]
3. May, M.; Schindler, C.; Engeli, S. Modern pharmacological treatment of obese patients. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* **2020**, *11*, 2042018819897527. [CrossRef]
4. Le Roux, C.W.; Heneghan, H.M. Bariatric Surgery for Obesity. *Med. Clin. N. Am.* **2018**, *102*, 165–182. [CrossRef] [PubMed]
5. Rega-Kaun, G.; Kaun, C.; Jaegersberger, G.; Prager, M.; Hackl, M.; Demyanets, S.; Wojta, J.; Hohensinner, P.J. Roux-en-Y Bariatric Surgery Reduces Markers of Metabolic Syndrome in Morbidly Obese Patients. *Obes. Surg.* **2020**, *30*, 391–400. [CrossRef] [PubMed]
6. Abad-Jimenez, Z.; Lopez-Domenech, S.; Gomez-Abril, S.A.; Perianez-Gomez, D.; De Maranon, A.M.; Banuls, C.; Morillas, C.; Victor, V.M.; Rocha, M. Effect of Roux-en-Y Bariatric Bypass Surgery on Subclinical Atherosclerosis and Oxidative Stress Markers in Leukocytes of Obese Patients: A One-Year Follow-Up Study. *Antioxidants* **2020**, *9*, 734. [CrossRef] [PubMed]
7. Aly, S.; Hachey, K.; Pernar, L.I. Gender disparities in weight loss surgery. *Mini Invasive Surg.* **2020**, *4*, 21. [CrossRef]

8. Pinto, S.L.; Juvanhol, L.L.; Licursi de Oliveira, L.; Clemente, R.C.; Bressan, J. Changes in oxidative stress markers and cardiometabolic risk factors among Roux-en-Y gastric bypass patients after 3- and 12-months postsurgery follow-up. *Surg. Obes. Relat. Dis. Off. J. Am. Soc. Bariatric Surg.* **2019**, *15*, 1738–1745. [[CrossRef](#)]
9. Vafai, S.B.; Mootha, V.K. Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* **2012**, *491*, 374–383. [[CrossRef](#)]
10. Gao, A.W.; Canto, C.; Houtkooper, R.H. Mitochondrial response to nutrient availability and its role in metabolic disease. *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6*, 580–589. [[CrossRef](#)]
11. Bach, D.; Naon, D.; Pich, S.; Soriano, F.X.; Vega, N.; Rieusset, J.; Laville, M.; Guillet, C.; Boirie, Y.; Wallberg-Henriksson, H.; et al. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: Effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes* **2005**, *54*, 2685–2693. [[CrossRef](#)]
12. Montaigne, D.; Marechal, X.; Coisne, A.; Debry, N.; Modine, T.; Fayad, G.; Potelle, C.; El Arid, J.M.; Mouton, S.; Sebti, Y.; et al. Myocardial contractile dysfunction is associated with impaired mitochondrial function and dynamics in type 2 diabetic but not in obese patients. *Circulation* **2014**, *130*, 554–564. [[CrossRef](#)]
13. Bakkman, L.; Fernstrom, M.; Loogna, P.; Rooyackers, O.; Brandt, L.; Lagerros, Y.T. Reduced respiratory capacity in muscle mitochondria of obese subjects. *Obes. Facts* **2010**, *3*, 371–375. [[CrossRef](#)]
14. Tezze, C.; Romanello, V.; Desbats, M.A.; Fadini, G.P.; Albiero, M.; Favaro, G.; Cicilioti, S.; Soriano, M.E.; Morbidoni, V.; Cerqua, C.; et al. Age-Associated Loss of OPA1 in Muscle Impacts Muscle Mass, Metabolic Homeostasis, Systemic Inflammation, and Epithelial Senescence. *Cell Metab.* **2017**, *25*, 1374.e1376–1389.e1376. [[CrossRef](#)]
15. Wai, T.; Langer, T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **2016**, *27*, 105–117. [[CrossRef](#)]
16. Gomes, L.C.; Di Benedetto, G.; Scorrano, L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 589–598. [[CrossRef](#)]
17. Molina, A.J.; Wikstrom, J.D.; Stiles, L.; Las, G.; Mohamed, H.; Elorza, A.; Walzer, G.; Twig, G.; Katz, S.; Corkey, B.E.; et al. Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes* **2009**, *58*, 2303–2315. [[CrossRef](#)]
18. Liesa, M.; Shirihai, O.S. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab.* **2013**, *17*, 491–506. [[CrossRef](#)]
19. Yin, X.; Lanza, I.R.; Swain, J.M.; Sarr, M.G.; Nair, K.S.; Jensen, M.D. Adipocyte mitochondrial function is reduced in human obesity independent of fat cell size. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, E209–E216. [[CrossRef](#)]
20. Koh, E.H.; Park, J.Y.; Park, H.S.; Jeon, M.J.; Ryu, J.W.; Kim, M.; Kim, S.Y.; Kim, M.S.; Kim, S.W.; Park, I.S.; et al. Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes. *Diabetes* **2007**, *56*, 2973–2981. [[CrossRef](#)]
21. Heilbronn, L.K.; Gan, S.K.; Turner, N.; Campbell, L.V.; Chisholm, D.J. Markers of mitochondrial biogenesis and metabolism are lower in overweight and obese insulin-resistant subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, *92*, 1467–1473. [[CrossRef](#)]
22. Sacks, J.; Mulya, A.; Fealy, C.E.; Huang, H.; Mosinski, J.D.; Pagadala, M.R.; Shimizu, H.; Batayyah, E.; Schauer, P.R.; Brethauer, S.A.; et al. Effect of Roux-en-Y gastric bypass on liver mitochondrial dynamics in a rat model of obesity. *Physiol. Rep.* **2018**, *6*, e13600. [[CrossRef](#)]
23. Ferraz-Bannitz, R.; Welendorf, C.R.; Coelho, P.O.; Salgado, W., Jr.; Nonino, C.B.; Beraldo, R.A.; Foss-Freitas, M.C. Bariatric surgery can acutely modulate ER-stress and inflammation on subcutaneous adipose tissue in non-diabetic patients with obesity. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2021**, *13*, 19. [[CrossRef](#)]
24. Gastaldi, G.; Russell, A.; Golay, A.; Giacobino, J.P.; Habicht, F.; Barthassat, V.; Muzzin, P.; Bobbioni-Harsch, E. Upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator gene (PGC1A) during weight loss is related to insulin sensitivity but not to energy expenditure. *Diabetologia* **2007**, *50*, 2348–2355. [[CrossRef](#)]
25. Liang, H.; Ward, W.F. PGC-1alpha: A key regulator of energy metabolism. *Adv. Physiol. Educ.* **2006**, *30*, 145–151. [[CrossRef](#)]
26. Zamora-Mendoza, R.; Rosas-Vargas, H.; Ramos-Cervantes, M.T.; Garcia-Zuniga, P.; Perez-Lorenzana, H.; Mendoza-Lorenzo, P.; Perez-Ortiz, A.C.; Estrada-Mena, F.J.; Miliar-Garcia, A.; Lara-Padilla, E.; et al. Dysregulation of mitochondrial function and biogenesis modulators in adipose tissue of obese children. *Int. J. Obes.* **2018**, *42*, 618–624. [[CrossRef](#)]
27. Kugler, B.A.; Gundersen, A.E.; Li, J.; Deng, W.; Eugene, N.; Gona, P.N.; Houmard, J.A.; Zou, K. Roux-en-Y gastric bypass surgery restores insulin-mediated glucose partitioning and mitochondrial dynamics in primary myotubes from severely obese humans. *Int. J. Obes.* **2020**, *44*, 684–696. [[CrossRef](#)]
28. Nijhawan, S.; Richards, W.; O’Hea, M.F.; Audia, J.P.; Alvarez, D.F. Bariatric surgery rapidly improves mitochondrial respiration in morbidly obese patients. *Surg. Endosc.* **2013**, *27*, 4569–4573. [[CrossRef](#)]
29. Abad-Jiménez, Z.; López-Domènech, S.; García-Gargallo, C.; Vezza, T.; Gómez-Abril, S.Á.; Morillas, C.; Díaz-Pozo, P.; Falcón, R.; Bañuls, C.; Víctor, V.M. Roux-en-Y Gastric Bypass Modulates AMPK, Autophagy and Inflammatory Response in Leukocytes of Obese Patients. *Biomedicines* **2022**, *10*, 430. [[CrossRef](#)]
30. Asghar, A.; Sheikh, N. Role of immune cells in obesity induced low grade inflammation and insulin resistance. *Cell. Immunol.* **2017**, *315*, 18–26. [[CrossRef](#)]
31. Mingrone, G.; Panunzi, S.; De Gaetano, A.; Guidone, C.; Iaconelli, A.; Nanni, G.; Castagneto, M.; Bornstein, S.; Rubino, F. Bariatric–metabolic surgery versus conventional medical treatment in obese patients with type 2 diabetes: 5 year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial. *Lancet* **2015**, *386*, 964–973. [[CrossRef](#)]

32. Schauer, P.R.; Bhatt, D.L.; Kirwan, J.P.; Wolski, K.; Aminian, A.; Brethauer, S.A.; Navaneethan, S.D.; Singh, R.P.; Pothier, C.E.; Nissen, S.E.; et al. Bariatric Surgery versus Intensive Medical Therapy for Diabetes—5-Year Outcomes. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 641–651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Chang, S.H.; Stoll, C.R.; Song, J.; Varela, J.E.; Eagon, C.J.; Colditz, G.A. The effectiveness and risks of bariatric surgery: An updated systematic review and meta-analysis, 2003–2012. *JAMA Surg.* **2014**, *149*, 275–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sjostrom, L. Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial—A prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *J. Intern. Med.* **2013**, *273*, 219–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Douros, J.D.; Tong, J.; D’Alessio, D.A. The Effects of Bariatric Surgery on Islet Function, Insulin Secretion, and Glucose Control. *Endocr. Rev.* **2019**, *40*, 1394–1423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Ellulu, M.S.; Patimah, I.; Khaza’ai, H.; Rahmat, A.; Abed, Y. Obesity and inflammation: The linking mechanism and the complications. *Arch. Med. Sci. AMS* **2017**, *13*, 851–863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Villarreal-Calderon, J.R.; Castillo, E.C.; Cuellar-Tamez, R.X.; Garcia-Garza, M.; Elizondo-Montemayor, L.; Garcia-Rivas, G. Reduced Th1 response is associated with lower glycolytic activity in activated peripheral blood mononuclear cells after metabolic and bariatric surgery. *J. Endocrinol. Investig.* **2021**, *44*, 2819–2830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Lopez-Domenech, S.; Banuls, C.; Diaz-Morales, N.; Escribano-Lopez, I.; Morillas, C.; Veses, S.; Orden, S.; Alvarez, A.; Victor, V.M.; Hernandez-Mijares, A.; et al. Obesity impairs leukocyte-endothelium cell interactions and oxidative stress in humans. *Eur. J. Clin. Investig.* **2018**, *48*, e12985. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Monzo-Beltran, L.; Vazquez-Tarragon, A.; Cerda, C.; Garcia-Perez, P.; Iradi, A.; Sanchez, C.; Climent, B.; Tormos, C.; Vazquez-Prado, A.; Girbes, J.; et al. One-year follow-up of clinical, metabolic and oxidative stress profile of morbid obese patients after laparoscopic sleeve gastrectomy. 8-oxo-dG as a clinical marker. *Redox Biol.* **2017**, *12*, 389–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Herzig, S.; Shaw, R.J. AMPK: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2018**, *19*, 121–135. [[CrossRef](#)]
41. Hardie, D.G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: Conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2007**, *8*, 774–785. [[CrossRef](#)]
42. Ojuka, E.O.; Nolte, L.A.; Holloszy, J.O. Increased expression of GLUT-4 and hexokinase in rat epitrochlearis muscles exposed to AICAR in vitro. *J. Appl. Physiol.* **2000**, *88*, 1072–1075. [[CrossRef](#)]
43. Winder, W.W.; Holmes, B.F.; Rubink, D.S.; Jensen, E.B.; Chen, M.; Holloszy, J.O. Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **2000**, *88*, 2219–2226. [[CrossRef](#)]
44. Long, Y.C.; Barnes, B.R.; Mahlapuu, M.; Steiler, T.L.; Martinsson, S.; Leng, Y.; Wallberg-Henriksson, H.; Andersson, L.; Zierath, J.R. Role of AMP-activated protein kinase in the coordinated expression of genes controlling glucose and lipid metabolism in mouse white skeletal muscle. *Diabetologia* **2005**, *48*, 2354–2364. [[CrossRef](#)]
45. Garcia-Roves, P.M.; Osler, M.E.; Holmstrom, M.H.; Zierath, J.R. Gain-of-function R225Q mutation in AMP-activated protein kinase gamma3 subunit increases mitochondrial biogenesis in glycolytic skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 35724–35734. [[CrossRef](#)]
46. Zong, H.; Ren, J.M.; Young, L.H.; Pypaert, M.; Mu, J.; Birnbaum, M.J.; Shulman, G.I. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15983–15987. [[CrossRef](#)]
47. Bergeron, R.; Ren, J.M.; Cadman, K.S.; Moore, I.K.; Perret, P.; Pypaert, M.; Young, L.H.; Semenkovich, C.F.; Shulman, G.I. Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2001**, *281*, E1340–E1346. [[CrossRef](#)]
48. Rojas, J.; Arraiz, N.; Aguirre, M.; Velasco, M.; Bermudez, V. AMPK as Target for Intervention in Childhood and Adolescent Obesity. *J. Obes.* **2011**, *2011*, 252817. [[CrossRef](#)]
49. Jornayvaz, F.R.; Shulman, G.I. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* **2010**, *47*, 69–84. [[CrossRef](#)]
50. Wu, Z.; Puigserver, P.; Andersson, U.; Zhang, C.; Adelmant, G.; Mootha, V.; Troy, A.; Cinti, S.; Lowell, B.; Scarpulla, R.C. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **1999**, *98*, 115–124. [[CrossRef](#)]
51. Semple, R.K.; Crowley, V.C.; Sewter, C.P.; Laudes, M.; Christodoulides, C.; Considine, R.V.; Vidal-Puig, A.; O’Rahilly, S. Expression of the thermogenic nuclear hormone receptor coactivator PGC-1alpha is reduced in the adipose tissue of morbidly obese subjects. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* **2004**, *28*, 176–179. [[CrossRef](#)]
52. Koh, J.H.; Kim, Y.W.; Seo, D.Y.; Sohn, T.S. Mitochondrial TFAM as a Signaling Regulator between Cellular Organelles: A Perspective on Metabolic Diseases. *Diabetes Metab. J.* **2021**, *45*, 853–865. [[CrossRef](#)]
53. Schottl, T.; Kappler, L.; Fromme, T.; Klingenspor, M. Limited OXPHOS capacity in white adipocytes is a hallmark of obesity in laboratory mice irrespective of the glucose tolerance status. *Mol. Metab.* **2015**, *4*, 631–642. [[CrossRef](#)]
54. Heinonen, S.; Buzkova, J.; Muniandy, M.; Kaksonen, R.; Ollikainen, M.; Ismail, K.; Hakkarainen, A.; Lundbom, J.; Lundbom, N.; Vuolteenaho, K.; et al. Impaired Mitochondrial Biogenesis in Adipose Tissue in Acquired Obesity. *Diabetes* **2015**, *64*, 3135–3145. [[CrossRef](#)]
55. Antoun, G.; McMurray, F.; Thrush, A.B.; Patten, D.A.; Peixoto, A.C.; Slack, R.S.; McPherson, R.; Dent, R.; Harper, M.E. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation and supercomplex assembly in rectus abdominis muscle of diabetic obese individuals. *Diabetologia* **2015**, *58*, 2861–2866. [[CrossRef](#)]

56. Bhatti, J.S.; Bhatti, G.K.; Reddy, P.H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders—A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2017**, *1863*, 1066–1077. [[CrossRef](#)]
57. Shadel, G.S.; Horvath, T.L. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell* **2015**, *163*, 560–569. [[CrossRef](#)]
58. Kitamura, N.; Nakamura, Y.; Miyamoto, Y.; Miyamoto, T.; Kabu, K.; Yoshida, M.; Futamura, M.; Ichinose, S.; Arakawa, H. Miep, a p53-inducible protein, controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e16060. [[CrossRef](#)]
59. Ghosh, S.; Dent, R.; Harper, M.E.; Stuart, J.; McPherson, R. Blood gene expression reveal pathway differences between diet-sensitive and resistant obese subjects prior to caloric restriction. *Obesity* **2011**, *19*, 457–463. [[CrossRef](#)]
60. Hansen, M.; Lund, M.T.; Gregers, E.; Kraunsøe, R.; Van Hall, G.; Helge, J.W.; Dela, F. Adipose tissue mitochondrial respiration and lipolysis before and after a weight loss by diet and RYGB. *Obesity* **2015**, *23*, 2022–2029. [[CrossRef](#)]
61. Coen, P.M.; Menshikova, E.V.; Distefano, G.; Zheng, D.; Tanner, C.J.; Standley, R.A.; Helbling, N.L.; Dubis, G.S.; Ritov, V.B.; Xie, H.; et al. Exercise and Weight Loss Improve Muscle Mitochondrial Respiration, Lipid Partitioning, and Insulin Sensitivity After Gastric Bypass Surgery. *Diabetes* **2015**, *64*, 3737–3750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ezquerro, S.; Becerril, S.; Tuero, C.; Mendez-Gimenez, L.; Mocha, F.; Moncada, R.; Valenti, V.; Cienfuegos, J.A.; Catalan, V.; Gomez-Ambrosi, J.; et al. Role of ghrelin isoforms in the mitigation of hepatic inflammation, mitochondrial dysfunction, and endoplasmic reticulum stress after bariatric surgery in rats. *Int. J. Obes.* **2020**, *44*, 475–487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Song, Z.; Ghochani, M.; McCaffery, J.M.; Frey, T.G.; Chan, D.C. Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 3525–3532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Elgass, K.; Pakay, J.; Ryan, M.T.; Palmer, C.S. Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochim. Et Biophys. Acta* **2013**, *1833*, 150–161. [[CrossRef](#)]
65. Zorzano, A.; Liesa, M.; Palacin, M. Mitochondrial dynamics as a bridge between mitochondrial dysfunction and insulin resistance. *Arch. Physiol. Biochem.* **2009**, *115*, 1–12. [[CrossRef](#)]
66. Putti, R.; Sica, R.; Migliaccio, V.; Lionetti, L. Diet impact on mitochondrial bioenergetics and dynamics. *Front. Physiol.* **2015**, *6*, 109. [[CrossRef](#)]
67. Bach, D.; Pich, S.; Soriano, F.X.; Vega, N.; Baumgartner, B.; Oriola, J.; Daugaard, J.R.; Lloberas, J.; Camps, M.; Zierath, J.R.; et al. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 17190–17197. [[CrossRef](#)]
68. Mingrone, G.; Manco, M.; Calvani, M.; Castagneto, M.; Naon, D.; Zorzano, A. Could the low level of expression of the gene encoding skeletal muscle mitofusin-2 account for the metabolic inflexibility of obesity? *Diabetologia* **2005**, *48*, 2108–2114. [[CrossRef](#)]
69. Kristensen, M.D.; Petersen, S.M.; Moller, K.E.; Lund, M.T.; Hansen, M.; Hansen, C.N.; Courraud, J.; Helge, J.W.; Dela, F.; Prats, C. Obesity leads to impairments in the morphology and organization of human skeletal muscle lipid droplets and mitochondrial networks, which are resolved with gastric bypass surgery-induced improvements in insulin sensitivity. *Acta Physiol.* **2018**, *224*, e13100. [[CrossRef](#)]
70. Peng, Y.; Murr, M.M. Roux-en-Y gastric bypass improves hepatic mitochondrial function in obese rats. *Surg. Obes. Relat. Dis. Off. J. Am. Soc. Bariatric Surg.* **2013**, *9*, 429–435. [[CrossRef](#)]
71. Verbeek, J.; Lannoo, M.; Pirinen, E.; Ryu, D.; Spincemaille, P.; Vander Elst, I.; Windmolders, P.; Thevissen, K.; Cammue, B.P.; Van Pelt, J.; et al. Roux-en-y gastric bypass attenuates hepatic mitochondrial dysfunction in mice with non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* **2015**, *64*, 673–683. [[CrossRef](#)]



Article

Systemic Oxidative Stress and Visceral Adipose Tissue Mediators of NLRP3 Inflammasome and Autophagy Are Reduced in Obese Type 2 Diabetic Patients Treated with Metformin

Zaida Abad-Jiménez ¹, Sandra López-Domènech ¹ , Rubén Díaz-Rúa ¹, Francesca Iannantuoni ¹, Segundo Ángel Gómez-Abril ^{2,3}, Dolores Periañez-Gómez ², Carlos Morillas ¹, Víctor M. Víctor ^{1,4,5,*} and Milagros Rocha ^{1,4,*}

¹ Department of Endocrinology and Nutrition, University Hospital Doctor Peset, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), 46017 Valencia, Spain; zaiaji@alumni.uv.es (Z.A.-J.); Sandra.Lopez@uv.es (S.L.-D.); diaz_rub@gva.es (R.D.-R.); franian@alumni.uv.es (F.I.); carlos.morillas@uv.es (C.M.)

² Department of General and Digestive System Surgery, University Hospital Doctor Peset, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), 46017 Valencia, Spain; gomez_seg@gva.es (S.Á.G.-A.); perianez_dol@gva.es (D.P.-G.)

³ Department of Surgery, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia, Av Blasco Ibáñez 13, 46010 Valencia, Spain

⁴ CIBERehd-Department of Pharmacology, University of Valencia, Av Blasco Ibáñez 13, 46010 Valencia, Spain

⁵ Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain

* Correspondence: victor.victor@uv.es (V.M.V.); milagros.rocha@uv.es (M.R.)

Received: 25 August 2020; Accepted: 18 September 2020; Published: 21 September 2020



Abstract: Obesity is a low-grade inflammatory condition affecting a range of individuals, from metabolically healthy obese (MHO) subjects to type 2 diabetes (T2D) patients. Metformin has been shown to display anti-inflammatory properties, though the underlying molecular mechanisms are unclear. To study whether the effects of metformin are mediated by changes in the inflammasome complex and autophagy in visceral adipose tissue (VAT) of obese patients, a biopsy of VAT was obtained from a total of 68 obese patients undergoing gastric bypass surgery. The patients were clustered into two groups: MHO patients and T2D patients treated with metformin. Patients treated with metformin showed decreased levels of all analyzed serum pro-inflammatory markers (TNF α , IL6, IL1 β and MCP1) and a downwards trend in IL18 levels associated with a lower production of oxidative stress markers in leukocytes (mitochondrial ROS and myeloperoxidase (MPO)). A reduction in protein levels of MCP1, NF κ B, NLRP3, ASC, ATG5, Beclin1 and CHOP and an increase in p62 were also observed in the VAT of the diabetic group. This downregulation of both the NLRP3 inflammasome and autophagy in VAT may be associated with the improved inflammatory profile and leukocyte homeostasis seen in obese T2D patients treated with metformin with respect to MHO subjects and endorses the cardiometabolic protective effect of this drug.

Keywords: visceral adipose tissue (VAT); obesity; type 2 diabetes (T2D); inflammatory cytokines; autophagy; oxidative stress; metformin

1. Introduction

Obesity represents a risk factor for diverse clinical and metabolic disturbances, leading to increased mortality and shortened life expectancy. The predominant storage of fat in the visceral adipose tissue (VAT) depot characteristic of the abdominal obesity phenotype is typically accompanied by a wide range

of metabolic abnormalities, including dyslipidemia, insulin resistance, hypertension and endothelial dysfunction [1,2]. These effects are exacerbated by the particularly aberrant release of cytokines and adipokynes by the VAT [3], which contributes to systemic low-grade inflammation, increased cardiovascular risk and development of type 2 diabetes (T2D).

The first-choice medical approach to achieve glycemic control and reduce cardiovascular risk factors in T2D patients is oral anti-diabetic medication. Metformin is the most commonly prescribed drug for T2D and is thought to exert its primary anti-diabetic action by suppressing hepatic glucose production and through a direct effect on cellular metabolism by inducing AMP-activated protein kinase (AMPK) and inhibiting mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production through mitochondrial complex I. Metformin not only displays anti-hyperglycemic properties, but also improves endothelial function, lipid profile and hemostasis [4]. In addition, it is now attracting attention due to its role as an immune system modulator with anti-inflammatory properties [5–7], though the molecular mechanisms underlying these pleiotropic effects have not yet been determined. Emerging evidence suggests that metformin displays anti-inflammatory effects via direct and indirect targeting of tissue-resident immune cells in metabolic organs such as the liver, gastrointestinal tract and adipose tissue [8].

In contrast to obese T2D patients, who constitute a paradigm population of metabolic complications, there is a sub-cluster of “metabolically healthy” obese (MHO) subjects characterized by an absence of metabolic abnormalities. It is now thought that MHO is a transient phenotype that can turn into unhealthy metabolic obesity during the natural course of the disease [9]. Such patients are characterized by the storage of fat predominantly in the subcutaneous depot, less immune cell infiltration into the VAT depot, and a more favorable adipokine secretion pattern and inflammatory profile, including a lower release of tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin 1 β (IL1 β) [10–12] compared to that released by VAT. In this way, the inflammasome complex is a key component of our innate immune system, representing the backbone of the host defense and inflammatory response. Activation of the nucleotide-binding oligomerization domain (NOD), leucine-rich repeats (LRR) and pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome usually requires both priming and an activation signal. The nuclear factor κ B (NF κ B) transcription factor, which is activated by Toll-like receptor (TLR) ligands and cytokines, such as TNF α and IL1 β , is the main mediator of the priming signal, and acts by inducing the transcriptional expression of NLRP3 and pro-IL1 β [13]. The second signal of inflammasome activation is triggered by various microbial components (pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)) or molecules released by necrotic cells and damaged tissues (damage-associated molecular patterns (DAMPs)) [14], which are thought to activate NLRP3 by inducing various cellular events, including K⁺ efflux, Ca²⁺ signaling and mitochondrial and lysosomal damage, all of which release substances such as ROS, oxidized mitochondrial DNA and lysosomal proteases [15,16]. Metabolic abnormalities in obese patients are accompanied by higher levels of both immune cell infiltration and expression of NLRP3 and IL1 β in VAT than those seen in MHO subjects [12,17]. However, whether metformin exerts its anti-inflammatory effect by modulating the activation of the inflammasome complex in the VAT of obese patients has been poorly studied to date [18,19].

Autophagy not only constitutes a mechanism of cell recycling necessary for cellular homeostasis and viability, but it is also increasingly recognized as an important component of both innate and acquired immunity to pathogens [20]. In this process, cytosolic macromolecules and damaged organelles are a target for autophagosomal capture following degradation by lysosome fusion [21]. This process involves a heterogeneous network of protein signaling pathways named mammalian autophagy-related (ATG) proteins, which are organized in six functional protein groups and proteins, including Beclin1, microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3) and sequestosome 1 (p62) [22]. Since classic autophagy is known to be activated principally by pathways that mediate the nutrient deficiency/low energy state that induces AMPK and inhibits mechanistic target of rapamycin (mTOR) activity [20], it would be expected that obesity—a chronic state of nutrient overabundance—is associated with the downregulation of autophagy. However, there is strong evidence that autophagy levels are upregulated in obese adipocytes and adipose tissue explants [23–25], even in diabetic conditions, which leads to

attenuated mTOR signaling [26]. Although metformin has been found to induce an upregulation of autophagy mediators in cardiomyocytes, melanoma cells and hepatocytes [27–29], few studies have investigated the effect of metformin on the induction of autophagy in adipose tissues [29,30].

Given the well-known contribution of VAT accumulation and the chronic inflammation and metabolic disturbances characteristic of diabetes and obesity, it is possible that the beneficial effects of metformin on the modulation of immune cell response, oxidative stress and subclinical low-grade inflammation [31,32] can be mediated by targeting adipose-specific activities. For this reason, the present study was undertaken to explore whether the underlying molecular mechanisms of the systemic anti-inflammatory and immune regulatory effects of metformin involve NLRP3 complex activation and/or modulation of the autophagy pathway in the VAT of obese subjects. Hence, we first aimed to confirm the effect of metformin on serum proinflammatory cytokines and systemic oxidative stress markers. Secondly, and more importantly, we evaluated the association between these systemic responses and VAT-specific pathways, including the NLRP3 inflammasome and autophagy.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

This was a transversal study of 68 obese patients between the ages 30 and 60 that were recruited from the Outpatient's Department of Endocrinology and Nutrition at University Hospital Dr. Peset (Valencia, Spain). The patients were clustered into two groups: metabolically healthy obese (MHO) subjects and obese patients with T2D treated with metformin, all of whom underwent a laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass (RYGB). The MHO group consisted of subjects who did not meet any of the following clinical criteria for metabolic syndrome—fasting glucose ≥ 100 mg/dL or use of anti-diabetic treatment, systolic blood pressure ≥ 130 mmHg and/or diastolic blood pressure ≥ 85 mmHg or use of antihypertensive drugs, triglyceride concentrations ≥ 150 mg/dL or high-density lipoprotein cholesterol (HDLc) < 40 mg/dL for men and < 50 mg/dL for women or the use of lipid-lowering medication [33] ($n = 34$). The T2D group was defined according to the criteria of the American Diabetes Association Guidelines [34] ($n = 34$). Exclusion criteria were severe disease (including malignancies, severe renal or hepatic disease, alcohol or drug abuse and psychiatric disorders), history of cardiovascular or chronic inflammatory disease, and secondary obesity (hypothyroidism and Cushing's syndrome).

The study protocol was approved by the Ethics Committee of the hospital (reference code 96/16) and was regulated according to the guidelines set out in the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all subjects.

2.2. Clinical and Biochemical Determinations

Anthropometric measures—weight, height, waist circumference, body mass index (BMI) and systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP)—were obtained by physical examination. Blood samples were collected from the antecubital vein in fasting conditions between 8:00 a.m. and 9:30 a.m. for biochemical and molecular determinations. To obtain serum, centrifugation was performed at $650\times g$ for 10 min at 4°C . Glucose, total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) serum levels were determined by enzymatic assay (Beckman Corp. Brea, CA, USA). The percentage of HbA1c was obtained with an automatic glycohemoglobin analyzer (Arkay inc., Kyoto, Japan). HDLc concentration was measured using a Beckman LX20 analyzer (Brea, CA, USA) and low-density lipoprotein cholesterol (LDLc) levels were calculated with Friedewald's formula. Insulin levels were measured by immunochemiluminescence (Abbott, Chicago, IL, USA) and the homeostatic model assessment of the insulin resistance (HOMA-IR) index was calculated as $((\text{fasting insulin } (\mu\text{U/mL}) \times \text{fasting glucose } (\text{mg/dL}))/405)$. High-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) was analyzed using a latex-enhanced immunonephelometric assay (Behring Nephelometer II; Dade Behring, Inc., Newark, DE, USA) and leukocytes were counted with a COULTER[®] LH 500 Hematology Blood Analyzer from

Beckman Coulter (Brea, CA, USA). All biochemical determinations were performed in the hospital's Clinical Analysis Department.

2.3. Cell Isolation

Citrated blood samples were incubated with dextran (3%) for 45 min in order to isolate polymorphonuclear leukocytes (PMNs). The supernatant, layered over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), was then centrifuged at $650\times g$ for 25 min. Lysis buffer was added to remove the erythrocytes remaining in the pellet. PMNs were washed twice and re-suspended in Hanks's balanced salt solution (HBSS; Sigma Aldrich, MO, USA). Finally, PMNs were counted with a Scepter 2.0 cell counter (Millipore, MA, USA).

2.4. Analysis of Oxidative Stress Markers and Serum Cytokines

To detect mitochondrial ROS, leukocytes were seeded in a 48-well plate (1.5×10^5 cells/well) and incubated for 30 min with MitoSOX dye (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) prepared at $5 \mu\text{M}$ in HBSS. The nuclei were visualized using the nuclear stain Hoechst 33342. The fluorescence signal was detected with an IX81 Olympus fluorescence microscope and analyzed with ScanR software version 2.03.2 (Olympus, Shinjuku, Japan).

Serum levels of interleukin 6 (IL6), IL1 β , interleukin 18 (IL18), TNF α and myeloperoxidase (MPO) were measured with a Luminex[®] 200 analyzer system (Austin, TX, USA) following the Milliplex[®] MAP Kit manufacturer's procedure (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). The intra-serial and inter-serial variation coefficients were $<5.0\%$ and $<20.0\%$, respectively.

2.5. VAT Protein Analysis

During RYGB surgery, approximately 1.5–2.0 g VAT biopsies were retrieved from the omentum area and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . For protein isolation, 150 mg of VAT were homogenized with Ultra-Turrax[®] in the protein lysis buffer provided by the Ne-Per[®] Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in the presence of protease and phosphatase inhibitors (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Following the manufacturer's protocol, samples were centrifuged twice at $15,000\times g$ for 20 min at 4°C to remove superficial fat. The total concentration of proteins was quantified using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

To determine protein expression levels, 25 μg of protein samples were resolved on polyacrylamide gels and then transferred onto nitrocellulose membranes. Next, membranes were blocked and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: monoclonal anti-NF κB (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), monoclonal anti-monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), monoclonal anti-NLRP3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), monoclonal anti-apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain (CARD) (ASC; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), monoclonal anti-autophagy related protein 5 (ATG5; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), monoclonal anti-Beclin1 (Abcam, Cambridge, UK), monoclonal anti-p62 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), monoclonal anti-CCAAT enhancer-binding protein homologous protein (CHOP; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Monoclonal anti-actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used to assess loading protein control. Horseradish peroxidase (HRP) -goat anti-mouse (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and HRP-goat anti-rabbit (Millipore Iberica, Madrid, Spain) were employed as secondary antibodies. Membranes were exposed to ECL Plus reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) or SuperSignal West Femto (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The chemiluminescence signal was detected with the Fusion FX5 acquisition system and quantified by densitometry using Bio1D software version 15.03a (Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, France).

2.6. Statistical Analysis

SPSS 20.0 software (IBM SPSS Statistic, Chicago, IL, USA) was used for data analysis. The parametric data shown in the tables are expressed as mean \pm SD, whereas non-parametric data are shown as median and interquartile range (25th and 75th percentiles). Bar graphs show mean + SEM. Data were compared with an unpaired Student's *t*-test or Mann–Whitney U test for parametric and non-parametric variables, respectively. Pearson's correlation coefficient was employed to determine the degree of relationship between the study variables. Possible confounding variables, such as age, were used as covariates to generate a univariate general linear model for analyzing biochemical parameters and serum lipids. A confidence interval of 95% was used for all the tests, and differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Anthropometric and Biochemical Parameters

Our study analyzed anthropometric and biochemical parameters and prescribed medication in 68 obese patients, most of whom were women, and all of whom underwent RYGB surgery (Table 1). All the diabetic patients were taking metformin as an oral anti-diabetic drug; 62% were under hypotensive medication, 67% were on lipid-lowering drugs and 35% were receiving all three drugs.

Table 1. Anthropometric and biochemical parameters of the study cohort.

Parameters	MHO	T2D-Met	Corrected by Age
<i>n</i> (females %)	34 (85.3)	34 (70.6)	
Age (years)	38.1 \pm 9.1	51.8 \pm 9.1 ***	
BMI (kg/m ²)	38.8 \pm 4.3	39.6 \pm 4.6	$p > 0.05$
Waist (cm)	111 \pm 11	120 \pm 12 **	$p < 0.01$
Waist-to-hip ratio	0.86 \pm 0.06	0.93 \pm 0.10 **	$p < 0.05$
SBP (mmHg)	120 \pm 9	138 \pm 20 ***	$p < 0.001$
DBP (mmHg)	76 \pm 7	84 \pm 15 *	$p < 0.05$
Glucose (mg/dL)	90 \pm 8	119 \pm 37 ***	$p < 0.001$
Insulin (μ U/mL)	12.90 \pm 6.11	18.18 \pm 9.76 *	$p < 0.001$
HOMA-IR	2.96 \pm 1.60	5.81 \pm 9.12 **	$p < 0.001$
HbA1c (%)	5.24 \pm 0.32	6.20 \pm 0.88 ***	$p < 0.001$
TC (mg/dL)	182 \pm 37	181 \pm 42	$p > 0.05$
HDLc (mg/dL)	46 \pm 8	45 \pm 9	$p > 0.05$
LDLc (mg/dL)	116 \pm 31	107 \pm 36	$p > 0.05$
TG (mg/dL)	85 (66, 109)	122 (98, 163) **	$p < 0.05$
hsCRP (mg/L)	4.79 (3.42, 11.05)	4.00 (1.34, 7.98)	$p > 0.05$
Leukocytes (cells $\times 10^3/\mu$ L)	7.3 \pm 1.8	7.8 \pm 1.9	$p > 0.05$
Treatment <i>n</i> (%)			
Hypertension	-	21 (62%)	
Hyperlipidemia	-	23 (67%)	
T2D	-	34 (100%)	

Data are expressed as mean \pm SD or *n* (percentage). TG and hsCRP are represented in median and interquartile ranges (25% and 75% percentile). Values were statistically compared with an unpaired Student's *t*-test or Wilcoxon's test, and were considered significantly different when * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; HbA1c, glycated hemoglobin; TC, total cholesterol; LDLc, Low-density lipoprotein cholesterol; HDLc, high-density lipoprotein cholesterol; TG, triglycerides; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; MHO, metabolically healthy obese; T2D-Met, type 2 diabetic patients treated with metformin.

The diabetic group treated with metformin had higher waist circumference ($p < 0.01$), waist-to-hip ratio (WHR) ($p < 0.01$), SBP ($p < 0.001$), DBP ($p < 0.05$) and TG ($p < 0.01$) than MHO subjects, whereas BMI distribution, leukocyte count, hsCRP and lipid profile were similar in the two groups (Table 1). As expected, T2D patients treated with metformin displayed significant differences in glucose metabolism parameters, including elevated levels of glucose ($p < 0.001$), insulin ($p < 0.05$), HOMA-IR

($p < 0.01$) and HbA1c ($p < 0.001$) with respect to the MHO group. Finally, although diabetic patients were generally older, differences remained significant when we introduced age as a covariant in the general linear model (Table 1).

3.2. Systemic Oxidative Stress Markers and Pro-Inflammatory Cytokines

Oxidative stress markers and cytokines were assessed in the leukocytes and serum of patients (Figure 1). The results showed a decrease in the production of mitochondrial ROS (Figure 1A, $p < 0.05$) in leukocytes of diabetic patients treated with metformin. In addition, we determined MPO levels in serum, since it is a potent pro-oxidant, derived mainly from neutrophils, that mediates vascular damage. The results showed that MPO was markedly reduced in the diabetic population (Figure 1B, $p < 0.05$), although their total leukocyte count remained unchanged (Table 1), thus suggesting a reduced MPO release by the leukocyte defense system. Moreover, systemic levels of TNF α and IL6 were also lower in T2D patients treated with metformin (Figure 1C,D, $p < 0.05$).

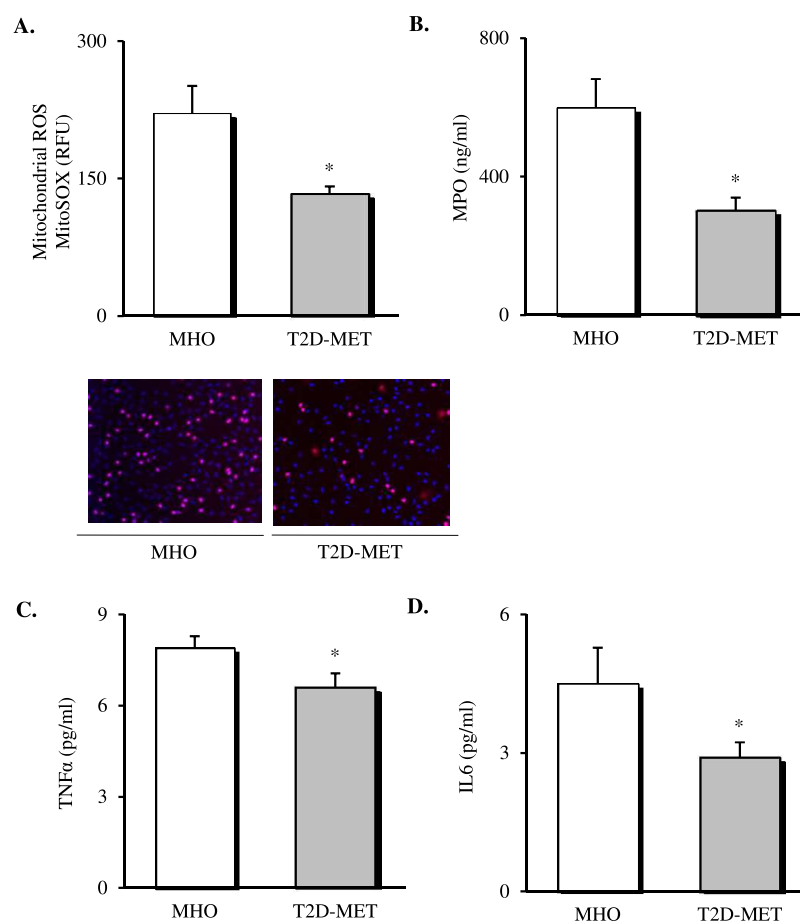


Figure 1. Evaluation of systemic oxidative stress markers and cytokines in the serum of MHO and obese T2D patients treated with metformin. Levels of mitochondrial ROS production (A) expressed as arbitrary units and the representative images of their leukocytes stained with MitoSox (red) and Hoechst 33,342 (blue) and visualized by fluorescence microscopy ($n = 20$ in MHO and $n = 17$ in T2D-Met), serum levels of (B) MPO ($n = 11$ in MHO and $n = 16$ in T2D-Met), (C) TNF α ($n = 14$ in MHO and $n = 15$ in T2D-Met) and (D) IL6 ($n = 12$ in MHO and $n = 15$ in T2D-Met). Data are expressed as mean + standard error. * $p < 0.05$ when compared using unpaired Student's t -test. ROS, reactive oxygen species; RFU, relative fluorescence units; MPO, myeloperoxidase; IL6, interleukin 6; TNF α , tumor necrosis factor alpha; MHO, metabolically healthy obese; T2D-Met, type 2 diabetic patients treated with metformin.

3.3. NLRP3 Inflammasome Complex Activation in VAT

The inflammatory status of VAT was evaluated by assessing the expression of different proteins of the NLRP3 inflammasome complex and pro-inflammatory mediators. Firstly, we observed a decrease in the protein expression levels of all the analyzed markers in the VAT of diabetic patients treated with metformin (Figure 2). Specifically, our results showed a decline in the percentage of the expression of NF κ B (Figure 2A, $p < 0.01$), NLRP3 (Figure 2B, $p < 0.05$) and ASC (Figure 2C, $p < 0.05$) in the metformin-treated group compared to MHO subjects, which was accompanied by a significant drop in the expression of the chemoattractant signal MCP1 (Figure 2D, $p < 0.05$).

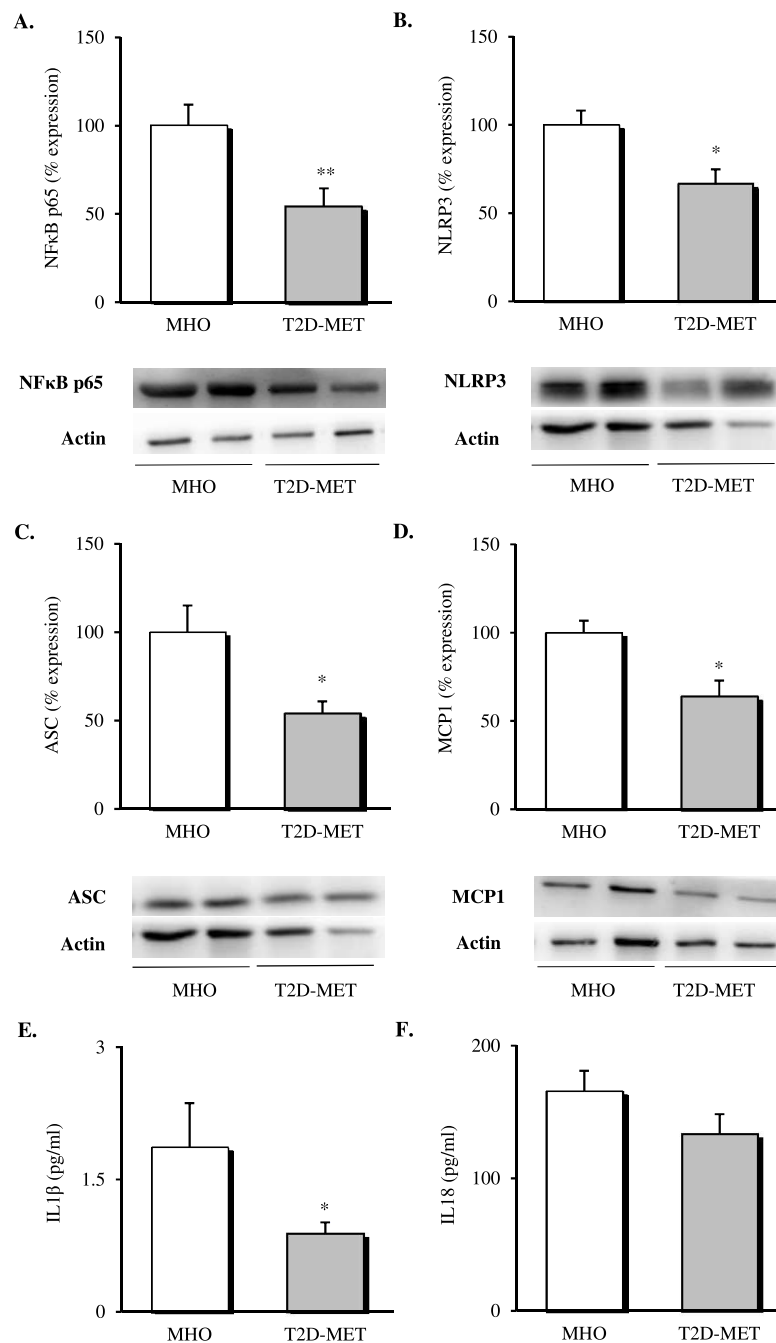


Figure 2. Evaluation of inflammasome complex mediators and interleukins in the VAT and serum of MHO and obese T2D patients treated with metformin. Relative protein expression and representative

western blot images of the inflammatory transcription factor (A) NF κ B ($n = 9$ in MHO and $n = 10$ in T2D-Met), inflammasome complex components (B) NLRP3 ($n = 11$ in MHO and $n = 9$ in T2D-Met) and (C) ASC ($n = 12$ per group), (D) MCP1 ($n = 9$ in MHO and $n = 13$ in T2D-Met) and serum levels of (E) IL1 β ($n = 10$ in MHO and $n = 14$ in T2D-Met) and (F) IL18 ($n = 13$ per group). Data are expressed as mean + standard error. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ when compared using unpaired Student's t -test. VAT, visceral adipose tissue; MHO, metabolically healthy obese; T2D-Met, type 2 diabetic patients treated with metformin; NF κ B, nuclear factor κ B; MCP1, monocyte chemoattractant protein 1; NLRP3, NACHT, LRR and PYD domain-containing protein 3; ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain; IL1 β , interleukin 1 beta; IL18, interleukin 18.

When we evaluated serum levels of cytokines released by the formation of the NLRP3 inflammasome complex, a significant decrease in serum IL1 β (Figure 2E, $p < 0.05$) and a downward trend in serum IL18 (Figure 2F, $p = 0.146$) were observed in diabetic patients treated with metformin with respect to MHO subjects.

3.4. Protein Expression of Autophagy Mediators in VAT

When different autophagy markers were analyzed in VAT, a general downregulation of this pathway was observed in patients treated with metformin (Figure 3); in particular, lower protein levels of ATG5 (Figure 3A, $p < 0.01$) and Beclin1 (Figure 3B, $p < 0.05$) and significantly higher p62 levels (Figure 3C, $p < 0.05$) were detected when compared with MHO subjects. Finally, the proapoptotic marker CHOP was also evaluated, showing a significant drop (Figure 3D, $p < 0.01$) in the diabetic group, in line with the improved adipose tissue functionality.

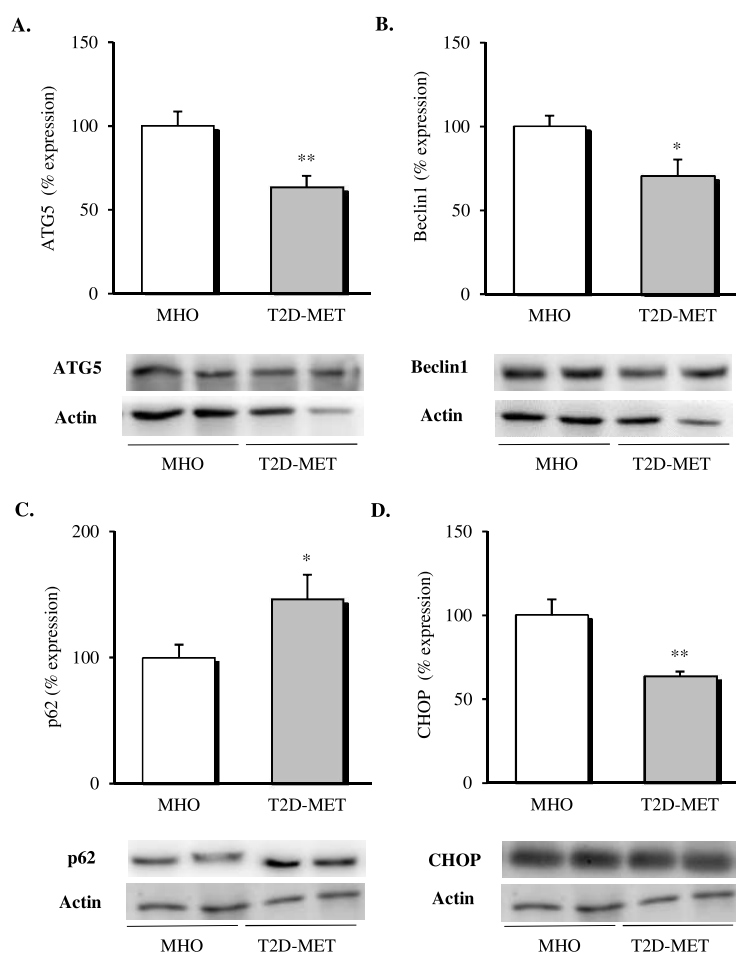


Figure 3. Evaluation of autophagy mediators and CHOP in the VAT of MHO and obese T2D patients

treated with metformin. Relative protein expression and representative western blot images of (A) ATG5 ($n = 12$ in MHO and $n = 13$ in T2D-Met), (B) Beclin1 ($n = 12$ in MHO and $n = 13$ in T2D-Met), (C) p62 ($n = 12$ in MHO and $n = 11$ in T2D-Met) and proapoptotic marker (D) CHOP ($n = 12$ in MHO and $n = 10$ in T2D-Met). Data are expressed as mean + standard error. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ when compared using unpaired Student's *t*-test. CHOP, CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein; VAT, visceral adipose tissue; MHO, metabolically healthy obese; T2D-Met, type 2 diabetic patients treated with metformin; ATG5, autophagy related 5.

3.5. Analysis of Correlations between Variables

Pearson's correlation studies revealed a significant and positive correlation between mitochondrial ROS in leukocytes and systemic MPO ($r = 0.665$, $p = 0.004$, $n = 17$). When we analyzed the inflammatory profile, systemic cytokine IL1 β was positively associated with VAT expression of ATG5 ($r = 0.598$, $p = 0.031$, $n = 13$). Both IL1 β and IL6 were negatively correlated with the autophagic flux protein p62 ($r = -0.577$, $p = 0.049$, $n = 12$; $r = -0.682$, $p = 0.010$, $n = 13$), and the expression of the inflammatory mediator NF κ B in VAT was positively associated with Beclin1 ($r = 0.613$, $p = 0.005$, $n = 19$), ATG5 ($r = 0.664$, $p = 0.003$, $n = 18$), NLRP3 ($r = 0.626$, $p = 0.017$, $n = 14$) and ASC ($r = 0.813$, $p = 0.000$, $n = 18$). At the same time, NLRP3 and ASC both correlated with the autophagic markers ATG5 ($r = 0.809$, $p = 0.000$, $n = 19$; $r = 0.734$, $p = 0.000$, $n = 23$, respectively) and Beclin 1 ($r = 0.614$, $p = 0.005$, $n = 19$; $r = 0.574$, $p = 0.004$, $n = 23$, respectively). Additionally, MCP1 expression was positively associated with ATG5, Beclin1 and NLRP3 ($r = 0.631$, $p = 0.002$, $n = 21$; $r = 0.542$, $p = 0.011$, $n = 21$ and $r = 0.606$, $p = 0.008$, $n = 18$, respectively). When we evaluated the expression of the proapoptotic protein CHOP, we observed a positive correlation with ATG5 ($r = 0.535$, $p = 0.012$, $n = 21$), Beclin1 ($r = 0.458$, $p = 0.032$, $n = 22$) and mediators of the inflammasome complex NF κ B ($r = 0.537$, $p = 0.026$, $n = 17$), NLRP3 ($r = 0.655$, $p = 0.003$, $n = 18$) and serum IL1 β ($r = 0.605$, $p = 0.037$, $n = 12$).

4. Discussion

In the present study, we demonstrate that obese T2D patients treated with metformin display a more favorable immuno-inflammatory status than MHO subjects: namely, a reduction in leukocyte ROS production, an improved systemic inflammatory profile, and an amelioration in the activation of the inflammasome complex, autophagy and apoptosis mediators measured in VAT. In the context of its emerging role as an immune system modulator, we suspect that metformin mediates these anti-inflammatory responses and improves the cardiometabolic profile of T2D patients, even with respect to obese individuals that do not apparently exhibit overt metabolic abnormalities.

Consistent data show that mitochondria are the main subcellular target of metformin, wherein it reduces ROS production as a direct consequence of mitochondrial complex I suppression [4]. In line with this, our present data reveal a decrease in mitochondrial ROS production by leukocytes of obese diabetic patients treated with metformin compared with MHO subjects. These results are in apparent conflict with our previous results in which T2D patients showed higher ROS production than MHO subjects [35]. However, there are differences between the two study designs that need to be taken into consideration. In the study by Bañuls et al., previous metformin treatment was not considered as an inclusion criterion, and patients with T2D displayed higher BMI than those with MHO, a characteristic we have previously shown to increase oxidative stress [36]. In addition, metformin treatment reduced mitochondrial ROS and increased antioxidant levels with respect to non-metformin-treated T2D patients [37], which is in accordance with our present findings and those of Buddak et al., who showed that macrophages treated with metformin express less ROS and display increased antioxidant activity and reduced inflammatory cytokine production [38].

Simultaneously, MPO, which is stored mainly in neutrophils, can also contribute to vascular injury and oxidative stress, thus exacerbating the inflammatory response [39]. Our data support these findings, as they show a positive correlation between MPO and mitochondrial ROS production in leukocytes. Among the few studies published about the effect of metformin on MPO, one reported

that metformin significantly reduced MPO activity in pulmonary tissue [40], which is in accordance with our findings.

Under conditions of obesity, adipose tissue and leukocytes are crucial mediators of a chronic low-grade inflammatory state, since they secrete proinflammatory mediators and contribute to insulin resistance [41]. Previous clinical studies have shown that metformin reduces systemic inflammatory markers such as IL6 and TNF α in obese and T2D patients [42,43]. Furthermore, it has been demonstrated that metformin diminishes TNF α and MCP1 production in adipose tissue in a rodent obesity model with insulin resistance [18]. MCP1 is an adipocytokine that is crucial for triggering macrophage infiltration into adipose tissue and recruiting more macrophages to sites of infiltration, where these activated macrophages further stimulate MCP1 production. In a model of hypertrophied adipocytes, MCP1 protein was shown to be significantly inhibited by treatment with metformin by a mechanism involving the NF κ B pathway [44]. As a whole, these previous results are in line with our present findings, and together they confirm a role for metformin in ameliorating systemic inflammation, with a specific action in adipose tissue, where it reduces expression of MCP1 and NF κ B.

As mentioned previously, NF κ B is the main mediator of the priming signal of the NLRP3 inflammasome. Thus, the inhibition of NF κ B expression could be involved in downregulation of the NLRP3 inflammasome [45]. In fact, when compared with obese subjects without metabolic complications, our obese diabetic patients treated with metformin exhibited a significantly lower expression of the inflammasome components NLRP3 and ASC and a drop in the systemic release of IL1 β and IL18, the specific cytokines resulting from NLRP3 inflammasome activation. This response could have been mediated by the well-known effect of metformin on NF κ B and ROS decline [44,46]. In line with this, Li et al. reported that metformin prevented NLRP3 inflammasome activation by suppressing endoplasmic reticulum (ER) stress, indicated by dephosphorylation of IRE1 α and eIF2 α in the adipose tissue of diabetic mice [19]. These findings are consistent with the reduced expression of the proapoptotic factor CHOP observed in the present study, which is a downstream signal of chronic ER stress activation. Furthermore, we have previously reported that leukocytes from patients treated with metformin present impaired production of NLRP3 and reduced levels of IL1 β and IL18 compared with non-diabetic subjects [47], which is also in line with our present findings.

Several studies have reported a crosstalk between autophagy and inflammasome activation in macrophages, suggesting that the former accompanies the latter as an autoregulatory mechanism to restrain its pro-inflammatory function [48,49]. Accordingly, we observed that NLRP3 and ASC were both positively correlated with ATG5 and Beclin1, while systemic IL1 β showed a positive association with ATG5 and a negative association with p62, which is constantly degraded during the autophagic process [50]. This endorses a positive correlation between activation of the inflammasome complex and autophagy.

Compelling evidence suggest that metformin could display its effect on the regulatory mechanism of autophagy in a tissue-dependent fashion. Thus, in a diet-induced obesity model, metformin was shown to improve autophagy in the liver, while it was inhibited in the epididymal adipose tissue [29], which is in line with the inhibition of autophagy in VAT observed in the present work, and mediated by a significant drop in protein expression of Beclin 1 and ATG5 and an increase in p62 (autophagy initiation, elongation and cargo recognition, respectively). In contrast, autophagy has been shown to increase progressively in epididymal adipose tissue in a lean mouse model after metformin treatment [30]. We can speculate about whether these differential responses to metformin treatment could be modulated by obesity. Indeed, autophagy is regulated in a defective manner in the hypertrophic adipose tissue of mice and humans. In a study in lean mice, caloric deprivation was shown to result in a significant increase in the expression of markers of autophagy in VAT, while it was reduced in obese mice. A similar response has been found in human obese subjects, in which body mass reduction led to an attenuation of autophagy in subcutaneous adipose tissue [51].

One of the main strengths of the present study is that we included an MHO group without any cardiometabolic risk or pharmacological treatment. Moreover, as far as we know, this is the first

study to report a modulation of the NLRP3 inflammasome and autophagy activation in the VAT of obese patients treated with metformin. Indeed, the significant correlation between these specific tissue markers and circulating cytokines IL6 and IL1 β supports the modulation of these molecular pathways in highly metabolically active VAT as contributors to the systemic anti-inflammatory effect of metformin.

Although these results undoubtedly broaden our understanding of the global action of metformin, the transversal nature of the study limits the inference of causality, and therefore more mechanistic studies are required to confirm this notion. One weakness of the study is the lack of a group of drug-naive diabetic patients, though it should be stressed that patients undergoing RYGB are closely monitored with respect to medication. In addition, we chose to carry out our analyses in VAT, which is composed of a diverse cell population that includes adipocytes, vascular stromal cells and various immune cells with an important role in obesity. In this way, whole-tissue changes may mask specific regulation of molecular pathways in a particular cell population and/or may reflect changes in the cellular composition of the tissue.

5. Conclusions

To summarize, our findings provide evidence that obese T2D patients treated with metformin exhibit an improved inflammatory and oxidative status with respect to MHO subjects. This improvement seems to be modulated by changes in the activation of the inflammasome complex and autophagy in VAT, suggesting—despite common belief—that MHO subjects are not as cardiometabolically protected as expected. Future mechanistic studies should aim to determine the direct targets of metformin responsible for mediating these responses.

Author Contributions: Conceptualization, M.R. and V.M.V.; formal analysis and data curation, Z.A.-J., S.L.-D., V.M.V. and M.R.; funding acquisition, M.R. and V.M.V.; investigation, Z.A.-J., S.L.-D., R.D.-R. and F.I.; methodology, Z.A.-J., S.L.-D., R.D.-R. and F.I.; project administration, M.R. and V.M.V.; resources, S.Á.G.-A., D.P.-G., C.M., M.R. and V.M.V.; supervision and validation, S.L.-D., R.D.-R. and M.R., visualization, Z.A.-J. and F.I.; writing—original draft, Z.A.-J., S.L.-D. and R.D.-R.; writing—review and editing, M.R. and V.M.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by grants PI19/00437 and PI19/00838 by the Carlos III Health Institute (ISCIII), co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF “A way to build Europe”) and by the PROMETEO/2019/027 grant from the Ministry of Education of the Valencian Regional Government. Z.A.-J. and R.D.-R. are recipients of PFIS and Sara Borrell fellowships from the Carlos III Health Institute (ISCIII) (FI17/00144 and CD18/00069, respectively). S.L.-D. is the recipient of an APOSTD/2020/145 fellowship from the Ministry of Innovation, University, Science and Digital Society of the Valencian Regional Government. V.M.V. is recipient of CES/10/030 from the Ministry of Health of the Valencian Regional Government. An unrestricted grant is from Menarini S.A.

Acknowledgments: The authors thank Brian Normanly (University of Valencia/CIBERehd) for his editorial assistance; Rosa Falcón (PTA2017-14355-I/FISABIO) and Begoña Zaragoza (University Hospital Doctor Peset) for their technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Després, J.-P. Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: An update. *Circulation* **2012**, *126*, 1301–1313. [[CrossRef](#)]
2. Frühbeck, G. Obesity: Screening for the evident in obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2012**, *8*, 570–572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Fontana, L.; Eagon, J.C.; Trujillo, M.E.; Scherer, P.E.; Klein, S. Visceral Fat Adipokine Secretion Is Associated With Systemic Inflammation in Obese Humans. *Diabetes* **2007**, *56*, 1010–1013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Pernicova, I.; Korbonits, M. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2014**, *10*, 143–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Cameron, A.R.; Morrison, V.L.; Levin, D.; Mohan, M.; Forteath, C.; Beall, C.; McNeilly, A.D.; Balfour, D.J.K.; Savinko, T.; Wong, A.K.F.; et al. Anti-Inflammatory Effects of Metformin Irrespective of Diabetes Status. *Circ. Res.* **2016**, *119*, 652–665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Arai, M.; Uchiba, M.; Komura, H.; Mizuochi, Y.; Harada, N.; Okajima, K. Metformin, an antidiabetic agent, suppresses the production of tumor necrosis factor and tissue factor by inhibiting early growth response factor-1 expression in human monocytes in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *334*, 206–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Ursini, F.; Russo, E.; Pellino, G.; D'Angelo, S.; Chiaravalloti, A.; De Sarro, G.; Manfredini, R.; De Giorgio, R. Metformin and Autoimmunity: A “New Deal” of an Old Drug. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1236. [[CrossRef](#)]
8. Foretz, M.; Guigas, B.; Viollet, B. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2019**, *15*, 569–589. [[CrossRef](#)]
9. Blüher, M. Metabolically Healthy Obesity. *Endocr. Rev.* **2020**, *41*, 405–420. [[CrossRef](#)]
10. Klötting, N.; Fasshauer, M.; Dietrich, A.; Kovacs, P.; Schön, M.R.; Kern, M.; Stumvoll, M.; Blüher, M. Insulin-sensitive obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2010**, *299*, E506–E515. [[CrossRef](#)]
11. Iacobini, C.; Pugliese, G.; Blasetti Fantauzzi, C.; Federici, M.; Menini, S. Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity. *Metab. Clin. Exp.* **2019**, *92*, 51–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Esser, N.; L'homme, L.; De Roover, A.; Kohnen, L.; Scheen, A.J.; Moutschen, M.; Piette, J.; Legrand-Poels, S.; Paquot, N. Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue. *Diabetologia* **2013**, *56*, 2487–2497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sutterwala, F.S.; Haasken, S.; Cassel, S.L. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2014**, *1319*, 82–95. [[CrossRef](#)]
14. Vanaja, S.K.; Rathinam, V.A.K.; Fitzgerald, K.A. Mechanisms of inflammasome activation: Recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol.* **2015**, *25*, 308–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Abderrazak, A.; Syrovets, T.; Couchie, D.; El Hadri, K.; Friguet, B.; Simmet, T.; Rouis, M. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol.* **2015**, *4*, 296–307. [[CrossRef](#)]
16. He, Y.; Hara, H.; Núñez, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 1012–1021. [[CrossRef](#)]
17. Vandanmagsar, B.; Youm, Y.-H.; Ravussin, A.; Galgani, J.E.; Stadler, K.; Mynatt, R.L.; Ravussin, E.; Stephens, J.M.; Dixit, V.D. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 179–188. [[CrossRef](#)]
18. Lu, C.-H.; Hung, Y.-J.; Hsieh, P.-S. Additional effect of metformin and celecoxib against lipid dysregulation and adipose tissue inflammation in high-fat fed rats with insulin resistance and fatty liver. *Eur. J. Pharmacol.* **2016**, *789*, 60–67. [[CrossRef](#)]
19. Li, A.; Zhang, S.; Li, J.; Liu, K.; Huang, F.; Liu, B. Metformin and resveratrol inhibit Drp1-mediated mitochondrial fission and prevent ER stress-associated NLRP3 inflammasome activation in the adipose tissue of diabetic mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2016**, *434*, 36–47. [[CrossRef](#)]
20. Ma, Y.; Galluzzi, L.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Autophagy and Cellular Immune Responses. *Immunity* **2013**, *39*, 211–227. [[CrossRef](#)]
21. Ohsumi, Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.* **2014**, *24*, 9–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Wesselborg, S.; Stork, B. Autophagy signal transduction by ATG proteins: From hierarchies to networks. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 4721–4757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kovsan, J.; Blüher, M.; Tarnovscki, T.; Klötting, N.; Kirshtein, B.; Madar, L.; Shai, I.; Golan, R.; Harman-Boehm, I.; Schön, M.R.; et al. Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, E268–E277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Jansen, H.J.; van Essen, P.; Koenen, T.; Joosten, L.A.B.; Netea, M.G.; Tack, C.J.; Stienstra, R. Autophagy activity is up-regulated in adipose tissue of obese individuals and modulates proinflammatory cytokine expression. *Endocrinology* **2012**, *153*, 5866–5874. [[CrossRef](#)]
25. Kosacka, J.; Kern, M.; Klötting, N.; Paeschke, S.; Rudich, A.; Haim, Y.; Gericke, M.; Serke, H.; Stumvoll, M.; Bechmann, I.; et al. Autophagy in adipose tissue of patients with obesity and type 2 diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2015**, *409*, 21–32. [[CrossRef](#)]

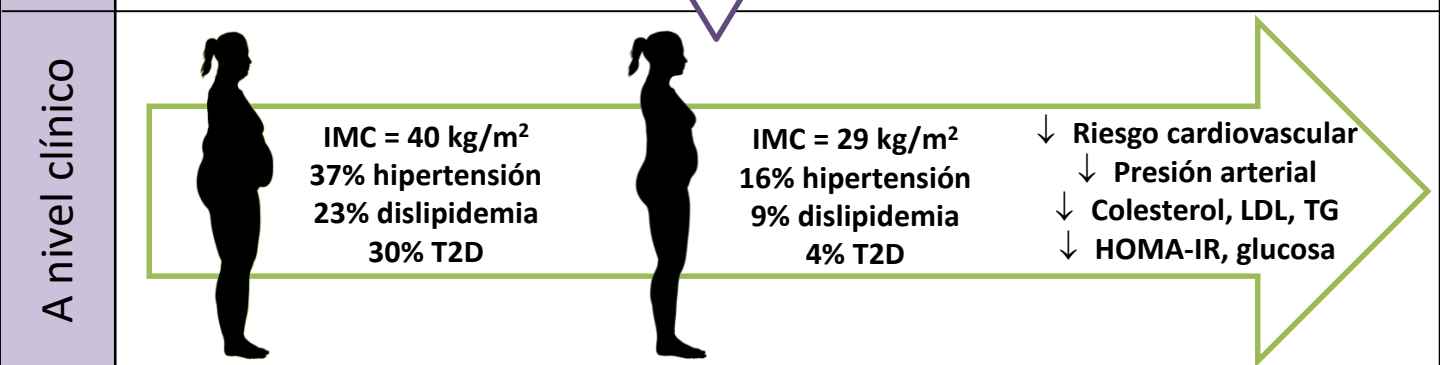
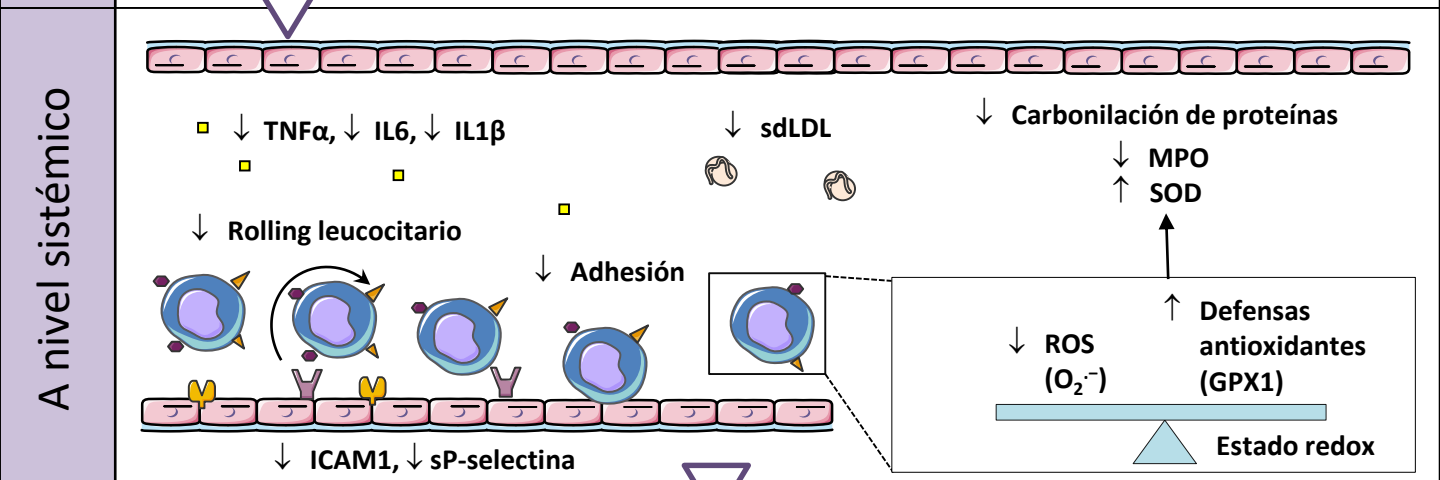
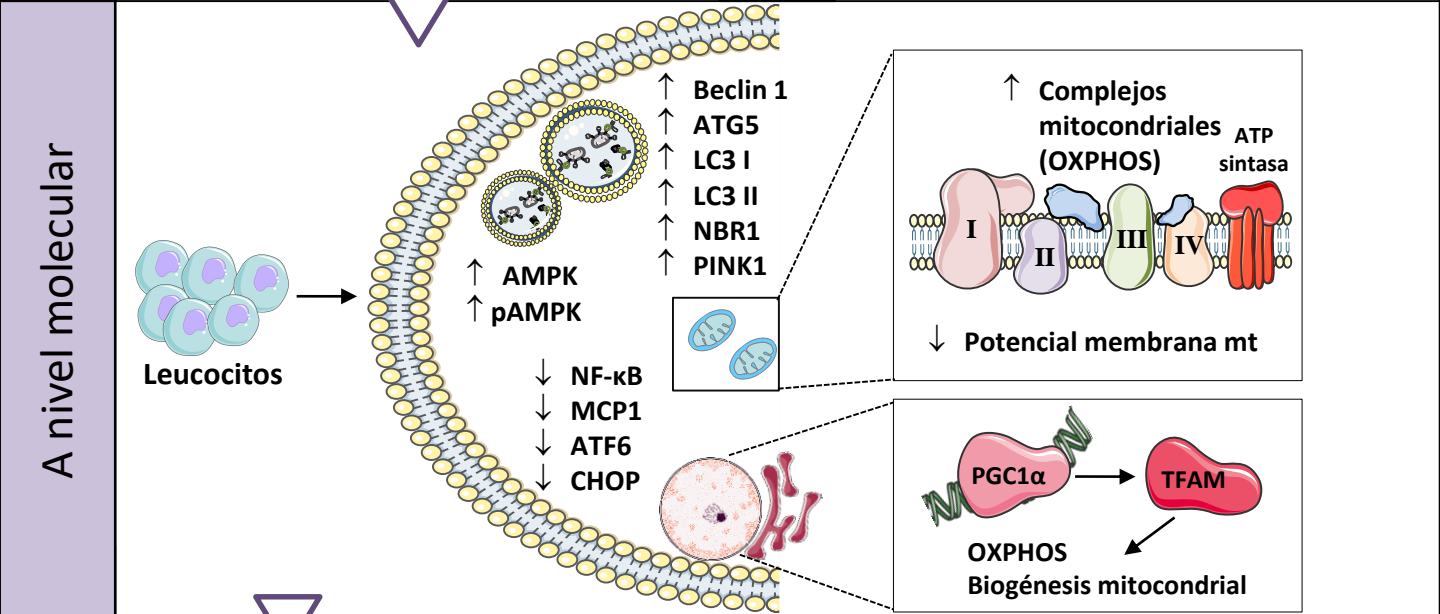
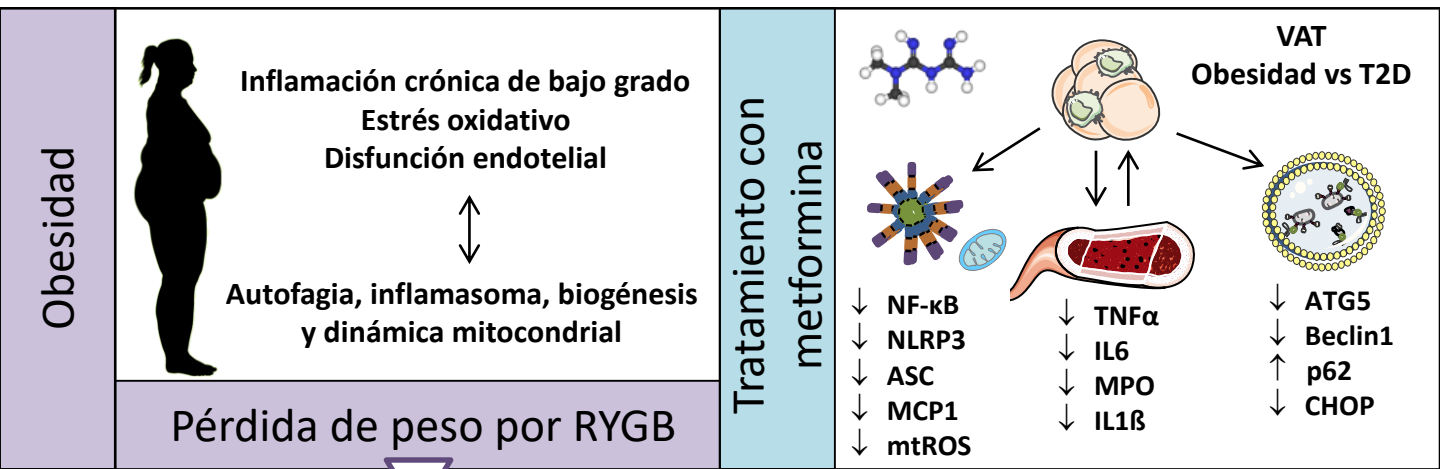
26. Ost, A.; Svensson, K.; Ruishalme, I.; Brännmark, C.; Franck, N.; Krook, H.; Sandström, P.; Kjolhede, P.; Strålfors, P. Attenuated mTOR signaling and enhanced autophagy in adipocytes from obese patients with type 2 diabetes. *Mol. Med.* **2010**, *16*, 235–246. [[CrossRef](#)]
27. He, C.; Zhu, H.; Li, H.; Zou, M.-H.; Xie, Z. Dissociation of Bcl-2-Beclin1 complex by activated AMPK enhances cardiac autophagy and protects against cardiomyocyte apoptosis in diabetes. *Diabetes* **2013**, *62*, 1270–1281. [[CrossRef](#)]
28. Tomic, T.; Botton, T.; Cerezo, M.; Robert, G.; Luciano, F.; Puissant, A.; Gounon, P.; Allegra, M.; Bertolotto, C.; Bereder, J.-M.; et al. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death Dis.* **2011**, *2*, e199. [[CrossRef](#)]
29. Li, M.; Sharma, A.; Yin, C.; Tan, X.; Xiao, Y. Metformin ameliorates hepatic steatosis and improves the induction of autophagy in HFD-induced obese mice. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *16*, 680–686. [[CrossRef](#)]
30. Lettieri Barbato, D.; Tatulli, G.; Aquilano, K.; Ciriolo, M.R. FoxO1 controls lysosomal acid lipase in adipocytes: Implication of lipophagy during nutrient restriction and metformin treatment. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e861. [[CrossRef](#)]
31. Berg, A.H.; Scherer, P.E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ. Res.* **2005**, *96*, 939–949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Tilg, H.; Moschen, A.R. Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6*, 772–783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Grundy, S.M. Metabolic Syndrome Scientific Statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**, *25*, 2243–2244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. American Diabetes Association 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care* **2018**, *41*, S13–S27. [[CrossRef](#)]
35. Bañuls, C.; Rovira-Llopis, S.; Lopez-Domenech, S.; Diaz-Morales, N.; Blas-Garcia, A.; Veses, S.; Morillas, C.; Victor, V.M.; Rocha, M.; Hernandez-Mijares, A. Oxidative and endoplasmic reticulum stress is impaired in leukocytes from metabolically unhealthy vs. healthy obese individuals. *Int. J. Obes.* **2017**, *41*, 1556–1563. [[CrossRef](#)]
36. López-Domènech, S.; Bañuls, C.; Díaz-Morales, N.; Escribano-López, I.; Morillas, C.; Veses, S.; Orden, S.; Álvarez, Á.; Victor, V.M.; Hernández-Mijares, A.; et al. Obesity impairs leukocyte-endothelium cell interactions and oxidative stress in humans. *Eur. J. Clin. Investig.* **2018**, *48*, e12985. [[CrossRef](#)]
37. Diaz-Morales, N.; Rovira-Llopis, S.; Bañuls, C.; Lopez-Domenech, S.; Escribano-Lopez, I.; Veses, S.; Jover, A.; Rocha, M.; Hernandez-Mijares, A.; Victor, V.M. Does Metformin Protect Diabetic Patients from Oxidative Stress and Leukocyte-Endothelium Interactions? *Antioxid. Redox Signal.* **2017**, *27*, 1439–1445. [[CrossRef](#)]
38. Bułdak, L.; Łabuzek, K.; Bułdak, R.J.; Kozłowski, M.; Machnik, G.; Liber, S.; Suchy, D.; Duława-Bułdak, A.; Okopień, B. Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. *Pharmacol. Rep. PR* **2014**, *66*, 418–429. [[CrossRef](#)]
39. Sena, C.M.; Leandro, A.; Azul, L.; Seiça, R.; Perry, G. Vascular Oxidative Stress: Impact and Therapeutic Approaches. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 1668. [[CrossRef](#)]
40. Ghavimi, H.; Sheidaei, S.; Vaez, H.; Zolali, E.; Asgharian, P.; Hamishehkar, H. Metformin-attenuated sepsis-induced oxidative damages: A novel role for metformin. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2018**, *21*, 469–475.
41. Olefsky, J.M.; Glass, C.K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* **2010**, *72*, 219–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Evia-Viscarra, M.L.; Rodea-Montero, E.R.; Apolinar-Jiménez, E.; Muñoz-Noriega, N.; García-Morales, L.M.; Leños-Pérez, C.; Figueroa-Barrón, M.; Sánchez-Fierros, D.; Reyes-García, J.G. The effects of metformin on inflammatory mediators in obese adolescents with insulin resistance: Controlled randomized clinical trial. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab. JPEM* **2012**, *25*, 41–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Fidan, E.; Onder Ersoz, H.; Yilmaz, M.; Yilmaz, H.; Kocak, M.; Karahan, C.; Erem, C. The effects of rosiglitazone and metformin on inflammation and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* **2011**, *48*, 297–302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Morita, N.; Hosaka, T.; Kitahara, A.; Murashima, T.; Onuma, H.; Sumitani, Y.; Takahashi, K.; Tanaka, T.; Kondo, T.; Ishida, H. Novel Mechanisms Modulating Palmitate-Induced Inflammatory Factors in Hypertrophied 3T3-L1 Adipocytes by AMPK. *J. Diabetes Res.* **2018**, *2018*, 9256482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2017**, *2*, 17023. [[CrossRef](#)]
46. Schuiveling, M.; Vazirpanah, N.; Radstake, T.R.D.J.; Zimmermann, M.; Broen, J.C.A. Metformin, A New Era for an Old Drug in the Treatment of Immune Mediated Disease? *Curr. Drug Targets* **2018**, *19*, 945–959. [[CrossRef](#)]
47. Iannantuoni, F.; Diaz-Morales, N.; Escribano-Lopez, I.; Sola, E.; Roldan-Torres, I.; Apostolova, N.; Bañuls, C.; Rovira-Llopis, S.; Rocha, M.; Victor, V.M. Does Glycemic Control Modulate the Impairment of NLRP3 Inflammasome Activation in Type 2 Diabetes? *Antioxid. Redox Signal.* **2019**, *30*, 232–240. [[CrossRef](#)]
48. Shi, C.-S.; Shenderov, K.; Huang, N.-N.; Kabat, J.; Abu-Asab, M.; Fitzgerald, K.A.; Sher, A.; Kehrl, J.H. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 255–263. [[CrossRef](#)]
49. Zhong, Z.; Umemura, A.; Sanchez-Lopez, E.; Liang, S.; Shalapour, S.; Wong, J.; He, F.; Boassa, D.; Perkins, G.; Ali, S.R.; et al. NF- κ B Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria. *Cell* **2016**, *164*, 896–910. [[CrossRef](#)]
50. Bjørkøy, G.; Lamark, T.; Pankiv, S.; Øvervatn, A.; Brech, A.; Johansen, T. Chapter 12 Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1. In *Methods in Enzymology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2009; Volume 452, pp. 181–197. ISBN 978-0-12-374547-7.
51. Nuñez, C.E.; Rodrigues, V.S.; Gomes, F.S.; de Moura, R.F.; Victorio, S.C.; Bombassaro, B.; Chaim, E.A.; Pareja, J.C.; Geloneze, B.; Velloso, L.A.; et al. Defective regulation of adipose tissue autophagy in obesity. *Int. J. Obes.* **2013**, *37*, 1473–1480. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ANEXO II. GRAPHICAL ABSTRACT



ANEXO III. OTROS MÉRITOS DURANTE LA FORMACIÓN DEL DOCTORADO

Otras publicaciones con autoría durante el desarrollo de la tesis doctoral

ARTÍCULOS ORIGINALES

1. de Marañón, AM; Díaz-Pozo, P; Canet, F; Díaz-Morales, N; **Abad-Jiménez, Z**; López-Domènech, S; Vezza, T; Apostolova, N; Morillas, C; Rocha, Víctor, VM. Metformin modulates mitochondrial function and mitophagy in leukocytes from type 2 diabetic patients. *Redox Biol.* 2022;53:102342.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102342>
Índice de impacto: **10,787**
Categoría: Bioquímica y Biología Molecular (**D1**)
2. de Marañón, AM; Canet, F; **Abad-Jiménez, Z**; Jover, A; Morillas, C; Rocha, M; Víctor, VM. Does metformin modulate mitochondrial dynamics and function in type 2 diabetic patients? *Antioxid Redox Signal.* 2021;35(5):377-85.
Doi: <https://doi.org/10.1089/ars.2021.0019>
Índice de impacto: **7,468**
Categoría: Bioquímica y Biología Molecular (**Q1**); Endocrinología y Metabolismo (**Q1**)
3. Rovira-Llopis, S; Díaz-Rúa, R; Grau del Valle, C; Iannantuoni, F; **Abad-Jiménez, Z**; Bosch-Sierra, N; Panadero-Romero, J; Víctor, VM; Rocha, M; Morillas, C; Bañuls, C. Characterization of differentially expressed circulating miRNAs in metabolically healthy versus unhealthy obesity. *Biomedicines.* 2021;9(3):321
Doi: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030321>
Índice de impacto: **4,757**
Categoría: Bioquímica y Biología Molecular (**Q2**); Medicina, Investigación y Experimentación (**Q2**); Farmacología y Farmacia (**Q2**)
4. de Marañón, AM; Iannantuoni, F; **Abad-Jiménez, Z**; Canet, F; Díaz-Pozo, P; López-Domènech, S; Roldán-Torres, I; Morillas, C; Rocha, M; Víctor, VM. Association between proinflammatory markers, leukocyte endothelium interactions and carotid intima-media thickness in type 2 diabetes: role of glycaemic control. *J Clin Med.* 2020;9(8):2522.
Doi: <https://doi.org/10.3390/jcm9082522>

Índice de impacto: **4,242**

Categoría: Medicina, General e Interna (**Q1**)

5. Iannantuoni, F; de Marañón, AM; **Abad-Jiménez, Z**; Canet, F; Díaz-Pozo, P; López-Domènech, S; Morillas, C; Rocha, M; Víctor, VM. Mitochondrial alterations and enhanced human leukocyte/endothelial cell interactions in type 1 diabetes. *J Clin Med.* 2020;9(7):2155.

Doi: <https://doi.org/10.3390/jcm9072155>

Índice de impacto: **4,242**

Categoría: Medicina, General e Interna (**Q1**)

6. Martínez-Herrera, M; **Abad-Jiménez, Z (co-first)**; Silvestre, FJ; López-Domènech, S; Márquez-Arrico, CF; Silvestre-Rangil, J; Víctor, VM; Rocha, M. Effect of non-surgical periodontal treatment on oxidative stress markers in leukocytes and their interaction with the endothelium in obese subjects with periodontitis: A pilot study. *J Clin Med.* 2020;9(7):2117.

Doi: <https://doi.org/10.3390/jcm9072117>

Índice de impacto: **4,242**

Categoría: Medicina, General e Interna (**Q1**)

7. de Marañón, AM; Iannantuoni, F; **Abad-Jiménez, Z**; Canet, F; Díaz-Pozo, P; López-Domènech, S; Jover, A; Morillas, C; Mariño, G; Apostolova, N; Rocha, M; Víctor, VM. Relationship between PMN-endothelium interactions, ROS production and Beclin-1 in type 2 diabetes. *Redox Biol.* 2020;34:101563.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101563>

Índice de impacto: **11,799**

Categoría: Bioquímica y Biología Molecular (**D1**)

8. Iannantuoni, F; de Marañón, AM, Diaz-Morales, N; Falcón, R; Bañuls, C; **Abad-Jiménez, Z**; Víctor, VM; Hernández-Mijares, A; Rovira-Llopis, S. The SGLT2 inhibitor empagliflozin ameliorates the inflammatory profile in patients with type 2 diabetes and promotes an antioxidant response in leukocytes. *J Clin Med.* 2019;8(11):1814.

Doi: <https://doi.org/10.3390/jcm8111814>

Índice de impacto: **3,303**

Categoría: Medicina, general e interna (**Q1**)

9. Escribano-López, I; de Marañón, AM; Iannantuoni, F; López-Domènech, S; **Abad-Jiménez, Z**; Díaz-Pozo, P; Solá, E; Apostolova, N; Rocha, M; Víctor, VM. The mitochondrial antioxidant SS-31 modulates oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and autophagy in type 2 diabetes. *J Clin Med*. 2019;8(9):1322.

Doi: <https://doi.org/10.3390/jcm8091322>

Índice de impacto: **3,303**

Categoría: Medicina, general e interna (**Q1**)

10. López-Domènech, S; Martínez-Herrera, M; **Abad-Jiménez, Z**; Morillas, C; Escribano-López, I; Díaz-Morales, N; Bañuls, C; Víctor, VM; Rocha, M. Dietary weight loss intervention improves subclinical atherosclerosis and oxidative stress markers in leukocytes from obese humans. *Int J Obes (Lond)*. 2019;43(11):2200-09.

Doi: <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0309-5>

Índice de impacto: **4,514**

Categoría: Endocrinología y metabolismo (**Q1**); Nutrición y dietética (**Q1**)

11. Escribano-López, I; de Marañón, AM; Iannantuoni, F; López-Domènech, S; **Abad-Jiménez, Z**; Díaz-Pozo, P; Solá, E; Apostolova, N; Rocha, M; Víctor, VM. The mitochondrial antioxidant SS-31 increases SIRT1 levels and improves inflammation, oxidative stress, and leukocyte-endothelial interactions in type 2 diabetes. *Sci Rep*. 2018;8(1):15862.

Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34251-8>

Índice de impacto: **4,011**

Categoría: Ciencias Multidisciplinarias (**Q1**)

12. López-Domènech, S; **Abad-Jiménez, Z**; Iannantuoni, F; de Marañón, AM; Rovira-Llopis, S; Morillas, C; Bañuls, C; Víctor, VM; Rocha, M. Moderate weight loss attenuates chronic stress of the endoplasmic reticulum and mitochondrial dysfunction in human obesity. *Mol Metab*. 2019;19:24-33.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.10.005>

Índice de impacto: **6,181**

Categoría: Endocrinología y metabolismo (**Q1**)

- 13.** López-Domènech, S; Bañuls, C; de Marañón, AM; **Abad-Jiménez, Z**; Morillas, C; Gómez-Abril, SÁ; Rovira-Llopis, S; Víctor, VM; Hernández-Mijares, A; Rocha, M. Pinitol alleviates systemic inflammatory cytokines in human obesity by a mechanism involving unfolded protein response and sirtuin 1. *Clin Nutr.* 2018;37(6 Pt A):2036-44.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.09.015>

Índice de impacto: **5,496**

Categoría: Nutrición y dietéticas (**D1**)

REVISIONES BIBLIOGRÁFICAS

- 1.** Vezza, T; Díaz-Pozo, P; Canet, F; de Marañón, AM; **Abad-Jiménez, Z**; García-Gargallo, C; Roldán, I; Solá, E; Bañuls, C; López-Domènech, S; Rocha, M; Víctor, VM. The role of mitochondrial dynamic dysfunction in age-associated type 2 diabetes. *World J Mens Health.* 2022;40(3):399-411.

Doi: <https://doi.org/10.5534/wjmh.210146>

Índice de impacto: **6,494**

Categoría: Andrología (**D1**); Urología y Nefrología (**D1**)

- 2.** Vezza, T; **Abad-Jiménez, Z**; Martí-Cabrera, M; Rocha, M; Víctor, VM. Microbiota-mitochondria inter-Talk: a potential therapeutic strategy in obesity and type 2 diabetes. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(9):848.

Doi: <https://doi.org/10.3390/antiox9090848>

Índice de impacto: **6,313**

Categoría: Bioquímica y biología molecular (**Q1**), Química medicinal (**D1**), Ciencia de los alimentos y tecnología (**D1**)

- 3.** Burgos-Morón, E; **Abad-Jiménez, Z**; de Marañón, AM; Iannantuoni, F; Escribano-López, I; López-Domènech, S; Salom, C; Jover, A; Mora, V; Roldán, I; Solá, E; Rocha, M; Víctor, VM. Relationship between oxidative stress, ER

stress, and inflammation in type 2 diabetes: the battle continues. *J Clin Med.* 2019;8(9):1385.

Doi: <https://doi.org/10.3390/jcm8091385>

Índice de impacto: **3,303**

Categoría: Medicina, general e interna (**Q1**)

Comunicaciones representativas en congresos nacionales o internacionales

INTERNACIONALES

La doctoranda ha participado en 20 congresos internacionales, destacando:

1. **Abad-Jiménez, Z;** Kusters, YH; Joris, PJ; Plat, J; Mensink, RP; Stehouwer, CDA; Schalkwijk, CG; Houben, AJHM. Skin microvascular flowmotion is unaltered in abdominally obese men. Zoom Forward 2022 - Congress on obesity. European Association for the Study of Obesity. Poster. 04.05.2022 - 07.05.2022. Maastricht, Limburg, Netherlands.
2. **Abad-Jiménez, Z;** López-Domènech, S; García-Gargallo, C; de Marañón, AM; Vezza, T; Gómez-Abril, SÁ; Bañuls, C; Víctor, V; Rocha, M. Bariatric surgery improves autophagy and leukocyte-endothelial cell interactions through AMK activation at one year follow-up. 89th EAS Congress 2021. European Atherosclerosis Society. *Science at a glance*. 30.05.2021 - 02.06.2021. Virtual.
3. **Abad-Jiménez, Z;** López-Domènech, S; Díaz-Rúa, R; García-Gargallo, C; de Marañón, AM; Gómez-Abril, SÁ; Morillas, C; Víctor, VM; Rocha, M. Roux-en-Y gastric bypass improves oxidative stress markers and leukocyte-endothelial-cell interactions in obese patients at one year follow up. 88th EAS Congress 2020. European Atherosclerosis Society. *Science at a glance*. 04.10.2020 - 07.10.2020. Virtual.

NACIONALES

La doctoranda ha participado en 26 congresos nacionales, destacando:

1. **Abad-Jiménez, Z;** López-Domènech, S; Díaz-Rúa, R; Gómez-Abril, SÁ; Iannantuoni, F; Escribano-López, I; Falcón, R; Bañuls, C; Víctor, VM; Rocha, M. Efecto de la pérdida de peso sobre marcadores subclínicos de aterosclerosis y de estrés oxidativo en leucocitos de pacientes sometidos a cirugía de bypass gástrico. XXXII Congreso Nacional. Sociedad Española de Arteriosclerosis. *Póster*. 12.06.2019 - 14.06.2019. Girona, Cataluña, España.

2. **Abad-Jiménez, Z;** López-Domènech, S; Díaz-Rúa, R; Bañuls, C; Falcón, R; Gómez-Abril, SÁ; Víctor, VM; Rocha, M. Estudio de la autofagia y la activación del inflammasoma en el tejido adiposo visceral de pacientes obesos metabólicamente sanos vs diabéticos. XV Congreso Nacional SEEDO Obesidad. Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO). *Póster*. 13.03.2019 - 15.03.2019. Vigo, Galicia, España.

3. **Abad-Jiménez, Z;** López-Domènech, S; Borella, R; Morillas, C; Víctor, VM; Hernández-Mijares, A; Bañuls, C; Rocha, M. Efecto de la pérdida de peso sobre marcadores de estrés oxidativo y de retículo endoplasmático en leucocitos de sangre periférica. XIV Congreso Nacional SEEDO Obesidad. Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO). *Póster*. 14.03.2018 - 16.03.2018. Lleida, Cataluña, España. **Premio al mejor póster del área básica**