



EVIDÈNCIES EN TEIXIT ADIPÓS D'ALTERACIONS GÈNIQUES DELS VASOS LIMFÀTICS EN L'OBESITAT

Alfons Horra Pueyo

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Alfons Horra Pueyo

**EVIDÈNCIES EN TEIXIT ADIPÓS
D'ALTERACIONS GÈNIQUES DELS VASOS
LIMFÀTICS EN L'OBESITAT**

TESI DOCTORAL

Dirigida per
Dr. Joan Josep Vendrell Ortega

Departament de Medicina i Cirurgia



UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI

TARRAGONA 2016

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EVIDÈNCIES EN TEIXIT ADIPÓS D'ALTERACIONS GÈNIQUES DELS VASOS LIMFÀTICS EN L'OBESITAT

Alfons Horra Pueyo



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
Departament de Medicina i Cirurgia

Joan Josep Vendrell Ortega, Professor titular del departament de Medicina i Cirurgia de la Universitat Rovira i Virgili, Cap d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona

FAIG CONSTAR que:

aquest treball, titulat "**EVIDÈNCIES EN TEIXIT ADIPÓS D'ALTERACIONS GÈNIQUES DELS VASOS LIMFÀTICS EN L'OBESITAT**", que presenta **Alfons Horra Pueyo**, per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció al Departament Medicina i Cirurgia d'aquesta universitat.

Tarragona, 31 de desembre del 2015

El director de la tesi doctoral

Professor Dr Joan Josep Vendrell Ortega

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EVIDÈNCIES EN TEIXIT ADIPÓS D'ALTERACIONS GÈNIQUES DELS VASOS LIMFÀTICS EN L'OBESITAT

Alfons Horra Pueyo

AGRAÏMENTS

Concretar les paraules que han de mostrar la meva gratitud no és sempre una tasca fàcil. La realització d'aquesta tesi va acompanyada de moltes circumstàncies i persones.

Quan contactes amb persones proposant-los idees i projectes, moltes vegades un es pot trobar que la porta es tanca. A totes aquelles portes que es van tancar agraeixo la seva honestedat perquè gràcies a elles s'ha pogut fluir vers la consolidació d'aquest projecte. Gràcies, moltes gràcies.

Més enllà de les idees calen persones que en facilitin la seva realització i en aquest punt han estat determinants certes persones. Aquesta tesi respon a la voluntat d'una persona que quan la vaig contactar no va dir que NO. Aquesta persona és el Dr Joan Vendrell i Ortega, sense ell no hi hagués hagut projecte, sense ell no hi hauria respostes. Gràcies, moltes gràcies.

El camí vers aquesta tesi no ha sigut casual al mateix temps que no ha estat mancada de causalitats. La passió per la limfa arriba per dues persones a qui tinc gran estima. El Professor Albert Leduc i el Doctor Olivier Leduc, professors meus en la meva inoblidable etapa a la Universitat Lliure de Brussel·les. Ells em van inocular el virus del dubte, de la recerca constant de respostes i la passió irrefrenable pel coneixement de la limfa. Gràcies, moltes gràcies.

No està de més considerar que qualsevol acció humana precisa de molta gent darrera i no puc oblidar en aquest sentit totes aquelles persones, el personal tècnic del laboratori, que amb la seva feina han estat un gran suport per a mi. Gràcies, moltes gràcies.

Sense molts dels meus amics no hauria pogut desenvolupar aquest projecte; pels seus coneixements, per la seva paciència, pels seus consells, pels diàlegs, debats i confrontacions tingudes, moltes gràcies. Per vosaltres i amb vosaltres van sorgir reflexions, idees, arguments i sobretot amistat. Molts sou i no podria recordar-vos a tots i totes en cada detall i circumstància. Gràcies, moltes gràcies, per tantes coses.

Voldria recordar a totes aquelles investigadores i investigadors que m'heu precedit. A totes aquelles persones que amb el vostre treball i dedicació heu facilitat observacions, reflexions, certeses i respostes a qüestions que m'han fet créixer i reflexionar. Gràcies, moltes gràcies. Si no hi haguéssiu estat, jo no hauria arribat on he arribat.

No puc tampoc menystenir aquells que donen sentit a la recerca, aquells que han hagut de marxar abans d'hora fruit de la incapacitat humana de respondre a les seves necessitats de supervivència. Magdeleine, Olatz, Roberto, Alex, Joan, Maria, Josep, Matilde i molts anònims als meus ulls que formeu part d'aquelles morts primerenques. No sé si aquest projecte aportarà molt, poc, o res a la ciència. En tot cas, lamento no haver-ho fet abans si això hagués suposat no perdre-us tan aviat. Gràcies, moltes gràcies per motivar-me a seguir endavant.

Les raons que ens fan viure són moltes i potser moltes són, a ulls d'alguns, irrellevants: un cafè amb llet en una cafeteria, un somriure entre amics, un llibre que dona respostes a qüestions no resoltes, una abraçada, un petó, unes paraules... Un llibre, el cervell i el sentit de la vida del Paul Thagard, em va il·lustrar sobre que el sentit de la vida estava en l'amor, la feina i el joc. Reflexions que comparteixo.

L'amor: l'amor a la vida, a les persones, a la ciència, a la feina, al plaer de l'art, de la música, de la pintura... Possiblement l'amor no defineix el seu sentit en l'objecte del nostre amor sinó en la voluntat de sentir amor. Agraïxo a la meva família per haver-me fet créixer en l'amor a la llibertat; llibertat de pensar, estimar i de viure. M'heu ensenyat el més important que es pot ensenyar a ningú, possiblement des de la inconsciència d'haver-ho fet. M'heu ensenyat que poc importa el que pensis; el més important és que ho facis des de l'honestedat i el respecte. La llibertat no s'ensenyava sinó que s'exerceix, i ho heu fet molt bé. M'heu ensenyat l'amor en la seva vessant humana, m'heu ensenyat voluntat, perseverança, raó i dubte. M'heu ensenyat tantes coses ! Gràcies, moltes gràcies.

La feina: la meva feina ha donat i dona sentit a la meva vida en tant que em fa créixer. A nivell personal, pel diàleg amb els meus pacients i, professionalment, pel que aprenc de les seves dolences. Dels meus pacients, n'aprenc els matisos de la natura, del seu sentit de desordre i d'equilibri. Saviesa continguda que sempre és un gran gaudi descobrir. Gràcies, moltes gràcies.

El joc: el joc és el sentit més bàsic del nostre creixement com a individus. El vivim en la infantesa des de la seva espontaneïtat i el vivim en tant que adults des de la seva racionalitat. L'esport, la música, el lleure amb els amics en formen part. Què faríem sense el joc? De ben segur que la vida perdria sentit. Gràcies, moltes gràcies.

No voldria acabar aquestes pàgines sense agrair a l'atzar la meva existència. Jacques Monod en el seu assaig "**Le Hasard et la Nécessité, Essai sur la philosophie naturelle de la biologie moderne**" em va fer reflexionar sobre el concepte d'atzar i vaig arribar a la conclusió que l'atzar és el reflex de la nostra incapacitat de donar resposta amb prou rapidesa i encert a les nostres preguntes: que l'atzar és la manifestació de la nostra ignorància. Tot ha condicionat la meva vida; no sé en quina mesura i de quina forma, heus aquí la meva ignorància. I a tot dono gràcies d'haver-ho fet. Gràcies, moltes gràcies.

L'atzar, la ignorància, mou la nostra existència com a espècie perquè només des de la voluntat de superar-la i amb la certesa de mai aconseguir-ho, donem sentit a la vida. Aprendre, fer créixer el coneixement i transmetre'l és l'objectiu, als meus ulls, de viure. Desconec si hi haurà més o menys certesa en aquest projecte però sí que puc dir que ha estat un plaer viure'l. Simplement gràcies.

ÍNDEX GENERAL

ABREVIATURES	1
PRESENTACIÓ I JUSTIFICACIÓ	7
RESUM	9
INTRODUCCIÓ	11
1. DESENVOLUPAMENT DELS VASOS LIMFÀTICS	13
1.1 Origen dels vasos limfàtics	13
1.2 Estructuració dels vasos limfàtics	16
1.2.1 El guiatge del desenvolupament dels vasos limfàtics	24
1.2.2 Les cèl·lules hematopoètiques en el desenvolupament dels vasos limfàtics	25
1.2.3 El desenvolupament diferenciat dels diferents tipus de vasos limfàtics	26
1.3 La formació dels nòduls limfàtics	27
2. <i>PROSPERO-HOMEBOX PROTEIN 1</i>	29
2.1 Expressió de <i>prox1</i> en els diferents teixits	29
2.2 Prox1 en l'organogènesi	30
2.3 Prox1 (<i>prox1^{-/-}</i> / <i>prox1^{+/-}</i>) implicacions en el metabolisme	33
2.4 Malalties associades a alteracions de <i>prox1</i>	34
3. <i>PODOPLANINA</i>	41
3.1 L'expressió de <i>pdpn</i> en diferents teixits	41
3.2 La PDPN en el desenvolupament dels vasos limfàtics	42
3.3 Malalties associades a alteracions de <i>pdpn</i>	42
4. LA LIMFOGÈNESI	45
4.1 Regulació de la limfogènesi per mediació de l'àcid lisofosfatídic	45
4.2 Altres formes de regulació de la limfogènesi	47
5. L'ENTRAMAT LIMFÀTIC EN LA REGULACIÓ DEL METABOLISME	50
5.1 Valoració de la regulació limfàtica del metabolisme	50
5.2 L'entramat limfàtic en la regulació dels factors de risc metabòlic	54
5.2.1 La regulació de la pressió arterial	54
5.2.2 La regulació del colesterol	55
5.2.3 La regulació de la inflamació	56
6. L'ENTRAMAT LIMFÀTIC EN LA REGULACIÓ DEL TEIXIT ADIPÓS	59
6.1 L'absorció dels lípids	59
6.1.1 La síntesi de lipoproteïnes	59
6.1.2 Models de síntesi de lipoproteïnes	61
6.1.3 La captació dels lípids pels vasos limfàtics	64
6.1.3.1 L'absorció de lípids per part dels vasos limfàtics intestinals (lacteals)	65
6.1.3.2 L'absorció de lípids per part dels vasos limfàtics en l'àmbit perifèric	67
6.2 Relació de l'entramat de vasos limfàtics amb el teixit adipós	68

HIPÒTESI i OBJECTIUS	79
MATERIALS i MÈTODES	83
RESULTATS	101
Estudi 1 - Limfogènesi i alteració metabòlica (estudi microarrays)	103
1. Microarrays de teixit adipós	103
2. Gens vinculats a la regulació de la limfogènesi	103
3. Gens vinculats a la regulació de la limfogènesi presents en l'alteració metabòlica (resistència a la insulina, obesitat i diabetis)	104
Estudi 2 – Valoració de l'expressió de <i>prox1</i> i de <i>pdpn</i> en funció del tipus de teixit adipós	109
Estudi 3 – Valoració de l'expressió de <i>prox1</i> i <i>pdpn</i> en presència d'alteració metabòlica	112
1. Expressió de <i>prox1</i> i <i>pdpn</i> en funció de la presència d'alteració metabòlica	112
2. Vincles de les variables d'estudi amb l'expressió de <i>prox1</i> i <i>pdpn</i> en alteració metabòlica	113
3. Expressió de <i>prox1</i> i <i>pdpn</i> en funció de diferents graus d'obesitat	122
4. Expressió de <i>prox1</i> i <i>pdpn</i> en funció dels nivells de certs marcadors metabòlics	125
Estudi 4 – Estudi d'expressions gèniques associades al LPA en relació a l'expressió gènica de <i>prox1</i> i <i>pdpn</i>	129
Expressions gèniques en funció de l'expressió <i>prox1</i> (alta/baixa)	130
Estudi 5 - Estudi d'expressions gèniques associades a l'expressió dels gens <i>prox1</i> i <i>pdpn</i>	132
1. Cohorts d'estudi	132
2. Comparació entre els gens que correlacionen amb <i>prox1</i> i <i>pdpn</i> amb els gens vinculats a la regulació de la limfogènesi	132
3. Nous gens vinculats a la regulació de la limfogènesi	133
RESUM RESULTATS	135
DISCUSSIÓ	137
CONCLUSIONS	165
BIBLIOGRAFIA	169
ANNEXOS	191

ABREVIATURES*

Abca1 ATP-binding cassette, sub-family A member 1	Agpat5 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 5 (lysophosphatidic acid acyltransferase, epsilon)	ARN Àcid ribonucleic	c1galt1 core 1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase, 1	Ccl21 chemokine (C-C motif) ligand 21	Cdk5 Cyclin-Dependent Kinase 5	Cmtm7 CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 7
Abcg1 ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1, transcript variant 1	Agpat9 1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase 9	Atg3 autophagy related 3	Calcr1 Calcitonin gene related peptide type 1 receptor	Ccl5 chemokine (C-C motif) ligand 5	Cdkn1b cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	Col18a1 collagen, type XVIII, alpha 1
Acaca acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha (ACACA), transcript variant 2	Akt v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	Atg7 autophagy related 7	cdNA complementary DNA	Ccl7 chemokine (C-C motif) ligand 7	Cdkn1c cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	Col1a collagen, type I, alpha
Acsf1 acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	Alk5 Activin Receptor-Like Kinase 5 (TGFBRI)	Atgl Adipose triglyceride lipase	cAMP cyclic adenosine monophosphate	Ccl8 chemokine (C-C motif) ligand 8	Cebpa CCAAT/enhancer binding protein-alpha	Coup-TFII COUP transcription factor 2 (NR2F2)
Acss2 acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	Ampk AMP kinase (PRKAA2)	Azgp Alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding	Cav1 caveolin 1	Ccne1 cyclin E1	Celsr1 cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1	Cox2 Cyclooxygenase-2 (PTGS2)
Actn1 alpha-actinin	Angpt Angiotensin	Bcl2 B-cell lymphoma 2	Ccbe1 Collagen and calcium binding EGF-domains containing protein 1	Ccr7 CC chemokine receptor type 7	CETP cholesterylester transfer protein	Cpt1a carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)
Adm adrenomedullin	Anp Atrial natriuretic peptid	BEC blood endothelial cell	Ccl1 chemokine (C-C motif) ligand 1	Cd11b cluster of differentiation molecule 11B (ITGAM)	Cldn5 claudin 5	Csk c-src tyrosine kinase
ADN Àcid desoxiribonucleic	Apln Apelin	Bmal1 Brain and Muscle ARNT-Like 1	CCL19 CC motif chemokine 19	Cd36 cluster of differentiation 36 (FAT)	Clec1b C-type lectin domain family 1 member B (Clec2)	Ct threshold cycle
Agpat3 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	Apm (Apm1) Adipose Most Abundant Gene Transcript 1 (Adipoq)	Bmp Bone morphogenetic protein	Ccl2 chemokine (C-C motif) ligand 2	CdH1 cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	Clec2 C-type lectin domain family 2 (Clec1b)	Ctnnb1 catenin beta 1
Agpat4 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4 (lysophosphatidic acid acyltransferase, delta)	Aqp7 aquaporin 7	BNP Brain natriuretic peptide	Ccl20 chemokine (C-C motif) ligand 20	Cdh5 cadherin 5, type 2 (vascular endothelium)	Cm Centimetre	Cxadr Coxsackievirus and adenovirus receptor

* Malgrat que la tesi ha sigut editada en català, el desplegament de les abreviatures que s'ha fet correspon al de la llengua en el qual estan normativitzades (si la sigla està reconeguda en català l'he utilitzada en català, però si encara no està normativitzada en català he fet servir la versió anglesa).

Cxcl1	Cxcr4	Dpp-IV	Ephb4	Fabp4	GAG	Glp1R
<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)</i>	<i>CXC chemokine receptor type 4</i>	<i>Dipeptidyl peptidase IV</i>	<i>ephrin receptor b4</i>	<i>Fatty acid binding protein 4</i>	<i>glicosaminoglican</i>	<i>glucagon-like peptide 1 receptor</i>
Cxcl10	Cxcr5	E2f7	Ephs	FABP	Gata2	GPT
<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i>	<i>CXC chemokine receptor type 5</i>	<i>E2F transcription factor 7</i>	<i>Ephrines</i>	<i>fatty acids binding protein</i>	<i>Endothelial transcription factor GATA2</i>	<i>glutamic-pyruvate transaminase (alanine aminotransferase)</i>
Cxcl11	Dab1	E2f8	Epo	Fgf-2 (bFGF),	GGT	Grp78
<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 11</i>	<i>Dab, reelin signal transducer, homolog 1 (Drosophila)</i>	<i>E2F transcription factor 8</i>	<i>erythropoietin</i>	<i>fibroblast growth factor 2</i>	<i>gamma-glutamyltransferase</i>	<i>G protein-coupled receptor 78</i>
Cxcl12	Dagt	Efnb2	eQTL	Fiaf	Gipc1	Grp94
<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 12</i>	<i>Diacylglycerol acyltransferasa</i>	<i>EphrinB2</i>	<i>expression quantitative trait loci</i>	<i>Fasting-induced adipose factor</i>	<i>GIPC PDZ domain containing family, member 1</i>	<i>G Protein-Coupled Receptor 94</i>
CXCL13	DC	Egf	Er71	Flt1	Gja1	GWAS
<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 13</i>	<i>Dendritic cell</i>	<i>epidermal growth factor</i>	<i>Ets-Related Protein 71</i>	<i>fms-related tyrosine kinase 1</i>	<i>gap junction protein, alpha 1, 43kDa</i>	<i>genome-wide association studies</i>
Cxcl3	Dcc	Egfr	Erk	Flt4	Gja4	HbA1c
<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 3</i>	<i>Deleted In Colorectal Carcinoma</i>	<i>Epidermal Growth factor receptor</i>	<i>Extracellular-signal-regulated kinases</i>	<i>fms-related tyrosine kinase 4</i>	<i>gap junction protein, alpha 4, 37kDa</i>	<i>Hemoglobina glicosilada</i>
Cxcl5	Ddit3	Elavl1	ERK	Fn1	Gjb2	HDL
<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 5</i>	<i>DNA damage inducible transcript 3</i>	<i>ELAV like RNA binding protein 1</i>	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>	<i>fibronectin 1</i>	<i>gap junction protein, beta 2, 26kDa</i>	<i>high-density lipoprotein</i>
Cxcl6	Dgat1	Emilin1	ERRa	Foxc2	Gjc2	HFC
<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 6</i>	<i>diacylglycerol O-acyltransferase 1</i>	<i>elastin microfibril interfacier 1</i>	<i>Estrogen-related receptor alpha (ESRRA)</i>	<i>Forkhead box protein C2</i>	<i>gap junction protein, gamma 2, 47kDa</i>	<i>hiperlipemia familiar combinada</i>
Cxcl9	DIL	Ephb1	ETS	FRET	Gk	Hgf
<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 9</i>	<i>drenatge intersticial limfàtic</i>	<i>ephrin receptor b1</i>	<i>E-twenty six</i>	<i>Föster resonance energy transfer</i>	<i>glycerol kinase</i>	<i>hepatocyte growth factor</i>
Cxcr1	DM	Ephb2	Etv2	GAD	Glp1	Hif
<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 1</i>	<i>diabetis mellitus</i>	<i>ephrin receptor b2</i>	<i>Ets variant 2 (Er71)</i>	<i>glutamic acid decarboxylase</i>	<i>glucagon-like peptide 1</i>	<i>hypoxia-inducible factor 1</i>

HIV-1 <i>human immunodeficiency virus 1</i>	I-Fabp <i>intestinal-fatty acid binding protein</i>	IL1b <i>interleukin 1, beta</i>	Itgb1 <i>integrin, beta 1</i>	Lcp2 <i>lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa)</i>	LPA <i>Lysophosphatidic acid</i>	Lt <i>lymphotoxin</i>
HOMA-β <i>homeostatic model assessment beta cell function</i>	Ifnar1 <i>interferon (alpha, beta and omega) receptor 1</i>	IL3 <i>Interleukin-3</i>	Jnk <i>c-jun N-terminal kinase</i>	LDL <i>low density lipoprotein</i>	LPC <i>lysophosphatidylcholine</i>	Lta <i>lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)</i>
HOMA-IR <i>homeostatic model assessment insulin resistance</i>	Ifnar2 <i>interferon (alpha, beta and omega) receptor 2</i>	IL7 <i>Interleukin-7</i>	Kdr <i>kinase insert domain receptor</i>	LDLc <i>LDL calculat</i>	Lpcat1 <i>lysophosphatidylcholine acyltransferase 1</i>	Ltb <i>lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)</i>
Hras <i>v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>	Ifng <i>interferon, gamma</i>	IL7R <i>Interleukin-7 receptor subunit alpha</i>	Kif11 <i>kinesin family member 11</i>	LDLox <i>LDL oxidases</i>	Lpcat2 <i>lysophosphatidylcholine acyltransferase 2</i>	Ltbr <i>lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)</i>
HTA <i>hipertensió arterial</i>	Ifngr1 <i>interferon gamma receptor 1</i>	IL7R <i>Interleukin-7 receptor subunit alpha</i>	Klf2 <i>Kruppel like factor 2</i>	LEC <i>lymphatic endothelial cell</i>	Lpcat3 <i>lysophosphatidylcholine acyltransferase 3</i>	LTi <i>Lymphoid tissue inducer</i>
HuR <i>Human antigen R</i>	Ifngr2 <i>interferon gamma receptor 2</i>	IL8 <i>interleukin 8 (CXCL8)</i>	Kras <i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>	Lef <i>Lymphoid enhancer-binding factor</i>	Lpcat4 <i>lysophosphatidylcholine acyltransferase 4</i>	LTβR <i>lymphotoxin beta receptor</i>
HUVEC <i>Human umbilical vein endothelial cells</i>	IFNa <i>interferon alpha 1</i>	IMC <i>índex de massa corporal</i>	LADA <i>Latent autoimmune diabetes in adults</i>	L-FABP <i>Liver-fatty acid binding protein</i>	LPE <i>Lysophosphatidylethanolamine</i>	Lyve1 <i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1</i>
Hyou1 <i>hypoxia up-regulated 1</i>	Igf1 <i>insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)</i>	IR <i>Insulina resistència</i>	Lama5 <i>laminin, alpha 5</i>	LHR-1 <i>liver receptor homolog 1</i>	Lpin1 <i>lipin 1</i>	Mac-2 <i>macrophage galactose-specific lectin-2</i>
Icam1 <i>intercellular adhesion molecule 1</i>	Ikbkg <i>inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma</i>	Itga6 <i>integrin, alpha 6</i>	Lcat <i>lecitin-cholesterol acil transferasa</i>	Lipe <i>lipase, hormone-sensitive</i>	LPS <i>Lysophosphatidylserine</i>	Madcam1 <i>Mucosal addressin cell adhesion molecule 1</i>
Id2 <i>inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein</i>	IL17 <i>Interleukin 17</i>	Itga9 <i>integrin, alpha 9</i>	Lcn2 <i>lipocalin 2 (oncogene 24p3)</i>	LOH <i>loss of heterozygosity</i>	Lrp8 <i>low density lipoprotein receptor-related protein 8</i>	Magt <i>MG acyl transferasa</i>

Mapt <i>microtubule-associated protein tau</i>	NEFA <i>Non-esterified fatty acid</i>	Nrp2 <i>Neuropilin2</i>	Pai1 <i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>	Pik3r1 <i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (p85 alpha)</i>	Ppap2B <i>phosphatidic acid phosphatase type 2B</i>	Pten <i>phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)</i>
Mcp1 <i>monocyte chemotactic protein 1</i>	Nfatc1 <i>nuclear factor of activated T-cell c1</i>	NTN <i>netrin</i>	PAS <i>pressió arterial sistòlica</i>	Pitx2 <i>paired-like homeodomain transcription factor 2</i>	Ppap2C <i>phosphatidic acid phosphatase type 2C</i>	Ptger2 <i>prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa</i>
Mcp1r <i>monocyte chemotactic protein 1 receptor</i>	NF-kB <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>	Ntn1a <i>Netrin1a</i>	PC <i>fosfatidilcolina</i>	Pka <i>Protein kinase A</i>	Ppara <i>peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>	Ptgs2 <i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)</i>
Mek <i>Mitogen/Extracellular signal-regulated Kinase</i>	Nfkb1 <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>	Ntn4 <i>Netrin4</i>	Pck1 <i>phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)</i>	Pkb <i>protein kinase B</i>	Ppard <i>peroxisome proliferator-activated receptor delta</i>	Ptpn11 <i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 (Noonan syndrome 1)</i>
MG <i>mono acilglicerol</i>	Nfkb2 <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)</i>	Ob <i>obès</i>	PCR <i>proteïna C reactiva</i>	Pkca <i>protein kinase C, alpha</i>	PPARG <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>	Ptpn14 <i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14</i>
Milt4 <i>myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 4</i>	Notch1 <i>Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)</i>	Omn <i>omentin</i>	Pde3b <i>phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited</i>	Plcg2 <i>phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific)</i>	Ppfibp1 (Iiprin beta 1) <i>PTPRF interacting protein, binding protein 1</i>	Ptprb <i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, B</i>
Mmp2 <i>Matrix metalloproteinase 2</i>	Nr2f2 <i>nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2</i>	PA <i>phosphatidic acid</i>	Pdprn <i>podoplanin</i>	Pld6 <i>phospholipase D family member 6</i>	Ppp1r13b <i>protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 13B</i>	Ptprc <i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, C</i>
Mmp9 <i>Matrix metalloproteinase 9</i>	Nrap <i>nebulin-related anchoring protein</i>	PAD <i>pressió arterial diastòlica</i>	Pecam1 <i>platelet/endothelial cell adhesion molecule</i>	Plin <i>perilipin</i>	Prkaa1 <i>protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit</i>	PTPRD <i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, D</i>
MPS <i>monocyte phagocytic system</i>	Nrp <i>neurolipin</i>	Paf <i>Platelet-activating factor</i>	Pi3K <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>	Plxna1 <i>plexin A1</i>	Prkca <i>protein kinase C, alpha</i>	PYY <i>peptide YY</i>
MTP <i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>	Nrp1 <i>Neuropilin1</i>	PAFAH <i>HDL-associated PAF acetylhydrolase</i>	Pik3ca <i>phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>	Ppap2A <i>phosphatidic acid phosphatase type 2A</i>	Prox1 <i>prospero-related homeobox 1</i>	Rac1 <i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)</i>

Raf1	Relb	SIDA	stnfr2	Tie1	Tlr8	Trance-R	Wnt
<i>Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>	<i>v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B</i>	síndrome d'immunodeficiència adquirida	<i>soluble tumor necrosis factor receptor 2</i>	<i>tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1</i>	<i>toll-like receptor 8</i>	<i>TNF-related activation-induced cytokine receptor</i>	<i>wingless-type MMTV integration site family, member 1</i>
Ramp2	Reln	Slk	Syk	Timp3	Tlr9	T-syn (C1galt1)	Wnt5b
<i>Receptor activity modifying protein 2</i>	<i>Reelin</i>	<i>STE20-like kinase (yeast)</i>	<i>Tyrosine protein kinase SYK</i>	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase 3</i>	<i>toll-like receptor 9</i>	<i>T synthase</i>	<i>wingless-type MMTV integration site family, member 5B</i>
Rank	Rgs1	Smad4	Tbx1	Tlr1	Tnfrsf11a	Unc5B	xbp1
<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B</i>	<i>regulator of G-protein signalling 1</i>	<i>SMAD family member 4</i>	<i>Tbox transcription factor TBX1</i>	<i>toll-like receptor 1</i>	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFKB activator</i>	<i>unc-5 netrin receptor B</i>	<i>X-box binding protein 1</i>
Rankl	Rorc	SNP	Tcf	Tlr10	Tnfrsf1a	Vcam1	Zyx
<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>	<i>RAR-related orphan receptor C</i>	single-nucleotide polymorphism	<i>transcription factor 1, hepatic; LF-B1, hepatic nuclear factor (HNF1), albumin proximal factor</i>	<i>toll-like receptor 10</i>	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A</i>	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>	<i>Zyxin</i>
Rara	Rorg	Sos1	Tek (Tie2)	Tlr2	Tnfrsf1b	Vegfa	
<i>retinoic acid receptor, alpha</i>	<i>retinoid orphan receptor</i>	<i>son of sevenless homolog 1 (Drosophila)</i>	<i>TEK tyrosine kinase, endothelial (venous malformations, multiple cutaneous and mucosal)</i>	<i>toll-like receptor 2</i>	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B</i>	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>	
Rasa1	RT-PCR	Sox18	TG	Tlr3	Tnfsf10	Vegfc	
<i>RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1</i>	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>	<i>SRY-related HMG-box 18</i>	triglicèrids	<i>toll-like receptor 3</i>	<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10</i>	<i>Vascular endothelial growth factor C</i>	
RCT	S1P	Spred1	Tgfb1	Tlr4	Tnfsf11	Vegfr3	
reverse cholesterol transport	<i>sphingosine-1-phosphate</i>	<i>Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1</i>	<i>transforming growth factor, beta 1</i>	<i>toll-like receptor 4</i>	<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11</i>	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 3</i>	
RE	sc	Spred2	Tgfb1	Tlr5	Tnfa	Vezf1	
reticle endoplasmàtic	subcutani	<i>Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 2</i>	<i>transforming growth factor, beta receptor 1</i>	<i>toll-like receptor 5</i>	<i>tumor necrosis factor alpha</i>	<i>Vascular Endothelial Zinc Finger 1</i>	
Rel	Sema3a	SR	Tgfb2	Tlr6	TonEBP	vis	
<i>v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)</i>	<i>sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A</i>	scavenger receptor	<i>transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)</i>	<i>toll-like receptor 6</i>	<i>tonicity-responsive enhancer binding protein</i>	visceral	

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EVIDÈNCIES EN TEIXIT ADIPÓS D'ALTERACIONS GÈNIQUES DELS VASOS LIMFÀTICS EN L'OBESITAT

Alfons Horra Pueyo

PRESENTACIÓ I JUSTIFICACIÓ

Aquest treball s'ha desenvolupat en el grup de recerca de la diabetis i les malalties metabòliques associades – *Diabetes and metabolic associated diseases research group* - en el marc del Servei d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona.

La tesi s'estructura en diferents apartats. En la introducció es fa una consideració de la malaltia metabòlica des de la perspectiva d'una alteració hidrodinàmica en la captació del líquid intersticial per part dels vasos limfàtics. Es valora de manera específica, mitjançant l'expressió dels gens relacionats amb la limfogènesi, *prox1* i *pdpn*, el vincle que tenen els vasos limfàtics en el funcionament i alteració del teixit adipós. *Prox1* i *pdpn* són dos gens que es precisen per a l'estructuració dels vasos limfàtics. La seva deleció comporta la pèrdua del fenotip de vas limfàtic. Es fa una revisió de l'àmbit d'estudi dels vasos limfàtics que va des de la l'embriologia dels vasos limfàtics i el seu funcionament fins a les disfuncions trobades en les diferents situacions metabòliques (obesitat, resistència a la insulina i diabetis).

Un cop posada en evidència la importància del drenatge limfàtic en els processos metabòlics mencionats, plantegem una hipòtesi estructurada i un objectiu general que inclou una anàlisi descriptiva en diverses cohorts del paper dels dos principals gens involucrats en la limfogènesi; *Prox1* i *pdpn*.

En l'apartat de *Materials i mètodes* es descriuen les cohorts estudiades, els mètodes empleats en l'anàlisi de les variables tant clíniques com analítiques i es descriu la metodologia d'anàlisi utilitzada

Els *Resultats* es valoren en funció dels objectius establerts agafant de referència el comportament de *prox1* i *pdpn* en teixit adipós en cada situació d'estudi.

En la *Discussió* es fa una valoració dels resultats obtinguts agrupant-los a l'estat actual de la qüestió.

I en la *Conclusió* es presenten totes les evidències trobades.

En els *Annexos* s'inclou informació complementària sobre l'anàlisi de *microarrays* i dels estudis RT-PCR.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EVIDÈNCIES EN TEIXIT ADIPÓS D'ALTERACIONS GÈNIQUES DELS VASOS LIMFÀTICS EN L'OBESITAT

Alfons Horra Pueyo

RESUM

L'obesitat es caracteritza per tenir associada una inflamació sistèmica crònica de baix grau que es manifesta tant de manera sistèmica com local. El teixit adipós en l'obesitat és testimoni d'aquesta situació i ho manifesta de manera més o menys explícita pel cúmul de lípids. Entre els factors que poden condicionar aquest context inflamatori hi ha la capacitat drenant de l'interstici per part dels vasos limfàtics.

En aquest treball hem analitzat diverses cohorts de pacients afectes d'obesitat, resistència a la insulina i diabetis. En una primera anàlisi, vàrem partir de les dades obtingudes en un estudi preliminar d'expressió gènica mitjançant tecnologia de *microarray*. Es va fer una classificació dels gens en funció de dades obtingudes de la literatura (vinculació de marcadors gènics a limfogènesi), comparant els diversos grups inclosos a l'estudi genètic (primers, obesos mòrbids amb i sense resistència a la insulina i pacients amb diabetis tipus 2). Es descriu una afectació desigual tant quantitativament com qualitativa sent major la seva incidència en la condició de l'obesitat.

En una nova cohort, l'anàlisi de l'expressió gènica en el teixit adipós per RT-PCR mostra que les expressions de *prox1* i *pdpn*, dos gens vinculats de manera directa a l'estructuració dels vasos limfàtics, presenten diverses associacions amb l'alteració metabòlica, i més concretament amb l'obesitat. L'avaluació conjunta dels dos gens permet establir de manera indirecta quin grau d'estructuració limfàtica podria tenir el teixit adipós en cadascuna de les condicions metabòliques que es consideren i amb quines variables estan relacionades.

Els resultats indiquen que l'expressió gènica de *prox1* i *pdpn* té un comportament homogeni quan comparem les diferents situacions metabòliques. Tenint en compte el tipus de teixit adipós, subcutani i visceral, els resultats mostren que l'expressió d'aquests gens és sempre més elevada en teixit adipós visceral en relació al subcutani. La variació de l'expressió d'aquests gens va associada a la variació d'una sèrie de variables de tipus antropomètriques, bioquímiques i gèniques en l'obesitat. El que fa considerar la hipòtesi d'un vincle entre l'alteració limfàtica i aquestes variables en l'obesitat com possible. Cal destacar també que el colesterol, la glucosa i els triglicèrids, no es vinculen amb l'expressió d'aquests gens però que sí que ho fa el colesterol HDL, coincidint amb el descrit en models animals. Quan analitzem quines variables modifiquen l'expressió de *prox1* i *pdpn*, l'expressió de mRNA de *atg7* i *d'atg3* respectivament, es mostren com els principals determinants. L'expressió de *prox1* i *pdpn* disminueix a mesura que augmenta el grau d'obesitat i augmenten els marcadors propis de l'alteració metabòlica (adipositat, inflamació, alteració del metabolisme del glucosa, la pressió arterial)

Es manifesta la correlació entre l'expressió de certs gens vinculats al LPA amb l'expressió de *prox1* i *pdpn*, majoritàriament amb *prox1*. La relació és desigual entre tipus de teixit adipós però tanmateix es mantenen moltes similituds.

Com a conclusió general podem dir que dos dels marcadors gènics implicats en la limfogènesi mostren canvis en el context de diverses alteracions metabòliques. Aquest fet, encara que de manera indirecta, dóna peu a considerar la hipòtesi dels canvis hidrodinàmics com un paràmetre clínic a tenir en compte en l'alteració metabòlica, especialment en l'obesitat.

INTRODUCCIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EVIDÈNCIES EN TEIXIT ADIPÓS D'ALTERACIONS GÈNIQUES DELS VASOS LIMFÀTICS EN L'OBESITAT

Alfons Horra Pueyo

1. DESENVOLUPAMENT DELS VASOS LIMFÀTICS

La descripció acadèmica més recent de l'embriologia humana (1) estableix l'inici de l'entramat limfàtic a partir de la cinquena setmana de gestació, des de l'endoteli venós, per una mena d'evaginacions en forma de sac.

Els primers sacs limfàtics que es formen són els jugulars, a la junció entre les venes cardinals anteriors i les venes jugulars, tal com clàssicament s'havia descrit. A partir del conjunt d'aquests sacs limfàtics i per un procés de proliferació centrífuga, es forma una xarxa de vasos que en la seva maduració constituirà l'entramat de vasos limfàtics. Hi ha sis sacs limfàtics primaris: dos sacs jugulars, en la unió de les venes subclàvies i cardinal anterior; dos sacs ilíacs en el punt d'unió de les venes ilíiques i cardinal posterior; un de retroperitoneal, proper al sostre del mesenteri, i un altre, anomenat cisterna de quilo, a la part dorsal del sac retroperitoneal.

1.1 Origen dels vasos limfàtics

Establir quin és l'origen dels vasos limfàtics ha confrontat dos models embriològics distints. Inicialment es va proposar un origen mesenquimàtic. Aquesta teoria plantejava que l'estructuració dels vasos limfàtics era fruit de l'assemblatge de cèl·lules d'origen mesenquimàtic (Budge, Sala, Gulland...). Més endavant, però, amb Langer inicialment i després amb Ranvier, Mac Callum, Sabin... es va començar a considerar que l'origen podia ser endotelial vascular i, més concretament, venós (2). En aquest cas es considerava que les cèl·lules no provenien del mesènquima sinó de l'endoteli venós. Florence Sabin, gran defensora d'aquest model, va ser considerada al llarg dels anys com el referent descriptiu dels vasos limfàtics i de la seva embriologia, i la seva descripció va ser considerada la més vàlida (3). La constatació que el desenvolupament dels vasos limfàtics no està afectat en embrions on s'ha limitat l'expressió d'un gen, *runx1*, molt implicat en la proliferació de cèl·lules mare hematopoètiques de tipus adult així ho fa pensar (4). L'evidència que l'alteració de certs gens vinculats al desenvolupament endotelial vascular, en general, *tie-2*, i venós en particular *coup-tfII*, afecta el desenvolupament limfàtic, així com el mateix seguiment de l'expressió dels marcadors dels vasos limfàtics, fa pensar en el seu origen venós (3-5).

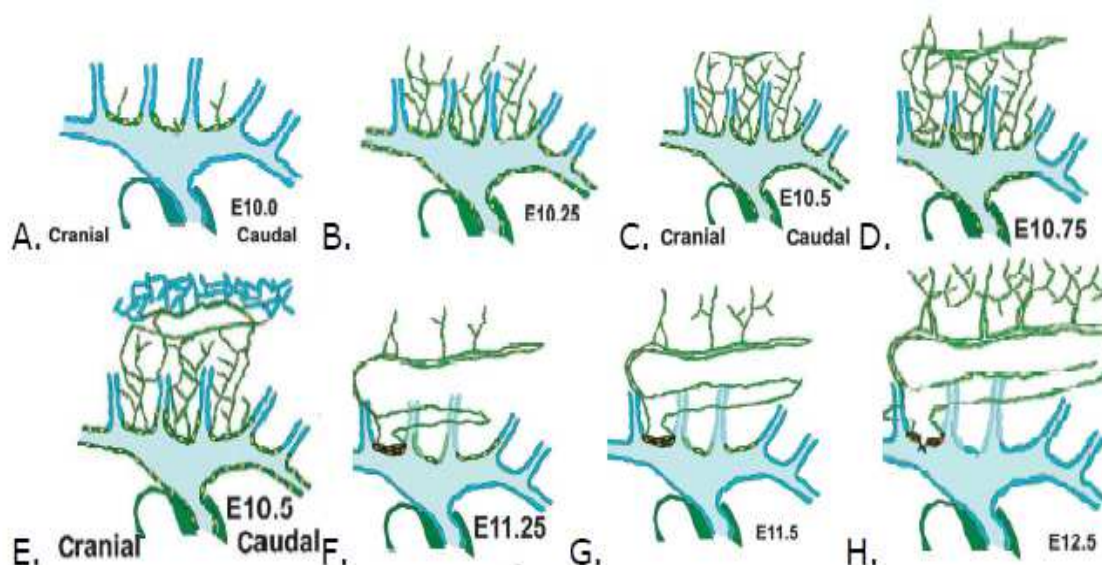
Hi ha certs aspectes a destacar que evidencien que malgrat que no sigui discutible l'origen venós de les cèl·lules endotelials limfàtiques (LEC) hi ha una certa interacció mesenquimàtica. Les LEC, que expressen *prox1*, no es troben únicament en la vena cardinal sinó que també les trobem en l'àmbit dels vasos intersomites; vasos presents en el mesènquima. Aquestes LEC coincideixen amb les provinents de la vena cardinal per formar l'entramat limfàtic. Es desconeix l'origen dels vasos intersomites. Aquests poden

DESENVOLUPAMENT DELS VASOS LIMFÀTICS

provenir de la mateixa vena cardinal o dels angioblasts del mesènquima (5).

El desenvolupament de les tècniques de microscòpia ha permès a Hägerling *et al* (6) determinar, si més no en ratolins, que les cèl·lules progenitores limfàtiques en l'àmbit intersegmentari, provenen, en part, de la mateixa vena cardinal i, en part, del plexe limfàtic superficial. El que es detecta inicialment és l'existència d'un flux de cèl·lules en forma de fus que es dirigeix a l'àmbit intersomàtic i entra en un procés d'agregació. Des d'aquest agregat es formaria el vas limfàtic perifèric superficial a partir del qual s'estructuraria l'entramat limfàtic superficial (figura 1 - D). De manera simultània, en la proximitat de la vena cardinal es produeix, també, una acumulació de LEC que deriva en la formació del que s'anomena conducte toràctic primordial que forma part de l'entramat limfàtic profund (figura 1- G -H).

Figura 1. Descripció del desenvolupament limfàtic. Adaptada de (6).



La presència de cèl·lules progenitores limfàtiques en l'àmbit del plexe venós superficial en situacions en què la capacitat migratòria de les LEC ha estat afectada per l'alteració en la secreció de VEGFC, confirmaria la idea que la capacitat de generar l'entramat limfàtic no seria únicament atribuïble a la vena cardinal sinó al conjunt de totes les venes (figura 2). A partir d'aquest fet, s'ha especulat sobre la possibilitat que el procés de limfogènesi embrionària fos generat de manera massiva i sincrònica en el conjunt de venes, considerant que les diferències observades es deuen a una major capacitat de resposta als estímuls inductors per part de les LEC progenitores en les seves diferents ubicacions (6).

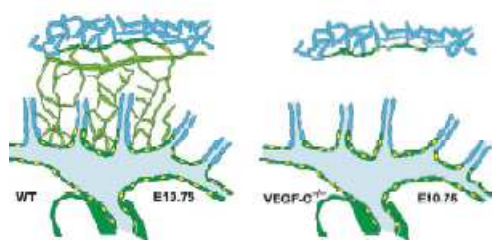


Figura 2. Embriogènesi limfàtica vinculada a l'absència de VEGFC. Adaptada de (6).

De manera general, es pot concloure que l'origen del sistema endotelial limfàtic en mamífers deriva de l'endoteli vascular i que, tal com es descriu (7), les cèl·lules hematopoètiques tenen poca cosa a veure, o res a veure, en la iniciació del procés constitutiu dels vasos limfàtics en condicions fisiològiques, de manera que són només les plaquetes les que semblen jugar un rol considerable en la separació del sistema endotelial venós del limfàtic. En aquest sentit, s'ha demostrat, en model animal (8), que el procés de separació dels vasos sanguinis dels limfàtics precisa de la presència i acció de les plaquetes. L'adhesió de les plaquetes a la paret vascular en la interfase de diferenciació entre els dos tipus de conductes fa pensar que les plaquetes exerceixen com de barrera física que impedeix connexions entre ambdues estructures (8). Aquest model de separació es constata, també, en el fet que les plaquetes són activades pel seu contacte amb la molècula PDPN (marcador endotelial limfàtic), així com també en el fet que en models animals deficientes en *pdpn* la separació limfovenosa és defectuosa (8).

No obstant això, no es pot considerar que la polèmica hagi quedat resolta. Recents publicacions mostren que, possiblement, ens trobem davant d'una realitat dual de desenvolupament. Martínez-Corral *et al* (9) han mostrat que els vasos limfàtics de la pell tenen un desenvolupament dual i no únicament venós. Kloltz *et al* (10) també van definir l'origen dual en el cas dels limfàtics del cor.

El cert és que aquesta realitat dual ja es dona en altres espècies. El plexe limfàtic de les aus i el dels amfibis tenen un origen dual, per una part, des de la vena cardinal anterior i, per una altra, per limfoblasts del mesènquima (7). Koltowska *et al* (11) fan esment que l'evolució de les espècies en l'àmbit limfàtic no deixa de presentar certes particularitats diferenciadores que poden respondre a les seves necessitats adaptatives al medi.

L'origen dual no és l'única divergència que podem trobar entre espècies evolutivament diferenciades. Els peixos, per exemple, no disposen de vasos limfàtics valvulats ni de nòduls. El flux limfàtic es genera, sembla ser, per l'acció de músculs esquelètics. Els amfibis, d'altra banda, tenen la particularitat de disposar en el trajecte dels vasos limfàtics de dilatacions que actuen com de «cors limfàtics», fet que ajuda a mobilitzar la limfa. En els rèptils es destaca la similitud amb els amfibis, però amb la presència de cors únicament a la part posterior. Els ocells, en canvi, tenen vasos limfàtics valvulats, però els manquen cors limfàtics. Els mamífers, al seu torn, ja

DESENVOLUPAMENT DELS VASOS LIMFÀTICS

disposen d'una complexitat limfàtica major perquè compten amb nòduls limfàtics. Així, presenten una jerarquitització dels vasos que es manifesta per diferències estructurals (la presència o no de vàlvules) i/o funcionals (captació i transport de la limfa o únicament de transport).

La variabilitat manifesta entre espècies en l'estructuració dels vasos limfàtics condueix a considerar que aquesta variabilitat és fruit de la mateixa necessitat adaptativa. El millor exemple de versatilitat adaptativa és la capacitat dual del desenvolupament limfàtic. No és d'estranyar, doncs, que en la recerca d'una millor capacitat adaptativa s'hagi definit una complexitat evolutiva que persisteixi entre espècies i es manifesti de manera distinta en funció de l'espècie i de la seva necessitat adaptativa. De fet, en les ciències de la complexitat aquest fenomen es podria valorar com un procés d'autoorganització. Des d'aquesta visió evolutiva, podríem considerar que la versatilitat en el desenvolupament afavoreix que es disposi d'un ventall de possibilitats d'estructuració, però que les circumstàncies en defineixen una de determinada i d'acord amb una forma de desenvolupament i no una altra. Bascombe i Luque (12), quan parlen dels processos d'autoorganització, expliquen que aquests processos permeten l'aparició d'estructures complexes i que la selecció natural actua sobre l'estructura ja formada.

1.2 Estructuració dels vasos limfàtics

La base de l'estructuració limfàtica recau, en el cas dels mamífers, com ja hem pogut veure, en la formació de l'entramat venós. Aquesta formació depèn de la formació dels seus precursors endotelials, els angioblasts, que provenen dels precursors mesodèrmics durant la gastrulació. Un factor de transcripció ETS (*E-twenty six*), l'Etv2 (Er71), lidera aquest procés de diferenciació de les cèl·lules endotelials. Les vies de senyalització de NOTCH, BMP i WNT en fan la modulació (13). Aquest procés de diferenciació mesodèrmica en cèl·lules precursors endotelials és el pas previ a qualsevol procés d'estructuració limfàtica.

L'estructuració limfàtica engloba diversos processos. La diferenciació de les cèl·lules endotelials venoses en limfàtiques és el primer pas en el reconeixement dels vasos limfàtics, però hi trobem, també, altres processos vinculats: la limfogènesi, que respon a la formació de nous vasos; la separació entre els vasos sanguinis i limfàtics; els processos de remodelació i maduració dels vasos limfàtics; l'estructuració de les vàlvules dels vasos limfàtics; l'assemblatge de la matriu extracel·lular i les seves interaccions amb l'entorn (14). El conjunt d'aquests processos és el que acaba determinant l'adequada estructuració i l'adequat funcionament de l'entramat limfàtic d'acord amb els requeriments funcionals que el sistema, l'organisme, requereixi.

En els mamífers, en l'àmbit embriològic, les LEC, són reconegudes com a tals, al seu inici, a partir de l'expressió de *prox1* (15). *Prox1* és el més significatiu i únic requisit per part d'aquestes cèl·lules endotelials per iniciar el procés diferenciador de les cèl·lules endotelials venoses a limfàtiques (4). Segons diferents estudis, s'ha pogut constatar que el fenotip limfàtic és làbil i reversible. El manteniment del fenotip precisa de l'expressió continuada de *prox1* (16).

Per a Oliver, el procés de formació dels vasos limfàtics en els mamífers consta de quatre etapes (17):

- Δ *Lymphatic competence*. En aquesta fase certes cèl·lules endotelials venoses adopten la capacitat de respondre a certs estímuls inductors de la caracterització limfàtica.
- Δ *Lymphatic bias (LEC precursors)*. En aquesta fase intermèdia les cèl·lules exposades als senyals inductors generen una distinció estructural respecte a les no exposades. L'expressió de *prox1* és el fet més representatiu d'aquesta etapa.
- Δ *Lymphatic specification*. Aquesta etapa està marcada pel fet que les cèl·lules diferenciades tenen una capacitat proliferativa independent, autònoma; la qual cosa comporta que les cèl·lules són capaces de proliferar de manera independent de l'entorn en el qual s'han definit.
- Δ *LEC differentiation*. Aquesta etapa és la que engloba la síntesi de tots els components propis a l'estructuració dels vasos limfàtics.

Les cèl·lules endotelials progenitores de l'endoteli limfàtic són descrites com una subpoblació de cèl·lules endotelials que es troben a les venes cardinals. L'evolució en l'expressió de *prox1* en tot el procés així ho confirma (4). Yang *et al* (5) descriuen que l'expressió de *prox1*, a més de donar peu a la diferenciació, en permet la migració amb la consideració que l'expressió de *prox1* és necessària per al desenvolupament limfàtic, però també ho és per al desenvolupament de les vàlvules limfovenoses. A la vena cardinal, hi persisteixen un cert nombre de cèl·lules endotelials que expressen *prox1* que no intervenen de manera directa en l'estructuració dels vasos limfàtics sinó que ho fan en la de les vàlvules limfovenoses.

Yang *et al* (5) identifiquen que l'expressió de *prox1* en les venes cardinals i en les venes intersomites defineix el desenvolupament d'una subpoblació de cèl·lules endotelials venoses amb la capacitat de convertir-se en cèl·lules progenitores limfàtiques. Aquestes cèl·lules només expressen *pdpn* en el moment de sortir de la vena cardinal. És el que marca la distinció fenotípica endotelial limfàtica, la qual cosa els va fer pensar en l'existència d'una inhibició fenotípica limfàtica, mentre les cèl·lules endotelials progenitores

DESENVOLUPAMENT DELS VASOS LIMFÀTICS

són als vasos sanguinis, i que la diferenciació total només es fa en el moment en el qual aquestes cèl·lules progenitores limfàtiques surten dels vasos.

És important considerar la manera com les cèl·lules progenitores de l'endoteli limfàtic surten de les venes. Inicialment es va pensar que sortien lligades entre elles per juncions d'adhesió, la integritat de les quals, així com la seva dinàmica, condicionarien el procés migratori. Per aquest motiu, es pensava que el procés d'alliberament del sac limfàtic a partir de la vena requeria que no hi hagués modificacions estructurals i funcionals de la vena després de la migració. Es parlava de la necessitat que les juncions cel·lulars es desplaçessin de tal manera que es mantingués la integritat de la vena (5). Un cert punt de discrepància apareix quan es considera que la sortida de les LEC progenitores no es fa de manera agrupada, en forma de sac, sinó de manera més individualitzada (6).

Es planteja, també, la qüestió per què algunes cèl·lules endotelials venoses comencen a expressar *prox1*. La resposta, pel que sembla, rau en SOX18. SOX18 és una proteïna que es lliga a l'ADN i que en modula l'activitat transcripcional. SOX18 es localitza de manera diferenciada en les cèl·lules endotelials dorsolaterals de la vena cardinal i activa directament l'expressió de *prox1* (18). Durant l'embriogènesi, com descriu François (18), *sox18* s'expressa de manera transitòria en totes les cèl·lules endotelials. A partir d'un cert moment, en el desenvolupament, com en les cèl·lules d'adults, es detecta l'expressió de *prox1*, però no la de *sox18*, la qual cosa ve a indicar que l'expressió de *sox18* té una relació inversa a la de *prox1* (figura 3).

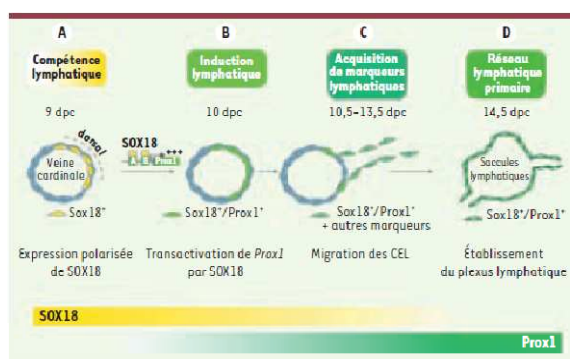


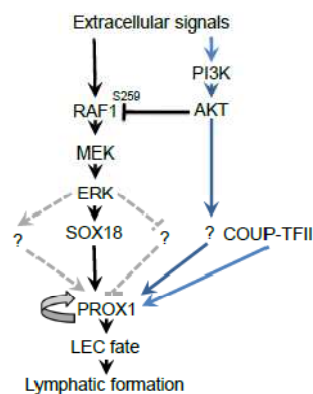
Figura 3. Relació en l'expressió de *sox18* i *prox1* en l'embriologia de ratolins. Obtinguda de (18).

La regulació de SOX18 està associada a la regulació de la via de les ERK (19, 20). Els factors que indueixen aquesta regulació no estan encara ben definits. Un senyal local, que podria ser la presència de VEGFC, activaria la via de senyalització de la PI3K/AKT i RAF/MEK/ERK, i esdevindria el major inductor d'aquest procés.

L'alteració de la via RAF1/ERK, mitjançant la introducció d'un gen mutat RAF1^{S259A} que n'impedeix la fosforilació en el lloc Ser259, comporta l'activació constitutiva d'ERK, fet que comporta l'expressió de *prox1* en tota la vena. En condicions normals AKT inhibeix l'activació d'ERK per la

fosforilació de RAF1 en Ser259. Això ha fet considerar que l'activació de la via de la PI3K i de l'AKT, també anomenada PKB, és un dels possibles mecanismes involucrats en la polarització del senyal de Prox1 a la cara dorsolateral de les venes cardinals (figura 4).

Figura 4. Model de senyalització de la via RAF1/MEK/ERK que indueix l'especificació de les LEC i el desenvolupament dels vasos limfàtics mitjançant el control de l'expressió de SOX18 proposat per Deng *et al* en (19).



En un estudi previ fet amb ratolins ja es va evidenciar que $AKT1^{-/-}$ generava una dilatació excessiva dels vasos col·lectors així com un reclutament menor de cèl·lules musculars llises al voltant dels vasos limfàtics (21).

Els resultats indiquen que la regulació de les ERK per part d'AKT no seria un mecanisme únic, que hi hauria altres molècules o mecanismes capaços d'induir el procés. Cal tenir present, també, que AKT no és l'única cinasa capaç de fosforilar Ser259, també ho poden fer PKA i $PKC\alpha$. L'activació excessiva d'aquestes vies RAF/MEK/ERK o la seva manca de regulació negativa per part de PI3K/AKT, deriva en el desenvolupament excessiu dels vasos limfàtics i en el seu disfuncionament (*Rasopathies*).

La disminució de l'activitat d'ERK mitjançant la inhibició que genera AKT s'ha descrit (22) com el possible mecanisme de regulació que permet definir a partir de quin moment s'ha d'estimular la limfogènesi, la diferenciació a LEC de les BEC i el manteniment del fenotip limfàtic.

Més enllà del tipus d'activació directa que es dona pel lligand de VEGFC al seu receptor VEGFR3 existeixen altres formes d'interacció dins el procés de desenvolupament. En un congrés del 2013 es fa menció que els receptors per BMP i per $TGF\beta$ activen o modulen el procés proliferatiu limfàtic. Simons i Eichmann (22) comenten, a tall d'exemple, en referència al mateix congrés, que la deleció dels receptors $TGF\beta$ ($TGF\beta R2$ i $Alk5$) modifica la dinàmica proliferativa de les LEC en interferir en el funcionament del VEGFR3 o de l'altre receptor del VEGFC, la neuropilin-2. També es fa menció de la importància que té una proteïna, *Human antigen R* (HuR), que permet l'estabilització de l'ARN missatger que codifica el VEGFC i el VEGFA, i que permet un correcte desenvolupament limfàtic.

El VEGFC és determinant en l'inici del desenvolupament dels vasos limfàtics (23, 24). El VEGFC, com bé comenten Simons i Eichmann (22), es fixa en un dels seus receptors, VEGFR3, i en provoca la dimerització, fet que

DESENVOLUPAMENT DELS VASOS LIMFÀTICS

comporta que el receptor autofosforili els seus residus de tirosina en el seu domini citoplasmàtic. D'aquesta manera, s'activarien les dues vies, la PI3K / AKT i la de l'ERK, ja comentades prèviament. Es possibiliten, així, diferents opcions de desenvolupament en les diferents etapes mitjançant la regulació de les dues vies, la qual cosa facilita la resposta cel·lular en funció de l'etapa del desenvolupament en què ens trobem.

L'origen ontogènic comú de les venes i els limfàtics obliga a disposar d'un mecanisme molecular de diferenciació cel·lular. Dixon (25) comenta, en una revisió temàtica que fa, que és l'expressió de la *fiaf* el que inicia aquest mecanisme diferenciador. La FIAF s'ha associat a l'homeòstasi de la glucosa, al metabolisme dels lípids, a la sensibilitat a la insulina, així com a l'apoptosi i a la inhibició dels processos de metàstasi. Ratolins genoanul·lats de *fiaf* (*fiaf*^{-/-}) mostren limfàtics intestinals amb contingut sanguini i una disminució de tres vegades en l'expressió de *prox1*.

Cal fer esment que una gran part del desenvolupament dels vasos sanguinis i limfàtics ve regulada per la presència de nombroses glucoproteïnes, de les quals destaquem els O-glicans. Aquestes intervenen en el desenvolupament vascular, tant embrionari com postnatal; així com en la partició vascular-limfàtica mitjançant la regulació de l'expressió de la *pdpn*.

T-syn, una glicosiltransferasa, regulada per l'expressió de *c1galt1*, és determinant en la formació dels O-glicans. La deleció de la *c1galt1* comporta una alteració en l'expressió i la funció de la O-glicoproteïna *pdpn* que deriva en una desestructuració dels vasos limfàtics i una funció limfàtica alterada. Fu *et al* (26), basant-se en models de ratolins genoanul·lats en T-syn (T-syn^{-/-}), evidencien, ja en l'àmbit embrionari, contingut sanguini en els limfàtics i una mortalitat elevada, abans i tot que els limfàtics esdevinguin funcionals.

La determinació d'una presència més marcada de VEGFC en les zones on s'inicien els vasos limfàtics, així com la seva presència en aquelles zones riques en vasos limfàtics, va fer considerar el seu possible rol en el desenvolupament limfàtic (23). El VEGFC estimula la sortida de les cèl·lules progenitores limfàtiques de les venes amb la particularitat que el VEGFR3 és present en totes les cèl·lules endotelials venoses, però únicament migren les que expressen *prox1*.

En ratolins s'ha pogut evidenciar, segons la valoració de la β -galactosidasa que permet detectar la secreció de VEGFC endògena, que l'expressió de VEGFC apareix en la regió jugular, allí on els sacs limfàtics es formen primer. En associar, a més a més, la immunoreactivitat a VEGFR3, s'ha constatat que VEGFC està fortament expressat en l'àmbit del mesènquima dorsolateral en la proximitat de les venes jugulars que expressen VEGFR3, així com en les cèl·lules musculars llises que envolten les grans artèries com l'aorta (24). Tot plegat ha portat a pensar que és la secreció de VEGFC el senyal desencadenant de la migració de les LEC per formar els sacs limfàtics.

Koltowska *et al* (11) fan esment que hi ha molts factors que influencien la limfogènesi en ratolins i que molts d'aquests són moduladors de la via de senyalització de VEGFC/VEGFR3. Destaquen la NRP2, la synectin, l'ephrin B2, el receptor β 1-integrin –mitjançant c-Src (CSK)–, el col·lagen I –possiblement mitjançant β -integrin–, la Rho GTPasa RAC1 i el factor de transcripció TBX1, tots ells amb interacció més o menys directa amb la via. És per aquest motiu que es concedeix tanta importància a la modulació d'aquesta via en el desenvolupament limfàtic així com en el seu posterior creixement.

Una observació interessant a tenir en compte en l'estructuració dels vasos limfàtics és la que deriva de l'estudi de Cermenati *et al* (27) en el qual es destaca la relació que hi pot haver entre un factor de creixement com és VEGFC i un factor de transcripció com és SOX18. En un model d'estudi de la limfogènesi en peixos zebra s'analitza l'efecte del bloqueig parcial simultani combinat dels gens de SOX18 i VEGFC mitjançant un dosatge controlat de morfelines. Les morfelines són molècules sintètiques que permeten regular l'expressió dels gens de manera que fan els genoanul·lats simultanis viables. Pel que fa als gens considerats, es va detectar l'existència d'una sinergia funcional entre ambdós gens en la proliferació tant de les venes com dels vasos limfàtics que provenien de la vena cardinal; i, d'altra banda, que l'alteració d'aquesta sinergia afecta l'estructuració del canal toràcic. Això va conduir a pensar en l'existència d'un patró d'interacció comú que possibilitava la interacció entre l'expressió del factor de transcripció i la del factor de creixement vascular.

El desenvolupament d'una línia cel·lular endotelial limfàtica pròpia precisa a part de PROX1 i SOX18, de COUP-TFII (5). COUP-TFII és un factor de transcripció que intervé directament sobre la caracterització de l'endoteli venós mitjançant la inhibició de la via de senyalització de Notch (Notch1) característica del fenotip arterial (28).

L'expressió de COUP-TFII és present en les LEC i n'és determinant per al manteniment fenotípic. Ho fa per una interacció física i funcional directa sobre *prox1* (29-31). En cultius d'HUVEC s'ha pogut establir que COUP-TFII regula, per interacció directa, l'activitat transcripcional de *prox1* a l'hora de formar VEGFR3 i ciclina E1, així com sobre l'acció proliferativa i migratòria que té PROX1 mitjançant VEGFC (29). En el mateix estudi, basant-se en cultius de LEC dèrmiques humanes, se suggereix que, ja que qualsevol tipus de modificació de la funció de COUP-TFII implica alteració en l'expressió de *vegfr3* i de ciclina E1, COUP-TFII és un requeriment necessari per al manteniment de la caracterització de les LEC; i que és la vinculació amb la ciclina E1 el mecanisme adient per fer-ho.

De COUP-TFII cal destacar que la seva interacció amb Prox1 sembla estar definida sobre la via de les PI3k/AKT i no sobre la de RAF1/ERK. Això s'ha pogut establir pel fet que Prox1 manté la seva expressió en artèries on ha estat estimulada la via RAF1/ERK i COUP-TFII ha estat abolida. Però, d'altra

banda, quan se suprimeix la via de la PI3k/AKT hi ha una inhibició tant de l'expressió de Prox1 com de COUP-TFII (19).

Altres vies moleculars descrites (11) que influencien el desenvolupament limfàtic són les associades, per una banda, a l'*adrenomedullin* i els seus receptors (Ramp2 i Calcrl) i, per l'altra, a la CCBE1 que sembla tenir una acció sinèrgica al VEGFC (6) (figura 5).

L'*adrenomedullin* és un pèptid de 52 aminoàcids al qual s'atribueixen diverses funcions. Va ser identificat inicialment com un potent vasodilatador (32) i s'ha relacionat com a mediador de diverses patologies: cardiovascular, renal, sèpsia, inflamació, diabetis i càncer. Manifesta, a més a més, una relació amb la tumorigènesi per la seva acció antiapoptòtica (33).

L'*adrenomedullin* també ha estat relacionada a una acció antifibròtica en l'adventícia arterial en un context d'hipertensió induïda, a través de la modulació de la funció fibroblàstica, per la correcció que exerceix sobre el TGF- β 1, fet que permet modular la diferenciació dels miofibroblasts i, així, intervenir en el procés de remodelació vascular (34).

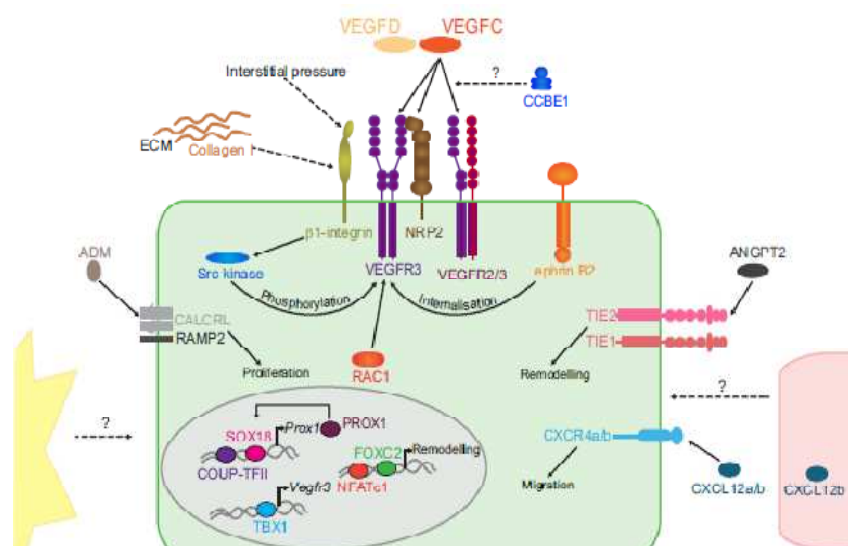
Vinculada a l'endoteli vascular, l'*adrenomedullin* s'ha relacionat amb l'angiogènesi i la integritat vascular (35). La secreció per part de les cèl·lules endotelials i la presència del seu receptor Ramp2 regula la formació de l'actina cortical en el si de les cèl·lules endotelials i la integritat de la seva barrera. Aquest procés es genera a través de la regulació positiva que fa cAMP i l'activació de RAC1. La seva alteració genera un augment de la permeabilitat vascular, la infiltració de cèl·lules inflamatòries, dany vascular i un procés accelerat d'envelliment vascular (36).

És molt interessant la seva implicació en la formació dels vasos limfàtics que es generen per l'associació que té l'*adrenomedullin* amb l'activació d'ERK. Els resultats obtinguts per la modificació de la via de l'*adrenomedullin* (activació de l'ERK), així com els obtinguts amb relació a Spred-1 i Spred 2 (inhibició d'ERK), han portat a considerar el control de l'activació d'ERK com un procés important en el control de la proliferació de les LEC durant el seu desenvolupament (37). Cal destacar el fet, tal com ho exposa Mark L. Kahn en el seu editorial (38), que existeixen molècules relacionades tant amb l'estructuració vascular com amb la limfàtica que quan perden les seves vies de senyalització generen fenotips en ambdós sistemes, ja siguin els casos de l'*adrenomedullin*, l'angiopoietina o l'efrina B2 (figura 5)

La CCBE1 és una proteïna de matriu que té relació amb els senyals extracel·lulars que les LEC generen quan surten de les venes. La CCBE1 interactua, de manera autònoma a les cèl·lules, amb el VEGFC tot reforçant la seva acció prolimfogènica. S'ha constatat en models CCBE1^{-/-} que hi ha defectes en la migració de les LEC i que en embrions deficientes en VEGFC i CCBE1 existeix la formació dels vasos, però s'originen en els plexes venosos laterals i no en la vena cardinal, fet que no ha deixat de sorprendre (6).

Mereix ser considerat un estudi fet amb peixos zebra en el qual es descriu l'acció que exerceix E2f7/8 sobre CCBE1 i VEGFR3 (39). E2f7/8 s'havia descrit com un repressor dels gens del cycle cel·lular que s'involucraven en la replicació, el metabolisme i la reparació de l'ADN, així com en la mitosi i la citocinesi. També se l'ha reconegut com un activador transcripcional de VEGFA que incideix en la formació de vasos sanguinis. En aquest cas, se n'ha evidenciat l'acció en la regulació de factors limfangiogènics. S'observa que E2F7/8 regula directament VEGFR3 i CCBE1, i es mostra com n'és, d'essencial, aquesta *atypical* E2F en el desenvolupament limfàtic. E2f7/8 és un regulador acurat de l'expressió de *ccbe1* i *vegfr3* d'una manera específica al tipus cel·lular que facilita la quantitat de senyalització de VEGFR3 que es precisa en cada moment durant el desenvolupament limfàtic (figura 5)

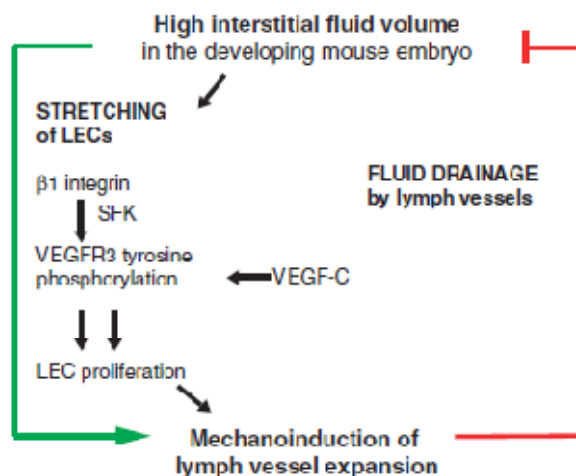
Figura 5. Resum de factors que incideixen en el desenvolupament dels vasos limfàtics. Obtingut de (11).



S'ha pogut constatar que factors biofísics resulten determinants per a l'estructuració dels vasos en l'àmbit embriològic (40). En aquest estudi de Plana-Paz *et al* es constata que, modificant les condicions de l'interstici, de l'espai extracel·lular dels embrions, mitjançant tècniques de guany o pèrdua de fluid (és a dir, generant més o menys pressió intersticial), es controla l'elongació, la senyalització de la VEGFR3, i la proliferació de les LEC. En aquest procés destaquen la implicació de les β -integrines (figura 6).

DESENVOLUPAMENT DELS VASOS LIMFÀTICS

Figura 6. Possible model d'interacció entre les condicions de l'interstici i el desenvolupament limfàtic en l'àmbit embrionari. Imatge obtinguda de (40).



Recentment, s'han descrit nous mecanismes vinculats al desenvolupament dels vasos limfàtics (22). La proteïna BMP2 es descriu com a indispensable per a la proliferació venosa sense que modifiqui el desenvolupament arterial. El que té de particular aquest procés és que ho fa limitant la proliferació dels vasos limfàtics, BMP2 bloqueja PROX1, la molècula principal en el desenvolupament dels vasos limfàtics.

L'equilibri entre els diferents senyals que arriben a les BEC, ja siguin els associats al mecanisme de la BMP2 o els associats a la senyalització de les ERK, determinen que les BEC persisteixin en el seu fenotip venós o que es decantin pel limfàtic.

1.2.1 El guiatge del desenvolupament dels vasos limfàtics

El desenvolupament dels vasos limfàtics segueix un cert guiatge. Hi ha diversos processos que marquen aquest guiatge. Un d'ells és el que es vincula a la presència de VEGFC. La sortida de les cèl·lules progenitores de les LEC, com ja s'ha comentat, ve condicionada per la presència d'aquest estímul de migració que és el VEGFC (24).

D'altra banda, es parla de la influència que tenen les prolongacions de les neurones adjacents al procés constitutiu dels vasos limfàtics durant el seu desenvolupament. L'alteració, en peixos zebra, del funcionament de les motoneurones properes al desenvolupament limfàtic implica l'alteració en la migració de les LEC i la seva disposició espacial. Aquest procés sembla condicionat per NTN1a i el seu receptor DCC. Quan s'altera el procés, la disposició limfàtica es veu alterada. En el mateix sentit, l'alteració d'un altre receptor de la NTN1a, UNC5B, reproduïx el mateix patró disfuncional (11). La importància d'aquest receptor es va manifestar quan es va constatar que UNC5B és present en el vas limfàtic perifèric longitudinal, en el conducte toràcic primordial i en les LEC superficials que es formen. Entre els altres lligands que tenen aquest receptor hi ha NTN4 que té un caràcter

prolimfogènic definit. Tot i això, no és la NTN4 l'efectora directa d'aquest procés sinó que ho serien les integrines $\alpha 6$ i $\beta 1$ (6). És, de fet, la integrina $\beta 1$ la molècula que s'ha relacionat, com ja he comentat, amb la desigual proliferació limfàtica en funció de les condicions intersticials (40). De la mateixa manera que la secreció de certes molècules lligades a l'acció de guiatge que fan certes neurones, mitjançant l'àcid retinoic que elles mateixes secreten, està relacionada amb l'estructuració dels nòduls limfàtics. I hi ha la possibilitat que altres molècules puguin vincular-se de manera semblant en el guiatge dels vasos limfàtics (41).

El fet que les cèl·lules progenitores limfàtiques disposin del receptor CXCR4 fa que la secreció de CXCL12b o de CXCL12a per part de les artèries i dels músculs, respectivament, generi un efecte quimioattractiu sobre les LEC progenitores, fet que en condiciona la disposició i orientació (11, 42). D'aquí, la disposició paral·lela, més o menys estreta, entre els vasos sanguinis i els limfàtics. La redundància entre les diferents vies de quimiocines o entre les quimiocines i altres factors de guia és evident quan s'observa que, malgrat la generació de deficiències en les diferents vies es manté la disposició i l'orientació dels vasos limfàtics (11).

1.2.2 Les cèl·lules hematopoètiques en el desenvolupament dels vasos limfàtics

Les cèl·lules hematopoètiques tenen una relació directa amb el sistema limfàtic. Així, en la resposta immune, tant l'adaptativa com la innata, i en els mecanismes d'homeòstasi, aquestes cèl·lules tenen una interacció estreta amb l'endoteli limfàtic. Cal considerar què passa durant el desenvolupament dels vasos limfàtics. Ja s'ha esmentat la importància que tenen les plaquetes en el procés de separació entre la vena i els vasos en formació. El desenvolupament limfàtic i vascular no es veu condicionat per la presència de més o menys leucòcits en la mesura que queden coberts uns mínims de producció cel·lular i un flux suficient. D'altra banda, la formació d'un sistema hematopoètic no es pot generar en absència d'un sistema endotelial primitiu (7, 8).

Els macròfags sí que semblen incidir en una certa mesura (11) en el patró de desenvolupament dels vasos limfàtics. En models deficients en la síntesi de macròfags s'ha pogut constatar una hiperplàsia en els vasos limfàtics superficials i una hipoplàsia en el conjunt d'estructures limfàtiques disposades a la proximitat de la jugular. En el mateix sentit es descriu que la presència de cèl·lules mieloides, sobretot les que disposen de SYK, una tirosina cinasa, estimulen la formació de nous vasos mitjançant la secreció de factors limfogènics com són VEGF, MMP2 i MMP9. En mutacions generades sobre *syk* existeix un cúmul major de macròfags i s'observa una hiperplàsia en els limfàtics dèrmics superficials.

1.2.3 El desenvolupament diferenciat dels diferents vasos limfàtics

Existeixen tres tipus de vasos limfàtics: els inicials, els precol·lectors i els col·lectors. La distinció entre ells ve determinada per la seva pròpia morfologia i per les funcions que assumeixen. Així, els vasos inicials tenen com a funció principal la captació del líquid intersticial; per això, disposen d'una estructuració molt més oberta, en cul-de-sac, i disposen d'una capa única de LEC que compta amb punts d'ancoratge en l'interstici, la qual cosa els permet interaccionar-hi davant les diferents situacions que es presenten. Els precol·lectors assumeixen, al seu torn, una funció d'absorció menor, però incorporen una major capacitat de transport del líquid absorbit, fet que comporta una major disposició de LEC, la incorporació de teixit muscular llis i una capa adventícia més desenvolupada. Els col·lectors, finalment, ja disposen d'una estructura més desenvolupada i complexa, en la qual destaca la presència de vàlvules. L'existència de vàlvules permet diferenciar parts dels vasos connexes, delimitades entre vàlvula i vàlvula, anomenades limfangions. El limfangió té una determinada independència funcional que dona un cert grau d'adaptació a les exigències locals, d'adaptació als requeriments immediats de drenatge que pot precisar un territori determinat.

Al llarg del desenvolupament embrionari es van succeir una sèrie de processos que permeten donar distinció als diferents tipus de vasos, és el que s'anomena procés de remodelació limfàtica. Les LEC ja tenen patrons d'expressió gènica diferents en funció del moment del desenvolupament en el qual es trobin (11). Del treball realitzat per Norrmén *et al* (43) s'ha pogut establir que és l'expressió de *foxc2* el que en defineix la distinció fenotípica entre els vasos limfàtics inicials i els col·lectors. Altres factors, NFATc1, en la seva fixació amb FOXC2, també marca la identitat de col·lector. Norrmén (44) va poder establir, també, que la liprin $\beta 1$ és un marcador de les cèl·lules endotelials limfàtiques, que és més expressada, en general, en els vasos limfàtics col·lectors, així com, de manera específica, en els vasos limfàtics intestinals, i aconsegueix, segons es creu, la funció de mantenir l'estructura dels vasos limfàtics, de mantenir-ne la integritat.

Les efrines (Ephs) i els seus receptors tirosina cinasa són reguladors de diferents processos entre els quals s'inclouen elements importants en la maduració dels vasos limfàtics. EphB4 està present tant en vasos inicials com en col·lectors. L'EphB2 està, per contra, present de manera selectiva en els vasos col·lectors. La via de l'angiopoietina/Tie s'ha vinculat, també, a aquest procés diferenciador entre vasos (11).

La formació de les vàlvules, pròpies als vasos limfàtics col·lectors, engloba diversos gens (11). Cal destacar que l'alteració de la integrina α -9 (45) genera defectes en l'estructuració de les vàlvules i provoca un flux limfàtic retrògrad i un cúmul de líquid en l'àmbit intersticial que es manifesta en l'àmbit dels vasos limfàtics intestinals.

La formació de les vàlvules es dona en etapes successives que, progressivament, es van complementant a mesura que el procés constitutiu avança (46).

Tot el procés es vincula a la interacció existent entre diferents factors de transcripció, l'estimulació mecànica generada pel flux limfàtic i la disminució en l'expressió de certs gens i vies (46). Un requisit determinant en tot el procés és la presència d'un flux no laminar. Quan s'observa que les vàlvules s'ubiquen sempre en llocs on el flux està alterat (bifurcacions de vasos, punts de connexió) es fa palesa la veracitat de l'observació (47).

1.3 La formació dels nòduls limfàtics

Fins al moment s'ha descrit el desenvolupament del sistema drenant limfàtic sense fer distinció entre els vasos i els nòduls limfàtics.

Florence Sabin (2) descrivia els nòduls limfàtics com a òrgans derivats dels sacs limfàtics primitius. Pel que sembla, el desenvolupament dels nòduls limfàtics és independent del dels vasos (48). El procés de formació dels nòduls s'inicia per l'agrupació de cèl·lules hematopoètiques inductores del teixit limfoide (LTi) i de cèl·lules del mesènquima que, mitjançant l'expressió del receptor limfotoxina β (LT β R) i altres molècules, es diferencien en cèl·lules organitzadores de l'estroma. Aquest procés inductor d'acumulació de les LTi i la següent diferenciació implica una sèrie de vies i la presència de certs senyals. Segons sembla, aquests senyals serien independents de la presència de LEC, sacs limfàtics o de vasos limfàtics. Però, d'altra banda, s'ha constatat que l'estructuració dels nòduls limfàtics es veu alterada en mutacions embrionàries sobre *prox1*. Vondenhoff *et al* (48), ho justifiquen pel fet que des de les LEC se secreta CCL21, un inductor del reclutament de les LTi, el qual permetria captar les primeres LTi. En general, podem considerar que el desenvolupament dels nòduls, tot i no dependre de les LEC, sí que en condiona la seva estructuració.

Les LTi caracteritzades per la formació de nòduls limfàtics requereixen de la presència de ROR γ i de la proteïna de senyalització Id2, i, en menor mesura, però de manera remarcable, de TRANCE, anomenat també RANKL. Pel que se sap la via de senyalització de l'IL7R o la via de TRANCE-R (o RANK) són condicions necessàries per a l'expressió de limfotoxina (LT) en la superfície de les LTi (LT $\alpha_1\beta_2$). Aquesta limfotoxina es lliga a les LT β R de les cèl·lules estromals, la qual cosa dona peu a la secreció d'una sèrie de molècules que consoliden l'estructuració dels nòduls. Segons descriuen Cupedo *et al* (49), TRANCE esdevé primordial per al desenvolupament dels nòduls que poden substituir a IL7 en aquesta funció, però no a l'inrevés. Mentre que en la formació de les plaques de Peyer (*Peyer Patches*) en l'intestí és la IL-7 la que no pot ser substituïda per TRANCE.

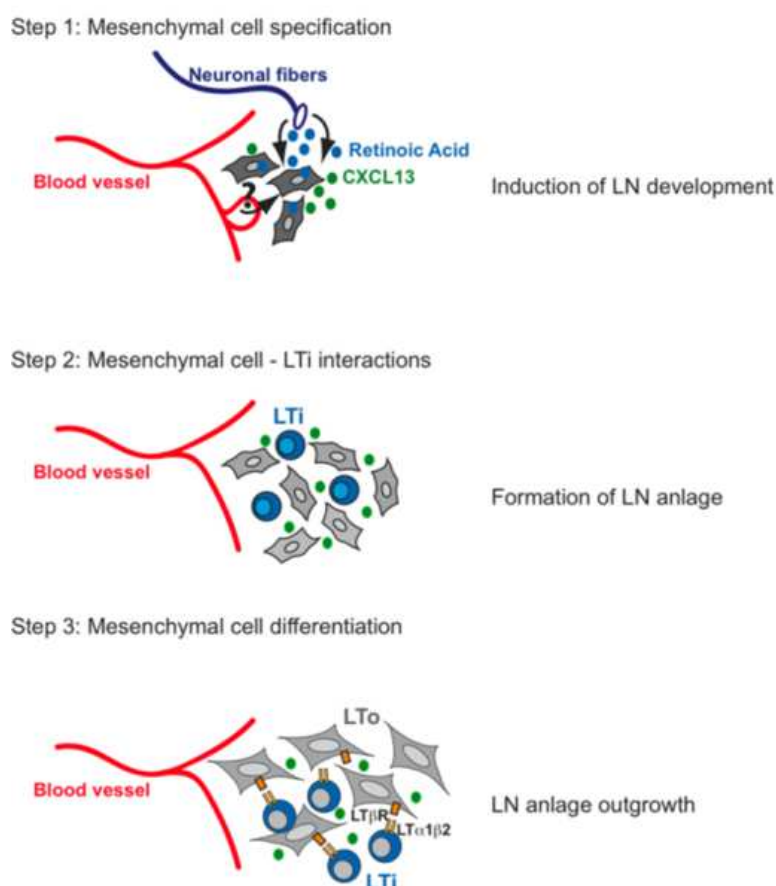
Pel que fa a la ubicació dels nòduls, segons el que s'ha descrit (41), es desconeix per quin mecanisme es dona. La secreció de CXCL13 per part de les cèl·lules del mesènquima és el primer senyal d'especialització d'aquestes

DESENVOLUPAMENT DELS VASOS LIMFÀTICS

cèl·lules dins de l'estructuració dels nòduls. La secreció d'àcid retinoic per part de les neurones estimula l'expressió de les *cxcl13* per part de les cèl·lules del mesènquima (figura 7). El fet que en els genoanul·lats de *cxcl13*^{-/-} i del seu receptor *cxc5*^{-/-} hi hagi cèl·lules del mesènquima especialitzades ha portat a pensar en l'existència d'altres factors de desenvolupament.

Pel que sembla, segons modelitzen Berdolan *et al* (41), les cèl·lules L_{Ti} que s'agrupen per formar els nòduls expressen tant *rankl* com el seu receptor *rank*, fet que comporta la secreció de LTα1β2. Aquesta molècula indueix, per la seva fixació al receptor LTβR de les cèl·lules del mesènquima, la síntesi d'una sèrie de molècules d'adhesió (VCAM-1, ICAM-1 i MAdCAM-1), així com altres molècules (CXCL13, CCL21 i CCL19) que estimulen el reclutament de més L_{Ti}. Tot plegat comporta que el desenvolupament dels nòduls limfàtics disposi d'un bucle de retroalimentació positiva que la mateixa estructuració del nòdul entreté.

Figura 7. Model de desenvolupament dels nòduls limfàtics. Obtingut de (41)



2. PROSPERO HOMEBOX PROTEIN 1

El gen *prox1* forma part d'una família de gens anomenats *homeobox*. Un *homeobox* és una seqüència d'ADN que està involucrada en la regulació dels patrons de desenvolupament anatòmic (morfogènesi) d'animals, fongs i plantes. Les proteïnes que deriven dels gens *homeobox*, anomenades homeodomini, tenen la capacitat de reconèixer i fixar seqüències concretes d'ADN, la qual cosa permet incidir en la regulació de l'expressió d'aquestes seqüències. Així, poden incidir de manera específica en el destí de les cèl·lules, sobre el desenvolupament embrionari i primerenc dels organismes. Cal tenir en compte, però, que els homeodominis no tan sols estan codificats pel conjunt de gens Hox sinó que també hi intervenen altres gens. Això ve a indicar que no ho fan de manera aïllada sinó agrupada mitjançant, per exemple, factors de transcripció.

El gen que codifica Prox1 es localitza en el cromosoma 1, en la posició 1q32.2-q32.3 per ser més exacte (50). Prox1 abasta 58.321 nucleòtids del cromosoma 1, entre la 213.983.181 i la 214.041.502. A Prox1 se li reconeix 2909 SNP. De *prox1* es deriven 7 variants de transcripció (Prox1-001; Prox1-002, Prox1-202, Prox1-201, Prox1-004, Prox1-006, Prox1-005) i 18 exons (51).

Des d'un punt de vista filogenètic, és un gen força conservat, disposa de 67 ortologies, és a dir, de gens presents en diferents espècies que provenen d'un únic gen present en un ancestre comú, estant present en els craniats (*craniata*) (~550 milions d'anys enrere) (52).

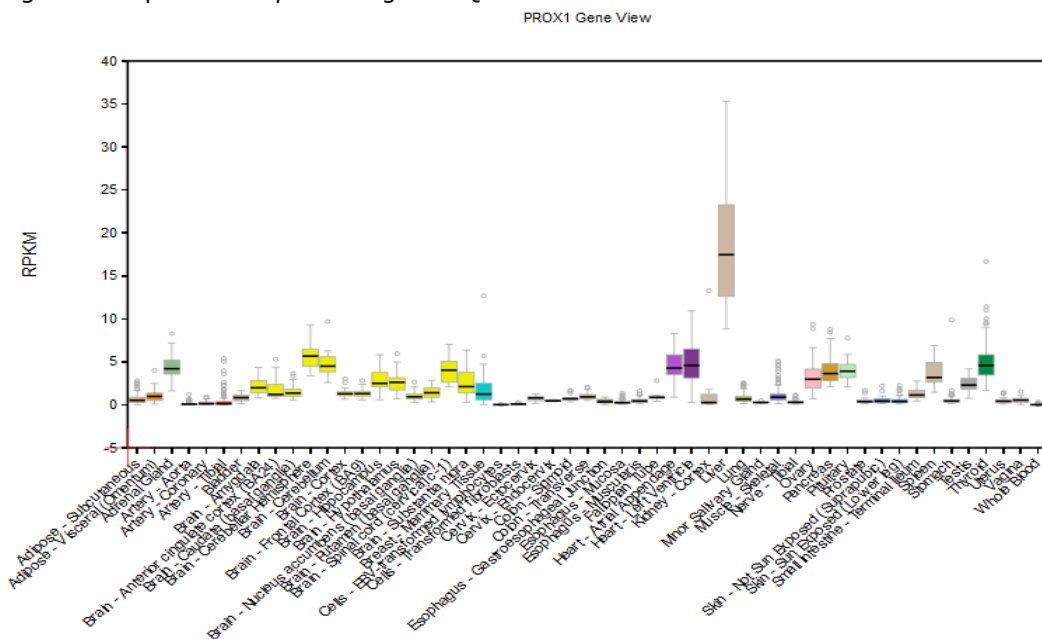
Prox1 disposa d'una única paralogia (*prox2*), és a dir, d'una duplicació seqüencial en el mateix genoma (51).

2.1 Expressió de *prox1* en els diferents teixits

Un patró d'estudi basat en la quantificació de l'expressió de trams concrets del genoma (*expression quantitative trait loci* (eQTL)) permet reconèixer perfils d'expressió de manera diferenciada d'aquests trams en diferents teixits. A partir d'aquesta valoració, s'ha pogut establir un catàleg de milers de variants d'eQTL, i definir afinitats i divergències en teixits d'un mateix individu, en el mateix tipus teixit de diferents individus o entre teixits d'individus diferents. D'acord amb aquesta forma d'estudi s'han pogut determinar xarxes de relació complexes i identificar variabilitats del genoma associables a certes condicions o patologies (53). Segons aquest procés s'ha pogut establir que l'expressió de *prox1* és present en molts teixits. Destaca la seva expressió en teixits com: el fetge, el cor, la melsa, la tiroides (54) (figura 8).

PROSPERO HOMEBOX PROTEIN 1

Figura 8. Expressió de *prox1* segons eQTL.



Cal destacar, per a l'estudi que portem a terme, que l'expressió en teixit adipós de *prox1*, tant subcutani com visceral, no dista de valors mínims d'expressió.

2.2 PROX1 en l'organogènesi

Des de l'inici de la morfogènesi dels individus es constata la marcada presència de *prox1* en certs espais. Estudis fets amb embrions de pollets, després validats amb embrions humans, han evidenciat que l'expressió de *prox1* està present en certes àrees de totes les capes germinals embrionàries (55) (taula 1).

Taula 1. Presència de Prox1 en les capes embrionàries.

Ectoderma	Mesoderma	Endoderma
Tub neural, trigeminal, espinal	Cardiomiòcits (lleu expressió)	Hepatòcits
Ganglis simpàtics	Endoteli limfàtic (forta expressió)	Conducte biliar
Retina		Epiteli pancreàtic
Estructures placodals: lent, olfactiva, òtica, facial, glossofaríngia i vagals		
Cresta ectodèrmica apical		

D'acord amb la seva presència en les diferents capes germinals, PROX1 esdevé determinant per al desenvolupament de molts òrgans.

En estudis fets amb ratolins, en una primera fase embrionària, *Prox1* està marcadament present en l'epiteli de la còclea i dels òrgans vestibulars. Després, la seva expressió es va diluint. L'expressió també està augmentada en certs tipus de cèl·lules de suport (Deiters') en l'oïda interna, més enllà de les fases embrionàries, en l'àmbit postnatal, quan també acaba diluint-se (56). En un model d'estudi de ratolins adults, el sac endolimfàtic, estructura moduladora de la hidrodinàmica del líquid intern de l'oïda interna (endolimfa), presenta tot l'epiteli marcat per l'expressió de *prox1* (57).

La morfogènesi pancreàtica es mostra, també, depenent de l'expressió de *prox1*, que és un dels primers marcadors específics de diferenciació cel·lular embriològica que afavoreix la formació del pàncrees i del fetge (58). L'alteració en l'expressió de *prox1* genera un obstacle en el desenvolupament de l'epiteli pancreàtic fins al punt de generar alteracions morfològiques globals en l'estructuració del pàncrees. Aquestes alteracions estructurals es manifesten en l'augment de producció dels precursors exocrins en detriment de la gènesi de les cèl·lules endocrines (59).

Elsir *et al* (60) descriu que la maduració del sistema nerviós també està associada a l'expressió de *prox1*. L'expressió de *prox1* és un requeriment imprescindible per a la neurogènesi. El bloqueig de la seva expressió per part de *Sox1* provoca que les cèl·lules progenitores neurals es mantinguin indiferenciades i mantinguin la seva autorenovació en continu (61). Un altre mecanisme alternatiu de control que apareix com a possible (62) estaria associat a la modulació que faria *Prox1* de *Notch1*, una proteïna que manté l'autorenovació de les cèl·lules progenitores en contra de la diferenciació neural. El procés diferenciador està mediat pel grup de factors de transcripció TCF/LEF que estan involucrats en la via de senyalització de la Wnt. La fixació d'aquest grup en l'ADN permet el reclutament del coactivador β -catenina que potencia els gens d'interès associats a la fixació, en aquest cas *prox1* (figura 9).

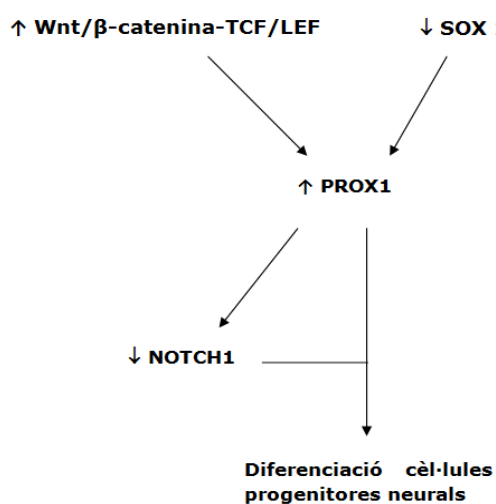


Figura 9. Neurogènesi mitjançant *prox1*.

La formació dels ulls també precisa de la presència de Prox1. El mecanisme se centra en el control dels gens vinculats a la regulació del cicle cel·lular, així com en la regulació de la transcripció en les lents. Segons s'ha pogut observar en estudis fets amb ratolins, l'expressió de *prox1* es veu fortament augmentada en les zones on les fibres de les lents del cristal·lí s'estiren. S'ha pogut constatar que l'absència de PROX1 genera una proliferació cel·lular anormal. Aquesta absència estaria provocada, pel que sembla, per la inactivació de certs inhibidors del cicle cel·lular, una expressió deficient de l'E-cadherina i una apoptosi alterada (63).

L'altre òrgan que es veu afectat en el seu desenvolupament per PROX1 és el fetge. En estudis fets amb ratolins (64), es constata que la migració dels hepatòcits es veu afectada quan hi ha una abolicció de *prox1* (*prox1^{-/-}*), la qual cosa genera una disminució de la grandària del fetge de fins al 70%. L'explicació que contemplen els autors de l'estudi és que fruit d'aquesta afectació de *prox1* es produeix una incapacitat en la degradació de la membrana basal i que hi ha una retenció més marcada dels contactes entre cèl·lules, la qual cosa en limitaria la migració. Es valora que sigui l'E-cadherina, també en aquest cas, la responsable ja que té una expressió alterada en aquest model d'estudi. A part de l'afectació pròpia de l'estructuració hepàtica, s'ha constatat que Prox1 també està involucrat en la mateixa funció hepàtica. Aquest és el cas de la seva incidència sobre certs gens vinculats en la mobilització del colesterol a través de la seva relació amb la *SUMOylation* (65). En models animals en els quals s'ha abolit aquesta funció s'ha pogut determinar que és PROX1 la molècula que incideix en el control per a la *SUMOylation* de LHR-1, del *liver receptor homolog 1*, mitjançant un efecte corepressor sobre el mateix.

L'estructuració del cor depèn de l'acció directa de regulació transcripcional que fa PROX1 sobre gens que codifiquen proteïnes importants com l' α -actinina, N-RAP i zyxin, que permeten que el complex proteínic actina- α -actinina es mantingui. Cal saber que aquest complex és determinant per al bon funcionament del sarcòmer, com s'ha evidenciat quan s'ha modificat el funcionament d'aquestes proteïnes (66).

L'expressió de *prox1* és imprescindible en l'estructuració dels vasos limfàtics. En models animals s'ha pogut constatar que els ratolins *prox1*-null estan desproveïts de vasos limfàtics (15).

Cal notar que l'expressió de *prox1* en l'endoteli limfàtic no respon a una necessitat inicial de diferenciació i prou. La seva expressió és un requeriment continu d'estructuració (16). Aquest fenomen s'explica pel fet que PROX1 suprimeix la identitat de les BEC en detriment de mantenir la diferenciació de les LEC. Aquest procés implica la supressió del ~40% dels gens representatius de les BEC, fet que no es dona en cap altre tipus de teixit. Si l'endoteli limfàtic deixa d'expressar *prox1* es reverteix la seva diferenciació limfàtica, és el que s'anomena dediferenciació.

2.3 *Prox1*(*prox1*^{-/-} /*prox1*^{+/-}) implicacions en el metabolisme

Diferents estudis confirmen la inviabilitat experimental de generar un ratolí en el qual s'ha abolit l'expressió de *prox1* (*null mice*). Wigle *et al* (63) descriuen que els *Homozygous Prox1-null mice* moren a meitat de la seva gestació per diversos defectes en el seu desenvolupament: proliferació cel·lular excessiva, disminució en l'expressió d'inhibidors del cicle cel·lular (Cdkn1b i Cdkn1c), alteració en l'expressió d'E-cadherina i alteració de l'apoptosi.

L'estudi genètic de *prox1* només ha sigut viable en la pèrdua de funció d'un dels dos al·lels de *prox1*, és a dir, en la seva haploinsuficiència (*prox1*^{+/-}). *Prox1*^{+/-} s'ha mostrat suficientment viable com per arribar a donar espècimens adults que manifesten una sèrie d'aspectes que val la pena destacar, donades les implicacions que se'n poden derivar en el present estudi (67). La *prox1*^{+/-} s'ha caracteritzat pel desenvolupament de l'obesitat tant en l'àmbit visceral com subcutani i tant des de la hipertròfia com des de la hiperplàsia. De l'estudi es valora que *prox1* s'expressa més en regions hipotalàmiques (*arcuate nuclei*). En aquests ratolins *prox1*^{+/-} no s'observen diferències substancials en consum i exercici abans del desenvolupament de l'obesitat. Després, un cop es manifesta l'obesitat, es constata disminució de consum i d'exercici. Les proteïnes hipotalàmiques no mostren alteracions: l'obesitat no ve de modificacions en la ingesta, el consum energètic o l'expressió de neuropèptids en l'àmbit hipotalàmic. Aquests ratolins *prox1*^{+/-} tenen la insulina augmentada en els obesos adults, però no hi ha una disminució de la concentració de glucosa. El glucagó i la leptina estan augmentats, i no hi ha alteració en la grelina ni en l'NPY. Es manifesta cert grau d'intolerància en la glucosa. Es considera un cert grau de resistència a la insulina causada per l'obesitat. *Prox1*^{+/-} obesos adults no mostren diferències substancials entre àcids grassos lliures, triglicèrids, en les HDL o en les LDL en sèrum. Hi ha un cúmul de lípids al fetge d'alguns ratolins adults *prox1*^{+/-} i de triglicèrids, però no de colesterol o d'àcids grassos lliures. La presència de certs indicadors enzimàtics augmentats, la ràtio alanina-aminotransferasa/aspartataminotransferasa defineix un fenotip de fetge gras. També hi ha associada la presència de macròfags Mac-2⁺, que són presents en inflamació crònica de baixa intensitat i en afectacions amb resistència a la insulina, així com en altres síndromes en els quals hi ha associada l'obesitat (67).

2.4 Malalties associades a alteracions de *prox1*

❖ Càncer

L'alteració en l'expressió de *prox1* ja es va associar, des dels primers estudis apareguts (63), a una proliferació cel·lular anormal associada, al seu torn, a l'acció directa sobre inhibidors del cicle cel·lular així com sobre la inhibició de l'apoptosi.

Una associació interessant que va aparèixer entre *prox1* i el càncer va sorgir de la caracterització dels vasos limfàtics en tumors hepàtics i en la cirrosi (68). En aquest estudi es valorava la implicació de *prox1*, juntament amb l'expressió de LYVE1, com a marcador dels vasos limfàtics. Els resultats indiquen que hi ha una major presència de vasos limfàtics en la cirrosi, la qual cosa fa pensar que la cirrosi s'acompanya de limfogènesi. D'altra banda, també destaca la seva absència en carcinomes hepatocel·lulars així com en metàstasi de fetge, casos en els quals es detecten únicament en els marges del tumor i en el teixit peritumoral. Dins d'una dinàmica semblant d'estudi apareix una publicació en la qual es valora la caracterització limfàtica d'un tipus d'alteració tumoral, de les més comunes en la infància, l'hemangioma infantil (69). El que es va poder comprovar és que l'absència d'expressió de *prox1* en les cèl·lules endotelials d'aquest tumor era comuna, al mateix temps que també ho era l'especial expressió de LYVE1, la qual es corregia amb la involució de la malaltia. Aquest fet es va valorar com una afectació en el desenvolupament vascular, com si hi hagués un bloqueig en els estadis primerencs de diferenciació vascular.

Nagai *et al* (70) descriuen que el procés de proliferació en neoplàsies limfoides i en línies cel·lulars hematològiques va associat a la desregulació d'oncògens. Aquest procés d'activació de l'oncogen inclou l'alteració de gens supressors tumorals. En aquest punt els autors observen que *prox1* està mutat en diverses línies cel·lulars hematològiques i en neoplàsies limfoides primàries. Aquesta mutació és induïda per la metilació aberrant de l'ADN en l'intró 1 del gen. Els autors comenten que en experiments preliminars van observar que la sobreexpressió de *prox1* tenia com a efecte una supressió del creixement cel·lular. Els autors consideren *prox1* com un gen supressor tumoral i que, per tant, l'acció de Prox1 pot ser determinant en alteracions de la proliferació cel·lular.

El càncer de mama és, també, un altre tipus de càncer que es veu afectat per la metilació de *prox1*. En un estudi fet per Versmold *et al* (71) per *microarray* d'anàlisi de la metilació en el genoma complet (*genome-wide methylation analysis*) en cinc mostres de carcinoma de mama esporàdic es detecta una CpG *island*, una zona densa en CpG, hipermetilada en l'intró 1 del gen *prox1*. A partir d'aquests resultats, valoren específicament la metilació d'aquesta regió en 33 parells de mostra (càncer primari de mama i teixit normal). Els resultats mostren que el 52% de les mostres de càncer de mama acumulen significativament CpG metilats amb una disminució de

l'expressió de *prox1* en comparació amb el teixit normal dels mateixos pacients. En metàstasi en el cervell de càncer primari de mama també s'observa una disminució en la metilació (57% dels casos). Prosseguint l'estudi, els autors valoren en altres mostres de metàstasi de cervell provinents de càncer primari de mama l'expressió de *prox1* i observen que és menor que en els càncers de mama i que en el teixit normal.

En el mateix estudi es determina l'associació significativa entre la hipermetilació de *prox1* i la sobreexpressió de receptors dels estrògens. En l'estudi es descriu que l'angiogènesi és induïda pels estrògens. I es fa notar, també, que la hipermetilació de TIMP3, un inhibidor de l'angiogènesi, ha estat associada a l'angiogènesi en carcinomes de mama en els quals hi ha presència de receptors estrogènics. El que contempen com a hipòtesi és que la hipermetilació de *prox1* observada tingui una conseqüència semblant a la que té TIMP3 en presència de receptors estrogènics, és a dir, la de la inhibició de l'angiogènesi. El que es valora és que sigui el silenci de l'expressió, des del punt de vista epigenètic, d'inhibidors de l'angiogènesi (TIMP3 i PROX1) per mediació dels receptors estrogènics, la relació observada entre la hipermetilació i la proliferació cel·lular.

Un altre dels determinants de la metilació de *prox1* que cal destacar, ja que s'ha avaluat directament en teixit adipós, és el pes (72). L'avaluació de la metilació de *prox1* en individus intervinguts per un *bypass* gàstric ha mostrat que amb la pèrdua de pes que es produïa per la intervenció hi havia associada una pèrdua de metilació en el gen de Prox1.

Petrova *et al* (73) constaten que la sobreexpressió de *prox1* indueix un canvi fenotípic que deriva en la progressió del càncer colorectal. Això comporta que *prox1*, en el cas del càncer de còlon, no actua com un supressor tumoral. De fet, la seva expressió està activada en resposta a una senyalització incrementada de manera anormal de TCF/ β -catenina en l'epiteli intestinal. L'expressió de *prox1* esdevé important en la mesura que condiona la progressió tumoral. Això es valora des de la incidència que té Prox1 sobre la polaritat cel·lular i l'adhesió.

La relació de *prox1* amb el càncer s'ha associat a la mateixa estructuració dels vasos limfàtics. Hi ha un tumor cutani, el sarcoma de Kaposi, que és causat per una infecció per l'herpes virus 8 que desemboca en una reprogramació genètica de les cèl·lules endotelials vasculars en cèl·lules limfàtiques mitjançant la inducció de l'expressió de gens relacionats amb la caracterització limfàtica en detriment de la vascular (74). Aquest sarcoma de Kaposi també s'ha relacionat com a càncer de definició clínica de la sida. Un estudi GWAS (75) ha determinat quins gens són susceptibles d'incidir en l'evolució de la malaltia, des de la infecció per HIV-1 en la progressió de la sida. Els autors de l'estudi van constatar que la sobreexpressió d'una zona relacionada amb *prox1* s'associava a una disminució en la progressió de la sida; un resultat que van poder replicar. L'explicació contemplada és que hi

ha una regulació inversa per part de PROX1 sobre l'expressió interferon- γ i també que hi ha una acció reguladora de PROX1 sobre l'angiogènesi.

Shimoda *et al* (76), estudiant mostres humanes de carcinomes hepatocel·lulars, constaten que hi ha una correlació significativa entre PROX1 i la taxa de diferenciació dels tumors. Van evidenciar que el pitjor pronòstic en la malaltia anava associat a nivells baixos de PROX1. Van constatar que la disminució de l'expressió de *prox1* mitjançant RNA d'interferència estimulava el creixement cel·lular *in vitro* mentre que la sobreexpressió el suprimia.

En mostres de carcinomes del sistema biliar (77) s'ha observat que hi ha una pèrdua d'heterozigosi (LOH - *loss of heterozygosity*) en el 50% de les mostres, una disminució de la proteïna PROX1 en el 63% i que hi ha una hipermetilació en el 47% dels casos. Tot i això, destaca el fet que no s'ha detectat correlació entre les característiques clíniques de la patologia amb la disminució en l'expressió de *PROX1*. Els autors destaquen la relació que hi ha entre la deleció gènica i la hipermetilació amb la inactivitat de PROX1 en els carcinomes del sistema biliar.

S'han descrit altres associacions de PROX1 amb el càncer. Els gliomes, tumors del sistema nerviós central, són valorats en diverses publicacions que són recollides per Elsir *et al* (60) en què es descriu que *PROX1* s'expressa de manera diferenciada en gliomes humans en funció del grau de malignitat, de manera que la proteïna té una correlació positiva amb el grau de malignitat. L'augment de PROX1 està associat al fet que un cert nombre de cèl·lules cancerígenes es manifesten fenotípicament com si fossin cèl·lules progenitores neurals en un estadi primerenc de desenvolupament. A més a més, s'ha constatat que hi ha una correlació en els gliomes de baix grau entre les cèl·lules que manifesten immunoreactivitat a Prox1 i la supervivència postquirúrgica.

❖ Diabetis

Més enllà de l'evidència d'una associació de PROX1 amb la proliferació cel·lular alterada hi ha una altra sèrie de malalties que també s'han associat al gen de Prox1. És de rellevància considerar la seva vinculació amb la diabetis mellitus tipus 2. En un GWAS fet en població xinesa s'ha definit *prox1* com un gen associat a la diabetis mellitus tipus 2 (78).

Una metanàlisi, anomenada MAGIC, de 21 GWAS feta per determinar localitzacions relacionades amb la glicèmia i característiques relacionades amb la insulina, posa en evidència que l'equilibri de la glucosa en dejuni i la diabetis tipus 2 estan lligades amb la localització de *prox1* (79) i, més concretament, a la variant rs340874 de *prox1*.

Complementant aquests resultats, apareixen una sèrie d'estudis que pretenen elucidar de manera específica quin és el paper que juguen aquests gens relacionats. Ingelsson *et al* (80) van estudiar aquests gens en funció

del processament de la insulina, la seva secreció i la seva sensibilitat a la insulina en una cohort de 29.084 individus i van poder constatar que hi ha una associació manifesta entre l'alteració en la secreció de la insulina i *prox1*, que es defineix per un baix índex insulínogènic, la no-associació amb la proinsulina o la sensibilitat a la insulina.

Hi ha un altre estudi (81) fet en població danesa (cohort Inter99) en el qual es valoren les variants dels gens descrites en els resultats obtinguts en l'estudi MAGIC. En aquest cas, s'ha confirmat que, a més a més de l'increment de glucosa en dejuni vinculat a la variant rs340874 de *prox1*, hi ha, també, associació a una disminució de la resposta a la insulina en la ingesta de glucosa. Es constaten, a més, que variants de certs gens, entre els quals hi hauria el de PROX1, estan vinculats amb factors que es correlacionen amb l'alliberament de la insulina.

En el mateix sentit hi ha un altre estudi en el qual es determina, en població del nord de Suècia, la incidència que pot tenir considerar, en l'avaluació del risc de diabetis, certes variants de gens no valorats com a específics en la malaltia, però sí incidents, entre els quals hi hauria la de *prox1* (82). En aquest cas es valora que incloure aquestes variants gèniques augmenta el poder de discriminació clínica entre les persones amb i sense manifestació de diabetis tipus 2 en comparació amb el fet de no tenir en compte aquestes variants. En el cas de la variant de *prox1*, es constata la incidència que presenta en els nivells de glucosa en dejuni i en els nivells d'insulina. En la mateixa població es fa, al llarg de 10 anys, un seguiment clínic que avalua, entre altres coses, l'associació entre els incidents d'alteració de la glucosa en dejuni amb les diferents variants de gens que ja s'havien associat a l'alteració de la glucosa en dejuni (83). La variant rs340874 de *prox1* manifesta una associació significativa amb els incidents d'alteració de la glucosa en dejuni, fet que marca un increment del risc de desenvolupar una alteració en l'equilibri de la glucosa.

Cal considerar un estudi fet en població xinesa de l'ètnia Han de Shanghai i de Beijing en el qual es valora el genotip de les variants de gens associats, nou exactament, entre els quals hi ha la variant del gen de Prox1 que, en estudis precedents, en poblacions d'origen europeu, es va relacionar amb l'homeòstasi de la glucosa en dejuni i amb la diabetis tipus 2 (84). Els resultats indiquen que no hi ha relació estadísticament significativa en aquesta població entre la variació rs340874 de *prox1* i la glucosa en dejuni. I, en tot cas, aquesta associació, si fos significativa, aniria en sentit oposat al que es plantejava en estudis de GWAS precedents. Tanmateix, destaca l'associació significativa que hi ha entre la variant de *prox1* i l'índex de massa corporal. En un estudi fet en població japonesa (85) tampoc s'establí una relació significativa entre la variant de *prox1* amb la glucèmia en dejuni, com passava en població europea. Però, en un estudi ulterior (86), en una cohort també de japonesos (diabètics i no diabètics), es va

confirmar que la variant rs340874 de *prox1* té relació amb un major risc de diabetis tipus 2 en població japonesa, tal com succeeix en població europea, i que la major presència de variants gèniques susceptibles augmenta el risc de diabetis així com de nivells més alts de glucosa en dejuni, de nivells alts d'HbA1c i d'un HOMA- β baix, si es compara amb els individus que tenen menys al·lels alterats.

El desenvolupament de la recerca en aquest àmbit d'estudi ha fet sorgir noves qüestions. Una d'aquestes qüestions que s'ha plantejat és si hi ha canvis en la relació del manifest vincle que aquestes variants gèniques tenen amb la glucosa en dejuni en el pas dels anys. En un estudi de seguiment de 18 anys (87) s'ha constatat que l'associació d'aquestes variants relacionades amb la glucosa en dejuni, entre les quals hi ha la de *prox1*, es manté constant en el temps, la qual cosa concorda amb el fet que la glucosa en dejuni es mantingui estable.

Amb la pretensió de relacionar el risc de càncer de pàncrees amb la manifesta associació d'aquestes variants gèniques es constata que la variant rs340874 de *prox1* no té relació amb un major risc de càncer de pàncrees (88).

Si es prenen en consideració els individus que tenen la variant de *prox1* que es relaciona amb la glucèmia en dejuni, destaca la manca d'associació significativa entre prendre metformina o fer un canvi en l'estil de vida i el fet de modificar el risc de desenvolupar diabetis en els 3,2 anys de seguiment de l'estudi (89).

En el mateix estudi es confirma la relació significativa de la variant rs340874 de *prox1* amb la incidència de diabetis, però, en aquest cas, en sentit contrari al que s'havia plantejat en l'estudi MAGIC en el qual s'incrementava el risc amb la variant.

Resulta interessant considerar un estudi en el qual es posa en evidència que l'expressió de la variant rs340874 de *prox1* està associada a un augment del risc d'hiperglucèmia induïda pel tractament antihipertensiu. Els autors contempen que els blocadors d'adrenoreceptors β i la tiazida poden generar un augment de risc de disglucèmia i diabetis quan es manifesta una hiperglucèmia a partir d'aquests tractaments antihipertensius.

Lecompte *et al* (90) a fi i efecte de determinar quin paper juga *prox1* en la diabetis tipus 2 determinen la conducta gènica i molecular en funció de variants de Prox1. Són analitzades 80 variants SNP. Tres SNP (rs340838, rs340837 i rs340836) han estat associats significativament amb els nivells en plasma de la insulina en dejú. Entre els resultats destaca que la disminució en l'expressió de *prox1* mitjançant RNA d'interferència en INS-1E, un tipus de cèl·lules beta de rates, mostra una disminució en 1,7 vegades de la secreció de la insulina vinculada a la glucosa. El conjunt de resultats vénen a indicar que és la reducció en l'expressió de *prox1* per a les variants cis-regulatòries la que genera una alteració en la secreció de la

insulina per a les cèl·lules beta i, així, la major susceptibilitat a la diabetis tipus 2.

Una afectació particular en la qual es veu afectada l'homeòstasi de la glucosa és LADA, que correspon a l'acrònim de *latent autoimmune diabetes in adults*. Aquesta malaltia es manifesta com un híbrid entre la diabetis tipus 1 i la tipus 2. La variant rs340874 s'ha manifestat, significativament, associada als pacients amb nivells alts d'anticossos de GAD.

❖ Hiperlipèmia

Una altra afectació susceptible de ser vinculada a *prox1* és la hiperlipèmia. En un estudi fet en teixit adipós de pacients amb hiperlipèmia familiar combinada es va evidenciar que l'expressió de *prox1* estava alterada en tots els individus estudiats (91), la qual cosa donava peu a considerar l'alteració de *prox1* com a vinculable a l'alteració lipídica. En la mateixa línia, cal tenir en compte que la hiperglucèmia s'ha relacionat estretament amb el metabolisme dels lípids i de les lipoproteïnes. Nivells alts de glucosa en dejuni s'han relacionat amb nivells alts de triglicèrids, amb la disminució de colesterol i en la formació de les LDL. Per aquest motiu, en un estudi fet en una cohort finlandesa d'homes no diabètics (92) s'ha volgut valorar la incidència de les variants gèniques vinculades a la diabetis tipus 2 o a la hiperglucèmia amb relació a les lipoproteïnes i la seva composició. El que s'ha pogut constatar és que la variant de *prox1* no manifesta cap relació amb les diferents subclasses de lipoproteïnes.

❖ Obesitat

L'obesitat també mostra relació amb *prox1* (93). En una cohort de famílies de Mongòlia, mitjançant estudis d'estratègia múltiple, que associen estudis de genotip amb relació a l'índex de massa corporal i el perímetre de cintura, així com estudis d'associació mitjançant GWAS, s'ha posat en evidència aquest lligam de *prox1* amb l'obesitat. El resultat d'aquesta estratègia d'estudi és la determinació que la localització 1q32, que té com gen més proper el gen de *Prox1*, és característica de l'obesitat. A més, aquesta localització d'incidència relacionada amb *prox1* es confirma en una cohort de famílies coreanes. Hi ha altres gens que també han estat relacionats amb l'obesitat, aquests són *ptrd* i *reln*. Els autors de l'estudi valoren que *prox1* és un gen particularment vinculat al perímetre de cintura en la població asiàtica.

❖ Regulació del cicle circadiari

Una darrera consideració clínica a fer és el paper que juga PROX1 en la coordinació del control del ritme circadiari (94). Certs factors de transcripció són capaços de regular gens relacionats amb el metabolisme de manera cíclica d'acord amb el seu propi ritme d'expressió en els teixits amb relació metabòlica. El factor de transcripció BMAL1 ja havia estat associat directament a la regulació d'alguns gens relacionats amb el metabolisme i el cicle circadiari. Arran d'un estudi GWAS s'han definit ERR α i PROX1 com

PROSPERO HOMEBOX PROTEIN 1

nous reguladors transcripcionals moleculars del cicle circadiari. Així doncs, s'ha determinat que BMAL, ERR α i PROX1 estan involucrats en el control tant dels bucles de regulació transcripcional per a molts components de vies metabòliques en el fetge com del seu ritme d'expressió.

3. **PODOPLANINA**

El gen *pdpn* es localitza en el cromosoma 1, més concretament en la posició 1p36.21. Abasta 34.492 bases, entre la 13.583.465 i la 13.617.957. A la *pdpn*, se li reconeixen 2.268 SNP. De la *Pdpn* es deriven 12 variants de transcripció (PDPN-001, PDPN-201, PDPN-002, PDPN-006, PDPN-007, PDPN-005, PDPN-004, PDPN-011, PDPN-010, PDPN-009, PDPN-003 i PDPN-008) i conté 32 exons (95).

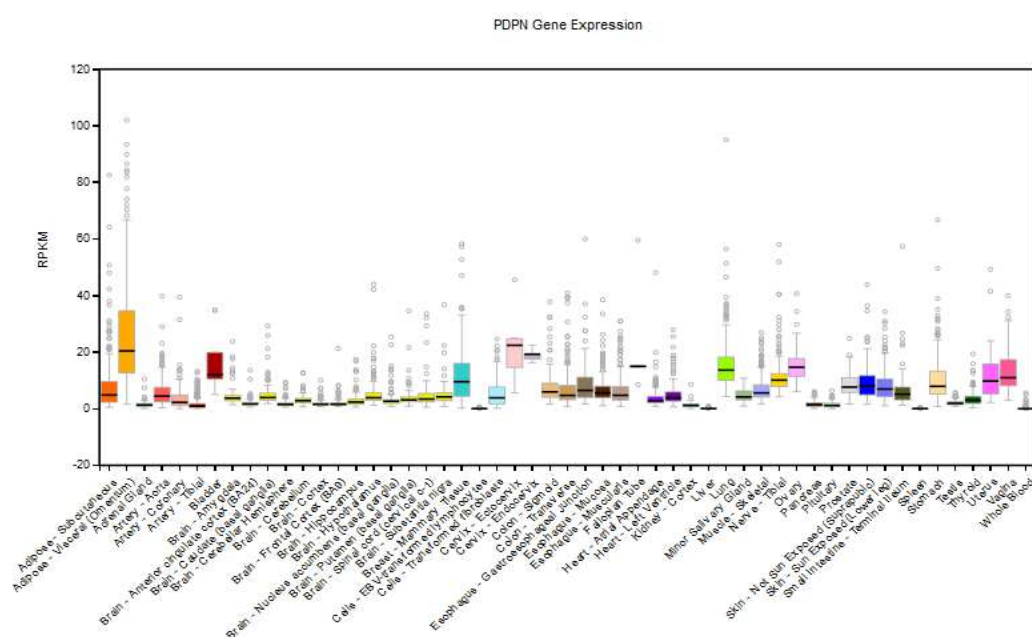
La *pdpn*, des d'un punt de vista filogenètic, igual que *prox1*, és un gen força conservat. Disposa de 44 ortologies, i amniota (~326 milions d'anys enrere) és l'ancestre comú més antic; la qual cosa indica que aquest gen és, des d'un punt de vista evolutiu, més recent que *prox1* (96).

La *pdpn* no disposa de paralogies descrites a dia d'avui (95).

3.1 L'expressió de *pdpn* en diferents teixits

Tal com es va considerar per a *prox1*, es descriuen els resultats de la quantificació de l'expressió de trams concrets del genoma (*expression quantitative trait loci* (eQTL)) que permeten reconèixer perfils d'expressió de manera diferenciada d'aquests trams en diversos teixits, de manera que es pot establir un catàleg de milers de variants d'eQTL, i definir afinitats i divergències en teixits d'un mateix individu, en el mateix tipus de teixit de diferents individus o entre teixits d'individus diferents, de manera diferenciada en molts teixits i òrgans (97). Seguint aquesta metodologia podem afirmar que *pdpn* s'expressa de manera diferenciada en diferents teixits (53) (figura 10).

Figura 10. Expressió de *pdpn* segons eQTL.



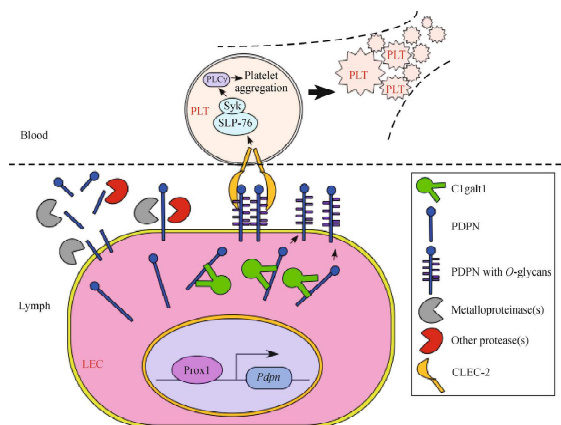
Per al present estudi destaca la major expressió de *pdpn* que hi ha en el teixit adipós, tant visceral com subcutani, més marcada en visceral, que no es donava en el *prox1*. És de destacar, també, la major expressió que es dona en pulmons, bufeta, ectocèrvix, ovaris, vagina i glàndula mamària, entre d'altres (97).

3.2 La PDPN en el desenvolupament dels vasos limfàtics

PROX1 s'ha manifestat imprescindible en el desenvolupament dels vasos limfàtics, però cal dir que dins el procés de desenvolupament dels vasos és igual d'important PDPN.

PROX1 facilita la transcripció de *pdpn*. C1GALT1 transfereix PDPN a la membrana tot facilitant-ne la modificació interna per les *1-derived O-glycans*. La deleció de la *c1galt1* comporta una alteració en l'expressió i funció de la O-glicoproteïna PDPN formada que deriva en una desestructuració dels vasos limfàtics i una funció limfàtica alterada (26). La PDPN formada així, amb *1-derived O-glycans*, permet l'activació de les plaquetes i la seva agregació, la qual cosa permet mantenir separats els vasos limfàtics dels vasos sanguinis. Yanfang Pan i Lijun Xia (98) ho han reproduït esquemàticament (figura 11).

Figura 11. Regulació de l'expressió de *pdpn* en les LEC reproduït de (98).



3.3 Malalties associades a alteracions de *pdpn*

Atenint-nos a la descripció de l'expressió de *pdpn* en diferents bases de dades en funció de la seva associació a diverses malalties, podem considerar que l'alteració de la seva expressió està associada a certes malalties (99).

❖ Inflamació crònica

És de destacar la seva relació amb els processos inflamatoris crònics. Es valora l'augment de l'expressió que es dona en les afectacions inflamatòries de budell i en els casos de colitis ulcerosa en els quals no hi ha hagut resposta a l'infliximab, un potent antiinflamatori i inductor de l'apoptosi. Cal notar que succeeix el mateix en malalts de malaltia de Crohn que tenen augmentada l'expressió de *pdpn* quan aquesta medicació no té efecte.

❖ Càncer

L'estudi de les afectacions relacionades amb *pdpn* posa de relleu la vinculació que hi ha entre l'expressió de *pdpn* i el càncer en general. Molts són els càncers associats a *pdpn*: còlon, cèrvix, mama, estómac, cervell, fetge, pulmó, pell, ossos, ovari, pròstata, ronyó, testicles, úter, esòfag, teixit connectiu i tiroides, entre d'altres (99). Tal i com descriuen Dang *et al* (100), la seva relació en el desenvolupament del càncer és ambivalent, és a dir que tant actua de supressor tumoral com estimulador de la progressió i de la metastasi tumoral, sense que hi hagi, de moment, una explicació concloent. Els autors descriuen algunes explicacions plausibles associades a les pròpies interaccions de *pdpn*. Valoren la transició de les cèl·lules epitelials en cèl·lules del mesènquima, procés que implica que les cèl·lules epitelials perdin la seva polaritat i la seva cohesió, i afavoreixin, així, la proliferació i la metastasi tumoral. També contempen el paper de la *pdpn* d'acord amb la seva implicació en el manteniment de la cohesió de conjunts cel·lulars quant aquests conjunts es mostren capaços de migrar vers teixits contigus. Una altra opció considerada és la que relaciona la *PDPN* amb l'agregació de les plaquetes. Les plaquetes s'agregarien per la interacció de *PDPN* amb *CLEC-2*. Aquest procés ha estat fortament vinculat a la progressió de la metastasi del càncer. També destaca la interacció de *PDPN* com a inhibidor, en els pulmons, de la secreció de *VEGFC*, un destacat inductor prolimfogènic a través de la senyalització de les *JNK*. Tot i que els autors manifesten la necessitat de disposar de més estudis al respecte, no deixa de ser un primer pas en la comprensió d'aquest comportament dual de *pdpn*. Una darrera forma d'interacció contemplada ja mencionada amb relació a *prox1*, que és de gran importància dins la concepció del present treball, és la relació que té l'expressió de *pdpn* en la limfogènesi. L'expressió ectòpica de *pdpn* promou la formació de nous vasos limfàtics.

Així, es constata que la seva expressió en les cèl·lules epitelials de càncer d'ovari es veu disminuïda mentre que, en la de les cèl·lules estromals del mateix càncer, està augmentada; un augment que també s'observa en els glioblastomes, entre altres tumors.

S'ha de destacar, també, la disminució, en aquest cas, de l'expressió de *pdpn*, quan es considera la resistència a la gefitinib, un tractament contra un tipus de càncer que té associat un excés d'EGF.

❖ Limfoedema

La *pdpn* esdevé un marcador propi de l'estructuració dels vasos limfàtics en la mesura que la seva coexpressió amb *prox1* és imprescindible per al desenvolupament dels vasos limfàtics (101). En aquest estudi, es va observar que la *PDPN* està present, també, en la membrana basal de l'epidermis i que la seva absència no afecta la diferenciació de l'epidermis, cosa que sí passa amb els vasos limfàtics. També es va contemplar que la

PODOPLANINA

PDPN promou la formació de cèl·lules d'adhesió, la migració i la formació del tub del conducte. De fet, esdevé com la base estructural d'assentament de la mateixa proliferació cel·lular a partir de la qual es donarà estructura al vas limfàtic. La pèrdua parcial de l'expressió de *pdpn* (ARN d'interferència) deriva en la disminució de l'adhesió de les cèl·lules endotelials limfàtiques. Els defectes que s'observen en models de ratolins *pdpn*^{-/-} indiquen una pèrdua de capacitat de transport per part dels vasos limfàtics, la manifestació d'un limfoedema congènit i la dilatació dels vasos limfàtics cutanis i intestinals.

Cal destacar, tal com ja s'ha comentat, que la distinció fenotípica dels vasos limfàtics depèn de l'expressió constant de *prox1* i *pdpn*. I cal tenir present, també, que la seva expressió està regulada, des del punt de vista transcripcional, en els vasos limfàtics per l'expressió de *prox1* (102).

4. LA LIMFOGÈNESI

La limfogènesi és el procés de formació de nous vasos limfàtics. Hi ha moltes molècules involucrades en tot el procés de la limfogènesi, unes molècules incideixen en l'estructura i altres en la seva funció. És, però, la secreció VEGFC i la fixació al seu receptor VEGFR3 el que acaba definint tot el procés de proliferació de les cèl·lules endotelials (13). Al mateix temps, VEGFR3 incideix retroactivament sobre l'expressió de *prox1* i es produeix d'aquesta manera, un control retroactiu continu entre PROX1, iniciador del procés, i VEGFR3, finalitzador del procés (103).

4.1 Regulació de la limfogènesi per mediació de l'àcid lisofosfatídic

Aquest factor de creixement vascular, VEGFC, és regulat, no de manera única, per la presència de l'àcid lisofosfatídic (LPA). La secreció de VEGFC per l'acció de l'LPA es pot donar, a través de dos dels seus receptors, LPA₁ i LPA₃, i deriva en la presència de COX-2, la qual afavoreix la translocació d'un receptor de membrana, l'EGFR que, a la vegada, activa l'NF-κB (104) (figura 12). L'activació d'aquesta cascada de senyalització intracel·lular possibilita que les cèl·lules endotelials derivin en un fenotip limfàtic.

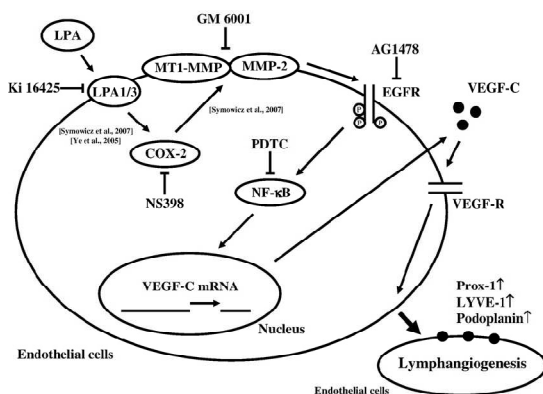


Figura 12. Mecanisme de regulació de la limfogènesi per part de les cèl·lules endotelials per mediació de l'LPA proposat per Lin *et al* (104).

L'activació de les cèl·lules endotelials per mediació de l'LPA genera, també, la secreció de certes citocines (IL-8 i MCP-1) que en coacció amb el mateix LPA, poden afavorir o inhibir interaccions entre l'endoteli i els monòcits circulants (105) i que poden estar involucrades en diferents processos fisiopatològics, com és el de l'aterosclerosi (106).

Segons descriu D'Aquilio (107), en la seva tesi l'LPA és un fosfolípid hidrosoluble que es compon d'una columna central de glicerol amb un grup hidroxil en la posició sn-2 o sn-1, un grup fosfat a la posició sn-3 i un àcid gras saturat o insaturat en la posició sn-1 o sn-2. L'LPA s'ha considerat com un pas intermediari en la formació de lípids neutres com són els triglicèrids i els fosfolípids. Els LPA que trobem al sèrum poden contenir tant una cadena llarga d'àcid gras saturat com insaturat. El que sí sembla és que els LPA

amb un àcid gras insaturat es manifesten més actius biològicament (107). La diversitat d'acció de l'LPA (108) pot ser justificada per la diferent composició de l'LPA per part de l'àcid gras que el forma.

La producció de l'LPA es pot donar tant a dins com a fora de les cèl·lules. Sembla ser que l'LPA més bioactiu seria el que es forma a l'exterior. L'activació cel·lular que es dona en la coagulació sanguínia, en la curació de ferides o en la inflamació augmenta la producció i l'activitat de l'LPA (107). Una meitat de l'LPA del sèrum es produiria per l'activació de les plaquetes. L'altra meitat ho faria de manera independent, o sigui, sense activació de les plaquetes.

S'han descrit diferents vies de producció de l'LPA (108, 109). L'activació de les plaquetes facilita l'alliberament de fosfolípids que provenen de la membrana. Aquests fosfolípids deriven en la formació de LPC, LPE i LPS, tots ells precursors de la formació de l'LPA -via 1.

La conversió de PC sèrica en LPC per mediació de la LCAT, un enzim vinculat a la fisiopatologia de certes malalties de l'àmbit metabòlic, també incideix en la producció de l'LPA -via 2.

L'acció de certs enzims sobre l'àcid fosfatídic (PA) que provenen de les plaquetes també formaria LPA. Aquesta via és independent de l'activació de les plaquetes -via 3.

I la darrera via de producció que s'ha proposat és la que implica la formació d'LPA a partir d'LPC provinent dels eritròcits -via 4 (109).

Actualment, sabem que existeixen altres fonts d'LPA. Les cèl·lules mesangials, els fibroblasts i certs tipus de cèl·lules cancerígenes (110) també produeixen LPA, així com els adipòcits (111, 112) i les lipoproteïnes (113). Cèl·lules implicades en la immunitat (macròfags, cèl·lules dendrítiques, mastòcits) (114) també secreten LPA, la qual cosa fa pensar en la possible interacció de l'LPA en la resposta immunitària.

L'LPA té un paper immunoregulator per la capacitat que té d'induir una resposta inflamatòria local o sistèmica, mitjançant l'activació que fa dels macròfags així com dels limfòcits T i B (107). Al mateix temps, però, se li atribueixen propietats proinflamatòries que caracteritzarien certes malalties associades a inflamació, incloent també el càncer (115).

No està de més considerar quins lligams té l'LPA en l'àmbit metabòlic. L'LPA s'associa a l'obesitat per diferents vies. L'LPA, com ja s'ha esmentat, també és produït pels adipòcits. Això s'ha determinat tant *in vitro* com *in vivo* (111). Inicialment es va considerar que l'LPA augmentava la proliferació dels preadipòcits en cultiu per l'acció del seu receptor LPA₁ (116). Estudis ulteriors van constatar que la regulació de la proliferació de preadipòcits està marcada, també, per l'alliberament per part dels adipòcits d'autotaxin, un enzim ancorat a la membrana cel·lular i que facilita la formació d'LPA a partir d'LPC. L'autotaxin està fortament augmentada en els adipòcits de

ratolins db/db genèticament obesos i diabètics (117). D'altra banda, aquest mecanisme es neutralitza quan l'adipòcit és madur, la qual cosa ha portat a pensar que la producció local d'LPA pot exercir un efecte inhibidor continu en el desenvolupament del teixit adipós (118). Aquests estudis fan pensar que l'LPA tindria relació amb el control de la proliferació del teixit adipós en l'obesitat.

Una altra relació a considerar és la que es dona entre l'LPA i la lesió ateroscleròtica. La lesió ateroscleròtica s'inicia amb la proliferació d'una capa neointima en l'àmbit de l'artèria. Ulteriorment, apareixen implicats altres mecanismes: l'activació de les plaquetes, l'activació de les cèl·lules endotelials i la seva lesió, i la presència d'un infiltrat inflamatori, en són alguns. L'LPA s'ha vinculat a la fisiopatologia de l'aterosclerosi pel fet que, a la placa d'aterosclerosi, s'hi acumula LPA i que les LDL oxidades són productores d'LPA (119). S'ha constatat que l'LPA activa de manera directa les PPAR γ i que fan de mitjanceres en la transcripció de les CD36 (120). El CD36 és un *scavenger receptor* (SR) de membrana que està present en els macròfags i que permet la captació de les LDL oxidades i l'acumulació de lípids en l'àmbit intracel·lular, i es vincula, a més a més, a la formació de cèl·lules escumoses en la placa. Aquesta via de captació de lípids no és l'única i tampoc la preferent en el cas dels macròfags en els quals s'associa l'efecte de l'LPA a una major expressió d'SR-A que de CD36 (121).

Tenint en compte el paper que juga la FABP4 en l'aterosclerosi cal saber que la FABP4 és un transportador de l'LPA intracel·lular (122) i que s'ha vinculat de manera directa amb l'acumulació de l'LPA en la progressió de la lesió de l'aterosclerosi (123). L'alliberament de FABP4 per part dels adipòcits i la seva presència en plasma (124) permet estimar un possible rol en el transport de l'LPA en l'àmbit plasmàtic. No sorprèn, doncs, donada la vinculació entre l'LPA i la limfogènesi, que mutacions en FABP4 apareguin associades als limfoedemes primaris (125).

La regulació de la glucosa en sang ha estat vinculada, també, a l'LPA (126) i a un dels seus precursors (127). Com ja s'ha comentat, existeix un augment de l'autotaxin en els adipòcits de ratolins db/db genèticament obesos i diabètics (117), la qual cosa possibilita l'opció d'un vincle entre la concentració d'aquesta molècula en sang i la diabetis.

4.2 Altres formes de regulació de la limfogènesi

Una altra forma d'estimulació de la limfogènesi és mitjançant la secreció de VEGFC per part dels macròfags. En rates s'ha constatat que una dieta rica en Na⁺, inductora d'hipertensió, genera l'acumulació de Na⁺ en la pell, en la seva porció intersticial. Els macròfags, per la secreció de VEGFC, generen un augment de la densitat i la hiperplàsia de l'entramat limfàtic (128). Aquest mecanisme està supeditat a la composició de la matriu extracel·lular, la qual depèn, a la vegada, de la capacitat del drenatge del teixit intersticial per part dels vasos limfàtics (129).

Una altra implicació dels macròfags en la limfogènesi ve donada pels macròfags CD11b+. Aquests macròfags esdevenen elements constitutius dels vasos limfàtics en la seva proliferació quan es donen condicions proinflamàtiques (130). Pel que sembla, els macròfags formen agregats que s'intercalen entre les cèl·lules endotelials limfàtiques i augmenten la capacitat de drenatge per part dels vasos limfàtics (131).

Cal tenir present que la presència de VEGFC no és l'únic requisit per a la formació dels vasos limfàtics.

La migració de les cèl·lules dendrítiques (DC) s'ha destacat, també, com un condicionant de la limfogènesi. La disminució de la capacitat de migració de les DC en la perifèria, com es dona en la retenció intersticial, genera estímuls per a la limfogènesi (132). La migració de les DC està afectada de manera sistemàtica en la dislipèmia que s'observa en ratolins apoE^{-/-} que és la que s'associa a l'aterosclerosi (133). Aquest procés es deu al PAF o a les LDLox que tenen un efecte mimètic al PAF. Aquest fenomen és neutralitzat per les HDL o per *HDL-associated PAF acetylhydrolase* (PAFAH). En el mateix model de ratolí (apoE^{-/-}), que és hipercolesterolèmic, s'han constatat alteracions estructurals i funcionals dels vasos limfàtics (134). Aparentment, la retenció de colesterol en circulació té un efecte desestructurador en els vasos limfàtics. Això es donaria per una falta de cèl·lules musculars llises, especialment en els vasos limfàtics col·lectors. FOXC2, VEGFR-3 (receptor de VEGFC) i angiopoietina-2/Tie-2 s'han descrit com a elements claus en el control del reclutament de cèl·lules musculars llises per part dels vasos limfàtics. La sobreexpressió de *foxc2* en model animal corregeix la hipertrigliceridèmia, la resistència a la insulina, el flux d'àcids grassos lliures i l'obesitat (135). Estudis de lligament genètic vinculen *foxc2* amb la HFC (136) i amb l'obesitat. Una mutació d'aquest gen s'associa, també, a la síndrome de distiquiasi limfoedema (137), signe d'un mal funcionament limfàtic. FOXC2 té la capacitat de controlar l'expressió d'Ang-2 en els adipòcits. Aquesta via de senyalització Foxc2-Ang-2 controla la funció vascular del teixit adipós i és determinant en l'augment del metabolisme (138) del teixit adipós.

Moltes són les molècules que, de manera directa o indirecta, es veuen involucrades en el procés de desenvolupament, control i consolidació de l'estructuració dels vasos limfàtics, així com en el seu funcionament. Seria inabastable abordar-les totes, però sí que cal fer menció que existeixen.

Un aspecte a considerar de la limfogènesi que pot ser interessant a l'hora d'abordar noves vies de recerca, així com terapèutiques, és la relació que té la limfogènesi amb el flux intersticial. El flux intersticial precedeix el desenvolupament limfàtic (139, 140), la qual cosa es pot interpretar com que el flux intersticial s'envolta de cèl·lules endotelials per formar el vas limfàtic.

La mateixa relació del flux i la limfogènesi va associada a la mateixa estructuració dels vasos limfàtics, ja que el mateix flux depèn de la funció

drenant dels vasos limfàtics. Les cèl·lules endotelials que componen els vasos limfàtics disposen de punts de fixació específics (filaments d'ancoratge de Leak) en els quals s'acumula un major nombre de filaments intersticials. Aquest fet permet al vas limfàtic, en funció de l'equilibri de pressions en l'àmbit de l'interstici, facilitar l'obertura o el tancament d'una cèl·lula endotelial amb relació a les cèl·lules veïnes (141, 142). Més enllà de la mateixa vinculació entre estructures, interstici i vas limfàtic, la relació es complementa en el mateix àmbit funcional, de manera que queda supeditada una a l'altra. Un exemple és la relació entre tots dos que es contempla en l'exercici físic. L'existència d'aquests filaments de Leak facilita entendre per què la captació de líquid intersticial i el flux limfàtic augmenten amb l'activitat física (129, 143, 144).

5. L'ENTRAMAT LIMFÀTIC EN LA REGULACIÓ DEL METABOLISME

Els vasos limfàtics poden intervenir en la regulació del metabolisme des de molts vessants. Ho poden fer tant amb relació a la quantitat i qualitat del líquid intersticial que són susceptibles d'absorbir com a partir dels efectes que es poden derivar del pas d'aquest líquid a través dels vasos i nòduls limfàtics.

5.1 Valoració de la regulació limfàtica del metabolisme

L'entramat limfàtic, en general, i el mesentèric, en particular, tenen la peculiaritat d'esdevenir una via de regulació metabòlica en la mesura que part de les molècules que poden incidir en la regulació tenen un passatge limfàtic. Al budell es fa evident aquesta opció en la mesura que, en funció d'una major o menor capacitat drenant per part dels vasos limfàtics, el camí que agafa el líquid absorbit de la llum intestinal s'encamina a un pas limfàtic o hepàtic. Un mecanisme d'incidència en l'àmbit metabòlic per part dels vasos limfàtics seria per la relació directa o indirecta que es pot donar entre les LEC i les molècules que s'absorbeixen. Una altra possibilitat que es contempla és la que deriva de la síntesi, per part de l'entramat limfàtic, de molècules que intervinguin en la regulació del metabolisme.

Si considerem la incidència de l'entramat limfàtic en el metabolisme dels lípids, segons els comentaris fets fins ara i com es podrà veure en l'apartat de l'absorció de lípids, és en l'anàlisi de la transició dejuni-ingesta en què s'observa la manera en què l'entramat limfàtic incideix en un primer moment en la distribució i metabolització dels lípids.

El pas de les lipoproteïnes riques en triglicèrids per l'intestí, en la transició entre el dejuni i la ingesta, està lligat a un seguit de processos, tal com descriu Xiao (145). A partir de la ingesta es dona l'absorció dels greixos i la secreció dels quilomicrons. La major presència de quilomicrons provoca una disminució en la lipòlisi en el teixit adipós, la qual cosa té com a conseqüència una disminució en la mobilització dels àcids grassos lliures provinents del teixit adipós cap al fetge i a l'intestí. Això afavoreix una major absorció dels àcids grassos lliures provinents de la ingesta per part del teixit adipós. Els quilomicrons residuals, romanents, són captats, en part, pel fetge, i hi ha una major presència d'àcids grassos en circulació provinents de la lipòlisi dels lípids ingerits que no han estat emmagatzemats al teixit adipós. Al mateix temps, s'accentua la utilització de les VLDL i, possiblement, una major síntesi de quilomicrons.

A partir d'aquest moment, el que es dona és un augment de la de *novo* lipogènesi, una major formació de gotes lipídiques en l'àmbit hepàtic i una menor oxidació dels àcids grassos en detriment d'una major esterificació dels mateixos àcids en el fetge.

El metabolisme glucídic també està relacionat amb l'estructuració i funció de l'entramat limfàtic. En el mateix procés d'ingesta en podem veure l'associació. La mateixa transició dejuni-ingesta passa per certs canvis hormonals (145). D'una part, hi ha l'alliberament de glucosa i de GLP1 estimulat, en part, per la insulina. I, de l'altra, es dona una supressió de la secreció del glucagó per part del pàncrees. Aquestes variacions hormonals afecten les lipoproteïnes. Pel que fa als quilomicrons, la GLP1 n'estimula la secreció mentre que la GLP2 i la insulina la suprimeixen. Pel que fa a les VLDL la seva secreció es veu reprimida per l'acció de la insulina i el glucagó. L'estudi de D'Alessio *et al* (146) del contingut limfàtic en dejuni i en l'àmbit postprandial en rates serveix de base per definir quina implicació pot tenir l'entramat limfàtic en la regulació metabòlica. La limfa mesentèrica conté insulina, glucosa, GLP1 i PYY, com també podem trobar-ne en el plasma, però hi ha diferències entre les concentracions relatives de limfa i plasma pel que fa a la insulina, PYY i GLP1. Amb relació a la insulina, es considera que la seva presència en la limfa deriva de la filtració provinent dels capil·lars. El fet que les concentracions d'insulina en plasma provinent de la vena porta siguin sempre més altes que les que provenen de la limfa i que el pic d'insulina sigui de 30 min en la vena porta i de 60 min en la limfa mesentèrica fa pensar que l'origen de la insulina limfàtica és la filtració capil·lar. GLP1 té una major concentració en el compartiment limfàtic que en plasma, fet que fa pensar més en un drenatge limfàtic directe de la mucosa intestinal que en un pas sanguini que derivi, després, en limfa. Aquesta més alta concentració de GLP1 respon, segons es pensa, a la necessitat d'un entorn protegit davant de la DPP-IV, un enzim que comporta una ràpida desactivació del GLP1. PYY manifesta una situació intermèdia entre la insulina i el GLP1.

La síntesi de GLP1 es produeix en l'àmbit de les cèl·lules L de l'intestí prim distal i del còlon per la ingesta de carbohidrats i lípids (147). L'alta concentració postprandial de GLP1 així ho demostra, tot i que els carbohidrats ho facin més tardanament que els lípids. La ingesta simultània de carbohidrats i lípids produeix un efecte combinat acumulatiu. Aquesta secreció es vincula, tal com es descriu en el mateix article, a la secreció de la insulina d'una manera glucodependent. GLP1 té altres efectes anti-diabètics com és la supressió del glucagó i l'alentiment del buidament gàstric. Té un efecte central directe de reducció de la ingesta que és contemplat per l'efecte que genera la injecció de GLP1 o d'agonistes del receptor GLP1R en l'àmbit intracerebral. S'ha observat, també, que els agonistes de GLP1R promociónen la biosíntesi d'insulina, la proliferació cel·lular i la supervivència de les mateixes cèl·lules mitjançant l'activació de vies antiapoptòtiques.

GLP1 té una relació directa dins de l'entramat limfàtic. El que s'ha pogut observar injectant GLP1 en l'àmbit intravenós en rates és que hi ha una disminució del flux limfàtic, del seu contingut en triglicèrids, així com una menor producció d'apo B i apo A-IV (148), la qual cosa ha fet pensar en un

procés d'alentiment del mecanisme d'absorció de lípids en l'àmbit intestinal. L'observació d'una major acumulació de triglicèrids en la mucosa i la disminució de la secreció de quilomicrons en limfa corroboren la idea que és una pèrdua de capacitat drenant la que deriva de la presència de més GLP1 en circulació.

És interessant considerar els resultats que deriven de la injecció en rates de GLP1 en l'àmbit perifèric (149). Fruit de la injecció perifèrica, intraperitoneal o en l'àmbit de la vena porta, hi ha una disminució de la quantitat d'ingesta. La injecció de GLP1 en l'àmbit intrahepàtic no en modifica l'efecte, estigui la rata vagotomitzada o no, cosa que sí passa quan es fa una injecció intraperitoneal. Quan les rates estan vagotomitzades la seva ingesta es manté. Això implica que l'efecte saciant del GLP1 observat en les injeccions intraperitoneals es dona per una estimulació directa de la senyalització aferent vagal. I que l'observada per la injecció intravenosa seria induïda per una acció directa sobre el cervell.

Cal, doncs, reconèixer la importància major que té el GLP1 en la regulació del metabolisme i la importància major que pot tenir la capacitat drenant de l'entramat limfàtic d'aquesta hormona, ja sigui per protegir-la de la seva degradació o ja sigui per a la seva mobilització, en el mateix procés de metabolització.

Wang (150) comenta que l'administració de lípids, sobretot aquells de cadena llarga que, com ja s'ha comentat, són els vinculats amb el pas limfàtic, inhibien la ingesta d'aliments. Del seu estudi, en ressalta que l'intestí prim exerceix un control directe sobre el metabolisme dels glúcids mitjançant un mecanisme de sensibilitat als lípids que, per una acció neuroendocrina intestí-cervell-fetge, genera una disminució de la producció de la glucosa hepàtica, manté l'equilibri energètic i inhibeix la ingesta d'aliments. Tant els lípids absorbits per part de l'intestí, que activen neurones sensibles als lípids que connecten directament amb el nucli del tracte solitari, com la presència de nutrients en l'àmbit hipotalàmic, exerceixen un eix d'inhibició de la producció de la glucosa cerebrohepàtica que en manté l'homeòstasi. Aquesta observació cal tenir-la present en la mesura que una disminució en la mobilització dels àcids grassos de cadena llarga per part de l'entramat limfàtic pot comportar una senyalització central no indicadora de la quantitat d'aliments ingerits sinó de la capacitat mobilitzadora dels lípids per part dels vasos limfàtics mesentèrics, lacteals. Això reforça la idea que una mala captació limfàtica pot generar una deficient senyalització central ja sigui de manera directa com indirecta.

És destacable que la interacció entre l'entramat limfàtic i la regulació de la glucèmia és bidireccional. Sense anar més lluny, la insulina s'ha relacionat directament amb la regulació del flux limfàtic i amb la captació del líquid intersticial (151). El subministrament d'insulina en un model animal, rates diabètiques, va comportar un augment del flux limfàtic i de la captació de líquid intersticial. Cal mencionar, també, una relació directa entre la diabetis i l'estructuració dels vasos limfàtics (152). El que s'observa en aquest cas

és que en la diabetis hi ha afectada la permeabilitat dels vasos limfàtics per una disminució de l'acció de NO, al mateix temps que es constata que la inhibició de la fosfodiesterasa 3 permet mantenir la integritat dels vasos limfàtics.

Una altra estimació que es precisa és la de conèixer la relació que manté l'entramat limfàtic en la regulació del metabolisme de les proteïnes. El metabolisme proteínic és força complex perquè la mateixa estructuració de la proteïna ho és. Els elements constitutius de les proteïnes, els aminoàcids, esdevenen la moneda d'intercanvi dins de l'organisme per fer una massa proteínica suficient, funcional i adequada a les exigències estructurals i funcionals de l'organisme. Això requereix mantenir un cert nombre d'aminoàcids en circulació per tal de satisfer les necessitats de síntesi que es donin. En el context extrem de dèficit energètic, l'organisme pot fer ús de les proteïnes com a font d'energia, però sempre prioritant al màxim les altres fonts d'energia en la mesura del que sigui possible. La regulació metabòlica de les proteïnes, disponibilitat, ús, degradació... està molt lligada a la transaminació, entre altres processos, que és la transferència dels grups amino entre els diferents aminoàcids. Això permet regular el metabolisme proteínic cap a les necessitats que en cada circumstància es poden generar i facilitar la degradació d'un aminoàcid per la formació d'un altre, buscant sempre l'opció més eficient.

Una particularitat que es dona, i que és de major interès, és que hi ha un cert nombre d'aminoàcids, els anomenats essencials, que no es poden sintetitzar a partir de la transformació d'altres aminoàcids. Això obliga a la seva absorció mitjançant la dieta. Són nou els aminoàcids la presència en l'organisme dels quals depèn de la seva correcta absorció en l'intestí. És en aquest punt en què l'entramat limfàtic pot exercir un paper primordial directe pel metabolisme de les proteïnes. El manteniment de la integritat de la via d'entrada dels aminoàcids essencials és una necessitat bàsica de regulació i pot afectar, de manera específica o global, qualsevol part de l'organisme. Això es justifica pel fet que qualsevol requeriment d'aminoàcids essencials per part d'un òrgan que no quedés cobert afectaria la dinàmica funcional del mateix òrgan amb majors o menors implicacions. L'estructuració i el funcionament de l'intestí depèn del bon funcionament de l'entramat limfàtic i és aquest grau de dependència funcional de l'intestí amb l'entramat limfàtic el que defineix de manera indirecta la relació de l'entramat limfàtic amb el metabolisme de les proteïnes.

A més a més, si considerem el fet que tant el metabolisme lipídic com el glucídic estan modulats, en part, per l'entramat limfàtic, existeix la possibilitat que, en la mesura que no es doni una suficient aportació energètica per part dels glúcids i lípids, aquesta aportació hagi de ser coberta per les proteïnes.

La mobilització de les proteïnes per part de l'entramat limfàtic, manifesta un altre aspecte a considerar. En aquest sentit esdevé de gran importància valorar la hidrodinàmica intersticial, la valoració del pas del fluid a través de

l'espai extracel·lular. Aquest pas ve marcat per la capacitat de filtració que tenen els capil·lars, per l'estructuració de l'espai intersticial i per la capacitat d'absorció/reabsorció dels mateixos capil·lars i de l'entramat limfàtic.

El sentit hidrodinàmic del sistema, vers la filtració o vers l'absorció/reabsorció del contingut intersticial, està fortament determinat des d'un punt de vista funcional, per la regulació que es faci del contingut de proteïnes. Un exemple descriptiu d'aquesta dinàmica és el que ve donat per l'estudi fet per Manning *et al* (153) en què es contextualitza en model animal, en gossos, una situació d'hiperproteïnèmia crònica. En aquesta circumstància, hi observem una notable disminució del flux limfàtic, una disminució del transport de proteïnes i un augment de la concentració de proteïnes en l'àmbit limfàtic que associen a una disminució del flux transcapil·lar de proteïnes. En altres paraules, es podria considerar que es dona com un alentiment de la hidrodinàmica intersticial. En aquestes circumstàncies, en un altre estudi de Manning (154), un increment continu de la hidratació deriva en un augment del volum, en hipervolemia i en hipertensió.

Segons el que s'ha descrit fins ara i sense pretendre entrar en masses més detalls, es pot considerar que l'entramat limfàtic té la capacitat de *per se* d'incidir de manera directa o indirecta sobre el metabolisme. La seva estructuració i el seu funcionament esdevenen, en la meua opinió, una variable necessària d'estudi de la regulació metabòlica.

5.2 L'entramat limfàtic en la regulació dels factors de risc metabòlic

Moltes alteracions metabòliques s'han associat a diferents factors, anomenats de risc pel que comporten en el seu desenvolupament de les malalties metabòliques. L'entramat limfàtic s'ha relacionat de manera més o menys directa a la regulació de molts d'aquests factors. És per aquest motiu que es fa necessari considerar-los i veure quina implicació té l'entramat limfàtic en tots ells.

5.2.1 La regulació de la pressió arterial

Abans de considerar aquesta manifesta relació dels vasos limfàtics amb la hipertensió caldria fer esment de l'estructuració i el funcionament de l'interstici. L'interstici està compost per una xarxa fibrosa de col·lagen que dona suport al conjunt de la matriu extracel·lular, un sistema fibrós de microfibril·les d'elastina, una substància fonamental i fluid intersticial. La substància fonamental és l'element bàsic de relació entre les cèl·lules constituents de l'interstici i la filtració provinent dels capil·lars que constitueix el fluid intersticial. La substància fonamental està composta per proteoglicans, estructures moleculars que contenen un nucli proteínic i glicosaminoglicans (GAG), entre els quals l'hialurà és el més comú (129, 155). En aquest cas, es valora el fet que l'interstici tingui relació en la regulació del contingut hídric tant en l'interstici com en el compartiment

vascular i que la mediació d'aquesta relació vingui donada per la capacitat drenant de l'entramat limfàtic.

Des del punt de vista funcional s'ha constatat que no hi ha correlació entre la ingesta de sodi i la retenció d'aigua en l'àmbit intersticial. Però sí que s'observa un moviment de líquid des de l'interstici cap a l'espai intravascular, fet que comporta un augment de la pressió arterial (156). Aquesta observació posa en evidència l'existència d'un mecanisme de reserva de sodi, en l'àmbit extracel·lular, que es manté inactiu des del punt de vista osmòtic (157). Aquest mecanisme respon a la fixació del sodi per part dels GAG i a la capacitat d'exercir hiperosmolaritat segons les circumstàncies que es presenten (158-160). Concomitant al reservori neutre de sodi, hi ha un mecanisme de resposta a l'estrès osmòtic que consisteix en l'activació d'una proteïna, TonEBP (*tonicity-responsive enhancer binding protein*), en cèl·lules del sistema mononuclear fagocític (MPS); un grup de cèl·lules de monòcits; macròfags, i cèl·lules dendrítiques que actuen en resposta a agressions a l'organisme. Les cèl·lules MPS activades d'aquesta manera modulen l'estructuració i la funció limfàtica a través de la secreció de VEGFC (128, 161, 162) que, com ja s'ha comentat en el capítol de l'embriologia, intervé de manera directa en la formació de nous vasos limfàtics, en la limfogènesi.

Un aspecte que caldria tenir en compte en aquesta regulació i que, de moment, no s'ha valorat és que les GAG, que estructuren l'interstici estan mobilitzades per l'entramat limfàtic en associació al flux limfàtic. D'aquesta manera la regulació que pot fer l'entramat limfàtic de la pressió sanguínia no vindria únicament de la mobilització que es pugui fer del sodi i de les cèl·lules MPS sinó també per la dinàmica estructural que tingui l'interstici vinculat a la capacitat drenant que té l'entramat limfàtic. Aquesta regulació vindria fortament associada al moviment. L'entramat limfàtic veu augmentada la seva capacitat drenant amb el moviment (144). En aquest sentit apareix la idea que la mateixa dinàmica de renovació del contingut de glicosaminoglicans pot ser clau en tot el mecanisme regulador.

5.2.2 La regulació del colesterol

Un altre exemple de regulació per part de l'entramat limfàtic és el que es desenvolupa entorn del colesterol. Swell (163), en la dècada dels anys 60, analitzant l'activitat específica del colesterol lliure i de l'èster de colesterol en el plasma, en l'entramat limfàtic, en el fetge i en l'intestí, evidencià que gran part del colesterol esterificat provenia de l'entramat limfàtic. I que, en l'eliminació del colesterol esterificat limfàtic, el fetge n'assumia el subministrament.

Kellner (164), estudiant conills hiperlipèmics, constatà que hi ha un augment de la concentració de colesterol i fosfolípids en els limfàtics. Això va fer pensar que es podien formar dipòsits de lípids en els òrgans, com podria ser el cas de les artèries, i que podia derivar en l'aterosclerosi. Sloop *et al* (165) descriuen que tant en l'interstici com en els limfàtics hi ha

lipoproteïnes HDL, però de característiques morfològiques diferents. Observen que hi ha una diferent presència d'apoproteïnes en comparació amb el plasma. I manifesten la importància que consideren que té l'entramat limfàtic en la mobilització del colesterol perifèric. El que plantegen és que les situacions amb les quals es trobi l'entorn immediat de les cèl·lules pot marcar l'entrada o la sortida del colesterol de les mateixes cèl·lules i que pot establir el condicionant inicial del procés de retorn dels excedents de colesterol. Consideren que, segons la situació que es donés, es podria derivar en una major o menor susceptibilitat dels organismes a l'aterosclerosi.

Lim *et al* (134), més recentment, constaten que en els ratolins hipercolesterolèmics es dona una desestructuració de l'entramat limfàtic, hi associen, a més a més, un drenatge deficient de l'interstici, fet que comporta una retenció perifèrica del líquid intersticial, del qual es deriva la presència d'edema. Els mateixos Lim *et al* (166), en estudis ulteriors, amb el mateix model de ratolins hipercolesterolèmics, han posat de manifest que el transport revers del colesterol (RCT -*reverse cholesterol transport*-), procés de reconducció de l'excés de colesterol de la perifèria, mitjançant les lipoproteïnes HDL, vers el fetge per a la seva excreció, depèn en gran mesura de la capacitat drenant dels vasos limfàtics. Constaten, també, que existeix una reversibilitat en la desestructuració i alteració funcional dels vasos limfàtics quan es corregeix la hipercolesterolèmia. I, així mateix, evidencien que la millora en la capacitat drenant per part dels vasos limfàtics genera una disminució en l'acumulació del colesterol en l'àmbit dels teixits, i que el drenatge limfàtic és un requisit per a la mobilització de les HDL des dels teixits perifèrics cap a la sang tot mostrant que la utilització d'ezetimibe (un inhibidor de la captació intestinal del colesterol) o de VEGFC la milloren. Destaquen, a més, els resultats que indiquen que les LEC disposen de transportadors d'HDL, el més utilitzat dels quals és l'SR-BI. De l'anàlisi del conjunt d'aquests estudis, se'n desprèn que l'entramat limfàtic està vinculat a la regulació dels primers passos de la RCT i que mentre es transporta el colesterol per l'entramat limfàtic hi ha una interacció entre les LEC i el colesterol lligada a la presència d'SR-BI.

Una de les primeres constatacions clíniques en les quals es posa en evidència una relació entre la disfunció metabòlica, en aquest cas la hipercolesterolèmia, i la disfunció limfàtica deriva d'un estudi de l'expressió gènica fet en teixit adipós de pacients amb hiperlipèmia familiar combinada. En aquest cas es descriu que hi ha una afectació en l'expressió de certs gens que estan relacionats amb l'estructuració limfàtica (91).

5.2.3 La regulació de la inflamació

En la regulació del colesterol hi ha altres mecanismes que intervenen en els quals els vasos limfàtics tenen un paper important. Sense anar més lluny, si considerem l'evolució de l'aterosclerosi, està fortament lligada a la resposta inflamatòria que exerceix la paret vascular. L'aterosclerosi es caracteritza

per la presència en la paret vascular de diferents tipus cel·lulars, per l'acumulació de colesterol i per la proliferació de cèl·lules musculars llises (167).

Si valorem el paper de les HDL en l'aterosclerosi podem considerar, tal com comenta Kaji (168), que les HDL acompleixen funcions antiinflamatòries així com certes interaccions amb el sistema immunitari, tant innat com específic, que es vinculen a la mateixa evolució de l'aterosclerosi. La implicació de les HDL en la RCT està lligada a la vasodilatació, a la reducció de l'oxidació de les LDL, a la inflamació, a l'apoptosi, a la trombosi i a la infecció.

Tenint en compte la implicació directa que hi ha entre la presència d'HDL i l'evolució de la placa d'ateroma, es va pensar que augmentant la concentració d'aquestes lipoproteïnes es podria revertir la fisiopatologia de l'aterosclerosi. Diferents assajos clínics es van dissenyar amb la finalitat d'augmentar la concentració de les HDL en sang mitjançant la inhibició de la CETP, però el fet que, malgrat augmentar la concentració de les HDL, hi hagués una major incidència d'esdeveniments cardiovasculars va fer aturar els assajos (169). Una altra sèrie d'assajos orientats a augmentar la concentració d'HDL en sang mitjançant la utilització de l'àcid nicotínic no ha suposat cap benefici d'ús (170, 171); la qual cosa ha fet aturar els assajos. Estudis genètics confirmen que increments en la concentració d'HDL en plasma no sembla que disminueixin el risc de patir un infart de miocardi (172). Tot plegat, ha qüestionat la veritable acció de les HDL en el procés fisiopatològic de l'aterosclerosi. Aquest qüestionament porta a considerar l'acció que es dona en la *macrophage RCT*, la qual Martel *et al* (173) descriuen com a sortida del colesterol emmagatzemat en els macròfags que han derivat en cèl·lules escumoses. El procés que es dona és que el colesterol present en els macròfags és desesterificat i passa, com a colesterol lliure, a les HDL. Es comenten diferents estudis que evidencien la importància que té una adequada capacitat d'alliberament del colesterol provinent dels macròfags. Els transportadors ABC i, més concretament, els ABCA1 i ABCG1 són els involucrats en la sortida del colesterol dels macròfags. Havent transferit el colesterol a les HDL, les HDL s'han de mobilitzar de la placa d'ateroma. Estudis recents en ratolins han mostrat la importància major que té l'entramat limfàtic en tot el procés de mobilització de l'HDL (174, 175). S'ha evidenciat que la major presència d'HDL no era raó *sine qua non* de regressió de la placa d'ateroma, sinó que ho era, més aviat, la manifesta capacitat drenant de l'entramat limfàtic. Altres estudis, valorats per Martel *et al* (173), indiquen una possible contradicció pel fet que hi hagi una major densitat de vasos limfàtics en diverses afectacions cardíques (176, 177). Aquesta contradicció podria ficar-se en entredit quan es valora que la mobilització no està condicionada únicament per la integritat estructural de l'entramat limfàtic, sinó també pel seu funcionament. Si l'interstici que precisa ser drenat manifesta un procés inflamatori agut, l'entramat limfàtic desencadena el que s'ha anomenat una

limfogènesi inflamatòria. Aquesta limfogènesi dóna peu a un augment de la proliferació dels vasos limfàtics (una major densitat de vasos) i a una dilatació dels existents (hiperplàsia limfàtica), tot plegat amb un augment del flux limfàtic (178). Malgrat que aquesta resposta, més enllà de no ser homogènia per al conjunt d'afectacions inflamatòries i de si té un major o menor efecte antiinflamatori (178), a mesura que la inflamació es torna crònica, causa que l'entramat limfàtic esdevingui no funcional, la qual cosa deriva en una disminució del flux limfàtic (178, 179). La dilatació dels vasos limfàtics present en la inflamació es pot generar per una acció molecular directa per part de factors proinflamatoris (178) o per una acció hidrostàtica indirecta provocada per la presència d'una major quantitat de fluid a drenar que la que el vas està capacitat a oferir. En aquest darrer cas desemboca en una modificació estructural, una alteració de la paret del vas, per defectes en la disposició de les fibres musculars llises, i en una insuficiència valvular limfàtica (180). Podem considerar que la resposta immediata a la inflamació és augmentar la capacitat drenant de l'interstici per part dels vasos limfàtics, però que, si aquesta augmentació no es dóna, si les necessitats drenants superen la capacitat drenant dels vasos, els vasos patiran una desestructuració que en situació extrema podria derivar en la seva destrucció. En aquest sentit, estudis recents de Jang *et al* (181) mostren, en ratolins, que la persistència d'un estímul tòxic deriva en la destrucció dels vasos limfàtics a partir de la qual es dóna la destrucció dels capil·lars sanguinis pròxims i la desorganització del teixit que els envolta, en aquest cas de l'intestí. Arran d'aquest treball s'ha valorat l'entramat limfàtic com un element protector de la integritat tissular i en contra de la sèpsia (182).

La hipòtesi que estem contemplant en aquest seguit d'exemples de regulació de factors de risc és que l'homeòstasi no es defineixi únicament sobre la major o menor presència de certs paràmetres o molècules, sinó que es faci, també, segons el reconeixement funcional del sistema. Així doncs, la referència funcional del sistema no recau únicament en les molècules reguladores, sinó en la capacitat de mobilitzar-les. D'aquesta manera, la importància de l'entramat limfàtic en la regulació metabòlica no respon únicament a la seva acció en un mecanisme concret ni en una molècula concreta sinó en el reconeixement que es fa del seu funcionament en cada circumstància. El que es planteja, doncs, no és que existeixi una afectació limfàtica metabòlica, sinó que el desigual funcionament de l'entramat limfàtic pot derivar en patologies molt diferents entre elles, però amb un patró d'alteració comú: la disfunció limfàtica. Aquesta disfunció limfàtica pot ser generada des de l'alteració de l'estructura dels vasos limfàtics, des de l'alteració del seu funcionament o des de l'alteració simultània de l'estructura i funcionament dels mateixos vasos limfàtics.

6. L'entramat limfàtic en la regulació del teixit adipós

Les malalties metabòliques associen com a factors de risc la pressió arterial, el sistema de coagulació, la resposta immunitària, la resposta inflamatòria i, de manera especialment rellevant, el metabolisme dels lípids. El teixit adipós està vinculat directament amb la seva pròpia regulació i el control del metabolisme lipídic. El teixit adipós s'ha vinculat no només amb el manteniment del pes corporal, sinó també amb la inflamació, la coagulació, la fibrinòlisi, la resistència a la insulina, la diabetis i l'aterosclerosi (183).

Els mecanismes que vinculen el teixit adipós a aquestes malalties són complexos i no estan del tot ben establerts. La consideració que es fa en el present estudi és que la deficiència en el drenatge de l'interstici per part dels vasos limfàtics, el drenatge intersticial limfàtic (DIL), podria formar part del mecanisme fisiopatològic que vincula el teixit adipós a aquestes malalties.

6.1 L'absorció dels lípids

L'associació entre el teixit adipós i la capacitat drenant dels vasos limfàtics no està únicament associada a la relació directa entre ambdós. Dins els condicionaments funcionals del teixit adipós hi ha el mateix procés d'absorció de lípids per part dels vasos limfàtics intestinals.

6.1.1 La síntesi de lipoproteïnes

L'absorció de lípids per part de l'intestí es veu condicionada d'inici per la mateixa ingesta d'aliments, per la quantitat de greixos ingerits i per la seva tipologia. El procés d'absorció precisa de partícules transportadores de lípids, les lipoproteïnes, que són pròpies de l'intestí (VLDL i quilomicrons). De tot aquest procés, deriva la via de transport que seguiran les lipoproteïnes formades d'aquesta manera i, conseqüentment, la seva metabolització.

* Trànsit gastrointestinal

El primer pas de l'absorció dels lípids passa per la fragmentació dels aliments. La lipasa gàstrica, la lipasa pancreàtica (amb l'ajuda de la colipasa) i la fosfolipasa pancreàtica A2, així com la mucosa intestinal afavoreixen aquesta fragmentació (184).

* Hidratació intestinal

Un altre factor que condiciona l'absorció dels lípids és el nivell d'hidratació que presenta l'intestí (25, 184, 185). Aquesta hidratació ha estat relacionada amb la presència, en l'àmbit dels enteròcits, d'unes proteïnes de

membrana que n'afavoreixen el pas: les aquaporines. Matsuzaki *et al* (185) destaquen, però, que la hidratació de la mucosa no depèn únicament de la presència d'aquestes proteïnes. L'existència d'altres vies de pas transcel·lular, altres proteïnes com la SGLT1, així com la possibilitat d'un passatge intercel·lular, serien altres formes d'hidratació.

Més enllà de l'efecte favorable que genera la hidratació a l'entrada dels lípids als enteròcits existeix, també, una relació favorable per a la sortida. La velocitat de formació de la limfa intestinal té una relació directa amb el transport dels quilomicrons. Pel que sembla, durant la fase d'absorció, la hidratació de l'espai intercel·lular, de l'interstici, facilita la formació del flux intersticial i, conseqüentment, l'augment del flux limfàtic; fet que és determinant en la mobilització dels quilomicrons a través de la làmina pròpia. Estudis fets en els quals es bloquejava l'absorció de fluids, tot associant un consum de greixos, confirmen aquesta idea ja que es dona una notable caiguda del flux limfàtic en aquesta circumstància (186).

* Absorció intestinal

Aquesta es dona per la penetració de micel·les, de vesícules líquides cristal·lines, així com les molècules de les sals de bilis que, en la seva interacció comuna, afavoririen una forma o altra d'absorció (184). El mateix procés d'absorció dels lípids té associat, també, el colesterol. L'absorció del colesterol requereix la presència de transportadors. El colesterol absorbit forma un cúmul de colesterol lliure que seria tant d'origen exogen com endogen. El colesterol provinent de la llum intestinal, considerat l'endogen, tindria tendència a ser utilitzat preferentment per a la formació de lipoproteïnes de pas limfàtic.

* Trànsit intracel·lular dels lípids absorbits

El següent pas dins el procés d'absorció dels lípids és el transport dels lípids absorbits cap al reticle endoplasmàtic (RE), que es fa mitjançant les FABP. Després de la interiorització dels àcids grassos i dels monoglicèrids al RE, aquests monoglicèrids es resintetitzen en triglicèrids (TG). D'una manera semblant, el colesterol i la lisofosfatidilcolina són acetaltzats per convertir-se en èster de colesterol i fosfatidilcolina (187). La concentració de certs lípids en detriment d'altres i la presència o no dels transportadors condicionen el sentit de síntesi o bé de degradació dels TG (184).

Hi ha dues vies de resíntesi dels TG després de ser absorbits els àcids grassos i els monoacilglicerols. Una és la del monoacilglicerol (MG) regulada per l'acció de la MAGT (*MG acyl transferasa*) i la DAGT (*Diacylglycerol acyltransferasa*). L'altra seria la de l'àcid fosfatídic que consisteix en l'acetilització del glicerol-3-fosfat endogen. La via de l'àcid fosfatídic estaria associada a la síntesi de lipoproteïnes limfàtiques més denses (VLDL), mentre que la reesterificació dels lípids exògens implicaria la formació de quilomicrons (188).

* Síntesi de les lipoproteïnes de captació limfàtica

La formació de les lipoproteïnes està marcada des de l'inici per l'entrada dels lípids en els enteròcits. Els quilomicrons i les VLDL són les lipoproteïnes que es formen a partir de l'absorció dels lípids en l'intestí (184).

Ockner *et al* (189) troben, en rates exposades al dejuni, que hi ha VLDL i quilomicrons d'origen intestinal en la limfa mesentèrica, d'entre les quals les VLDL són les més presents en aquestes circumstàncies. D'acord amb els resultats obtinguts van poder definir que l'origen d'aquestes VLDL no era plasmàtica sinó intestinal. Això implica la consideració que la formació i secreció de les VLDL també es fa als enteròcits i que, a més, utilitzen la sortida limfàtica de l'intestí. La formació de VLDL està associada a una càrrega lipídica intestinal baixa que seria la pròpia al dejuni mentre que els quilomicrons la tindrien més aviat alta (184). Segons les valoracions fetes fins ara, podríem considerar que la síntesi de VLDL a l'intestí es defineix per la presència d'àcids grassos de tipus endogen i una deficiència en la capacitat de síntesi de quilomicrons. D'altra banda, els quilomicrons requereixen entre altres condicionants d'una bona hidratació i d'una presència suficient d'àcids grassos exògens.

El principi funcional que es donaria és que l'enteròcit mantingui un flux continu de lipoproteïnes, ja siguin de tipus exogen: quilomicrons, com de tipus endogen: VLDL.

6.1.2 Models de síntesi de les lipoproteïnes

S'han descrit dos models diferents d'assemblatge de les lipoproteïnes intestinals (figura 13).

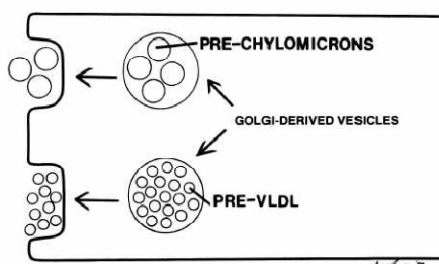


Figura 13. Model de síntesi de lipoproteïnes de manera independent. Imatge obtinguda de (184).

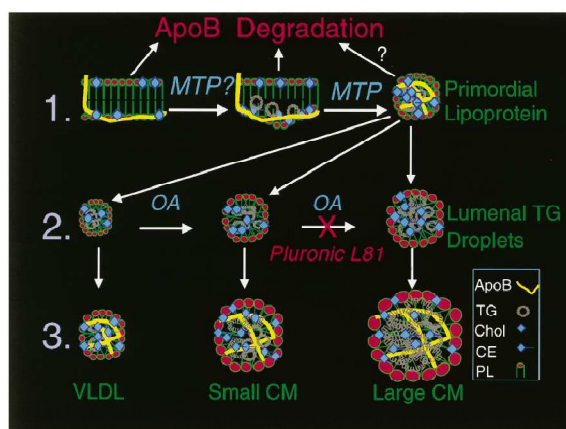
En un primer model plantejat es considera que els processos constituents de les lipoproteïnes són independents entre ells, és a dir, que utilitzen vies de producció diferents. Phan i Tso (190) argumenten que la composició en àcids grassos dels TG de les VLDL són diferents. També comenten l'existència d'estudis en els quals es mostra que les vesícules de Golgi intestinals agrupen de manera diferenciada partícules de prequilomicrons i de preVLDL i que hi ha molt poques vesícules mixtes. I una altra constatació que destaquen és que la utilització d'un agent tensioactiu hidrofòbic com és el Pluronic L-81 només afecta la síntesi de quilomicrons i no de VLDL, la qual cosa justificaria l'existència de vies diferenciades.

Un altre model planteja, a partir de diverses observacions fetes de cultius de cèl·lules Caco-2, la possibilitat d'un procés seqüenciat homogeni fins a la formació dels quilomicrons que, en el cas de poder acomplir-se, derivaria en la síntesi dels quilomicrons i, en cas contrari, en la síntesi de VLDL. Vàries revisions descriuen aquest model (188, 191, 192) en què en un inici s'estructuraria la lipoproteïna primordial, en la llum del reticle endoplasmàtic, que seria el resultat de la formació d'Apo-B en el reticle endoplasmàtic rugós, l'assemblatge de fosfolípids provinents de la membrana del RE i l'agregació de lípids de triglicèrids neutres. La *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP) afavoriria la transferència de lípids neutres al complex apoB format d'aquesta manera.

Una altra opció constitutiva de lipoproteïnes és la que derivaria de la formació de complexos lipídics rics en triglicèrids en el reticle endoplasmàtic llis a partir de lípids provinents de la síntesi en el transcurs de l'absorció dels mateixos lípids a través de la llum intestinal. Aquest procés es donaria sense apoB, cas en el qual la MTP ajudaria a la formació d'aquests complexos.

En una darrera fase, en la junció del reticle endoplasmàtic llis i rugós, es podria donar la fusió dels dos agregats, el provinent del RE rugós (lipoproteïna primordial) i la provinent del RE llis (complex lipídic de triglicèrids). És el que s'anomena *core expansion* (figura 14).

Figura 14. Model d'assemblatge seqüencial de la síntesi de lipoproteïnes. Imatge obtinguda de (191).



Aquest model es presenta, doncs, com una seqüència de tres etapes, independents entre elles; les quals serien: l'assemblatge de la lipoproteïna primordial, la formació dels agregats lipídics i la *core expansion*.

El grau de fusió d'aquests complexos és el que marcaria l'estructuració de les lipoproteïnes. La distinció entre quilomicrons i VLDL vindria donada, segons aquest model, per la quantitat d'agregats lipídics. Quan l'expansió de les lipoproteïnes fos mínima parlariem de VLDL i, si fos gran, de quilomicrons. En el cas que no disposéssim d'apoB els complexos lipídics romandrien en l'enteròcit fins a la seva possible transformació. El procés es completaria amb la fusió de les lipoproteïnes amb la membrana basolateral dels enteròcits en la qual s'alliberarien a la làmina pròpia per ser absorbits

pels vasos limfàtics inicials i conduïts a la circulació sanguínia mitjançant el canal toràcic.

Hi ha certes particularitats que poden fer pensar que ambdós models són compatibles i no excloents entre si. D'una banda, l'observació que a l'interior dels quilomicrons hi ha èster de retinol, en quantitats proporcionals a la seva talla, i és minsa la seva presència en les VLDL. Això ha fet pensar que l'èster de retinol és un element constitutiu dels quilomicrons. L'agent tensioactiu Pluronic L-81 afecta la secreció de l'èster de retinol sense causar cap augment de la seva secreció en lipoproteïnes més petites. Això va fer pensar a Iqbal i Hussain (192) que la secreció de l'èster de retinol és molt específic als quilomicrons i que té un efecte regulador en la síntesi de quilomicrons ja que el Pluronic L-81 limita la síntesi de quilomicrons. D'altra banda, s'ha observat que en funció de quin àcid gras s'introdueix en l'àmbit intraduodenal hi ha una síntesi major d'una o altra lipoproteïna. En general, la síntesi de quilomicrons es veu augmentada per la introducció de qualsevol àcid gras (oleic, palmític, linoleic). La introducció de palmitat fa proliferar VLDL, però la introducció de linoleic i oleic no afectaria la síntesi de VLDL (193), fet que faria pensar en línies constituents de secreció independents entre elles. A partir del que s'ha vist fins ara, podríem considerar que hi ha una distinció evident en l'estructuració de les lipoproteïnes i que la discussió deriva, més aviat, en el concepte de preferència de síntesi. Els dos models són compatibles, però dins un context definit. El que sembla clar és que la via preferent en dejuni seria la síntesi de les VLDL i la de la ingesta la síntesi de quilomicrons. Parlem d'un procés complex i dinàmic amb un nivell de correcció notable.

La durada del procés d'absorció de lípids ve determinat per la capacitat de trànsfert del TG des del RE al Golgi. En el context en què l'absorció ha estat alta i que la capacitat de trànsfert de TG al Golgi està saturada, els TG queden ubicats a la banda citosòlica del RE on esdevenen substrat per a l'acció de la lipasa intestinal (188).

Tso i Balint (186) també valoren en el seu estudi el pas dels quilomicrons a través de la làmina pròpia. La facilitat de passatge pot ser definida per les mateixes característiques estructurals de la zona de pas, per la seva composició o bé per la capacitat reguladora del seu funcionament. La major o menor dificultat de passatge dels quilomicrons per travessar la distància que separa l'espai intercel·lular i els vasos limfàtics intestinals que els han d'absorbir en marca la síntesi i la secreció per part dels enteròcits. Es planteja que els quilomicrons poden travessar la làmina pròpia de dues maneres: o bé per difusió o bé per la facilitació que deriva del pas de fluids provenint de l'absorció. Tso i Balint (186) evidencien que la velocitat de pas del flux limfàtic condiona la formació dels quilomicrons, en estudis realitzats per ells mateixos, sota el marcatge dels quilomicrons, constaten que en velocitats de pas $<40 \mu\text{l}/\text{min}$ el temps de detecció dels quilomicrons és inversament proporcional a la velocitat de pas o, el que és el mateix, que a major flux el temps que necessiten els quilomicrons per ser detectats és

menor. D'altra banda, quan el pas de limfa és superior a 40 $\mu\text{l}/\text{min}$, el que van observar és que hi ha un temps mínim per a la formació dels quilomicrons. A partir d'aquest temps, per molt que incrementi la formació dels quilomicrons, el flux de pas de quilomicrons no baixa, es manté. Aquest temps està estimat en 13,6 min, un temps que s'ha considerat com el mínim necessari per formar els quilomicrons.

En models animals, s'ha observat que, davant la impossibilitat de formar quilomicrons de manera eficaç, es donen mecanismes alternatius que mantenen els nivells d'absorció de lípids al budell. Una alteració en el transport dels quilomicrons per part dels vasos limfàtics mesentèrics deriva en la prioritització de la via de transport de la vena porta. En porcs, l'absorció per via limfàtica seria molt important, la qual cosa fa pensar que també ho pugui ser en humans donades les característiques ontogèniques d'ambdós (194).

Més enllà dels diferents elements i factors que influencien la síntesi del conjunt de lipoproteïnes, cal fer esment que hi ha encara altres aspectes a considerar. En estudis fets sobre un model d'intestí prim fetal humà s'ha constatat la influència de certes hormones en la capacitat de síntesi dels quilomicrons. La insulina té la capacitat d'inhibir la secreció dels quilomicrons, genera una disminució significativa d'apoB-48 i d'apoB-100, sense alterar la síntesi d'apoA-I (187).

L'EGF sembla induir la síntesi de quilomicrons i una disminució de VLDL i LDL, de manera que només se n'altera el nombre i no la talla. La infusió d'EGF genera una disminució de l'apoB-100 i un augment de l'apoB-48, sense que s'aprecii cap efecte sobre l'apoA-I (187). I-FABP i L-FABP estan sobreexpressades en resposta a una major presència d'àcids grassos de cadena llarga i menys expressats en presència d'EGF. La presència d'EGF permetria limitar la captació dels àcids grassos al mateix temps que permetria facilitar la formació de fosfolípids, la qual cosa ha servit per atribuir-li una possible funció reparadora dels enteròcits (188).

Davant l'acció de la hidrocortisona, la secreció de quilomicrons i de VLDL està molt disminuïda, al mateix temps que hi ha un augment de la secreció d'HDL (187).

6.1.3 La captació dels lípids pels vasos limfàtics

El contingut de lípids en plasma està condicionat, d'una banda, per l'absorció que se'n dona a l'intestí i, de l'altra, per l'efecte que pot tenir la capacitat d'absorció que tenen els vasos limfàtics dels lípids en l'àmbit perifèric. Aquesta captació, a la vegada, està condicionada per l'efecte de l'exercici sobre la mateixa captació.

6.1.3.1 L'absorció de lípids per part dels vasos limfàtics intestinals (lacteals)

La revisió que fan Porter i Charman (188) de l'absorció dels lípids pot servir de referent a l'hora d'abordar inicialment aquest procés. Les característiques estructurals dels vasos limfàtics (una làmina basal discontinua o, fins i tot, absent, unes junccions interendotelials més aviat àmplies) defineixen les peculiaritats de la seva absorció. Pel que sembla, els vasos limfàtics tenen tendència a captar molècules grans d'un pes superior a 10.000 Da o molècules molt hidrofíliques o grans estructures col·loïdals. S'ha comentat que l'absorció dels triglicèrids, per part dels vasos limfàtics mesentèrics, requeriria com a mínim una *log* amb coeficients de partició superior a 5 i una solubilitat lipídica superior a 50 mg/g. Tot i així, sembla ser que hi ha tres retinoides altament lipofílics (temarotè, etretinat i isotretinoïna) que manifestarien un comportament invers amb relació a la seva solubilitat lipídica i la seva absorció limfàtica. El que ve a dir que, en solubilitats inferiors, s'absorbirien més. Aquesta particularitat funcional podria ser deguda al paper que juga el retinol en la síntesi dels quilomicrons que podria indicar l'existència d'un patró de control actiu més que passiu. Hi hauria la possibilitat d'estudiar aquesta hipòtesi.

La quantitat d'àcids grassos insaturats sembla definir el nivell d'absorció i partició dels lípids entre la via porta i la limfa intestinal. També tindria incidència sobre la talla de les lipoproteïnes que serien més grans i, preferentment, transportades per via limfàtica (188).

La captació i el transport dels quilomicrons per part dels lacteals es descriu des del pas inicial del flux intersticial a l'interior dels vasos limfàtics inicials. Aquest pas pot venir donat per diferents mecanismes (195): la pressió hidrostàtica, la pressió oncòtica, la pressió col·loide i osmòtica reticular, la difusió activa/passiva de la membrana (canals intracel·lulars i sistema vesicular), canals intraendotelials, unions obertes, *stomata* limfàtica i fagocitosi. Tots aquests mecanismes són associables a disposicions anatomofuncionals concretes i poden ser preferents en certes circumstàncies i absents en altres.

Tot i la diversitat dels processos descrits, la majoria d'investigadors pensa que el mecanisme de la pressió hidrostàtica és el responsable principal de la formació de la limfa, però no es pot obviar l'efecte dels moviments passius dels teixits que envolten els vasos i les propietats contràctils de les cèl·lules endotelials (filaments d'actina-miosina) que semblen convergir cap a la formació del flux limfàtic (196).

L'entrada de lípids als lacteals inicialment es va associar a un procés majoritàriament paracel·lular, a través de les junccions obertes entre les cèl·lules, les anomenades *open junctions*. Alguns estudis (197) indiquen, d'altra banda, una via d'absorció de quilomicrons per transcitosi, mitjançant vesícules que contenen quilomicrons. Tot i la controvèrsia existent, cal considerar que hi ha molts condicionants aliens a la mateixa estructura dels

vasos. La pressió intraluminal del budell hi té una associació directa, així com el flux limfàtic. Aquest mecanisme independent a l'estructura dels vasos estaria reforçat per l'acció peristàltica dels intestins, que amb l'acció de cèl·lules musculars descrites en la proximitat dels vasos limfàtics podrien generar un efecte modulador de la captació dels quilomicrons, tal com descriu Dixon (198). Un altre mecanisme modulador en el transport dels quilomicrons pels vasos limfàtics vindria donat per l'acció contràctil dels vasos limfàtics col·lectors i incidiria en la modulació del passatge de la limfa. Un estudi sobre la contractilitat dels vasos limfàtics intestinals, els lacteals (199), va posar en evidència que era la dinàmica contràctil de la musculatura llisa que envolta els vasos limfàtics la que modula la ingesta de lípids i que, a més a més, ho fa mitjançant el sistema nerviós autònom. Cal destacar que hi pot haver un vincle entre el contingut limfàtic i la funció transportadora dels vasos limfàtics. L'administració d'oli d'oliva, per exemple, augmenta la contractilitat dels vasos limfàtics (200).

En humans, s'ha pogut evidenciar (201) que la ingesta de glucosa va associada, en individus prims, a l'activació de la funció drenant dels vasos limfàtics en el teixit adipós; però, en individus obesos, aquest efecte està molt minvat. D'aquesta circumstància sorgeix la idea que l'alentiment de la funció limfàtica no estigui relacionada amb el mateix desenvolupament de la inflamació en el teixit adipós i amb les alteracions pròpies de l'obesitat que s'hi associen.

En la valoració de l'absorció dels lípids en l'àmbit intestinal per part dels lacteals s'ha observat que la modificació del comportament de certs gens específics de la mateixa estructuració dels vasos limfàtics (*prox1* i *pdpn*) implica alteracions en l'estructuració i funció dels lacteals.

PROX1 és un factor de transcripció nuclear indispensable per a la diferenciació i per al manteniment d'un fenotip endotelial limfàtic (13). El *prox1*^{-/-} de ratolins no és viable. Una deleció parcial del gen, tot i que no genera connexions deficientes entre limfàtics i venes, manifesta una retenció de lípids en l'àmbit intersticial en el mesenteri (67).

La deleció de la *c1galt1* comporta una alteració en l'expressió i funció de la O-glicoproteïna podoplanina que deriva en una desestructuració dels vasos limfàtics i una funció limfàtica alterada. Fruit d'aquesta deleció, a més a més, es donen alteracions al fetge. S'hi acumulen lípids, quilomicrons, que transiten per la circulació porta, desemboquen al fetge i n'afecten el funcionament, mentre que l'adiant seria que passés per la via limfàtica (26).

Com bé comenta Dixon (25), el fet que hi hagi tants models animals (*fiaf*^{-/-}, *prox1*^{-/-}, *t-syn*^{-/-} i *itga9*^{-/-}) en els quals es relaciona l'alteració de l'estructuració dels vasos limfàtics i el trastorn en la mobilització dels lípids dóna peu a pensar en la possible existència d'un vincle entre l'homeòstasi lipídica i el drenatge intersticial que exerceixen els vasos limfàtics.

Kellner (164), com ja s'ha comentat, feia esment, a partir d'estudis en conills, al fet que la hiperlipèmia augmentava la concentració de colesterol i

fosfolípids en els limfàtics. Va considerar que, donada aquesta circumstància, hi podria haver acumulació de lípids en altres òrgans.

L'associació entre certes afectacions metabòliques, patologies lipídiques i la disfunció limfàtica va ser pròpiament contemplada per Horra *et al* (91). La idea que es va considerar és que el cúmul de lípids en l'interstici, propi a una incapacitat drenant per part dels vasos limfàtics del mateix interstici, podria limitar la capacitat capil·lar de filtració i, conseqüentment, afavorir la retenció de lípids en l'àmbit sanguini. Dixon (25) va confrontar aquesta idea en indicar la dificultat d'establir la hiperlipèmia dins d'una relació causa-efecte.

6.1.3.2 L'absorció de lípids per part dels vasos limfàtics en l'àmbit perifèric

Cooke *et al* (143) van valorar la relació existent entre la captació perifèrica de lípids per part dels vasos limfàtics i la concentració dels mateixos lípids en plasma, i van poder constatar que la concentració de limfa fluctua de manera circadiària, com ja s'ha comentat; que la presència d'una major concentració de lipoproteïnes en l'àmbit limfàtic va associada a una disminució del flux limfàtic; que hi ha una relació directa entre la concentració en limfa d'apoB i apoA-I i la que hi ha en plasma, i que aquesta correlació existeix també amb relació al contingut en limfa d'albumina. Cal mencionar, a més, que els canvis de posició generen modificacions en les concentracions, la qual cosa ve a indicar que les circumstàncies hidrodinàmiques que l'organisme manifesta en cada posició condicionen la reabsorció perifèrica. Una observació destacable és que la concentració de glicerol lliure en limfa està augmentada amb relació al plasma, la qual cosa pot fer pensar en la possibilitat d'un origen adipocitari del glicerol. L'existència d'una proteïna de membrana transportadora de glicerol i aigua present en els adipòcits, l'aquaporina 7 (AQP7), que es vincula tant al metabolisme dels lípids com a la fisiopatologia de l'obesitat (202, 203) i de la diabetis mellitus tipus 2 (203), pot fer pensar en la relació que pot tenir la hidrodinàmica de l'interstici i la major o menor activitat d'aquesta proteïna.

Cal destacar l'efecte que té l'activitat física en l'absorció de lípids. En l'àmbit perifèric aquesta absorció està augmentada, la qual cosa es pot justificar tenint en compte que el moviment afavoreix el drenatge limfàtic de l'interstici (143). Un exemple interessant a considerar és el del glicerol. La concentració de glicerol és més alta en la limfa que en el plasma (143), tant en repòs com en activitat; la qual cosa ha fet pensar que una part important del glicerol és susceptible de provenir dels adipòcits a través de la regulació de l'AQP7 (204). En un estudi de metabòlica en què es va valorar quins metabòlits estaven augmentats en plasma durant l'exercici es va detectar que el més augmentat és el glicerol (205). Tenint en compte que la limfa és retornada a la circulació sanguínia és coherent pensar que la

capacitat de captació i de conducció dels vasos limfàtics sigui el determinant de l'increment de glicerol en plasma.

L'exercici també està associat, tot i que de manera desigual en funció del gènere, amb l'expressió d'AQP7 en teixit adipós subcutani (206), la qual cosa pot respondre a la desigual estructuració i als requeriments hidrodinàmics que poden manifestar els individus en funció del gènere. En tot cas, la qüestió de si poden ser els requeriments hidrodinàmics els que marquin en certa mesura la funcionalitat metabòlica a la qual cada individu s'acabi referenciant i equilibrant agafa cada vegada més pes. I l'altra qüestió que sorgeix és saber quin punt d'equilibri es defineix com a òptim en cada individu.

6.2 Relació de l'entramat de vasos limfàtics amb el teixit adipós

L'estructuració del teixit adipós no està mancada de particularitats. Cal considerar aquestes particularitats com el reflex de la mateixa interacció que té el teixit adipós amb les cèl·lules i els teixits limítrofs. Com que hi ha una condició de veïnatge manifesta entre el teixit adipós i els vasos limfàtics, val la pena considerar aquestes particularitats com un element més d'estudi de la relació del teixit adipós amb els vasos limfàtics i, més concretament, amb la seva capacitat drenant de l'interstici. El remarcable estudi sobre l'evolució del teixit adipós en els mamífers fet per Caroline Pond (207) posa en relleu, en part, aquestes particularitats. Per començar, cal considerar que el teixit adipós blanc en els mamífers es manifesta de maneres diferents en funció de les propietats que la seva adaptació requereix. El teixit adipós pot adoptar propietats paracrines, d'aïllament o estructurals. Aquesta versatilitat facilita al teixit adipós una major capacitat adaptativa a cadascuna de les situacions que l'organisme li requereix. I aquestes situacions poden ser definides per la diferent caracterització hidrodinàmica dels vasos limfàtics en cada circumstància, és a dir, per la capacitat drenant que els vasos limfàtics tenen de l'interstici.

L'associació entre la funció limfàtica i el teixit adipós no és casual i pot estar justificada en diversos aspectes. Un primer pas en la consideració d'aquest vincle ve donat per la revisió feta per Terence Ryan (208). En la qual s'argumenta que:

- ∴ La concentració de lípids intracel·lular depèn de la seva concentració extracel·lular.
- ∴ L'estagnació del líquid intersticial condiona la formació del teixit adipós.
- ∴ La deposició de teixit adipós és més abundant en les zones en què els limfàtics estan absents, un aspecte que s'ha vist corroborat per l'absència o real disminució de vasos limfàtics en els lipomes i liposarcomes (209).

- ∴ La porció intersticial en el teixit adipós (< 10%) és menor que en molts òrgans (> 20%); aquesta porció intersticial es veu augmentada a mesura que passen els anys per un efecte de retenció d'aigua associat a un procés de deshidratació del teixit adipós.
- ∴ Hi ha una relació directa entre la riquesa vascular i l'engruiximent del lòbul adipós.
- ∴ La velocitat lenta del flux intersticial és una de les condicions per a la deposició del greix.
- ∴ Les velocitats dels fluxos sanguini i limfàtic tenen una relació inversa amb el creixement del teixit adipós (més flux sanguini o menys flux limfàtic, més teixit adipós).

Ryan, basant-se en estudis histològics de mostres de teixit adipós de persones amb paniculopatia, descriu les diferents etapes per les quals passa el teixit adipós exposat a una alteració en el drenatge intersticial per part dels vasos limfàtics. Cal comentar, abans de continuar, que la paniculopatia es caracteritza, en certa mesura, per una desigual inducció fibròtica en el teixit adipós. Inicialment es dona una retenció de líquid intersticial entre els adipòcits que continua amb una exsudació de limfòcits. El següent pas és la deposició de col·lagen, que Ryan descriu com a característica principal de la paniculopatia amb menor reversibilitat. Aquests dipòsits estarien presents tant en l'àmbit perivascular com al voltant dels adipòcits. La desigual deposició dels components fibril·lars condiciona la variació i deformitat dels vasos i dels adipòcits. Fruit d'aquesta circumstància es dona una desigual secció dels vasos sanguinis, fet que afavoreix una major exsudació plasmàtica que desemboca en la formació d'un recobriment fibrós. Ryan comenta que, entre les possibles explicacions a aquest recobriment fibrós, hi hauria, d'una banda, un excés d'exsudació per part dels vasos sanguinis i, per l'altra, una incapacitat de recollida dels excedents fibròtics, en part, agreujada per una deficient fibròlisi, però també justificada per una possible deficiència en la captació per part limfàtica (208).

Estudis fets en models animals d'estagnació intersticial induïda per pèrdua de captació limfàtica (210) mostren que l'estagnació s'associa a fibrosi, adipogènesi i inflamació.

La fibrosi

La fibrosi és entesa, com descriu Wynn (211), com un excés de deposicions de components de la matriu extracel·lular que són el producte final de les reaccions induïdes per la inflamació crònica.

La insuficiència de captació intersticial per part dels vasos limfàtics (210) generada en model animal mostra, com ja s'ha mencionat, la presència de fibrosi, acumulació de fibres de col·lagen, al voltant dels vasos limfàtics.

Considerant els possibles factors vinculats a la fibrosi i en certa mesura a la mateixa estructuració de la matriu extracel·lular, apareix de manera clara una vinculació directa amb la presència de certs mediadors inflamatoris. Aquests mediadors, citocines i quimiocines entre d'altres, faciliten el reclutament de cèl·lules del sistema immune que són les que acabaran iniciant el procés fibrogènic (212). Pel que sembla, el procés fibrogènic no és una conseqüència única del procés inflamatori sinó més aviat una circumstància associable a la persistència de la inflamació, a la seva cronicitat. El grau de variabilitat aniria associada a la tipologia de les cèl·lules reclutades i a com s'han activat (213).

És molt important la consideració que es fa de la inflamació com un mecanisme per revertir l'establiment i la progressió de la fibrosi (211). El que es valora és que el desencadenament inflamatori sigui el primer mecanisme de compensació al desencadenament de la fibrosi.

El cert és que l'alteració en el DIL, la retenció de líquid intersticial, no és de *per se* inductora de fibrosi. En estudis fets amb ratolins (214), s'ha pogut demostrar que la retenció de proteïnes en l'àmbit intersticial així com la persistència de limfoedema, manifestació intersticial de l'alteració limfàtica, no és causa suficient per generar fibrosi en el model animal estudiat. Tanmateix, anàlisis fetes en limfoedemes residuals no reactius al tractament físic de l'edema per Leduc i Brorson mostren l'existència d'aigua i de lípids. Brorson (215) i Leduc (216) en el XXXth Scientific Meeting of the European Lymphology Group a Brusel·les fan ponències que demostren que, a part de lípids, hi ha aigua. Brorson, analitzant el contingut de la liposucció que s'aplica a aquest tipus de pacients (217, 218), troba el 90% d'aigua i el 10% de lípids. Leduc i el seu equip, per la seva banda, indiquen que la composició és aigua i lípids, però determinen, a més a més, que la localització és intralobular, en l'àmbit del teixit adipós. Així doncs, el greix i l'aigua tenen presència en la insuficiència limfàtica.

De l'equip de Leduc sorgeix, també, l'estudi per ecografia, ressonància magnètica nuclear, espectroscòpia i histologia de mostres de teixit adipós subcutani de limfoedema (219). En l'estudi, es posa de manifest que en el limfoedema crònic hi ha un component fibrós ben definit en l'àmbit de la septa interlobular, però també en l'àmbit intralobular del teixit adipós subcutani. I també es posa en evidència que les diferents tècniques són complementàries per a la determinació dels diferents components constitutius observats en les mostres: component lipídic, component hídric i component fibrós.

L'adipogènesi/La lipogènesi

La formació de teixit adipós està lligada a l'equilibri hipertròfia/hiperplàsia. Està descrit (220) que la hipertròfia predomina en el teixit adipós blanc mesentèric mentre que la hiperplàsia ho fa en el subcutani.

En model animal (210), s'ha pogut determinar que l'adipogènesi estimulada per la insuficiència de captació per part dels vasos limfàtics es dona per

hipertròfia i hiperplàsia del teixit adipós. De fet, es contempla la possibilitat que sigui el mateix contingut limfàtic l'estímul d'adipogènesi. Aquesta consideració ve donada per estudis fets amb conills en els quals es fica limfa en cultius de preadipòcits i aquests es diferencien completament (221). Tot i així, Rosen (222) qüestiona que sigui un fenomen purament d'adipogènesi ja que aquests resultats són reproduïbles ficant únicament els quilomicrons de la limfa. Ell valora que pugui ser un fenomen de lipogènesi, tot i que no descarta rotundament l'adipogènesi com a opció. En tot cas, sigui lipogènesi o adipogènesi, hi ha una captació de greixos en l'àmbit del teixit adipós perilimfàtic associat a la mateixa alteració de la DIL.

Una anàlisi de l'associació entre el budell, el teixit adipós i el fetge (223) valora que el factor que determina aquest equilibri hipertrofia/hiperplàsia seria PPAR γ que, en la seva dominància, incidiria en la hiperplàsia i, en la seva inhibició, tendria a la hipertròfia.

Aquesta associació entre PPAR γ i l'adipogènesi es va manifestar en model animal d'insuficiència de captació limfàtica (224). En aquests estudis, es va constatar que l'expressió de *ppar γ* , *cebpa*, i l'adiponectina estaven augmentades tant en les cèl·lules inflamatòries com en les estromals. L'expressió de l'adiponectina no està augmentada en les LEC, però la resta sí. La consideració que es pot fer és que CEBP α , en tant que activador de PPAR γ , manté la distinció fenotípica del teixit adipós. L'adiponectina, inicialment, intervé en el reclutament de les cèl·lules immunitàries per, després, incidir en la limitació de les reaccions inflamatòries cròniques.

La relació entre la hipertròfia/hiperplàsia ve marcada per la capacitat de mobilització dels àcids grassos. Així doncs, el teixit adipós hipertrofiat mobilitza més àcids grassos que l'hiperplàsic. A més a més, també allibera més molècules proinflamatòries (223).

Quan es valora la relació entre el teixit adipós i els vasos limfàtics no està de més tenir present que no estem davant d'una relació desvinculada del conjunt de l'organisme. Així, una alteració manifesta en el teixit adipós mesentèric condiona el funcionament de la funció hepàtica (223) i indirectament del conjunt de l'organisme. El fetge es pot trobar exposat a l'alliberament de diverses molècules, de factors derivats de les bacteries, de citocines proinflamatòries i d'àcids grassos lliures, provinents del budell, el pàncrees i el teixit adipós visceral, i incidir d'aquesta manera directament en el seu funcionament (teoria portal). Aquesta circumstància podria ser associable directament o indirecta, amb relació al teixit adipós, a un excés de consum de lípids dietètics o bé al propi procés d'inflamació del teixit adipós. Tots aquests processos estan relacionats amb el funcionament dels vasos limfàtics, com ja s'ha comentat precedentment en altres apartats. La disminució en la capacitat drenant dels vasos limfàtics en l'àmbit visceral pot comportar una deriva de diverses molècules vers el fetge.

La inflamació

La inflamació respon de manera general a un augment de la permeabilitat dels vasos sanguinis. El procés d'inflamació està desencadenat per mecanismes: immunològics, humoral, biomecànic, físics transitoris (tèrmics, del gas -oxigen/diòxid de carboni-), i consisteix, tal com ho descriu Schmid-Schönbein (225), en una cadena de reaccions i d'activitats cel·lulars que serveixen per reparar els teixits en moltes circumstàncies de la vida.

La primera opció que es desencadena en el procés inflamatori és la resposta innata. Aquesta resposta està associada, en part, a la presència de mastòcits. Els mastòcits secreten diverses molècules que intervenen directament en el procés iniciador de la inflamació (226). Aquesta secreció es desencadena com a resposta a la presència d'antígens i al·lèrgens. Les molècules secretades tenen la finalitat d'atraure elements immunològics de suport, per si fos necessària la seva acció. Aquests elements serien les cèl·lules presentadores dels antígens, com ara són les cèl·lules dendrítiques (DC -*dendritic cells*-), els macròfags, els limfòcits B..., que acabarien desencadenant la resposta immune adaptativa.

De manera directa, s'ha pogut determinar que els mastòcits incideixen en la funció limfàtica. Un estudi d'avaluació de l'efecte de l'envelliment sobre la funció limfàtica en el budell (227) descriu que hi ha, en la proximitat dels vasos limfàtics mesentèrics, una major concentració de mastòcits, i, associada, una alteració de la funció limfàtica. La manifesta situació de preactivació dels mastòcits al budell que n'ha incrementat el nombre genera la consideració que amb l'envelliment en el mesenteri hi ha un entorn inflamatori crònic.

El teixit adipós es mostra com un element primordial en la regulació de la resposta immune. Els estudis comparatius fets per Pond (207) posen en evidència el lligam que hi ha entre el sistema immune i el teixit adipós des de l'inici evolutiu dels mamífers.

Una de les característiques comunes del teixit adipós és l'aprovisionament paracrí de lípids al sistema immunitari mitjançant la facilitació dels àcids grassos. És, d'aquesta manera, que la nutrició cel·lular es pot adaptar òptimament a totes les condicions possibles: dejuni, deficiència o desequilibri dietètic, tot acomplint la funció primordial de defensa de l'organisme. Cal notar que hi ha una relació estreta entre el teixit limfoide i el teixit adipós, i que aquesta és una característica pròpia en els vertebrats endotèrmics.

Pond (207) aprecia que la perspectiva funcional del teixit adipós va canviar quan es va considerar la relació que els dipòsits menors de teixit adipós tenien amb els teixits contigus: nòduls limfàtics, vasos limfàtics o la capa adventícia perivascular. És de gran rellevància la informació recollida per Pond entorn del teixit adipós perinodal. Ella comenta que aquest teixit adipós només és distingible per les seves propietats bioquímiques, altrament no s'hi poden apreciar diferències. Aquest teixit manifesta una

presència més alta de material extracel·lular i té menys volum. Tot i així, cal fer menció que el teixit adipós perinodal no és homogeni en tot l'organisme. Qualitativament es pot manifestar semblant d'una zona a una altra, però quantitativament no ho és. La diferència va associada al tipus de teixit limfoide amb què interacciona, el qual no es manifesta igual en una zona o una altra. La seva funció lipolítica està augmentada davant estímuls proinflamatoris, però arriba a un topall de resposta. Aquest nivell de resposta estaria vinculat a la proximitat amb el teixit limfoide amb el qual interactua: a més proximitat més resposta. Aquest tipus de teixit adipós no facilita les seves reserves energètiques en teixits remots i no genera productes de lipòlisi en dejuni, la qual cosa ve a dir que, en cas de manca nutricional, aquest teixit no interaccionarà per compensar-ho.

L'anàlisi de les DC presents en els nòduls limfàtics o en la proximitat del teixit adipós perinodal mostra diferències que són susceptibles d'indicar quina dinàmica funcional tenen els dos teixits en la resposta immunitària. Les DC del teixit adipós estimulen la lipòlisi mentre que les DC recollides dels nòduls limfàtics la inhibeixen. La sortida de les DC dels vasos limfàtics vers el teixit adipós perinodal anirà associada a una estimulació de la lipòlisi i a la facilitació d'una millora en l'estructuració de les DC per a l'alliberament des del teixit adipós de components estructurals que afavoriran el funcionament de les DC.

El que s'ha considerat és que sigui la concentració d'àcids poliinsaturats, àcid araquidònic (20:4n-6) linoleic ((18:2n-6) i linolènic (18:3n-3), el factor de millora associat al pas de les DC pel teixit adipós perinodal. Aquests àcids grassos poliinsaturats són, proporcionalment, més presents en el teixit adipós perinodal que en altres tipus de teixit adipós. Aquests àcids grassos essencials contribueixen a la fluïditat i a l'estructuració de les membranes cel·lulars. La inflamació disminueix la presència d'aquests àcids grassos en el teixit adipós perinodal i en les DC, i la suplementació d'aquests tipus d'àcids grassos per la dieta reverteix aquests efectes de la inflamació. La dieta incideix en la resposta immune no des d'un criteri energètic sinó inflamatori, però en fer-ho ho fa de manera homogènia. La composició en àcids grassos lliures tant en teixit adipós com en les DC es veu afectada de manera semblant per la dieta.

De la valoració feta per Pond (207), se'n deriva la idea que la disposició dels lípids essencials per a la resposta immune a partir del teixit adipós es fa d'acord amb la mateixa demanda de les cèl·lules limfoides i per interaccions directes d'aquestes cèl·lules amb el teixit adipós amb la mínima mobilització dels lípids. L'anàlisi feta per Unger (228), comentada per Pond, manifesta l'efecte lipotòxic que els lípids poden generar quan s'acumulen en teixits no adiposos, en haver-hi una aportació nutricional que supera les necessitats de l'organisme. Entre aquests efectes de lipotoxicitat, hi hauria la producció de ceramida que, associada a la senyalització lipídica, per mediació de l'òxid nítric, estimularia l'apoptosi de les cèl·lules amb contingut lipídic.

El que es planteja, doncs, és que el teixit adipós esdevé un mecanisme de compensació d'un sobreexcés nutricional amb la finalitat de limitar els efectes lipotòxics dels lípids en els diferents teixits que, en cas de saturació, derivarien en estímuls proapoptòtics. Així doncs, el teixit adipós, en aquest cas, acompliria la funció d'esdevenir un reservori de lípids que protegeix altres teixits de les fluctuacions en la quantitat i qualitat dels lípids dietètics davant les necessitats de resposta immunitària, al mateix temps que protegeix els teixits no adiposos de la presència anormal de lípids. Aquesta dinàmica seria l'òptima en la mesura que mobilitza els lípids mínimament i que ho fa de la manera més eficient possible.

Pond (207) descriu el concepte de *fat wrapping*, que podria anar en la mateixa línia. Pond considera que l'acumulació de greix periintestinal pot ser deguda a la senyalització, per part de les cèl·lules limfoides, de la necessitat d'àcids grassos en una situació d'estimulació proinflamatòria persistent.

Un estudi fet per Ding *et al* (229) va en la mateixa línia. En l'estudi es valora el rol de la microbiota amb relació a l'efecte proinflamatori que té la dieta rica en greixos. S'hi constata que la microbiota condiciona la inflamació i, a més a més, com a fenomen destacable, que la microbiota precedeix sempre el cúmul de greix per part del teixit adipós mesentèric.

En el model animal d'insuficiència de captació limfàtica (210) es va poder constatar que, fruit de la incapacitat de mobilització del líquid intersticial, es generava un procés inflamatori que derivava en l'acumulació de leucòcits, macròfags i monòcits en el teixit adipós.

Kuan *et al* (230) han pogut constatar que la inflamació persistent provoca una fuga d'antígens provinents de la limfa cap al teixit adipós que es troba al voltant dels vasos limfàtics col·lectors. Aquesta circumstància està associada a l'augment de la permeabilitat dels vasos limfàtics col·lectors. La fixació de components de la limfa pel teixit adipós perilimfàtic permet, aleshores, el reconeixement per part dels macròfags i de les DC. Fruit d'això, es genera una interacció específica per part de les cèl·lules T en el teixit adipós, que deriva en una proliferació de DC i esdevé un substrat cel·lular preparat per a la migració vers els nòduls limfàtics. D'aquesta manera es genera un mecanisme d'interacció en el qual, en funció de la permeabilitat induïda per la situació inflamatòria, gràcies a la retenció dels seus components inductors, el sistema immune pot actuar adequant un reservori de DC a les necessitats de resposta que es donin en cada ocasió.

Un exemple, emprat per Kuan *et al* (230), de possible relació entre el teixit adipós i el sistema immune és el que descriu amb relació als fragments d'hialurà que es generen després d'una lesió. Quan aquests fragments són absorbits pels vasos limfàtics inicials, si no són assimilats pels mateixos vasos limfàtics inicials passen als vasos limfàtics col·lectors. Si la permeabilitat dels limfàtics col·lectors està augmentada, aquests fragments podrien passar al teixit adipós perinodal i marcar el reclutament de les cèl·lules dendrítiques i de macròfags, i desencadenar, així, la migració vers

els nòduls limfàtics continguts. Dins d'aquest context el teixit adipós, per mediació de la capacitat drenant i d'integració de senyals per part dels vasos limfàtics, esdevindria un element de modulació de la resposta immunitària.

Els vasos limfàtics s'exposen quan se sotmeten a la inflamació d'una sèrie de canvis. Tal com descriuen Aebischer *et al* (231), la resposta immediata dels vasos limfàtics davant la inflamació és l'augment de l'entramat limfàtic. Aquest augment pot respondre a una proliferació de nous vasos o a una dilatació dels mateixos vasos. La definició d'un procés o un altre respon a estímuls concrets. Factors secretats per les cèl·lules immunes, les cèl·lules T, les cèl·lules B i els macròfags, afavoririen aquests processos.

El VEGFC facilitaria la proliferació dels vasos mentre que el VEGFA induiria a la dilatació. També es menciona que la persistència dels efectes de la inflamació generarien canvis en l'estructuració de les connexions entre cèl·lules.

La resposta a un estímulo inflamatori donat no és homogènia en tot l'organisme, però sí que ho és en l'òrgan en el qual incideix l'estímul. Aquesta precisió funcional té una importància major, als nostres ulls, en la mesura que aquest comportament només pot ser associat a una distribució o a una reabsorció homogènia en tot l'òrgan, a una hidrodinàmica de l'òrgan homogènia. D'acord amb els estudis valorats per Aebischer *et al* (231), s'han llistat una sèrie de molècules anomenades prolimfogèniques: VEGFC, VEGFA, LT α , LT α β 2, IL-17, IL-8 (CXCL8), HGF, IL-3, FGF-2 (bFGF), LPS, CXCL12, S1P, i una sèrie de molècules anomenades antilimfogèniques: TNF α , IL-27, IFN α , IFN γ , TGF β i CXCL10/11.

L'alteració dels vasos limfàtics per la inflamació no afecta tan sols l'estructura limfàtica també es dona sobre la seva funció. El que s'ha evidenciat és que la funció es veu alterada per mediadors inflamatoris: la histamina, les prostaglandines o l'òxid nítric (NO) disminueixen la contractilitat dels vasos limfàtics mentre que el VEGFC l'augmentaria, segons descriuen Aebischer *et al* (231). Liao i Von der Weid (232) no fan menció de la histamina com a inhibidor de la contractilitat, possiblement perquè la resposta no és homogènia, diferents nivells de concentració donen resultats diferents. Sí que consideren la prostaciclina o prostaglandina E2, així com l'NO, com a reconeguts inhibidors. Entre els que consideren com a estimuladors hi ha la prostaglandina H2/tromboxà A2.

Les cèl·lules endotelials dels vasos limfàtics són les primeres a confrontar les situacions que desencadenen la resposta immune. Les LEC s'han pogut relacionar amb la modulació de la resposta immune, tant la innata com l'adaptativa (233). En aquest article Card *et al* descriuen que ho fan mitjançant l'expressió de diverses citocines, molècules d'adhesió i receptors d'inhibició; mitjançant la detecció i el marcatge dels antígens per facilitar l'acció de les cèl·lules T o per modular l'acció de les cèl·lules presentadores dels antígens; i mitjançant la regulació del transport dels soluts i fluids d'acord amb els senyals inflamatoris que reben. Un exemple il·lustratiu a

considerar és l'efecte modulador de la migració de les cèl·lules dendrítiques induït pels vasos limfàtics. Johnson *et al* (234) valoren la migració de les cèl·lules dendrítiques amb relació als vasos limfàtics i destaquen que la citocina CCL21 secretada pels vasos limfàtics atrau les DC que disposen del seu receptor, el CCR7, cap a l'interior dels vasos limfàtics.

El control de fluids per part de l'organisme no està mancat de matisos i consideracions, alguns dels quals s'han de tenir presents quan afecten directament el funcionament dels vasos limfàtics. ANP i la BNP són dos hormones que es vinculen al control de la hipervolemia en l'àmbit de l'organisme. La determinació de la relació entre l'ANP i la BNP amb la permeabilitat dels vasos limfàtics ha mostrat que aquestes dues hormones secretades a distància dels vasos limfàtics incideixen en el seu funcionament amb l'augment de la seva permeabilitat. Els resultats també mostren que l'augment de la permeabilitat dels vasos genera una estagnació del líquid intersticial, retenció de proteïnes i fluids en l'interstici (235).

Pond (207) fa una consideració important amb relació al que succeeix quan hi ha un augment del nombre de vasos limfàtics. L'augment del nombre de vasos té com a conseqüència una disminució en el flux. Des del punt de vista hidrodinàmic, això s'explica pel fet que la mateixa força de propulsió es distribueix per més conductes, per més superfície; això té com a conseqüència una pèrdua de pressió i, per tant, baixa el flux. Aquesta disminució en el flux acaba generant una major resistència de pas, un augment de la pressió hidrostàtica; la qual cosa pot comportar una dilatació dels conductes i, en funció de la capacitat elàstica/plàstica dels conductes, una desestructuració i pèrdua del contingut.

La consideració que la dilatació dels vasos i la disminució de la freqüència de les contraccions dels vasos pugui implicar una pèrdua de capacitat drenant no és del tot certa. Liao i Von der Weid (232) valoren estudis que avalen que hi pot haver una millora en la conducció de limfa, si més no en un primer moment.

L'anàlisi de la sèpsia amb relació als vasos limfàtics feta per Jang *et al* (181) va permetre entendre una mica més el paper que juguen els vasos limfàtics en situacions extremes d'inflamació. La sèpsia és una síndrome de resposta inflamatòria sistèmica que es genera per un augment de la permeabilitat vascular deguda, en principi, a una alteració de les junccions entre les cèl·lules (236) o a la mateixa afectació del glicocàlix (237) o, segons Hutchins *et al* (238), a la supressió de la resposta immune. L'estudi, comentat per Jang, consistia a avaluar l'estructuració dels vasos limfàtics en l'intestí de ratolins alterats genèticament de manera que quan s'exposessin a una toxina es destruïssin els vasos limfàtics. Els resultats indiquen que, quan s'exposaven a la toxina específica, els vasos limfàtics intestinals es destruïen immediatament després i també succeïa el mateix en els teixits pròxims i en els nòduls limfàtics; tanmateix, els vasos limfàtics d'altres òrgans no es veien afectats. Això indica que els vasos limfàtics, si més no

els intestinals, són imprescindibles per a l'estructuració dels teixits i nòduls limfàtics pròxims.

En el sentit contrari, la resolució de la inflamació, es dóna, si més no en part, per la recuperació de l'estructura i la funcionalitat dels vasos limfàtics. Kilarski *et al* (239, 240) valoren la regeneració dels vasos limfàtics i descriuen que la remodelació limfàtica reparadora va lligada al reclutament de miofibroblasts. A més, destaquen el fet que els miofibroblasts reclutats són els únics que manifesten acció contràctil en el recobriment del vas limfàtic disfuncional. Un altre detall que consideren és que el màxim recobriment amb miofibroblasts es dóna en els vasos de menor diàmetre i que l'inductor d'aquest fet pot ser el mateix recobriment.

Atenint-nos a les anàlisis fetes fins ara podem considerar que sí que hi ha modificacions estructurals del teixit adipós fruit de l'alteració en la conducció limfàtica i que aquestes modificacions es manifesten amb relació al component hídric a través de la inflamació, amb relació al component fibrós per la fibrosi o amb relació al component lipídic a través de l'estimulació de l'adipogènesi/lipogènesi. L'alteració en la conducció del líquid intersticial per part dels vasos limfàtics pot incidir de manera singular en qualsevol dels tres components tant qualitativament com quantitativa, de manera que es tracta d'una resposta desigual, no homogènia.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EVIDÈNCIES EN TEIXIT ADIPÓS D'ALTERACIONS GÈNIQUES DELS VASOS LIMFÀTICS EN L'OBESITAT

Alfons Horra Pueyo

HIPÒTESI I OBJECTIUS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EVIDÈNCIES EN TEIXIT ADIPÓS D'ALTERACIONS GÈNIQUES DELS VASOS LIMFÀTICS EN L'OBESITAT

Alfons Horra Pueyo

HIPÒTESI

El fet que els vasos limfàtics intervinguin directament en l'homeòstasi intersticial, en la funció immune i en el metabolisme lipídic va fer pensar en un vincle directe entre drenatge intersticial limfàtic i el metabolisme.

El fet que la permeabilitat dels vasos limfàtics es relacioni directament amb l'estructuració i funcionament del teixit adipós va fer pensar que l'alteració en el drenatge intersticial en el teixit adipós per part dels vasos limfàtics i el seu funcionament podrien estar enllaçats.

Pensem que el drenatge intersticial limfàtic pot participar de manera directa en algunes de les alteracions metabòliques manifestades en el teixit adipós en el context de la obesitat i la diabetis.

OBJECTIU GENERAL

Analitzar el paper de dos gens requerits per a l'estructuració dels vasos limfàtics, *prox1* i *pdpn*, en el teixit adipós en el context d'obesitat.

Objectius específics:

1. Definir quins gens vinculats a la regulació de la limfogènesi tenen relació amb les diferents condicions d'alteració metabòlica, amb l'obesitat, amb la resistència a la insulina i la diabetis.
2. Determinar diferències d'expressió gènica de *prox1* i *pdpn* entre el teixit adipós subcutani i el visceral.
3. Definir la relació de l'expressió de *prox1* i *pdpn* en l'alteració metabòlica.
 - 3.1. Determinar quines variables vinclen amb l'expressió de *prox1* i *pdpn* en el teixit adipós quan hi ha alteració metabòlica (sobrepès, obesitat i/o diabetis).
 - 3.2. Determinar quina expressió de *prox1* i *pdpn* té el teixit adipós en funció del nivell de certs marcadors d'alteració metabòlica (sobrepès, obesitat o diabetis).
4. Definir la relació que manifesten gens vinculats a la síntesi de l'àcid lisofosfatídic i l'expressió de *prox1* i *pdpn* en teixit adipós.
5. Determinar in silico quins gens vinculats a la regulació metabòlica es poden vincular també a l'estructuració limfàtica (expressió de *prox1* i *pdpn*).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EVIDÈNCIES EN TEIXIT ADIPÓS D'ALTERACIONS GÈNIQUES DELS VASOS LIMFÀTICS EN L'OBESITAT

Alfons Horra Pueyo

MATERIALS I MÈTODES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EVIDÈNCIES EN TEIXIT ADIPÓS D'ALTERACIONS GÈNIQUES DELS VASOS LIMFÀTICS EN L'OBESITAT

Alfons Horra Pueyo

El desenvolupament del present estudi ha requerit la confluència de diverses tècniques i procediments.

- Reclutament de cohorts clíniques per l'estudi de les variables antropomètriques clíniques i analítiques portades a terme per l'estudi que es planteja.
- Desenvolupament d'una base de dades de llistats de gens, caracteritzats de manera específica, que ha definit una metodologia d'estudi propi que ha permès precisar nous àmbits de relació entre gens en diversos fenotips metabòlics.
- Revisió sistemàtica de la literatura.
- Integració de les dades, anàlisi estadístic i revisió crítica de les troballes

1.- Reclutament de cohorts

Estudi de Microarrays

Es va realitzar un estudi de perfils d'expressió del genoma complet (*genome-wide expression profiling*) per analitzar el RNA missatger de mostres de teixit adipós humà de dos llocs diferents (visceral i subcutani) i en cinc condicions diferents:

- C1, prim no insulinoresistent;
- C2, prim insulinoresistent;
- OB1, obès no insulinoresistent;
- OB2, obès insulinoresistent;
- OB3, obès diabètic.

La condició C1 correspon a 4 individus amb IMC compres entre 19 i 25 kg/m² i amb un HOMA-IR <2,5; La condició C2 correspon a 4 individus amb IMC compres entre 19 i 25 kg/m² i amb un HOMA-IR ≥ 2,5; La condició OB1 correspon a 4 individus amb IMC > 35 kg/m² i amb un HOMA-IR < 4,7; La condició OB2 correspon a 4 individus amb IMC > 35 kg/m² i amb un HOMAR-IR > 4,7; La condició OB3 correspon a 4 individus de IMC > 35 kg/m² i amb diabetis definit segons el criteri de l'ADA (*American Diabetic Association*) (241).

Els punts de tall del HOMA-IR s'han establert segons les referències publicades (242, 243)

Criteris d'exclusió:

S'exclouen els individus que tenen alteracions cardiovasculars, artritis, malaltia inflamatòria aguda, malaltia infecciosa o malignitats.

Tots els participants van signar el consentiment informat i el protocol d'estudi va ser revisat i aprovat pel comitè d'ètica i recerca del *Hospital Universitario de La Virgen de la Victoria* de Màlaga.

Cohort 1

Subjectes d'estudi.

Es van reclutar 55 individus (31 homes / 24 dones) de raça caucàsica, d'edat compresa entre 28 i 85 anys, amb un IMC entre 19,8 - 38,5 kg/m² (taula 8 - resultats), amb pes estable en els darrers 3 mesos abans d'entrar en estudi que havien de ser intervinguts quirúrgicament d'una colecistectomia o d'una hernia abdominal a l'hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona.

L'obesitat (IMC \geq 30 kg/m²) és l'única afectació sistèmica permesa en la selecció dels pacients.

Criteri d'exclusió: afectació hepàtica; afectació renal; neoplàsia; malaltia inflamatòria crònica; obesitat mòrbida (IMC \geq 40 kg/m²).

Els pacients van signar el consentiment informat i el protocol d'estudi va ser aprovat pel comitè d'ètica de l'hospital Joan XXIII de Tarragona.

Cohort 2

Subjectes d'estudi

Es varen incloure 24 individus caucàsics (8 homes / 16 dones) amb edat compresa entre els 25 i 59 anys amb un IMC entre 41,3 - 74,6 kg/m² (taula 8 - resultats). Reclutats a les consultes d'Endocrinologia i Nutrició del *hospital universitario Virgen de la Victoria* de Màlaga i programats per realitzar cirurgia bariàtrica. Els pacients es varen subclassificar en Obesos mòrbids amb resistència a la insulina (calculat mitjançant HOMA-IR:insulina sèrica en dejuni (μ IU/mL) \times glucosa en plasma en dejuni (mmol/L)/22.5 - (244, 245)) amb un HOMA-IR $<$ 4,7 i obesos mòrbids amb resistència a la insulina (HOMA-IR $>$ 8) segons dades de població del mateix àmbit territorial publicada en estudis precedents (246).

Criteris d'exclusió:

S'exclouen els individus que reben insulina o medicació hipoglucemiant, que tenen alteracions cardiovasculars, artritis, malaltia inflamatòria aguda, malaltia infecciosa o han rebut tractament susceptible d'alterar el perfil lipídic o paràmetres metabòlics en el moment de la inclusió de l'estudi. Tots els pacients han tingut el pes estable almenys en el darrer mes abans de ser inclosos a l'estudi i no tenen cap afectació renal.

Tots els participants van signar el consentiment informat i el protocol d'estudi va ser revisat i aprovat pel comitè d'ètica i recerca del *Hospital Universitario de La Virgen de la Victoria* de Màlaga.

Cohort 3

Subjectes d'estudi.

La cohort 3 respon al sumatori de les dues cohorts 1 i 2 que es defineix pel conjunt de variables comunes ambdós cohorts i que estan definides sobre els mateixos estàndards. Aquestes variables es valoren si han utilitzat la mateixa metodologia d'anàlisi i el mateix protocol d'estudi.

La cohort queda formada per 79 individus (39 homes / 40 dones) de raça caucàsica que responen als criteris de selecció i exclusió establerts en la cohort 1 i 2.

Cohort 4

Subjectes d'estudi

Es van seleccionar 12 subjectes de la lipoteca del biobanc de l'Hospital Universitari Joan XXIII, per analitzar l'expressió de proteïna en teixit adipós. Són 12 individus de raça caucàsica (10 homes / 2 dones) d'edats compreses entre 23 i els 73 anys, amb un IMC entre 22,6 – 38,0 (veure taula 8) i amb pes estable en els darrers 3 mesos abans d'entrar en estudi, que havien de ser intervinguts quirúrgicament d'una colecistectomia o d'una hernia abdominal.

L'obesitat ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) és l'única afectació sistèmica permesa en la selecció dels pacients.

Criteri d'exclusió: afectació hepàtica; afectació renal; neoplàsia; malaltia inflamatòria crònica; obesitat mòrbida ($IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$).

Els pacients van signar el consentiment informat i el protocol d'estudi va ser aprovat pel comitè d'ètica de l'hospital Joan XXIII de Tarragona formant part de la col·lecció de teixit adipós existent al centre.

2.- Mesures antropomètriques

L'alçada va ser mesurat amb un marge d'error de 0,5 cm. El pes va ser mesurat amb un marge d'error de 0'1 kg. L'IMC va ser calculat dividint el pes (kg) per l'alçada elevada al quadrat (m^2). El perímetre de cintura va ser mesurat mitjançant una cinta mètrica (cm) a mitja distància entre el contorn inferior de la darrera costella i el relleu de la cresta ilíaca es defineix per la part més prominent de la panxa.

La pressió arterial va ser mesurada en posició supina en el braç dret després d'estar en repòs durant 10 minuts. Es fa servir un esfigmomanòmetre de talla de braçal adequat a l'individu. S'anoten la primera i cinquena fase de cada toma que respon a la pressió sistòlica i diastòlica respectivament. Es registren tres tomes en un interval de 5 minuts entre cada una d'elles i valor de referència és la mitja dels tres registres.

El perímetre de maluc es mesura mitjançant cinta mètrica (cm) en el punt més ample del maluc per sobre de les natges sense roba, just damunt de la pell.

L'índex cintura / maluc s'obté de dividir el perímetre de cintura pel perímetre de maluc mesurats en centímetres.

3.- Metodologia de laboratori

Estudi microarrays

Farem una descripció breu de la metodologia emprada, doncs aquest estudi es va subcontractar (veure annex 1)

Cada condició es determina per quadruplicat. Es parteix de 1,5 µRNA per mostra (mostres de teixit adipós subcutani i visceral). Un total de 40 mostres de RNA són obtingudes i transferides als laboratoris IMGGM d'acord amb el sistema de gestió de qualitat de IMGGM, en termes d'etiquetatge i transferència de les mostres, IDs IMGGM-internes.

L'estudi es desenvolupa segons (Tecnologia IMGGM[®]Laboratories): s'utilitzen Microarrays *Agilent Whole Human Genome Oligo* (4x44K format) en combinació amb un protocol de hibridació basat en un sol color. Els senyals en els microarrays van ser detectats mitjançant *Agilent DNA MicroarrayScanner*.

L'expressió gènica diferenciada es determina mitjançant l'aplicació de procediments bioestadístics apropiats pel conjunt de dades. IMGGM[®]Laboratories ha utilitzat el programari *Feature Extraction 9.5.3.1*, *GeneSpring GX 10.0* i *Spot fire Decision Site 9.1.1* per normalitzar i analitzar-les dades en brut.

Totes les dades segueixen un procés de normalització i de validació que acaba definint quina expressió té cada situació analitzada. Es valora l'expressió diferencial en tres situacions metabòliques diferents com són l'obesitat respecte a la no obesitat; la resistència a la insulina respecte la no resistència a la insulina; la diabetis respecte a la no diabetis; així com l'expressió diferencial en pacients obesos entre el teixit adipós visceral i subcutani. Dels resultats obtinguts només es consideren els gens que estan augmentats o disminuïts en respecte a la seva situació de referència. A més d'aquests gens que augmenten o disminueixen s'obté el valor numèric d'aquest canvi expressat en numero de vegades. Per a més detalls es pot consulta la part descriptiva metodològica facilitada per l'empresa responsable del processament d'aquestes mostres adjuntada en l'annex.

Recollida i processament de les mostres de les cohorts

Totes les mostres són recollides després de 12 hores de dejuni prèvies a la intervenció quirúrgica. Les mostres de sang són recollides abans de la cirurgia.

Les mostres de sang s'obtenen per punció de la vena antecubital. S'agafen 20 ml de sang amb EDTA (1mg/ml) per l'obtenció de plasma i 10 ml de sang en tubs de silicona per l'obtenció de sèrum. Tant el plasma com el sèrum es guarden a -80°C abans de ser utilitzats per a fer el seu anàlisi.

Anàlisis bioquímics i hormonals de les mostres

Els nivells de glucosa, creatinina i enzims hepàtics: transaminasa glutamicooxalacètica (GOT), transaminasa glutamicopirúvica (GPT), gammaglutamiltranspeptidasa (GGT) colesterol i triglicèrids plasmàtics són analitzats mitjançant autoanalitzador Advia 1200 (Siemens, Munich; Alemanya) utilitzant mètodes enzimàtics estàndards. El Colesterol HDL es quantificat després de la precipitació amb polietilenglicol (PEG-6000) a temperatura ambient. El colesterol LDL es va calcular segons la fórmula de Friedewald ($LDL-C \text{ (mmol/L)} = TC - HDL-C - TG/2.2$) (1)

Les concentracions de sTWEAK van ser determinades per ELISA mitjançant el TWEAK/TNFSF12 kit DY1090 (R&D Systems Europe). El coeficient de variació intra assaig va ser de 2,5 % i entre assajos va ser del 7%.

HbA1c va ser mesurada per mètode cromatogràfic (Glico Hb Quick Column Procedure, Helena Laboratories, Beaumont, TX). La sensibilitat del mètode fou del 1,5% i el rang normal 3,8-5,5 %.

TNFR1 i TNFR2 van ser determinats per enzimoinmunoassaig sobre fase sòlida amb reactivitat amplificada (BioSource Europe SA, Fleunes, Belgium). El límit de detecció fou del 0,5 ng/ml per sTNFR1 i 0,1 ng/ml per sTNFR2, i els coeficients de variació intra i inter assaig van ser, respectivament, 7% i 9%. El sTNFR1 no van fer reacció creuada amb sTNFR2. El TNF α no va interferir en l'assaig.

La PCR sèrica va ser mesurada per immunonefelometria amb el kit d'alta sensibilitat N (NHHighSensitivity CRP kit) (DadeBehring, Deerfield, IL). La PCR té una sensibilitat del 0,175 mg/l i els coeficients de variació intra i inter assaig van ser del 4,4% i 5,7%, respectivament.

Els nivells d'IL6 van ser mesurats per tècnica d'immunoassaig enzimàtic sandvitx quantitatiu altament sensible Human IL6 Quantikine HS ELISA Kit (R&D Systems, Oxon, UK). La significació mínima detectable va ser 0,039 pg/mL. El coeficient de variació intra- i entre assajos van ser de 9.8% and 11.2%, respectivament.

MATERIALS I MÈTODES

La leptina plasmàtica va ser mesurada utilitzant un Assay Max Human Leptin ELISA Kit (Assaypro, St. Charles, MO, USA). La mínima detecció va ser < 150 pg/ml. El coeficient de variació intra i inter assaig va ser de 4,0% i 7,7%, respectivament.

La insulina plasmàtica es determina per assaig immunoradiomètric (*Coat-A-Countinsulin*; *Diagnostic Products*, Los Angeles, CA). La sensibilitat fou de 2,6 µIU/ml amb coeficients de variació intra i interassaig inferiors al 5 %.

El glicerol plasmàtic es valora mitjançant un kit de determinació de glicerol lliure i mitjançant un assaig de determinació quantitativa enzimàtica (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO). Els coeficients de variació van ser inferiors al 6 % i al 9,1 %, respectivament.

Els nivells d'àcids grassos lliures no esterificats en sèrum van ser determinats en un autoanalitzador Advia 1200 (Siemens) utilitzant un mètode enzimàtic desenvolupat per *Wako Chemicals* (Neuss, Germany). La sensibilitat de l'assaig va ser de 0,01 meq/l amb un coeficient de confiança intra i inter assaig inferior al 8 %.

Mostres de teixit adipós

Les mostres de teixit adipós són processades al poc temps després de ser extretes a quiròfan i rentades amb 1X PBS i congelades immediatament amb N₂ líquid i guardades a -80°.

Es disposen entre 400-500 mg de teixit adipós que s'homogeneïtzen mitjançant una Ultra-Turrax 8 (Ika, Staufen, Germany). El RNA total s'extrau mitjançant *RNeasyLipidTissue Midi Kit* (QiagenScience, Hilden, Germany) i RNA total obtingut es tracta mitjançant *55 U RNase-freeDNase* (Qiagen) segons disposicions procedimentals donades pel fabricant. Doscents cinquanta nanograms de RNA total són transcrits a DNA complementari utilitzant un kit d'alta capacitat de transcripció inversa de cDNA que disposa de inhibició de la RNasa (AppliedBiosystems, Foster City, CA) en un volum final de 20 µl.

φ RT- PCR

Aquesta tècnica ens permet valorar quantitativament l'expressió d'un determinat gen. La transcripció inversa, la RT, consisteix en la transcripció d'una cadena simple inicial de RNA a cDNA de cadena doble mitjançant l'acció de l'enzim transcriptasa inversa. El funcionament d'aquest enzim és similar al d'una DNapolimerasa utilitzant en aquest cas la cadena simple de RNA enlloc de la de DNA. D'aquesta forma disposem de motlles de DNA a partir de les quals es podran obtenir còpies de DNA a partir de la DNA polimerasa.

La PCR, la *polymerase chain reaction*, es basa en la fixació d'un parell de *primers* complementaris, específics a cada gen d'estudi, a una seqüència definida de cadascuna de les cadenes del cDNA que correspon al gen. La

desnaturalització de la cDNA permet la fixació dels *primers*, que es fa juntament amb la d'una molècula *reporter* fluorescent. La metodologia que s'ha emprat és la de Taqman, tot i que hi ha a disposició altres.

Aquesta metodologia utilitza sondes en l'activitat 5'-3' nucleasa de la Taq polimerasa (DNA polimerasa). Els oligonucleòtids que formen aquestes sondes estan doblement marcats, d'una banda per un *fluorocrom reporter* (fluorescència verda - longitud d'ona baixa -) en l'extrem 5' i de l'altra banda per un fluorocrom quencher (fluorescència vermella - longitud d'ona alta-) en l'extrem 3'. Mentre la sonda està hibridada hi ha una neutralització de l'emissió de la fluorescència per un excés de proximitat entre els fluorocroms (<10nm). Aquest fenomen s'anomena *Föster resonance energy transfer* (FRET).

La Taq polimerasa arribada a la sonda hibridada de DNA i per efecte la seva activitat 5'-3' exonucleasa l'acaba degradant. Com a conseqüència d'això es produeix l'alliberament del *quencher* i es facilita l'emissió de fluorescència. La quantitat de fluorescència captada és directament proporcional a l'alliberament de *fluorocrom reporter* alliberat i a la quantitat de DNA motlle. L'amplificació en el termociclador de la reacció guarda relació directa amb el nombre d'amplicons que a la vegada té correspondència amb la concentració inicial de la seqüència marcada inicial de DNA. Aquest cicle és conegut com *threshold cycle* (Ct) i guarda la relació que quan més alta és la concentració de inici més baix és el seu valor.

Sobre 2 ng de cDNA per gen es van fer servir per l'anàlisi RT-PCR (*Reverse transcription Polymerase chain reaction*) per duplicat utilitzant *7900 HT Fast Real-Time PCR system* (Applied Biosystems) i tecnologia Taqman. El programari SDS 2.3 i RQ Manager 1.2 (Applied biosystems) es van utilitzar per determinar els resultats. Totes les dades es van normalitzar en base l'expressió de la ciclofilina A (PPIA). Els càlculs es van fer segons el mètode $Ct (2^{-\Delta\Delta Ct})$.

En l'annex 2 es troba el conjunt de *primers* utilitzats per a la realització d'aquests estudis.

φ Quantificació de la proteïna PODOPLANINA

Aquest protocol ha estat dissenyat per Roche® i aplicat i modificat pel processament de totes les mostres d'estudi, en les quals s'inclou el de la podoplanina. Sempre s'ha de fer servir material autoclavat i lliure de RNAsa.

Aïllament de la proteïna

- Per fer aquesta purificació s'utilitzen els sobrenedants obtinguts en el pas g de la purificació de l'ADN (segons protocol de Tripure®). Es passen a eppendorfs de 2 ml.
- Es fa precipitar la proteïna.
- S'afegeix isopropanol al sobrenedant que s'ha tret del pas g d'aïllament de l'ADN. El volum adient és 1,5 ml d'isopropanol per cada ml de Tripure®.
- Es tapen bé els tubs, s'inverteixen diverses vegades fins que es barregi tot.
- Es deixen incubant a temperatura ambient un mínim de 10 minuts per tal que precipiti la proteïna.
- Es centrifuguen les mostres a 12000 x g durant 10 minuts a 4°C.
- S'eliminen els sobrenedants.
- Es renten els precipitats de proteïna seguint els següents passos (que es repetiran 3 vegades):
- Es resuspèn cada pellet amb uns 2 ml d'hidroclorur de guanidini 0.3 M amb etanol al 95%.
- Es deixen incubar les mostres a temperatura ambient durant 20 minuts.
- Es centrifuguen les mostres a 7500 x g durant 5 minuts a 4°C.
- S'eliminen els sobrenedants.
- A cada pellet de proteïna es fan els següents procediments:
 1. S'afegeixen 2 ml d'etanol absolut a cada pellet.
 2. S'agiten bé, però sense vortejar, per rentar-los.
 3. Es deixen incubar les mostres a temperatura ambient durant aproximadament, 20 minuts.
 4. Es centrifuguen a 7500 x g durant 10 minuts a 4°C.
 5. S'eliminen els sobrenedants.
 6. S'elimina l'excés d'alcohol deixant els eppendorfs oberts perquè s'evapori.
- Els pellets de proteïna es dissolen afegint SDS a l'1% i passant-los repetidament per una punta de pipeta o de xeringa. En cas que costi de resuspendre'ls es posen a 50°C fins que solubilitzin del tot.
- Per quedar-nos només amb la proteïna solubilitzada es centrifuguen les mostres a 10000 x g, 10 minuts a 4°C.
- Es passen els sobrenedant a eppendorfs nets i ja es poden guardar directament a -20°C o bé utilitzar-los per fer *Western Blot*.

Quantificació de proteïna pel mètode BCA

La determinació de la concentració de proteïna es fa mitjançant el mètode BCA de Pierce¹. Aquest mètode requereix fer una recta patró que serveixi per extrapolar els resultats de les mostres i poder determinar la seva concentració.

¹Referència del Kit de quantificació: Pierce™ BCA ProteinAssay Kit, Catalognumber: 23225

Les dilucions emprades per fer la recta patró van ser les següents:

CONCENTRACIONS	VOLUM DE BSA (μ l)	VOLUM D'H ₂ O (μ l)
0 μ g/ μ l	0 μ l	100 μ l
1.25 μ g/ μ l	0.63 μ l	99.27 μ l
2.5 μ g/ μ l	1.25 μ l	98.75 μ l
5 μ g/ μ l	2.5 μ l	97.5 μ l
10 μ g/ μ l	5 μ l	95 μ l
20 μ g/ μ l	10 μ l	90 μ l

De cada dilució de la recta patró i de cada mostra es reparteixen 2 μ l en tres pouets de la placa. Aquesta placa disposa de 96 pouets i s'afegeix a totes 200 μ l de reactiu de color.

El reactiu de color consta de dos solucions A i B que han d'estar en una proporció 50:1.

Un cop afegit el reactiu s'incuba la placa a 37°C durant 30 minuts. Després es deixa temperar durant 5 minuts i es llegeix la placa en un espectrofotòmetre a $\lambda = 562$ nm.

El resultat de concentració que ens doni el programa SoftMax ja és el definitiu.

Western Blot:

Un cop determinada la concentració de proteïna de les mostres es fan els càlculs corresponents per agafar el volum necessari per carregar 25 μ g de proteïna total. El tampó de mostra utilitzat és en condicions reductores (amb 2-mercaptoetanol).

Es preparen gels al 7.5% en acrilamida.

GEL SEPARADOR (1 gel)	7.5%	GEL APILADOR (4%)	Per 2 gels (4 ml)
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.25 ml	Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1ml
Acrilamida/Bisacrilamida	1.25 ml	Acrilamida/Bisacrilamida	0.52 ml
SDS 10%	50 μ l	SDS 10%	40 μ l
H ₂ O Milli-Q	2.43 ml	H ₂ O Milli-Q	2.44 ml
Persulfat amònic 15%	25 μ l	Persulfat amònic 15%	20 μ l
TEMED	2.5 μ l	TEMED	4 μ l

Es preparen els suports on correran les mostres pel gel.

Abans de carregar les mostres s'han d'escalfar a 95°C durant 5 minuts, juntament amb els marcadors de pes molecular.

Dins una cubeta es col·loquen els gels polimeritzats i s'emplena amb "Running Buffer" a pH 8.5 fins que cobreixi els gels.

Es carreguen les mostres i marcadors, una per pouet o butxaca, amb una xeringa Hamilton.

Es fa córrer electroforèticament les mostres a 80 Volts.

MATERIALS I MÈTODES

Per fer la transferència de les proteïnes del gel d'acrilamida a una membrana de nitrocel·lulosa, es necessita un cassette que contingui:

ESPONJA + 2 PAPER WATHMANN + GEL + MEMBRANA NITROCEL·LULOSA + 2 PAPER WATHMANN + ESPONJA.

Tot això es fa amb presència de tampó de transferència amb un 20% de metanol.

Cal precisar que la membrana de nitrocel·lulosa s'ha de deixar 15 minuts abans de la transferència en el tampó de transferència amb el 20% de metanol.

Es transfereix tota la nit a 4°C a un amperatge de 0.20 Ampers.

Feta la transferència, es passen les membranes de nitrocel·lulosa a una solució de ponceau, la qual tenyirà totes les bandes de proteïna de color vermell, i ens donarà una idea de la transferència i la qualitat de la càrrega de proteïna.

Passat el ponceau, es bloquegen les membranes amb 50 ml de solució de bloqueig (TBS-tween al 0.05% amb 5% de llet) durant 1 hora.

S'incuben les membranes amb 10 ml de solució de bloqueig més 10µl d'anticòs primari anti-PDPN (MABC117, Merck), que equival a una dilució de 1:1000 durant 1 hora.

Es fan 2 rentats amb TBS-Tween al 0.05% durant 15 minuts cadascun.

Es fan 2 rentats amb TBS durant 15 minuts cadascun.

S'incuben les membranes amb 10 ml de solució de bloqueig més 2 µl d'anticòs secundari anti-conill, que equival a una dilució de 1:5000 durant 1 hora.

Es fan 2 rentats amb TBS-Tween al 0.05% durant 15 minuts cadascun.

Es fan 2 rentats amb TBS durant 15 minuts cadascun.

Es revelen les membranes amb 2 ml per cada membrana del kit ECL (Amersham) durant 1 minuts, i després de retirar l'excés de ECL, s'emboliquen les membranes amb un plàstic.

Les bandes es capten amb el transiluminador i el programa QuantityOne de BioRad.

Els resultats s'expressen en U.D.O. (Unitats de Densitat Òptica).

4.- COMPARADOR DE LLISTATS DE GENS

Es desenvolupa una base de dades amb el programa *Microsoft Access 2007* per a poder comparar llistats de gens.

La base de dades s'estructura en una única taula sobre la qual es poden anar introduint tants llistats com es desitgi mitjançant una estructura en columnes d'Excel (*Microsoft Excel 2007*). Cada columna corresponen a cadascun dels camps predefinits de interès (símbol del gen, interval de canvi, Expressió - augmenta / baixa, valor p, identificador assaig, nom comú, *entrezgene*). Cada nou llistat introduït a la fulla d'Excel es bolca

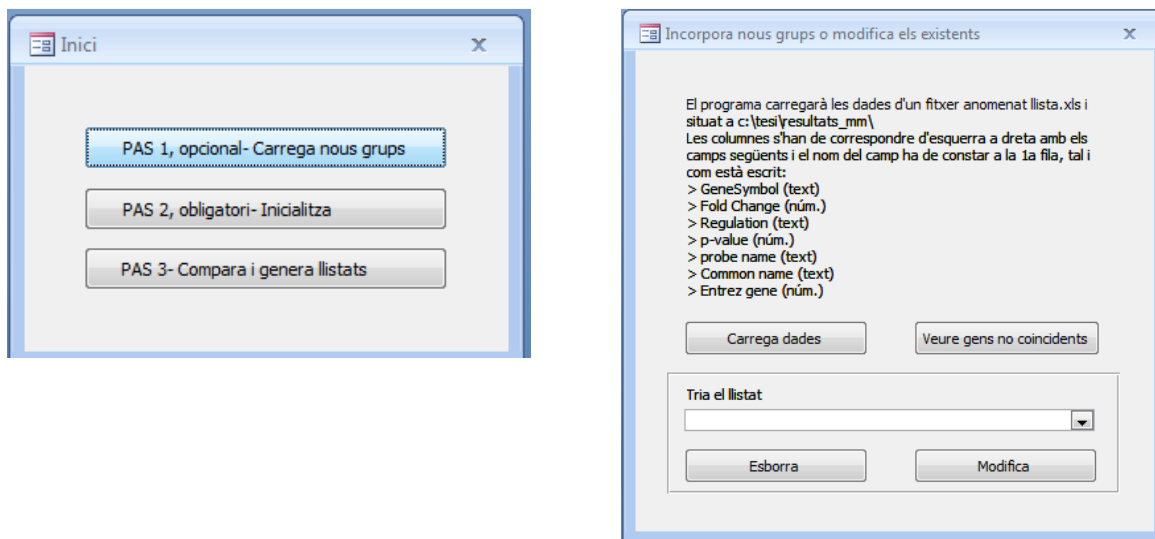
doncs a la taula general única que conté tots els camps definits i el títol de l'agrupació que li assigna l'usuari. Seguint aquest procés *Access* genera automàticament una altra taula que identifica unívocament els gens comparant les diferents agrupacions pel nom del gen, *entrezgen*, i els que no pot identificar dóna la possibilitat de vincular-lo als gens existents.

En cada moment la base de dades ofereix la possibilitat, mitjançant un formulari, de comparar els gens de totes les agrupacions que s'han introduït tenint en compte que sempre hi ha d'haver seleccionada més d'una agrupació. Després genera un formulari binari de resposta a la demanda de comparació on es llisten els gens per ordre alfabètic i una columna per a cada agrupació comparada on consta el gen *i*, si es dóna, l'expressió diferenciada del gen. Alhora aquesta informació es bolca a una full d'Excel per a facilitar-ne l'ús de la informació.

Quantes més agrupacions es seleccionen els gens coincidents seran menors i és donarà més concreció a la relació entre agrupacions.

L'ús de la base de dades queda simplificat per l'ús de tres formularis diferents que corresponen als tres passos diferenciats del procés de comparació. En el pas 1 es dóna l'opció de introduir a la base de dades un nou llistat de gens o modificar o esborrar un llistat introduït precedentment que s'ha fet de manera errònia (figura 15).

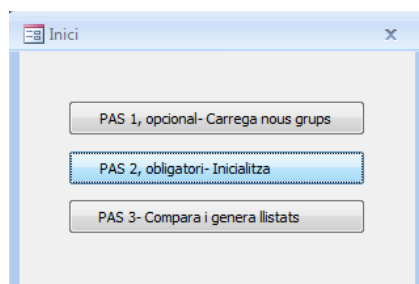
Figura 15. Pas 1 Carregar llistats de gens.



En el segon pas el que es fa és inicialitzar el procés de consulta a fi i efecte de tenir tots els llistats introduïts (figura 16).

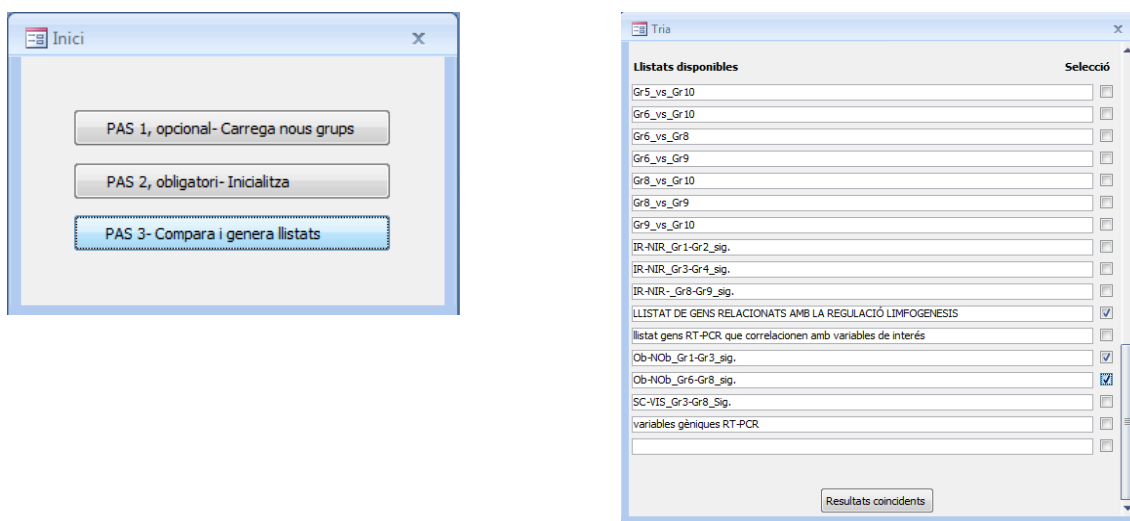
MATERIALS I MÈTODES

Figura 16. Pas 2: Validació dels llistats de gens.



En la tercera i darrera fase es seleccionen els llistats dels gens que es volen comparar i s'executa la consulta (figura 17).

Figura 17. Pas 3: Selecció dels llistats de gens i execució de la comparació.

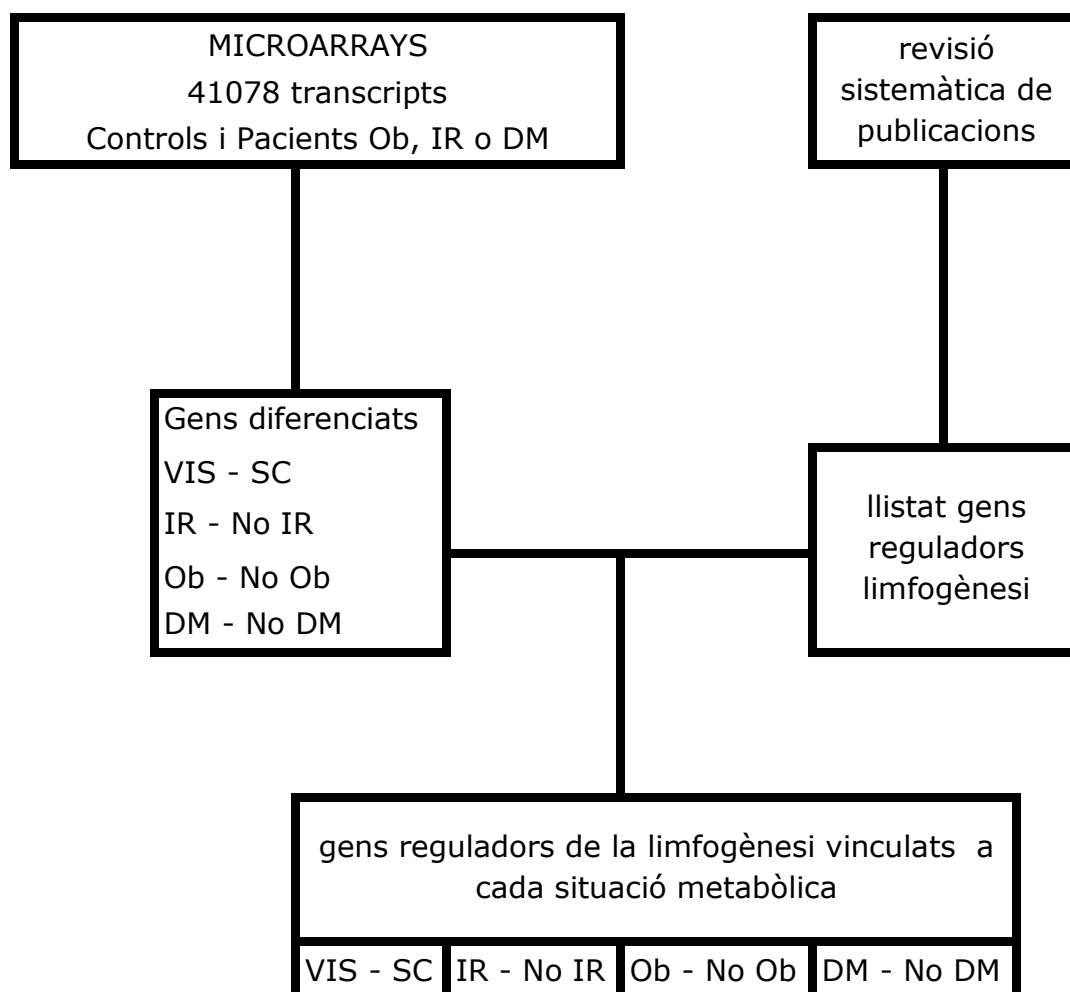


El resultat del procés de comparació defineix un nou llistat que està compost pels gens comuns a tots els llistats seleccionats.

En la present tesi aquest comparador de llistats de gens ha sigut utilitzat en l'estudi 1 i en l'estudi 5.

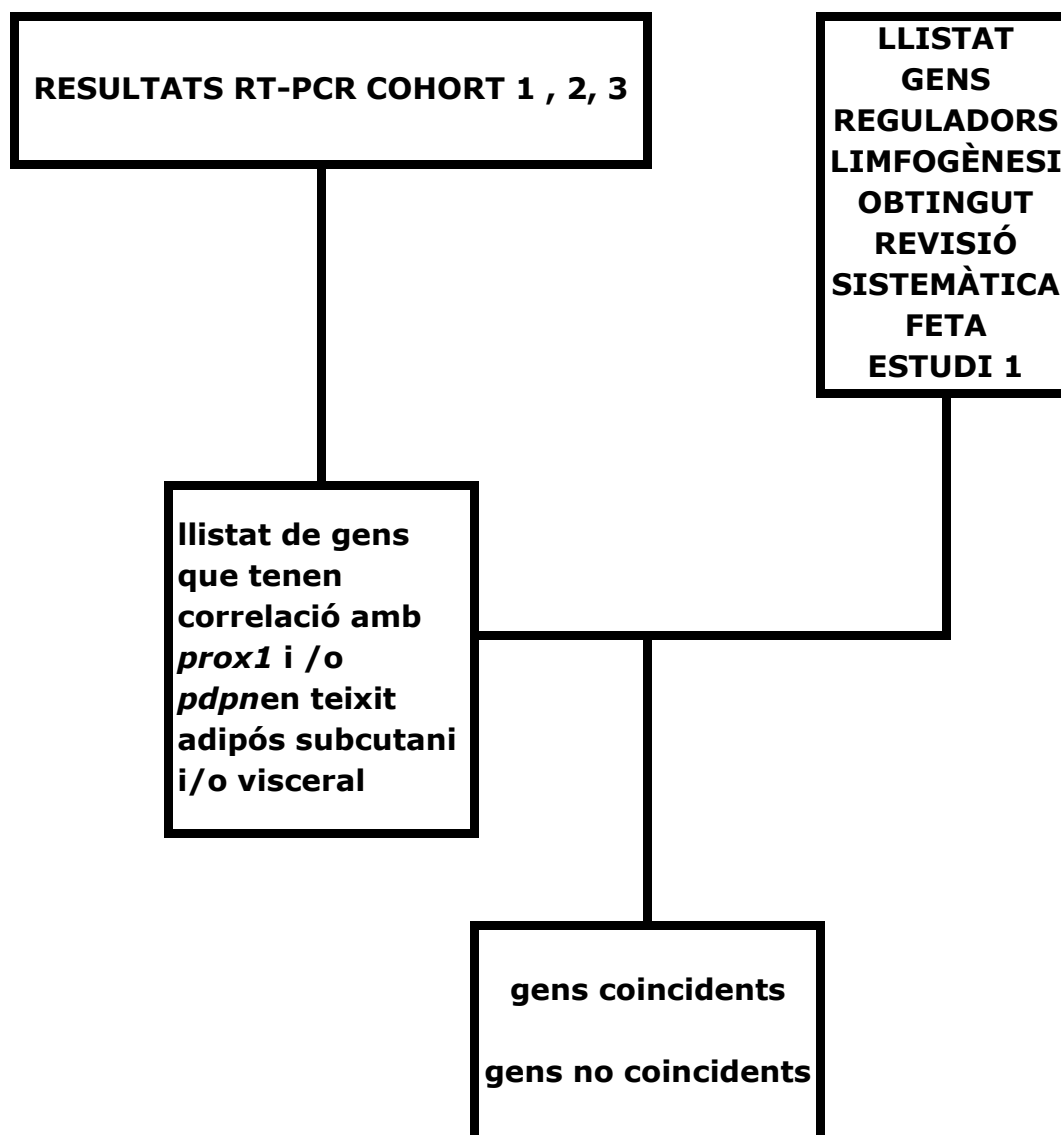
El llistat obtingut de la recerca sistemàtica de publicacions es compara amb el llistat de gens diferencialment expressats resultant de l'estudi de microarrays en cada situació metabòlica (estudi 1) (figura 18) així com amb el llistat de gens que s'associen amb l'expressió de *prox1* i *pdpn* (estudi 5) (figura 19).

Figura 18. Metodologia d'estudi dels *microarrays* en funció llistat gens reguladors limfogènesi (estudi 1).



El resultat de la comparació feta en l'estudi 1 descriu quins gens vinculats a la limfogènesi (llistat obtingut de la recerca sistemàtica de publicacions) estan diferencialment expressats en cada situació metabòlica. Els resultats s'expressen amb l'abreviatura representativa de cada gen, amb el valor de canvi (numero de vegades que canvia) i la relació de canvi en relació a la situació de referència (augmenta / baixa).

Figura 19. Metodologia d'estudi dels gens en funció llistat gens reguladors limfogènesi (estudi 5).



El resultat de la comparació fet en l'estudi 5 descriu quins gens dels que s'han associat amb l'expressió de *prox1* i *pdpn* són coincidents amb el llistat de gens vinculats a la limfogènesi. En aquest cas els resultats a destacar són els no coincidents que són els que no s'havien associat prèviament amb la limfogènesi. Els resultats s'expressen amb l'abreviatura resultant de cada gen.

5.- ANÀLISI ESTADÍSTIC

L'anàlisi estadístic es va fer mitjançant el programari estadístic SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versió 19 (Chicago, IL). En una primera fase d'estudi es valora la normalitat de les variables contínues mitjançant la prova Kolmogórov-Smirnov. Aquesta prova permet determinar

el grau d'aproximació entre dues distribucions. En la mesura que una de les distribucions és la distribució normal, l'altra en la mesura que no defineix diferències en relació a la normal indicarà que és normal i en cas contrari no.

Les variables clíniques i antropomètriques que segueixen una distribució normal són expressades com mitjana \pm desviació estàndard. Les variables que no segueixen una distribució gaussiana s'expressen com mediana (rang Inter quartil).

En la mesura que les variables no segueixen una distribució normal es van transformar en logarítmiques, exponencials o inverses. Les variables transformades que segueixen sent no normals es tractaren amb proves no paramètriques.

Les proves paramètriques es defineixen sota la premissa que es coneix la probabilitat que segueix la població de la qual s'ha extret la mostra, que seria la pròpia a la distribució normal.

Les proves paramètriques requereixen, a part de la distribució normal de la variable quantitativa en els grups que es comparen, la homogeneïtat de variàncies en les poblacions dels grups que es comparen i una N mostral no inferior a 30.

Les proves paramètriques que es van utilitzar per quantificar la relació, associació o independència, entre una variable quantitativa i una categòrica va ser la t -de Student (una o dues mostres relacionades o independents) o la ANOVA (més de dues mostres independents), o el coeficient de correlació de Pearson, entre dues variables quantitatives.

Si les variables a contrastar no responien a paràmetres de població de distribució normal o les mateixes condicionants de la prova paramètrica es feien servir proves no paramètriques. Les proves no paramètriques que s'han utilitzat van ser la χ^2 -quadrat que serveix per a determinar la bondat d'ajust i la independència entre variables categòriques. Donada la petita mida de la mostra analitzada o per la petita mida dels grups que es donaven després de la seva segmentació s'utilitzava l'estadístic exacte de Fisher.

Mann-Whitney, equivalent no paramètrica de la t -Student, valora quantitativament la relació, associació o independència entre una variable quantitativa i una categòrica en una o dues mostres relacionades o independents.

Kruskal-Wallis, equivalent no paramètric de l'anàlisi de variància (ANOVA), es va fer servir per tal de valorar quantitativament la relació, associació o independència entre una variable quantitativa i una categòrica en més de dues mostres independents.

El coeficient de correlació de Spearman, que el que fa és mesurar la correlació entre dues variables quantitatives.

MATERIALS I MÈTODES

Detectades l'existència de relacions entre les variables d'estudi, *prox1* i *pdpn*, d'una banda i variables vinculades a la regulació metabòlica per l'altra es fa estudi de regressió lineal.

RESULTATS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EVIDÈNCIES EN TEIXIT ADIPÓS D'ALTERACIONS GÈNIQUES DELS VASOS LIMFÀTICS EN L'OBESITAT

Alfons Horra Pueyo

Estudi 1 – Limfogènesi i alteració metabòlica (estudi *microarrays*)

1. *Microarrays* de teixit adipós.

En el *microarray* realitzat en mostres de teixit adipós subcutani i visceral provinents de pacients en diferents condicions, sense alteració metabòlica i amb alteració metabòlica (IR; Ob i DM) s'han pogut establir 41078 transcripts que han permès valorar l'expressió diferenciada d'una sèrie de gens en cada situació d'alteració metabòlica en relació a la condició de no alteració.

La comparació entre teixit adipós subcutani i visceral posa de manifest la presència de 4039 expressions diferenciades de gens. Pel que fa a la resistència a la insulina hi ha 3011 expressions diferenciades de gens. La distinció entre obesitat i no obesitat manifesta 3480 expressions diferenciades de gens. I, en darrer terme, la consideració de la diabetis en relació a la no diabetis evidencia 2671 expressions diferenciades de gens (taula 2).

Taula 2. Quantificació dels gens expressats diferencialment en cada situació metabòlica en relació a la condició de no alteració metabòlica en *microarrays* de teixit adipós.

VIS/SC (4039)		IR/No IR (3011)		Ob/ No Ob (3480)		DM/ No DM (2671)	
expressió		expressió		expressió		expressió	
augmentada	disminuïda	augmentada	disminuïda	augmentada	disminuïda	augmentada	disminuïda
2908	1706	1083	1959	1494	1986	1219	1453

Destacar, d'inici, que hi ha més gens que disminueixen la seva expressió en el context de l'alteració metabòlica. Constatar també que hi ha més gens que augmenten la seva expressió en teixit adipós visceral que no pas que el disminueixen en relació al teixit adipós subcutani (taula 2).

2. Gens vinculats a la regulació de la limfogènesi

S'ha creat un llistat de gens, 174 gens (taula 3), que s'han relacionat de manera directa o indirecta amb la limfogènesi d'acord a una exhaustiva revisió bibliogràfica (1155 referències).

Aquest llistat, més enllà de relacionar-se amb la regulació de la limfogènesi, té altres associacions funcionals possibles. Per a determinar quines són s'ha avaluat el llistat dins el programa de classificació de pantherdb (247) i s'ha constatat que majoritàriament els gens que conté intervenen en els processos biològics vinculats al funcionament cel·lular, a la regulació biològica, al desenvolupament, al sistema immunitari, al metabolisme i en la resposta a estímuls.

RESULTATS

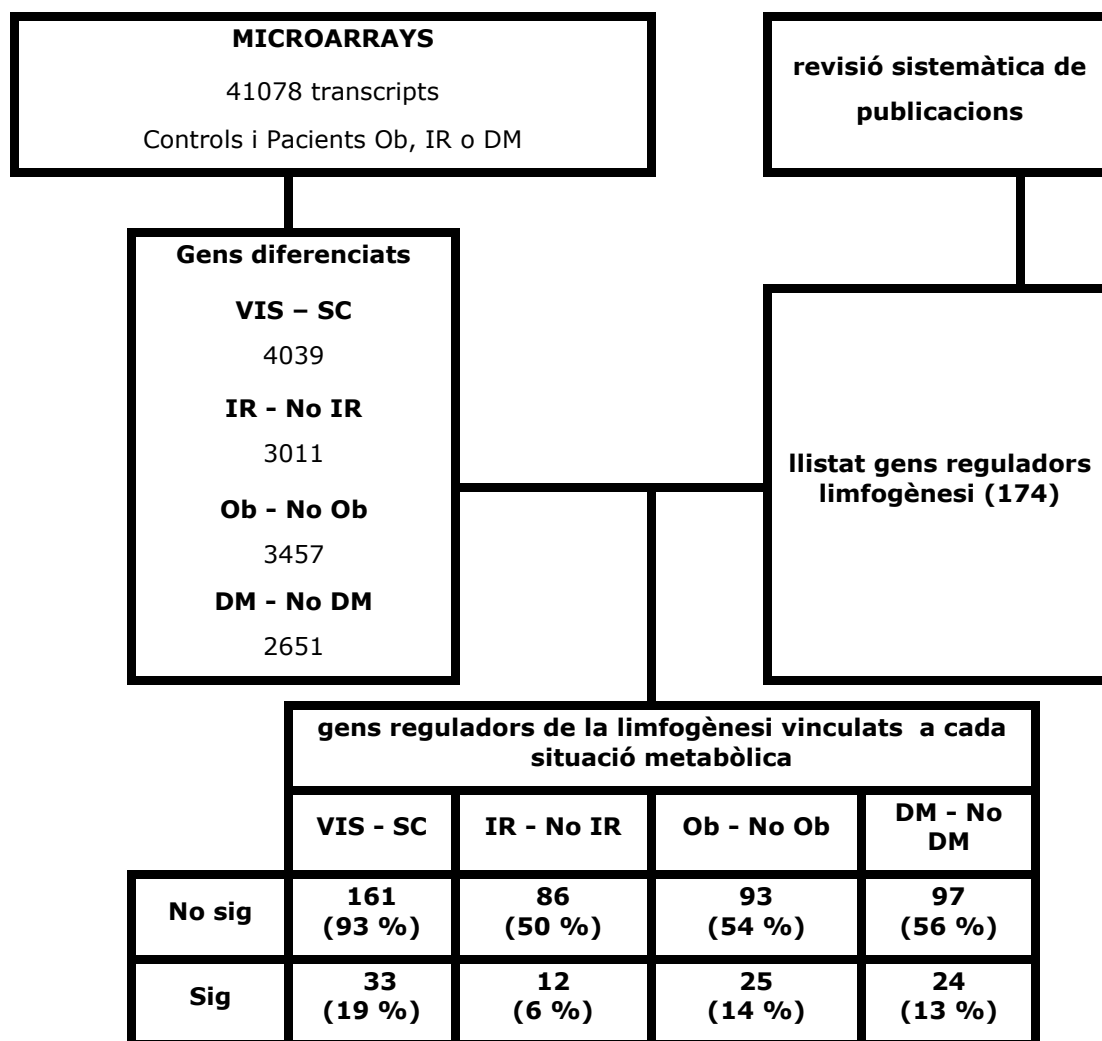
Taula 3. Llistat gens vinculats a la regulació de la limfogènesi.

<i>Adm</i>	<i>Dab1</i>	<i>Lcp2</i>	<i>Rela</i>
<i>Akt1</i>	<i>Dcc</i>	<i>Lrp8</i>	<i>Relb</i>
<i>Angpt2</i>	<i>E2f7</i>	<i>Lta</i>	<i>Reln</i>
<i>Angptl4</i>	<i>E2f8</i>	<i>Ltb</i>	<i>Rorc</i>
<i>Bmp2</i>	<i>Efnb2</i>	<i>Ltbr</i>	<i>Scarb1</i>
<i>C1galt1</i>	<i>Elavl1</i>	<i>Lyve1</i>	<i>Sema3a</i>
<i>Calcr1</i>	<i>Emilin1</i>	<i>Madcam1</i>	<i>Slk</i>
<i>Camp</i>	<i>Ephb1</i>	<i>Mapt</i>	<i>Smad4</i>
<i>Ccbe1</i>	<i>Ephb2</i>	<i>Milt4</i>	<i>Sos1</i>
<i>Ccl1</i>	<i>Ephb4</i>	<i>Mmp2</i>	<i>Sox18</i>
<i>Ccl19</i>	<i>Epo</i>	<i>Mmp9</i>	<i>Spred1</i>
<i>Ccl2</i>	<i>Flt1</i>	<i>Nfatc1</i>	<i>Spred2</i>
<i>Ccl20</i>	<i>Flt4</i>	<i>Nfkb1</i>	<i>Syk</i>
<i>Ccl21</i>	<i>Fn1</i>	<i>Nfkb2</i>	<i>Tbx1</i>
<i>Ccl5</i>	<i>Foxc2</i>	<i>Notch1</i>	<i>Tek</i>
<i>Ccl7</i>	<i>Gata2</i>	<i>Nr2f2</i>	<i>Tgfb1</i>
<i>Ccl8</i>	<i>Gipc1</i>	<i>Nrp1</i>	<i>Tgfb1</i>
<i>Ccne1</i>	<i>Gja1</i>	<i>Nrp2</i>	<i>Tgfb2</i>
<i>Ccr7</i>	<i>Gja4</i>	<i>Ntn4</i>	<i>Thbs1</i>
<i>Cd11b</i>	<i>Gjb2</i>	<i>Pdpn</i>	<i>Tie1</i>
<i>Cd36</i>	<i>Gjc2</i>	<i>Pecam1</i>	<i>Tlr1</i>
<i>Cdh5</i>	<i>Hgf</i>	<i>Pik3ca</i>	<i>Tlr10</i>
<i>Cdk5</i>	<i>Hras</i>	<i>Pik3r1</i>	<i>Tlr2</i>
<i>Celsr1</i>	<i>Icam1</i>	<i>Pitx2</i>	<i>Tlr3</i>
<i>Cldn5</i>	<i>Id2</i>	<i>Plcg2</i>	<i>Tlr4</i>
<i>Clec1b</i>	<i>Ifnar1</i>	<i>Plxna1</i>	<i>Tlr5</i>
<i>Cmtm7</i>	<i>Ifnar2</i>	<i>Ppfibp1</i>	<i>Tlr6</i>
<i>Col18a1</i>	<i>Ifng</i>	<i>Ppp1r13b</i>	<i>Tlr7</i>
<i>Col1a</i>	<i>Ifngr1</i>	<i>Prkaa1</i>	<i>Tlr8</i>
<i>Csk</i>	<i>Ifngr2</i>	<i>Prkca</i>	<i>Tlr9</i>
<i>Ctnnb1</i>	<i>Igf1</i>	<i>Prox1</i>	<i>Tnfrsf11a</i>
<i>Cxadr</i>	<i>Ikbkg</i>	<i>Pten</i>	<i>Tnfrsf1a</i>
<i>Cxcl1</i>	<i>Il1b</i>	<i>Ptger2</i>	<i>Tnfrsf1b</i>
<i>Cxcl10</i>	<i>Il7</i>	<i>Ptgs2</i>	<i>Tnfsf10</i>
<i>Cxcl11</i>	<i>Il7r</i>	<i>Ptpn11</i>	<i>Tnfsf11</i>
<i>Cxcl12</i>	<i>Itga6</i>	<i>Ptpn14</i>	<i>Unc5b</i>
<i>Cxcl13</i>	<i>Itga9</i>	<i>Ptprb</i>	<i>Vcam1</i>
<i>Cxcl3</i>	<i>Itgb1</i>	<i>Ptprc</i>	<i>Vegfa</i>
<i>Cxcl5</i>	<i>Kdr</i>	<i>Rac1</i>	<i>Vegfc</i>
<i>Cxcl6</i>	<i>Kif11</i>	<i>Raf1</i>	<i>Vezf1</i>
<i>Cxcl9</i>	<i>Klf2</i>	<i>Ramp2</i>	<i>Vldlr</i>
<i>Cxcr1</i>	<i>Kras</i>	<i>Rara</i>	<i>Wnt5b</i>
<i>Cxcr4</i>	<i>Lama5</i>	<i>Rasa1</i>	
<i>Cxcr5</i>	<i>Lcn2</i>	<i>Rel</i>	

3. Gens vinculats a la regulació de la limfogènesi presents en l'alteració metabòlica (resistència a la insulina, obesitat, diabetis)

A partir d'aquest llistat de gens vinculats a la regulació de la limfogènesi s'estableix quins d'ells estan més presents en cada situació metabòlica (figura 20).

Figura 20. Sumari estudi dels *microarrays* en funció llistat gens reguladors limfogènesi.



De manera general podem destacar que al voltant del 50% dels gens de la llista de gens associats a la regulació de la limfogènesi varien en totes les situacions estudiades d'alteració metabòlica en els *microarrays*, independentment de la seva significació i del sentit de la seva variació.

De les situacions d'alteració metabòlica estudiades (Ob, DM i IR)(taula 4, 5 i 6) l'obesitat és la que presenta major nombre de gens reguladors de la limfogènesi expressats diferencialment de manera significativa ($p < 0,05$ segons prova t de Welch) (15%) considerant els resultats de teixit adipós visceral i subcutani de manera conjunta.

En pacients obesos (taula 4) s'observa molta diferència entre la quantitat de gens que s'expressen diferencialment en teixit adipós visceral en comparació al teixit adipós subcutani (13% i 1% respectivament). El teixit adipós subcutani i visceral no comparteixen cap gen però sí que hi ha

RESULTATS

presència de dos gens paralogs entre ells, el de CCL7 en teixit adipós subcutani i el de CCL2 en el visceral.

Els resultats en teixit adipós visceral de pacients obesos ens mostren gens majoritàriament augmentats (taula 4). El 83% de tots els gens del llistat de la limfogènesi modifiquen la seva expressió en funció de la condició d'obesitat. Aquests correspondrien a processos relacionats amb inflamació, immunitat i apoptosi. En teixit adipós subcutani d'obesos només trobem dos gens expressats significativament de manera diferenciada: CCL7 que augmenta i EPHB4 que disminueix.

Taula 4. Llistat de gens reguladors de la limfogènesi diferencialment expressats en l'obesitat (Ob).

Obesitat vs No Obesitat					
Teixit adipós visceral			Teixit adipós subcutani		
Gen	expressió	nivell canvi	Gen	expressió	nivell de canvi
<i>Ptgs2</i>	augmenta	59,5092	<i>Ccl7</i>	augmenta	3,2512
<i>Il1b</i>	augmenta	50,2861	<i>Ephb4</i>	baixa	1,3324
<i>Cxcl3</i>	augmenta	37,1129			
<i>Ptgs2</i>	augmenta	29,8716			
<i>Cxcl3</i>	augmenta	28,3378			
<i>Il8ra</i>	augmenta	22,8079			
<i>Cxcr4</i>	augmenta	15,8460			
<i>Ccl2</i>	augmenta	12,7496			
<i>Icam1</i>	augmenta	7,3385			
<i>Klf2</i>	augmenta	6,2967			
<i>Ifng</i>	augmenta	4,2253			
<i>Ccr7</i>	augmenta	3,5658			
<i>Klf2</i>	augmenta	3,5098			
<i>Nrp2</i>	augmenta	3,1872			
<i>Rel</i>	augmenta	2,7575			
<i>Id2</i>	augmenta	2,3217			
<i>Tlr1</i>	augmenta	2,2594			
<i>Ptger2</i>	augmenta	2,0936			
<i>Lta</i>	augmenta	1,7635			
<i>Angptl4</i>	augmenta	1,6257			
<i>Rela</i>	augmenta	1,6170			
<i>Pik3r1</i>	augmenta	1,4270			
<i>Cxcl12</i>	baixa	7,0703			
<i>Igf1</i>	baixa	2,6100			
<i>Igf1</i>	baixa	2,4473			
<i>Emilin1</i>	baixa	1,2921			
<i>Col18a1</i>	baixa	1,2326			

S'ha de destacar també que els gens que es modifiquen en l'obesitat ho fan amb un nivell de variabilitat molt alt arribant a nivells de canvi de gairebé 60 ó 50 vegades (PTGS2 i IL1B respectivament) com a més destacables. El que els vincularia molt amb l'obesitat.

Quan valorem en els resultats dels *microarrays* la condició de Diabetis en front de la de No Diabetis en pacients obesos (taula 5) observem un grau similar d'expressió diferenciada de gens reguladors de la limfogènesi en

teixit adipós subcutani (7%) i teixit adipós visceral (8%). Globalment hi hauria més gens reprimits que sobre expressats, 86% vs 13% en teixit adipós subcutani i 76% vs 23% en teixit adipós visceral.

Taula 5. Llistat de gens reguladors de la limfogènesi diferencialment expressats en la diabetis (DM) en presència d'obesitat.

Diabetis vs No diabetis					
Teixit adipós visceral obès			Teixit adipós subcutani obès		
Gen	expressió	nivell canvi	Gen	expressió	nivell de canvi
<i>Pitx2</i>	augmenta	3,6357	<i>Reln</i>	augmenta	3,3986
<i>E2f8</i>	augmenta	2,3060	<i>Id2</i>	augmenta	1,3556
<i>Col18a1</i>	augmenta	1,4038	<i>Cdh5</i>	baixa	2,1691
<i>Il1b</i>	baixa	6,7131	<i>Flt4</i>	baixa	2,4993
<i>Cxcl3</i>	baixa	5,1943	<i>Flt4</i>	baixa	1,7721
<i>Cxcl3</i>	baixa	4,8430	<i>Ephb4</i>	baixa	2,1640
<i>Cxcr4</i>	baixa	4,6827	<i>Tnfrsf1b</i>	baixa	1,9956
<i>Icam1</i>	baixa	2,5642	<i>Notch1</i>	baixa	1,9074
<i>Ccl8</i>	baixa	2,1930	<i>Ctnnb1</i>	baixa	1,6979
<i>Tnfrsf1b</i>	baixa	1,6757	<i>Nfkb2</i>	baixa	1,6693
<i>Nfkb2</i>	baixa	1,5272	<i>Scarb1</i>	baixa	1,6627
<i>Tlr4</i>	baixa	1,5220	<i>Vegfa</i>	baixa	1,6385
<i>Ifngr2</i>	baixa	1,1478	<i>Itga9</i>	baixa	1,6082
			<i>Foxc2</i>	baixa	1,3820
			<i>Kras</i>	baixa	1,2569

Quan es valora la condició de IR vs No IR en pacients amb i sense obesitat (taula 6) s'observa que la variabilitat dels gens relacionats amb la regulació de la limfogènesi es baixa.

Taula 6. Llistat de gens reguladors de la limfogènesi diferencialment expressats en la resistència a la insulina (IR).

Insulinoresistència vs No Insulinoresistència								
Teixit adipós visceral no obesos			Teixit adipós visceral obesos			Teixit adipós subcutani obesos		
Gen	Expressió	nivell canvi	Gen	expressió	nivell canvi	Gen	expressió	nivell canvi
<i>Ccl2</i>	augmenta	3,2653	<i>Tlr2</i>	augmenta	3,5865	<i>Hgf</i>	augmenta	1,5095
<i>Efnb2</i>	augmenta	1,3736	<i>Relb</i>	augmenta	2,1837			
<i>Gjb2</i>	baixa	2,5964	<i>Tlr4</i>	augmenta	1,8522			
<i>Angpt2</i>	baixa	1,6714	<i>Ifngr1</i>	augmenta	1,4383			
<i>Blr1</i>	baixa	1,0175	<i>Hgf</i>	augmenta	1,2678			
			<i>Gipc1</i>	baixa	1,3832			
			<i>Hras</i>	baixa	1,3670			

Els gens que estan vinculats a la regulació de la limfogènesi que coincideixen amb els que estan modificats en la *microarray* on es confronta

RESULTATS

el teixit adipós visceral en relació al teixit adipós subcutani queden reflectits en la taula 7.

Taula 7. Llistat de gens reguladors de la limfogènesi diferencialment expressats en el teixit adipós visceral en relació al subcutani en obesos.

Teixit adipós visceral vs Teixit adipós subcutani					
Teixit adipós obès					
Gen	expressió	nivell de canvi	Gen	expressió	nivell de canvi
<i>Pitx2</i>	augmenta	14,3293	<i>Ccl21</i>	baixa	11,6229
<i>Ptpn11</i>	augmenta	2,1693	<i>Cxcl6</i>	baixa	10,0886
<i>Ptpn11</i>	augmenta	2,1614	<i>Cxcr4</i>	baixa	6,8655
<i>Angptl4</i>	augmenta	1,9952	<i>Reln</i>	baixa	5,1825
<i>Mapt</i>	augmenta	1,9327	<i>Prox1</i>	baixa	4,7418
<i>Mapt</i>	augmenta	1,7709	<i>Prox1</i>	baixa	2,7108
<i>Ptpn11</i>	augmenta	1,7925	<i>Ccl5</i>	baixa	4,5772
<i>Ptpn11</i>	augmenta	1,7323	<i>Celsr1</i>	baixa	3,5246
<i>Hras</i>	augmenta	1,4770	<i>Ifng</i>	baixa	3,3292
<i>Scarb1</i>	augmenta	1,4456	<i>Klf2</i>	baixa	2,7334
<i>Tgfbr1</i>	augmenta	1,3094	<i>Gja12</i>	baixa	2,3856
<i>Gipc1</i>	augmenta	1,2378	<i>Klf2</i>	baixa	2,2508
			<i>Vegfc</i>	baixa	2,1111
			<i>Id2</i>	baixa	2,0295
			<i>Id2</i>	baixa	1,9018
			<i>Ccbe1</i>	baixa	1,9907
			<i>Ptpnc</i>	baixa	1,8961
			<i>Ppp1r13b</i>	baixa	1,7055
			<i>Prkca</i>	baixa	1,5237
			<i>Tgfb1</i>	baixa	1,4185
			<i>Pten</i>	baixa	1,2200

Estudi 2 – Valoració de l'expressió de *prox1* i de *pdpn* en funció del tipus de teixit adipós

La taula 8 descriu les dades clíniques, antropomètriques i bioquímiques de cadascuna de les cohorts utilitzades per aquest estudi.

Taula 8. Descripció dades clíniques, antropomètriques i bioquímiques dels pacients de les cohorts 1, 2, 3 i 4.

	COHORT (1)	COHORT (2)	COHORT (3)	COHORT (4)
N	55	24	79	12
Gènere (Home / dona)	31 / 24	8 / 16	39 / 40	10 / 2
Edat (anys)	58 ± 14	39 ± 11	52 ± 16	52 ± 17
Pes (Kg)	74,2 ± 13,1	149,1 ± 29,3	79,5 (68,0-115,3)	85,0 ± 20,0
IMC (kg / m ²)	27,3 ± 3,7	56,8 ± 8,7	28,6 (25,5 - 45,0)	28,3 ± 5,6
Colesterol total (mM)	5,08 ± 1,11	5,13 ± 1,05	5,11 ± 1,08	5,45 ± 0,93
HDL colesterol (mM)	1,40 ± 0,39	1,11 ± 0,28	1,27 ± 0,43	1,21 ± 0,24
LDLcFriedewald (mM)	3,13 ± 1,02	3,41 ± 1,04	3,25 ± 0,99	3,72 ± 0,79
Triglicèrids (mM)	1,22 ± 0,68	1,57 ± 0,91	1,18 ± 0,48	1,35 ± 0,65
Glicerol (µM)	222,3 ± 137,6			241,5 ± 123,0
Glucosa (mM)	5,52 (4,87 - 6,11)	5,26 ± 0,65	5,41 ± 0,84	5,39 (4,88 - 5,80)
Insulina (µU/ml)	2,18 ± 0,49	3,24 ± 2,06	3,88 (2,05 - 7,03)	8,65 ± 7,50*
PAS (mmHg)	130 ± 17	138 ± 20	132 ± 18	132 ± 22
PAD (mmHg)	73 ± 12	83 ± 14	76 ± 13	78 ± 7
Diabetis (%)	14	29	18	0
HTA (%)	23	50	22	16

* n=6; Les dades s'expressen com mitjana ± DE (distribució normal); mediana (RIQ) (distribució no normal)

Com que els estudis comparatius de l'expressió gènica de *prox1* i *pdpn* en funció del gènere no van determinar diferències significatives en cap dels teixits considerem que aquest dos gens no presenten dimorfisme sexual. Això ha conduït a fer l'anàlisi de les cohorts en la seva globalitat sense fer distinció del gènere (dades no mostrades).

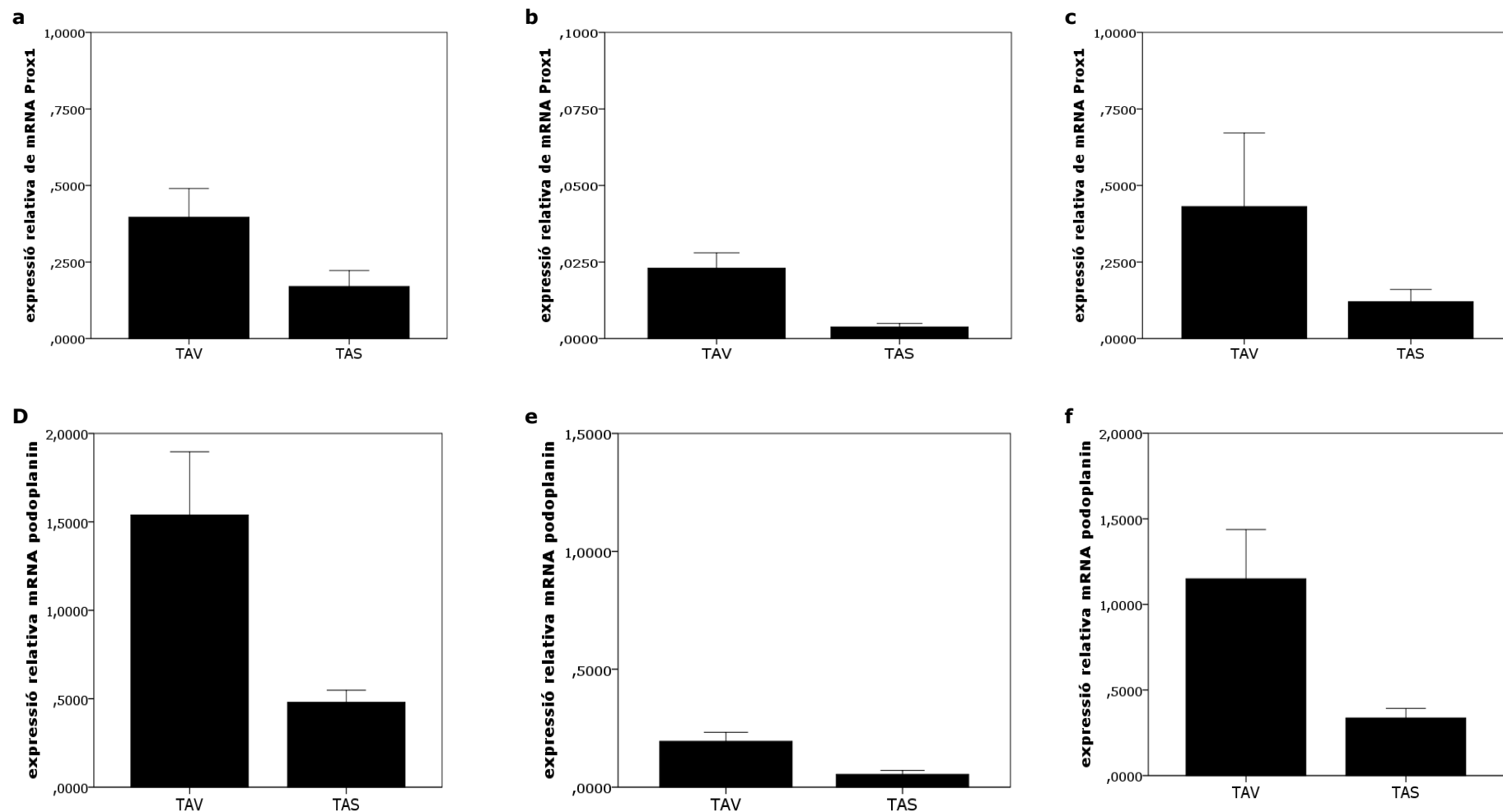
Els resultats dels microarrays mostren que l'expressió del gens *prox1* i *pdpn* està disminuïda en teixit adipós subcutani en relació al visceral en pacients obesos tot i que només es donen variacions estadísticament significatives en el cas de *prox1* (Taula 9). L'expressió dels gens d'interès valorada per RT-PCR mostra en les tres cohorts major expressió en teixit adipós visceral que subcutani (Figura 21 i taula 10).

Taula 9. Expressió diferencial de *prox1* i *pdpn* en *microarray* de teixit adipós d'obesos.

GEN	SONDA	SC vs VIS		p
		expressió	Nivell de canvi	
<i>prox1</i>	A_24_P88266	disminuïda	2,711	<0,05
	A_23_P137634	disminuïda	4,742	<0,05
<i>pdpn</i>	A_23_P430068	disminuïda	2,983	n.s
	A_24_P299685	disminuïda	3,269	n.s

P<0,05 segons prova t de Welch

Figura 21. Expressió de *prox1* (a,b,c) i *pdpn* (d,e,f) en teixit adipós subcutani (TAS) i visceral (TAV) en les diferents cohorts: a i d cohort 1; b i e cohort 2; c i f cohort 3.



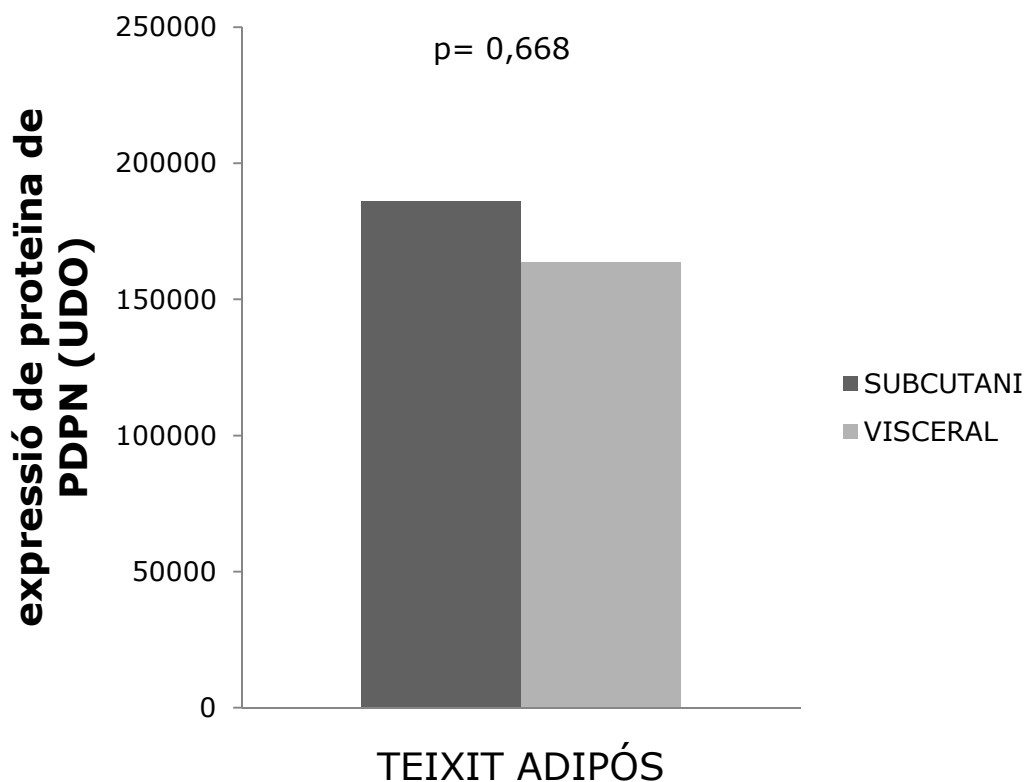
Taula 10. Expressió gènica per RT-PCR de *prox1* i *pdpn* en funció del tipus teixit adipós.

gen	tipus de teixit	Cohort 1	Cohort 2	Cohort 3
<i>Prox1</i>	SC	0,1065 (0,0436 - 0,2401)	0,0038 ± 0,0027	0,0515 (0,0056-0,1551)
	VIS	0,3966 ± 0,3473*	0,0230 ± 0,0124*	0,1962 (0,0315-0,4282)*
<i>Pdpn</i>	SC	0,4792 ± 0,2524	0,0545 ± 0,0401	0,3364±0,2496
	VIS	1,5386 ± 1,3234*	0,1945 ± 0,0935*	0,6100 (0,2400-1,6300)*

Les dades s'expressen com mitjana ± DE (distribució normal); mediana (RIQ) (distribució no normal).
 *p < 0,001 prova de U de Mann-Whitney.

S'avalua l'expressió proteica de PDPN en la cohort 4 constatant que no hi ha diferències significatives entre els dos tipus de teixit adipós (Figura 22).

Figura 22. Quantificació d'expressió proteica de PDPN en la cohort 4 (relació teixit adipós subcutani i visceral).



p de la prova de U de Mann-Whitney

Estudi 3 – Valoració de l'expressió de *prox1* i *pdpn* en presència d'alteració metabòlica

1. Expressió de *prox1* i *pdpn* en funció de la presència d'alteració metabòlica.

La taula 11 resumeix les dades clíniques, bioquímiques, antropomètriques dels pacients de la cohort d'estudi 3 en funció de si presenten o no alteració metabòlica (No:IMC < 25 i sense diabetis; Si:IMC ≥ 25 amb o sense diabetis). Els grups generats per la segmentació de la cohort en funció de l'alteració metabòlica estan ajustats per edat i gènere. Les diferències significatives entre grups s'observen en variables antropomètriques (IMC i Pes) i en nivells de glucosa. Això respon a la pròpia definició dels grups. Més enllà d'aquesta distinció destaca l'augment significatiu de la pressió arterial en el grup de pacients amb alteració metabòlica.

Taula 11. Descripció de la cohort 3 segmentada per la presència d'alteració metabòlica.

	ALTERACIÓ METABÒLICA		
	NO	SI	P
N	15	62	
Gènere (home / dona)	10 / 5	28 / 34	0,160
Edat (anys)	50 ± 15	53 ± 16	0,512
Pes (Kg)	65,0 (60,0 - 68,0)	84,5 (73,7 - 135,0)	<0,001†
IMC (kg / m²)	23,6 (22,1 - 23,9)	30,7 (27,1 - 52,8)	<0,001†
Colesterol total (mM)	5,0 ± 1,0	5,1 ± 1,1	0,882
HDL colesterol (mM)	1,5 ± 0,5	1,3 ± 0,3	0,230
LDLcFriedewald (mM)	3,1 ± 1,1	3,2 ± 0,9	0,624
Triglicèrids (mM)	1,1 ± 0,5	1,2 ± 0,5	0,228
Glucosa (mM)	4,8 ± 0,7	5,6 ± 0,8	0,001†
Insulina (μU/ml) *	3,27(2,16 - 7,93)	4,04 (2,16 - 7,01)	0,663
PAS (mmHg)	118 ± 11	136 ± 18	0,001†
PAD (mmHg)	66 ± 9	78 ± 13	0,005†
Diabetis (%)	0	24	0,030‡
HTA (%)	13	25	0,192

Les dades s'expressen com mitjana ± DE (distribució normal); mediana (RIQ) (distribució no normal)
 †p de la prova de U de Mann-Whitney; ‡p de l'estadístic exacte de Fisher

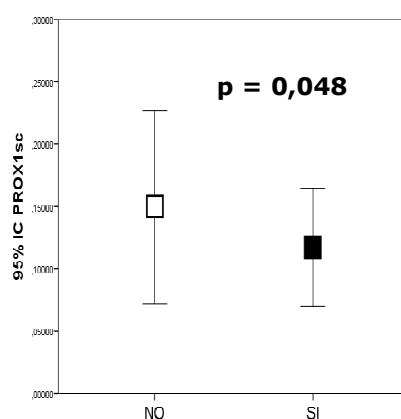
Els pacients del grup amb alteració metabòlica presenten una disminució en l'expressió de *prox1* i *pdpn* en els diferents tipus de teixit adipós (taula 12) sent significativa únicament en l'expressió de *prox1* en teixit adipós subcutani (taula 12 i figura 23).

Taula 12. Expressió gènica de *prox1* i *pdpn* en teixit adipós subcutani i visceral en funció de la presència d'alteració metabòlica en la cohort 3.

	ALTERACIÓ METABÒLICA		
	NO	SI	P
N	15	62	
<i>Prox1</i> sc	0,1065 (0,0332-0,2696)	0,0468 (0,0051-0,1559)	0,048
<i>Prox1</i> vis	0,2312 (0,1185-0,4219)	0,1809 (0,0274-0,4724)	0,132
<i>Pdpn</i> sc	0,4327 ± 0,1755	0,3222 ± 0,055	0,074
<i>Pdpn</i> vis	0,8400 (0,4600-2,5800)	0,535 (0,2296-1,4200)	0,085

Les dades s'expressen com mitjana ± DE (distribució normal); mediana (RIQ) (distribució no normal); p de la prova de U de Mann-Whitney.

Figura 23. Expressió de *prox1* en teixit adipós subcutani en funció de l'alteració metabòlica.



2. Vincles de les variables d'estudi amb l'expressió de *prox1* i *pdpn* en alteració metabòlica.

En les taules 13 i 14 es poden observar les correlacions que s'han donat al confrontar variables bioquímiques, antropomètriques (taula 13) i d'expressió gènica (taula 14) amb les variables d'interès (*prox1* i *pdpn*) en els grups que deriven de la segmentació de la cohort 3 en funció de l'alteració metabòlica (No:IMC < 25 i sense diabetis; Si:IMC ≥ 25 amb o sense diabetis). Un 72% (83 gens) de totes les variables confrontades estan relacionades de manera significativa amb les variables d'interès. D'aquestes variables n'hi ha 72 (87%) que ho fan en el grup d'alteració metabòlica mentre que només 15 (18%) ho fan en el grup de no alteració metabòlica, el que indica que hi ha variables (11 gens) que tenen correlació amb les variables d'interès tant en una situació com en una altra.

En la condició de no alteració metabòlica hi ha 8 correlacions amb les variables d'interès que són altament significatives ($p < 0,01$) amb coeficients de correlació (r) que van de 0,664 a 0,836. Amb menor grau de correlació

RESULTATS

($p < 0,05$) n'hi ha 25 que tenen coeficients de correlació (r) que van de 0,514 a 0,639.

En la condició d'alteració metabòlica hi ha 148 correlacions altament significatives ($p < 0,01$) amb coeficients de correlació (r) que van de 0,346 fins 790. En la mateixa condició hi ha 52 correlacions que es mostren menys significatives ($p < 0,05$) i amb coeficients de correlació (r) que oscil·len entre 258 i 400.

En la taula 13 podem destacar que en la condició d'alteració metabòlica les variables pes, IMC, perímetre cintura, perímetre maluc, PCR, GPT i la PAD manifesten una correlació inversa amb l'expressió de *prox1* i *pdpn*. Mentre que edat, colesterol HDL, creatinina, insulina, adiponectina i NEFA manifesten una correlació directa.

Taula 13. Correlacions de variables antropomètriques i bioquímiques amb *prox1* i *pdpn*.

	ALTERACIÓ METABÒLICA							
	NO				SI			
	<i>Prox1 sc</i> r	<i>Prox1 vis</i> r	<i>Pdpn sc</i> r	<i>Pdpn vis</i> r	<i>Prox1 sc</i> r	<i>Prox1 vis</i> r	<i>Pdpn sc</i> r	<i>Pdpn vis</i> r
Edat	-0,579*	-0,179	-0,106	-0,243	0,566**	0,544**	0,584**	0,676**
Pes	-0,303	0,023	0,080	0,043	-0,688**	-0,668**	-0,720**	-0,626**
IMC	-0,102	0,050	-0,324	-0,161	-0,718**	-0,638**	-0,705**	-0,583**
Perímetre cintura	-0,306	0,208	-0,130	0,005	-0,646**	-0,680**	-0,656**	-0,643**
Perímetre maluc	0,025	0,289	-0,026	0,043	-0,715**	-0,606**	-0,706**	-0,579**
Colesterol Total	-0,175	-0,018	-0,561*	0,05	0,062	0,015	0,061	0,020
Colesterol HDL	-0,325	-0,714**	-0,175	-0,300	0,346**	0,192	0,290*	0,258*
PCR	0,500	0,500	-0,500	0,500	-0,624**	-0,555**	-0,436**	-0,597**
Creatinina	0,502	0,163	0,132	0,427	0,242	0,281*	0,207	0,323*
Insulina	-0,060	-0,093	-0,366	-0,110	0,286*	0,368**	0,400**	0,266
Adiponectina	-0,057	-0,318	0,125	-0,039	0,154	0,200	0,294*	0,274*
GPT	-0,263	0,467	-0,491	-0,383	-0,584**	-0,398*	-0,576**	-0,536**
NEFA	0,064	0,145	0,045	-0,055	0,248	0,369**	0,371**	0,372**
PAD	0,108	-0,033	-0,057	0,137	-0,329*	-0,362*	-0,301*	-0,330*
Tabac	-0,585*	-0,100	0,283	0,234	-0,271	-0,158	-0,084	0,005

r: coeficient de correlació de Spearman; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Quan analitzem les variables gèniques estudiades podem constatar un ampli nombre de correlacions tant positives com negatives amb els marcadors principals d'estructuració limfàtica seleccionats en l'estudi. En la taula 14 es poden observar un gran nombre de correlacions amb les variables d'interès. Podem considerar diferents àmbits d'estudi dels resultats. D'una banda considerar que hi ha variables que correlacionen amb totes les variables d'interès en tot tipus de teixit adipós, independentment del teixit adipós on s'expressin elles mateixes. Un altre àmbit d'estudi correspondria a les variables que com a mínim es correlacionen amb les variables d'interès del mateix teixit on s'expressen i després caldria considerar aquelles variables que només ho fan des d'un tipus concret de teixit adipós.

Taula 14. Correlacions d'expressions gèniques amb *prox1* i *pdpn* en situació d'alteració metabòlica.

Gens	ALTERACIÓ METABÒLICA							
	NO				SI			
	<i>Prox1</i> sc r	<i>Prox1</i> vis r	<i>Pdpn</i> sc r	<i>Pdpn</i> vis r	<i>Prox1</i> sc r	<i>Prox1</i> vis r	<i>Pdpn</i> sc r	<i>Pdpn</i> vis r
<i>Prox1</i> sc	1	0,204	0,048	-0,004	1	0,739**	0,692**	0,501**
<i>Prox1</i> vis	0,204	1	0,052	0,596*	0,739**	1	0,662**	0,664**
<i>Pdpn</i> sc	0,048	0,052	1	0,266	0,692**	0,662**	1	0,739**
<i>Pdpn</i> vis	-0,004	0,596*	0,266	1	0,501**	0,664**	0,739**	1
<i>Acs1</i> sc	0,004	0,182	-0,309	0,421	-0,053	-0,072	-0,400*	-0,183
<i>Acs1</i> vis	0,000	-0,061	-0,577*	-0,275	0,153	0,057	-0,340*	-0,142
<i>Acsc2</i> sc	0,179	0,329	0,011	0,532*	-0,006	-0,247	-0,186	-0,126
<i>Adipsin</i> sc	0,475	-0,071	0,424	0,029	-0,095	-0,352*	-0,192	-0,255
<i>Adipsin</i> vis	0,400	-0,393	-0,290	-0,764**	-0,411**	-0,689**	-0,427**	-0,487**
<i>Apelin</i> sc	0,011	-0,518*	0,193	-0,114	-0,015	-0,068	0,105	0,009
<i>Apm</i> sc	0,321	0,236	0,366	0,150	-0,408**	-0,481**	-0,418**	-0,298*
<i>Apm</i> vis	0,639*	-0,200	0,334	-0,343	-0,435**	-0,617**	-0,644**	-0,547**
<i>Aqp7</i> sc	-0,336	0,146	0,454	-0,186	-0,411**	-0,490**	-0,515**	-0,360*
<i>Aqp7</i> vis	0,396	-0,046	0,232	-0,471	-0,226	-0,401**	-0,477**	-0,396**
<i>Atg3</i> sc	0,179	0,575*	0,250	0,446	0,571**	0,567**	0,687**	0,601**
<i>Atg3</i> vis	0,139	0,214	0,275	0,511	0,664**	0,598**	0,675**	0,591**
<i>Atg7</i> sc	0,561*	0,154	-0,193	-0,125	0,790**	0,505**	0,569**	0,437**
<i>Atg7</i> vis	0,454	0,450	-0,181	-0,189	0,642**	0,692**	0,555**	0,497**
<i>Atgl</i> sc	-0,275	0,089	-0,013	0,043	-0,478**	-0,457**	-0,487**	-0,272
<i>Atg lvis</i>	0,404	-0,275	-0,234	-0,461	-0,296*	-0,598**	-0,583**	-0,511**
<i>Azgp</i> sc	0,032	-0,107	0,533*	0,039	0,001	-0,232	-0,250	-0,241
<i>Azgp</i> vis	0,582*	0,104	0,250	0,057	0,003	-0,175	-0,170	-0,117
<i>Bcl2</i> sc	-0,143	-0,200	-0,443	-0,004	0,557**	0,526**	0,551**	0,593**
<i>Bcl2</i> vis	-0,182	-0,264	-0,063	-0,468	0,567**	0,536**	0,533**	0,494**
<i>Cav1</i> sc	0,336	0,114	0,179	0,296	-0,165	-0,377*	-0,142	-0,2
<i>Cav1</i> vis	0,343	-0,368	0,200	-0,543*	-0,203	-0,580**	-0,511**	-0,534**
<i>Cpt1a</i> sc	0,129	-0,293	-0,354	-0,064	0,634**	0,536**	0,580**	0,558**
<i>Cpt1a</i> vis	-0,407	0,404	0,084	0,350	0,639**	0,712**	0,692**	0,673**
<i>Ddit3</i> sc	0,579*	0,168	0,141	0,039	0,113	0,012	-0,134	-0,284
<i>Ddit3</i> vis	0,354	0,086	0,125	-0,096	-0,094	0,006	-0,170	-0,299*
<i>Dgat1</i> sc	-0,171	0,143	-0,170	0,214	-0,326*	-0,405**	-0,445**	-0,255
<i>Dgat1</i> vis	0,336	-0,275	0,023	-0,454	-0,255	-0,525**	-0,534**	-0,528**
<i>Fabp4</i> sc	-0,261	0,136	0,204	0,118	-0,649**	-0,675**	-0,652**	-0,588**
<i>Fabp4</i> vis	0,150	-0,132	0,304	-0,307	-0,510**	-0,695**	-0,707**	-0,666**
<i>Fiaf</i> vis	0,175	-0,132	0,181	-0,546*	-0,119	-0,508**	-0,279	-0,399**
<i>Gk</i> vis	0,175	0,514*	0,245	0,782**	-0,136	-0,162	-0,023	-0,095
<i>Grp94</i> .vis	0,286	0,318	0,207	0,664**	-0,233	-0,231	-0,199	-0,138
<i>Grp78</i> vis	-0,250	0,461	0,170	0,836**	-0,264	-0,182	0,065	-0,077
<i>Hif</i> sc	0,121	0,189	0,247	0,350	-0,198	-0,320*	-0,078	-0,376*
<i>Hif</i> vis	-0,029	0,439	0,300	0,521*	-0,254	-0,334*	-0,091	-0,146
<i>Hyou1</i> vis	-0,054	0,607*	-0,030	0,668**	-0,411**	-0,323*	-0,086	-0,253
<i>Il1b</i> vis	0,018	0,393	0,261	0,354	-0,250	-0,375*	-0,153	-0,077
<i>Lcn2</i> vis	0,161	0,489	0,195	0,389	-0,366*	-0,090	-0,158	-0,130
<i>Lipe</i> sc	-0,186	0,046	0,136	0,164	-0,267	-0,386**	-0,465**	-0,459**
<i>Lipe</i> vis	0,304	-0,032	0,420	-0,104	-0,109	-0,360*	-0,370*	-0,343*
<i>Lpin1</i> sc	-0,125	-0,054	-0,061	0,014	-0,122	-0,291	-0,323*	-0,319*
<i>Mcp1r</i> sc	0,050	0,118	0,774**	0,514*	-0,283	-0,161	-0,059	-0,152
<i>Obes</i> sc	-0,018	-0,032	0,127	0,200	-0,415**	-0,022	-0,215	-0,027
<i>Obes</i> vis	-0,411	-0,521*	-0,481	-0,221	-0,237	-0,243	-0,154	-0,062
<i>Omn</i> sc	-0,271	-0,025	0,284	0,586*	0,463**	0,371*	0,101	0,007
<i>Omn</i> vis	0,150	0,432	0,195	0,718**	-0,143	0,145	0,011	0,270
<i>Pai1</i> sc	-0,161	-0,082	0,293	0,418	-0,317*	-0,139	0,137	0,086
<i>Pck1</i> sc	-0,079	0,179	0,309	-0,050	-0,246	-0,306*	-0,299*	-0,253
<i>Pck1</i> vis	0,214	0,186	0,304	-0,007	0,026	-0,313*	-0,207	-0,161
<i>Pde3b</i> vis	0,400	-0,407	0,204	-0,379	0,012	-0,412**	-0,327*	-0,335*
<i>Plin</i> sc	-0,239	0,282	0,164	0,150	-0,356*	-0,510**	-0,418**	-0,197
<i>Plin</i> vis	0,307	-0,432	0,145	-0,600*	-0,094	-0,436**	-0,352*	-0,385**
<i>Pparα</i> sc	0,189	0,100	0,143	-0,039	-0,118	-0,337*	-0,360*	-0,418**
<i>Pparα</i> vis	0,261	0,046	0,182	0,014	-0,285	-0,348*	-0,201	-0,403**
<i>Pparγ</i> sc	-0,311	-0,161	-0,055	-0,129	-0,342*	-0,370*	-0,336*	-0,032
<i>Pparγ</i> vis	0,364	-0,375	-0,152	-0,639*	-0,260	-0,551**	-0,416**	-0,365*
<i>Pparδ</i> sc	0,071	-0,093	0,155	-0,064	-0,175	-0,442**	-0,439**	-0,623**
<i>Pparδ</i> vis	-0,121	0,432	0,409	0,35	-0,282	-0,357*	-0,293	-0,547**
<i>Rorc</i> vis	-0,304	0,079	0,114	0,468	-0,138	0,307*	0,172	0,213
<i>Vegfa</i> sc	-0,218	-0,193	0,130	-0,025	0,554**	0,417**	0,494**	0,493**
<i>Vegfa</i> vis	-0,264	0,239	-0,005	0,243	0,449**	0,482**	0,613**	0,580**
<i>Xbp1</i> sc	0,271	-0,018	0,252	0,211	0,147	0,193	0,464**	0,241
<i>Xbp1</i> vis	-0,204	0,371	0,188	0,614*	-0,213	0,022	0,193	0,212

r:coeficient de correlació de Spearman; * p< 0,05, ** p<0,01.

RESULTATS

Destaquem el subgrup de gens que en ambdues expressions, subcutània i visceral, manifesten vincles amb tots els gens d'interès tant en l'àmbit subcutani com visceral. Agafant a tall d'exemple el gen de *apm* veiem que tant l'expressió subcutània com la visceral d'aquest gen manifesten associació amb totes les variables d'interès en totes les seves condicions, tant en l'àmbit d'expressió subcutània com visceral. Són els gens *apm*, *bcl2*, *cpt1a*, *fabp4*, *vegfa*, *atg3* i *atg7* els que formen part d'aquest subgrup. A més a més, cal tenir presents també dos gens, *aqp7* i *atgl*, que només manquen de correlació amb *prox1* subcutània per part de *aqp7* visceral i amb *pdpn* visceral per part de *atgl* subcutània que també es podrien considerar dins d'aquest grup donat que no estarien lluny de tenir-la, acomplint significació per a la resta (taula 15).

Taula 15. Subgrup de variables antropomètriques, bioquímiques i gèniques que es vinculen tant en teixit adipós subcutani com visceral amb *prox1* i *pdpn*.

	ALTERACIÓ METABÒLICA							
	NO				SI			
	<i>Prox1sc</i> r	<i>Prox1vis</i> r	<i>Pdpnsc</i> r	<i>Pdpnvis</i> r	<i>Prox1sc</i> r	<i>Prox1vis</i> r	<i>Pdpnsc</i> r	<i>Pdpnvis</i> r
Edat	-0,579*	-0,179	-0,106	-0,243	0,566**	0,544**	0,584**	0,676**
Pes	-0,303	0,023	0,080	0,043	-0,688**	-0,668**	-0,720**	-0,626**
IMC	-0,102	0,050	-0,324	-0,161	-0,718**	-0,638**	-0,705**	-0,583**
Perímetre cintura	-0,306	0,208	-0,130	0,005	-0,646**	-0,680**	-0,656**	-0,643**
Perímetre maluc	0,025	0,289	-0,026	0,043	-0,715**	-0,606**	-0,706**	-0,579**
PCR	0,500	0,500	-0,500	0,500	-0,624**	-0,555**	-0,436**	-0,597**
GPT	-0,263	0,467	-0,491	-0,383	-0,584**	-0,398*	-0,576**	-0,536**
PAD	0,108	-0,033	-0,057	0,137	-0,329*	-0,362*	-0,301*	-0,330*
<i>Adipsin</i> vis	0,400	-0,393	-0,290	-0,764**	-0,411**	-0,689**	-0,427**	-0,487**
<i>Apm</i> sc	0,321	0,236	0,366	0,150	-0,408**	-0,481**	-0,418**	-0,298*
<i>Apm</i> vis	0,639*	-0,200	0,334	-0,343	-0,435**	-0,617**	-0,644**	-0,547**
<i>Aqp7</i> sc	-0,336	0,146	0,454	-0,186	-0,411**	-0,490**	-0,515**	-0,360*
<i>Aqp7</i> vis	0,396	-0,046	0,232	-0,471	-0,226	-0,401**	-0,477**	-0,396**
<i>Atg3</i> sc	0,179	0,575*	0,250	0,446	0,571**	0,567**	0,687**	0,601**
<i>Atg3</i> vis	0,139	0,214	0,275	0,511	0,664**	0,598**	0,675**	0,591**
<i>Atg7</i> sc	0,561*	0,154	-0,193	-0,125	0,790**	0,505**	0,569**	0,437**
<i>Atg7</i> vis	0,454	0,450	-0,181	-0,189	0,642**	0,692**	0,555**	0,497**
<i>Atgl</i> sc	-0,275	0,089	-0,013	0,043	-0,478**	-0,457**	-0,487**	-0,272
<i>Atgl</i> vis	0,404	-0,275	-0,234	-0,461	-0,296*	-0,598**	-0,583**	-0,511**
<i>Bcl2</i> sc	-0,143	-0,200	-0,443	-0,004	0,557**	0,526**	0,551**	0,593**
<i>Bcl2</i> vs	-0,182	-0,264	-0,063	-0,468	0,567**	0,536**	0,533**	0,494**
<i>Cpt1a</i> sc	0,129	-0,293	-0,354	-0,064	0,634**	0,536**	0,580**	0,558**
<i>Cpt1a</i> vis	-0,407	0,404	0,084	0,350	0,639**	0,712**	0,692**	0,673**
<i>Fabp4</i> sc	-0,261	0,136	0,204	0,118	-0,649**	-0,675**	-0,652**	-0,588**
<i>Fabp4</i> vis	0,150	-0,132	0,304	-0,307	-0,510**	-0,695**	-0,707**	-0,666**
<i>Vegfa</i> sc	-0,218	-0,193	0,130	-0,025	0,554**	0,417**	0,494**	0,493**
<i>Vegfa</i> vis	-0,264	0,239	-0,005	0,243	0,449**	0,482**	0,613**	0,580**

r:coeficient de correlació de Spearman; * p< 0,05, ** p<0,01.

Els resultats es podrien considerar també valorant la coexpressió en el mateix tipus de teixit adipós. Aquest és el cas del gen *plin* que expressant-se en teixit adipós subcutani es relaciona amb l'expressió de *prox1* i *pdpn* en l'àmbit subcutani. És també el cas dels gens *adipsin*, *cav1*, *fiaf*, *lipe* i *plin* que donada la seva expressió en teixit adipós visceral tenen relació amb

l'expressió de *prox1* i *pdpn* en el mateix tipus de teixit adipós, en aquest cas, el visceral i a més a més la fan de manera inversa (taula 14).

Regressions de les variables amb correlació amb *prox1* i *pdpn* en alteració metabòlica

De les 200 correlacions significatives observades amb les variables d'interès en alteració metabòlica en la cohort 3 cal destacar que n'hi ha 131 que veuen reforçada l'associació per la seva significació en l'estudi de regressió lineal (taula 16, taula 17 i taula 18).

Taula 16. Regressions de les variables antropomètriques i bioquímiques que tenen correlació amb *prox1* i *pdpn*, sc i vis.

Prox1 sc				Prox1 vis			
Variable	R²	β	p	Variable	R²	β	p
Edat	0,167	0,408	0,001	Edat	0,148	0,385	0,002
Pes	0,159	-0,399	0,001	Pes	0,176	-0,419	0,001
IMC	0,194	-0,441	< 0,001	IMC	0,191	-0,437	<0,001
Perímetre cintura	0,134	-0,367	0,005	Perímetre cintura	0,202	-0,45	<0,001
Perímetre maluc	0,158	-0,398	0,002	Perímetre maluc	0,175	-0,418	0,001
GPT	0,146	-0,382	0,020	Creatinina	0,113	0,336	0,009
				NEFA	0,021	0,146	0,28
Pdpn sc				Pdpn vis			
Variable	R²	β	p	Variable	R²	β	p
Edat	0,326	0,571	<0,001	Edat	0,266	0,516	<0,001
Pes	0,461	-0,679	<0,001	Pes	0,256	-0,506	<0,001
IMC	0,488	-0,698	<0,001	IMC	0,236	-0,486	<0,001
Perímetre cintura	0,383	-0,619	<0,001	Perímetre cintura	0,261	-0,511	<0,001
Perímetre maluc	0,477	-0,691	<0,001	Perímetre maluc	0,201	-0,448	<0,001
HDL Colesterol	0,077	0,277	0,030	PCR	0,131	-0,363	0,025
PCR	0,128	-0,357	0,028	GPT	0,212	-0,461	0,004
Insulina	0,165	0,406	0,003	NEFA	0,124	0,353	0,007
Adiponectina	0,080	0,282	0,030				
GPT	0,271	-0,521	0,001				
NEFA	0,131	0,363	0,006				

R², β i p de l'anàlisi de regressió lineal simple

Destacar que les variables antropomètriques i bioquímiques manifesten un nombre d'associacions equànime amb les variables d'interès; el nombre d'associacions és similar en ambdós tipus de teixit adipós. Per part de les variables gèniques podem constatar que hi ha moltes més associacions amb l'expressió de *prox1* visceral que amb la subcutània. Mentre que en l'expressió de *pdpn* passaria el contrari, hi ha més associacions amb l'expressió de *pdpn* subcutània que amb la seva expressió visceral.

Seguint amb les variables gèniques destacar que l'expressió de *prox1* subcutània té el mateix nombre d'associacions amb variables vinculades al

RESULTATS

teixit adipós subcutani com amb el visceral. Destaquen els gens *fabp4*, *atg3* i *atg7* que manifesten associació tant des de la seva expressió en teixit adipós subcutani com visceral.

Pel que fa a l'expressió de *prox1* visceral comentar que majoritàriament les associacions es fan des del mateix teixit adipós visceral. Destacar també que les associacions amb els gens *apm*, *aqp7*, *fabp4*, *lipe*, *plin*, *ppary* i *atg3* es donen tant des de l'expressió d'aquests gens en teixit adipós subcutani com visceral (taula 17).

Taula 17. Regressions de les variables gèniques que tenen correlació amb *prox1* sc i vis.

Prox1 sc				Prox1 vis			
Variable	R²	β	P	Variable	R²	β	P
<i>Prox1 vis</i>	0,169	0,411	0,001	<i>Prox1 sc</i>	0,169	0,411	0,001
<i>Pdpm sc</i>	0,103	0,321	0,011	<i>Pdpm sc</i>	0,222	0,471	<0,001
<i>Bcl2 vis</i>	0,098	0,313	0,014	<i>Pdpm vis</i>	0,133	0,365	0,004
<i>Cpt1A sc</i>	0,121	0,347	0,007	<i>Adipsin vis</i>	0,216	-0,465	0,001
<i>Fabp4 sc</i>	0,130	-0,360	0,007	<i>Apm sc</i>	0,108	-0,328	0,028
<i>Fabp4 vis</i>	0,091	-0,302	0,028	<i>Apm vis</i>	0,152	-0,389	0,004
<i>Atg3 sc</i>	0,195	0,442	<0,001	<i>Aqp7 sc</i>	0,119	-0,344	0,021
<i>Atg3 vis</i>	0,187	0,433	<0,001	<i>Aqp7 vis</i>	0,148	-0,385	0,009
<i>Atg7 sc</i>	0,407	0,638	<0,001	<i>Atgl vis</i>	0,146	-0,382	0,010
<i>Atg7 vis</i>	0,194	0,456	<0,001	<i>Cav1 vis</i>	0,241	-0,491	0,001
				<i>Cpt1a vis</i>	0,091	0,301	0,018
				<i>Dgat1 vis</i>	0,155	-0,393	0,008
				<i>Fabp4 sc</i>	0,148	-0,385	0,004
				<i>Fabp4 vis</i>	0,152	-0,39	0,004
				<i>Fiaf vis</i>	0,203	-0,451	0,002
				<i>Lipe sc</i>	0,088	-0,296	0,048
				<i>Lipe vis</i>	0,104	-0,322	0,031
				<i>Pde3b vis</i>	0,16	-0,399	0,007
				<i>Plin sc</i>	0,129	-0,359	0,015
				<i>Plin vis</i>	0,182	-0,427	0,003
				<i>Pparg sc</i>	0,087	-0,295	0,049
				<i>Pparg vis</i>	0,219	-0,468	0,001
				<i>Pparg sc</i>	0,102	-0,319	0,033
				<i>Rorc vis</i>	0,147	0,384	0,009
				<i>Atg3 sc</i>	0,135	0,367	0,004
				<i>Atg3 vis</i>	0,174	0,417	0,001
				<i>Atg7 vis</i>	0,336	0,579	<0,001

R², β i p de l'anàlisi de regressió lineal simple

L'expressió de *pdpm* subcutània té major nombre d'associacions vinculades al teixit adipós visceral que el subcutani. Els gens *prox1*, *apm*, *aqp7*, *atgl*, *bcl2*, *cpt1a*, *dgat1*, *fabp4*, *lipe*, *plin*, *pparg*, *vegfa*, *atg3* i *atg7* mantenen associació amb *pdpm* subcutània tant des de la seva expressió en teixit adipós subcutani com visceral (taula 18).

L'expressió de *pdpn* visceral té major nombre d'associacions amb variables gèniques que s'expressen en teixit adipós visceral que subcutani. Els gens *aqp7*, *cpt1a*, *fabp4*, *lipe*, *ppara*, *atg3* i *atg7* mantenen associació amb *pdpn* visceral tant des de la seva expressió en teixit adipós subcutani com visceral.

Taula 18. Regressions de les variables gèniques que tenen correlació amb *prox1sc* i vis.

<i>Pdpn sc</i>				<i>Pdpn vis</i>			
Variable	R ²	β	P	Variable	R ²	β	P
<i>Prox1 sc</i>	0,103	0,321	0,011	<i>Prox1 vis</i>	0,133	0,365	0,004
<i>Prox1 vis</i>	0,222	0,471	<0,001	<i>Pdpn sc</i>	0,429	0,655	<0,001
<i>Pdpn vis</i>	0,429	0,655	<0,001	<i>Adipsin vis</i>	0,143	-0,378	0,01
<i>Acs1 sc</i>	0,141	-0,375	0,017	<i>Apm vis</i>	0,142	-0,377	0,005
<i>Adipsin vis</i>	0,214	-0,463	0,001	<i>Aqp7 sc</i>	0,104	-0,323	0,03
<i>Apm sc</i>	0,152	-0,390	0,008	<i>Aqp7 vis</i>	0,095	-0,308	0,04
<i>Apm vis</i>	0,279	-0,528	<0,001	<i>Atg3 sc</i>	0,292	0,541	<0,001
<i>Aqp7 sc</i>	0,258	-0,508	<0,001	<i>Atg3 vis</i>	0,272	0,521	<0,001
<i>Aqp7 vis</i>	0,185	-0,430	0,003	<i>Atg7 sc</i>	0,065	0,255	0,049
<i>Atg3 sc</i>	0,584	0,764	<0,001	<i>Atg7 vis</i>	0,121	0,347	0,006
<i>Atg3 vis</i>	0,564	0,751	<0,001	<i>Atgl vis</i>	0,143	-0,378	0,01
<i>Atg7 sc</i>	0,198	0,445	<0,001	<i>Bcl2 sc</i>	0,140	0,373	0,003
<i>Atg7 vis</i>	0,171	0,413	0,001	<i>Cav1 vis</i>	0,167	-0,409	0,005
<i>Atgl sc</i>	0,225	-0,474	0,001	<i>Cpt1a sc</i>	0,161	0,402	0,001
<i>Atgl vis</i>	0,331	-0,575	<0,001	<i>Cpt1a vis</i>	0,175	0,419	0,001
<i>Bcl2 sc</i>	0,182	0,427	0,001	<i>Dgat1vis</i>	0,173	-0,416	0,004
<i>Bcl2 vis</i>	0,143	0,378	0,003	<i>Fabp4 sc</i>	0,197	-0,443	0,001
<i>Cav1 vis</i>	0,259	-0,509	<0,001	<i>Fabp4 vis</i>	0,178	-0,422	0,002
<i>Cpt1a sc</i>	0,252	0,502	<0,001	<i>Fiaf vis</i>	0,089	-0,298	0,047
<i>Cpt1a vis</i>	0,220	0,469	<0,001	<i>Lipe sc</i>	0,162	-0,402	0,006
<i>Dgat1 sc</i>	0,200	-0,447	0,002	<i>Lipe vis</i>	0,089	-0,298	0,047
<i>Dgat1 vis</i>	0,269	-0,519	<0,001	<i>Ppara sc</i>	0,093	-0,305	0,041
<i>Fabp4 sc</i>	0,449	-0,670	<0,001	<i>Ppara vis</i>	0,105	-0,323	0,03
<i>Fabp4 vis</i>	0,384	-0,619	<0,001	<i>Pparg vis</i>	0,102	-0,319	0,032
<i>Lipe sc</i>	0,202	-0,450	0,002	<i>Pparg sc</i>	0,153	-0,391	0,008
<i>Lipe vis</i>	0,115	-0,339	0,023	<i>Vegfa vis</i>	0,225	0,475	<0,001
<i>Lpin1 sc</i>	0,108	-0,329	0,028				
<i>Plin sc</i>	0,131	-0,361	0,015				
<i>Plin vis</i>	0,089	-0,298	0,047				
<i>Ppara sc</i>	0,136	-0,369	0,013				
<i>Pparg sc</i>	0,179	-0,423	0,004				
<i>Pparg vis</i>	0,200	-0,447	0,002				
<i>Ppard sc</i>	0,272	-0,521	<0,001				
<i>Vegfa sc</i>	0,223	0,472	<0,001				
<i>Vegfa vis</i>	0,317	0,563	<0,001				
<i>Xbp1 sc</i>	0,256	0,506	<0,001				

R², β i p de l'anàlisi de regressió lineal simple

Regressió lineal de les variables antropomètriques i bioquímiques

L'estudi de regressió lineal ha permès determinar la incidència major de cadascuna de les variables sobre l'expressió dels gens d'interès. En el cas de les variables de tipus antropomètric i bioquímic comentar que gairebé el

RESULTATS

17% de la variabilitat dels nivells d'expressió gènica de *prox1* subcutani ($r^2=0,167$) s'expliquen per la variabilitat en l'edat ($\beta=0,408$; $p=0,001$). Pel que fa referència a *prox1* visceral gairebé una cinquena part de la seva variabilitat en l'expressió ($r^2=0,191$) es justificaria per la variabilitat en els valors de l'índex de massa corporal ($\beta=-0,437$; $p=0,001$). Al voltant del 50% de la variabilitat de l'expressió de *pdpn* subcutani ($r^2=0,488$) es podria justificar mitjançant la variabilitat en els valors de l'índex de massa corporal ($\beta=-0,698$; $p < 0,001$). El perímetre de cintura ($\beta=-0,319$; $p=0,024$) i l'edat ($\beta=0,323$; $p=0,022$) justifiquen més d'una tercera part de la variabilitat de l'expressió de *pdpn* visceral ($r^2= 0,328$).

Regressió lineal de les variables gèniques

Un pas d'estudi més que es va plantejar era el de determinar quines variables gèniques poden incidir majorment en l'expressió dels marcadors d'estructuració limfàtica. Donat l'elevat nombre de correlacions trobades es va decidir acotar les variables a estudiar a les d'aquell subgrup que tingui associació amb tots els marcadors de l'estructuració limfàtica.

Els resultats d'un model de regressió lineal que inclou l'expressió gènica dels 9 gens que s'han valorat abans en les correlacions que responen a aquest subgrup mostren que el 40% de la variabilitat dels nivells d'expressió gènica de *prox1* subcutània ($r^2=0,407$) s'expliquen per la variabilitat en els nivells de l'expressió gènica en teixit adipós subcutani de *atg7* ($\beta=0,638$; $p<0,001$). En el mateix sentit la variabilitat de *prox1* subcutània s'explicaria també, en un 20% ($r^2=0,208$), per la variabilitat de l'expressió en teixit adipós visceral del gen de *atg7* ($\beta=0,456$; $p<0,001$).

Prox1 visceral no veuria justificada la seva variabilitat per cap expressió gènica provinent del teixit adipós subcutani. Mentre que sí que ho faria per l'expressió del gen de *atg7* ($\beta=0,336$; $p<0,001$) en l'àmbit visceral, que en justificarien gairebé el 60% ($r^2=0,579$).

Pel que fa referència a *pdpn* subcutània el 50% ($r^2=0,510$) de la seva variabilitat en l'expressió es justificaria per la variabilitat en els valors de l'expressió gènica en teixit adipós subcutani del gen *bcl2* ($\beta=-0,478$; $p=0,001$), *atg3* ($\beta=0,672$; $p<0,001$) i *aqp7* ($\beta=-0,313$; $p=0,021$). Sent per part de l'expressió gènica en teixit adipós visceral la del gen *atg3* ($\beta=0,751$; $p<0,001$) qui justificaria la variabilitat de la seva expressió en gairebé un 60% ($r^2=0,564$).

L'expressió de *pdpn* visceral no es justifica mitjançant cap variabilitat en l'expressió de gens en teixit adipós subcutani. Pel que fa a l'expressió en teixit adipós visceral és l'expressió del gen de *atg3* ($\beta=0,521$; $p<0,001$) qui condiona la variabilitat de *pdpn* en el mateix teixit en gairebé un 30% ($r^2=0,272$).

Considerant els resultats de les variables gèniques que s'associen amb les variables d'interès en acord a la seva coexpressió en el mateix teixit adipós comentar que la seva relació amb les variables d'interès es veu reafirmada per l'estudi de regressió lineal en tots els gens menys en l'expressió del gen de *plin* en l'àmbit subcutani amb *prox1* subcutània i del gen de *plin* visceral en relació amb *pdpn* visceral. Quan analitzem la influència d'aquestes variables gèniques en funció d'un model de regressió lineal podem constatar que la variabilitat de *prox1* visceral es justifica en gairebé un 25% ($r^2=0,241$) pel gen de la *cav1* visceral ($\beta=-0,491$; $p=0,001$). Mentre que la variabilitat de *pdpn* visceral es justifica en un 16% ($r^2=0,167$) per la del gen de *cav1* ($\beta=-0,450$; $p=0,001$) visceral. Per *prox1* i *pdpn* subcutània no es pot fer l'estudi.

Regressió lineal de les variables antropomètriques, bioquímiques i gèniques de manera conjunta.

Si agrupem totes les variables, antropomètriques i gèniques, que justifiquen major grau de variabilitat de les variables d'interès en un únic model de regressió lineal obtenim els resultats de la taula 19 diferenciats en funció de la variable d'interès, *prox1* i *pdpn*, i pel tipus de teixit adipós on valora l'expressió.

Taula 19. Sumari de les variables que més variabilitat de *prox1* i *pdpn* justifiquen en cada tipus de teixit adipós.

		R ²	β	p
prox1 sc	<i>atg7 sc</i>	0,407	0,638	< 0,001
prox1 vis	<i>atg7 vis</i>	0,336	0,579	< 0,001
pdpn sc	<i>atg3 sc</i>	0,510	0,672	< 0,001
	<i>bcl2 sc</i>		-0,478	0,001
	<i>aqp7 sc</i>		-0,313	0,021
pdpn vis	<i>atg3 vis</i>	0,272	0,521	< 0,001

R², β i p de l'anàlisi de regressió lineal múltiple

Com es pot observar totes les variables amb més pes en la variabilitat de l'expressió de *prox1* i *pdpn* són gèniques. Destaquen *atg7* en l'àmbit d'expressió *prox1* i *atg3* en l'àmbit d'expressió de *pdpn*.

Determinació de l'efecte de l'exercici en l'expressió de *prox1* i *pdpn*

D'acord amb aquests resultats i coneixedors de la incidència que té l'exercici sobre les variables antropomètriques es va considerar interessant avaluar en la cohort 1 l'efecte de l'exercici sobre els nivells d'expressió gènica dels gens d'interès. Per fer-ho es tenen en consideració només els individus amb alteració metabòlica i es divideix la cohort en funció del nivell d'exercici.

RESULTATS

S'obtenen tres grups: els individus que no fan exercici físic, els individus que fan menys de cinc hores per setmana i els que en fan més de cinc hores per setmana. És important destacar que no hi ha diferències significatives en els paràmetres antropomètrics (índex de massa corporal, pes, perímetre cintura i perímetre maluc) entre aquests grups. Els resultats indiquen que en aquesta cohort l'exercici físic no té incidència significativa sobre els nivells d'expressió gènica de *prox1* i *pdpn* subcutànies així com en l'expressió de *pdpn* visceral. No obstant, els resultats mostren una tendència a una disminució en els nivells d'expressió gènica de *prox1* subcutània en funció del nivell d'exercici físic tot i que aquests no mostren significació estadística. Pel que fa a *prox1* visceral hi ha una disminució significativa de la seva expressió gènica en el grup d'individus que fa més activitat setmanal (taula 20).

Taula 20. Expressió de *prox1* i *pdpn* en funció exercici físic en la cohort 1.

	EXERCICI FÍSIC			
	NO	< 5 hores /ss	> 5 hores /ss	P
N	11	9	14	
<i>Prox1</i> sc	0,1584(0,0515-0,2939)	0,1220 (0,0419-0,4344)	0,0887(0,0512-0,2730)	0,970
<i>Prox1</i> vis	0,3420 ± 0,2005	0,6934 ± 0,4502	0,2862 ± 0,2954	0,023
<i>Pdpn</i> sc	0,4909 ± 0,2191	0,4399 ± 0,1887	0,5567 ± 0,3928	0,904
<i>Pdpn</i> vis	1,5787 ± 1,6285	1,6573 ± 1,0055	1,1814 ± 0,9351	0,446

Les dades s'expressen com mitjana ± DE (distribució normal); mediana (RIQ) (distribució no normal)
 p de la prova de Kruskal-Wallis

Variables sense correlació

Cal mencionar que hi ha sis variables que, tot i ser molècules pròpies a l'àmbit metabòlic, no correlacionen amb les variables d'interès. D'una banda és important destacar d'entre aquestes variables la glucosa, el colesterol i els triglicèrids. El fet que aquestes variables no es vinculin de manera directa amb l'expressió dels gens d'interès comporta per si mateix un resultat destacable i evidencia que aquestes molècules, malgrat la seva importància en l'àmbit metabòlic, no estan vinculades a les variables d'interès en el context d'alteració metabòlica. D'altra banda tampoc presenten correlació la talla, la pressió arterial sistòlica i l'índex cintura maluc, fet que també mereix ser comentat.

3. Expressió de *prox1* i *pdpn* en funció de diferents graus d'obesitat

La taula 21 mostra els resultats d'expressió gènica dels gens d'interès en funció de la presència o no d'alteració metabòlica considerant en aquest cas diferents graus d'obesitat en funció de l'índex de massa corporal (classificació d'obesitat proposada per la Organització Mundial de la Salut) (248). Tant l'expressió de *prox1* com la de *pdpn* en ambdós tipus de teixit

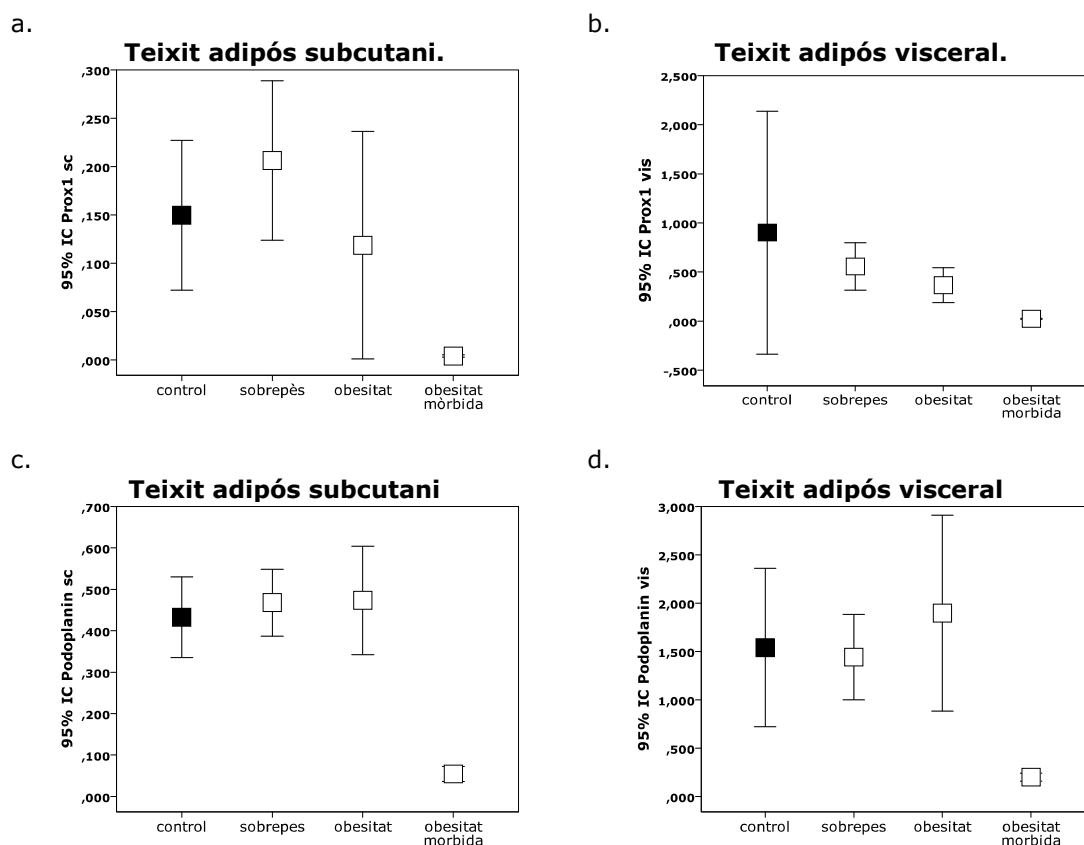
adipós presenten diferències significatives tenint en consideració la segmentació en diferents graus d'obesitat (taula 21). Aquestes dades ens indiquen que a major grau d'obesitat hi ha menys expressió de *prox1* i *pdpn* en ambdós tipus de teixit adipós, subcutani i visceral (figura 24).

Taula 21. Expressió gènica de *prox1* i *pdpn* en teixit adipós subcutani i visceral en funció de presència de diferents nivells d'obesitat en la cohort 3.

	Control	sobrepès	obesitat	obesitat mòrbida	P
N	15	28	12	22	
Prox1 sc	0,1065 (0,0332-0,2696)	0,1460 (0,0516-0,3108)	0,0624 (0,0253-0,1207)	0,0031 (0,0018-0,0056)	<0,001
Prox1 vis	0,2312 (0,1185-0,4219)	0,3982 (0,2111-0,8194)	0,2533 (0,1299-0,6036)	0,0198 (0,0144-0,0334)	<0,001
Pdpn sc	0,4327 ± 0,1755	0,4679 ± 0,2081	0,4733 ± 0,2062	0,0544 ± 0,0409	<0,001
Pdpn vis	0,8400 (0,4600-2,5800)	1,0350 (0,5450-2,2850)	1,2900 (0,6575-3,4650)	0,1918 (0,1203-0,2794)	<0,001

Les dades s'expressen com mitjana ± DE (distribució normal); mediana (RIQ) (distribució no normal); p de la prova de U de Mann-Whitney.

Figura 24. Expressió de *prox1* (a i b) i *pdpn* (c i d) en funció del nivell d'obesitat.



Correlacions amb l'expressió de *prox1* i *pdpn* en funció de diferents graus d'obesitat

En la taula 22 es poden observar les correlacions significatives que s'han donat de confrontar variables bioquímiques, antropomètriques i d'expressió gènica amb les variables d'interès (*prox1* i *pdpn*) en els grups que deriven

RESULTATS

de la segmentació del grup d'alteració metabòlica de la cohort 3 en funció de diferents nivells d'obesitat (classificació d'obesitat proposada per la Organització Mundial de la Salut) i en funció de l'índex de massa corporal (248).

Taula 22. Correlacions amb *prox1* i *pdpn* en funció dels diferents graus d'obesitat en situació d'alteració metabòlica.

	sobrepès				obesitat				obesitat mòrbida			
	<i>Prox1s</i> r	<i>Prox1vi</i> r	<i>Pdpn</i> r	<i>Pdpn</i> r	<i>Prox1</i> R	<i>Prox1vi</i> r	<i>Pdpn</i> r	<i>Pdpn</i> r	<i>Prox1</i> r	<i>Prox1vi</i> r	<i>Pdpn</i> r	<i>Pdpn</i> r
Edat	0,297	0,273	0,117	0,407*	0,074	-0,056	0,181	0,084	-0,085	-0,194	0,028	0,564**
IMC	0,025	0,233	-0,172	0,138	-0,091	-0,594	-0,011	-0,350	0,115	-0,077	0,360	-0,053
triglicèrids	-0,010	0,140	0,239	0,369	-0,189	0,049	-0,060	0,678*	0,358	0,120	0,297	-0,182
glucosa	-0,117	0,035	0,016	-0,247	-0,400	-0,333	-0,081	0,130	0,225	-0,127	0,465*	-0,040
PCR	-0,016	0,418	0,033	-0,121	-0,300	-0,300	-0,600	0,400	-0,177	-0,059	0,373	-0,538
Adiponectin	-0,024	0,119	0,057	0,116	0,297	-0,164	0,103	-0,745	-0,349	-0,226	0,089	0,386
sTNFR2	-0,192	-0,135	-0,035	0,139	0,317	0,717*	0,285	0,233
GGT	0,134	0,613	-0,768	-0,185	-1,000**	-0,600	-0,200	-0,400	-0,065	0,437*	-0,141	0,063
PAD	-0,305	-0,180	0,074	0,294	-0,421	-0,702	-0,790	-0,702	0,301	-0,076	0,396	-0,301
DM	0,040	0,110	0,000	-0,156	0,084	0,139	0,140	0,753**	0,049	0,049	0,122	0,024
HTA	0,195	0,130	-0,319	0,117	0,179	0,239	0,060	0,239	-0,426	-0,711*	0,213	-0,213
Acaca sc	-0,049	-0,128	-0,195	-0,188	0,427	0,503	0,343	-0,105	-0,900	-0,900	-0,600	0,100
Apm vis	0,276	-0,418*	-0,243	-0,282	-0,343	-0,392	-0,389	-0,469	0,068	0,411	-0,154	0,482
Aqp7 sc	-0,159	-0,166	-0,287	-0,096	-0,266	-0,622*	-0,224	-0,476	-0,700	-0,700	-0,300	0,000
Atgl sc	-0,350	-0,317	-0,232	0,070	-0,147	0,007	-0,266	-0,294	0,400	-0,100	0,100	0,900*
Atgl vis	0,168	-0,417*	-0,256	-0,321	-0,301	-0,329	-0,347	-0,343	0,029	-0,486	0,257	0,314
Atg3 sc	-0,427*	-0,045	-0,014	0,128	0,042	-0,483	0,102	-0,161	-0,120	-0,032	-0,047	-0,265
Atg7 sc	0,619**	-0,151	-0,184	-0,209	0,867**	0,329	0,834**	0,182	0,108	-0,107	0,039	0,592**
Atg7 vis	0,523**	0,697	0,071	0,137	0,133	0,196	-0,116	0,042	-0,183	-0,118	0,321	-0,018
Bcl2 sc	-0,356	-0,555**	-0,484**	-0,360	-0,280	0,056	-0,308	0,378	0,056	0,282	-0,251	0,331
Cav1 sc	-0,298	-0,510**	-0,106	-0,212	0,413	-0,049	0,193	-0,035	0,900*	0,500	0,500	0,600
Cav1 vis	0,077	-0,538**	-0,449*	-0,496**	-0,007	-0,517	-0,207	-0,545	-0,371	-0,429	-0,371	0,143
Cpt1a sc	0,025	-0,384*	-0,513**	-0,516**	-0,126	-0,189	-0,140	0,315	-0,087	-0,358	0,159	0,277
Ddit3 sc	0,015	0,072	-0,173	-0,400*	-0,168	-0,490	-0,200	-0,510	0,600	0,400	0,100	0,600
Fabp4 sc	-0,288	-0,166	-0,187	0,018	-0,196	-0,664*	-0,126	-0,315	-0,167	-0,273	-0,308	-0,022
Fiaf vis	0,093	-0,410*	-0,101	-0,267	-0,175	-0,615*	-0,158	-0,315	-0,486	-0,143	-0,371	-0,371
Glp1r vis	0,232	0,434*	0,341	0,265	-0,210	0,140	-0,081	0,343	0,200	0,829*	-0,086	-0,429
Grp94 vis	0,107	0,147	0,049	0,049	0,245	-0,252	0,172	0,217	-0,600	-0,829*	-0,314	-0,143
Grp78 vis	0,048	0,148	0,623**	0,151	0,413	0,182	0,389	0,420	-0,600	-0,829	-0,314	-0,143
Hyou1 sc	-0,162	-0,006	0,226	0,057	0,699*	0,021	0,627*	0,000	-0,300	-0,300	0,300	-0,500
Hyou1 vis	-0,159	0,036	0,415*	-0,051	0,538	0,161	0,417	0,308	-0,886	-0,829	-0,600	-0,257
Lcn2 sc	-0,088	0,012	0,050	0,101	-0,483	-0,434	-0,501	-0,580*	0,100	-0,400	0,400	0,500
Lipe sc	-0,184	-0,247	-0,322	-0,153	0,077	-0,259	-0,084	-0,797**	0,300	-0,300	0,300	0,800
Lpin1 vis	-0,159	0,034	0,055	0,001	0,252	-0,042	0,354	-0,147	-0,829*	-0,714	-0,600	-0,257
Mcp1 sc	-0,126	-0,093	0,304	0,071	0,238	-0,140	0,231	-0,028	-0,500	-0,100	0,100	-0,900*
Mcp1r sc	-0,304	-0,045	0,157	0,120	-0,112	-0,161	-0,112	-0,098	-0,500	-0,100	0,100	-0,900*
Omn sc	0,493**	0,354	-0,102	0,095	0,245	0,035	0,270	-0,469	0,900*	0,900*	0,600	0,000
Omn vis	0,123	0,290	0,221	0,369	-0,189	0,552	0,011	0,713**	-0,257	-0,771	-0,086	0,257
Pai1 sc	-0,183	0,065	0,428*	0,314	0,126	0,168	0,298	0,329	-0,300	0,000	0,000	-0,700
Pai1 vis	-0,041	0,241	0,501	0,323	0,224	0,182	0,326	0,636*	-0,371	-0,657	-0,086	-0,086
Pck1 sc	-0,008	-0,141	-0,163	-0,203	-0,140	-0,273	-0,210	-0,545	-0,100	-0,400	-0,600	0,900*
Pde3b vis	0,238	-0,453*	-0,226	-0,231	-0,308	-0,357	-0,308	-0,427	-0,371	-0,371	-0,143	-0,143
Plin sc	-0,326	-0,455*	-0,285	0,128	-0,042	-0,021	-0,154	-0,168	0,300	0,000	0,000	0,700
Plin vis	0,147	-0,519**	-0,227	-0,356	-0,266	-0,154	-0,266	-0,343	-0,371	-0,429	-0,371	0,143
Ppard sc	-0,060	-0,216	-0,385*	-0,496**	0,273	-0,448	0,249	-0,399	-0,100	-0,500	0,500	0,100
Ppard vis	-0,203	-0,037	-0,153	-0,435*	0,734**	-0,077	0,732**	-0,119	0,086	-0,486	0,429	0,200
Rorc vis	-0,087	0,479*	0,317	0,379	0,203	0,573	0,403	0,462	0,314	0,200	0,257	0,086
Xbp1 sc	-0,261	0,139	0,292	0,173	0,692*	0,014	0,658*	0,175	-0,200	-0,300	-0,700	0,700
Xbp1 vis	-0,145	0,364	0,528**	0,496**	0,566	0,252	0,564	0,531	-0,371	-0,657	-0,086	-0,086

r:coeficient de correlació de Spearman; * p< 0,05, ** p<0,01.

4. Expressió de *prox1* i *pdpn* en funció dels nivells de certs marcadors metabòlics.

S'ha considerat pertinent valorar quina modificació tenen les variables d'interès en funció de certes variables indicatives de les característiques patològiques, molt sovint associades a l'alteració metabòlica.

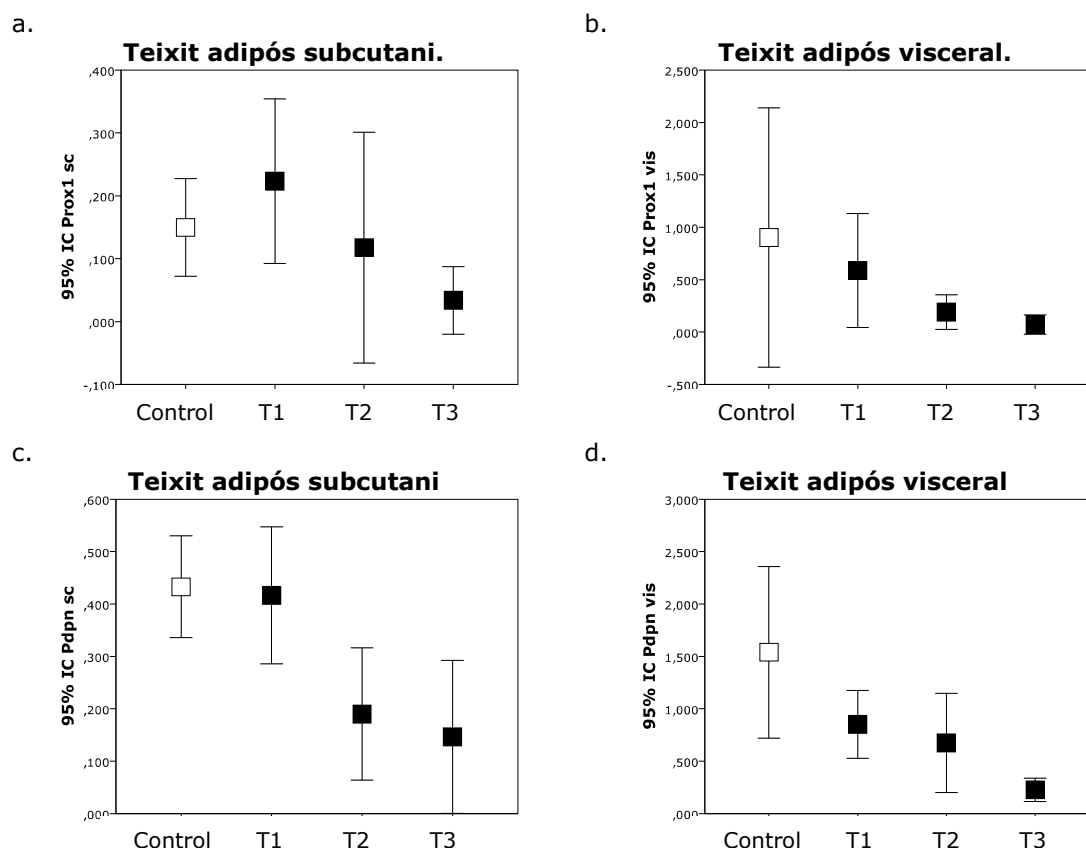
D'inici es valora en funció de la inflamació. Per fer-ho es valora en la cohort 3 l'expressió gènica dels gens d'interès en funció de diferents nivells de proteïna C reactiva en tant que marcador sistèmic d'inflamació. En la taula 23 es pot observar que les variables d'interès disminueixen de manera significativa la seva expressió quan els nivells d'inflamació, definits pels tercils de PCR, són més alts (taula 23; figura 25).

Taula 23. Expressió de *prox1* (a i b) i *pdpn* (c i d) en funció de presència de diferents nivells d'inflamació (tercils PCR) en la cohort 3.

	control	nivell d'inflamació (tercils PCR)			P
	0	T1	T2	T3	
N	15	12	12	12	
Prox1 sc	0,1065 (0,0332 - 0,2696)	0,1740 (0,0709-0,2934)	0,0080 (0,0032-0,0971)	0,0031 (0,0016-0,0084)	<0,001
Prox1 vis	0,2312 (0,1185 - 0,4219)	0,2586 (0,0987-0,8186)	0,0391 (0,0188-0,3341)	0,0295 (0,0140-0,0475)	0,001
Pdpn sc	0,4327±0,1755	0,4164 ± 0,2059	0,1899 ± 0,1986	0,1463 ± 0,2294	0,001
Pdpn vis	0,8400 (0,4600 - 2,5800)	0,9300(0,3200-1,2675)	0,3243 (0,2533-1,0975)	0,1875 (0,1139-0,2898)	<0,001

Les dades s'expressen com mitjana ± DE (distribució normal); mediana (RIQ) (distribució no normal); p de la prova de Kruskal-Wallis.

Figura 25. Expressió de *prox1* (a i b) i *pdpn* (c i d) en funció del nivell d'inflamació (PCR).



RESULTATS

L'altra característica estudiada associada a l'alteració metabòlica és la resistència a la insulina. Per a fer-ho s'ha agafat l'expressió dels gens d'interès en funció dels nivells d'insulina en la cohort 3, tercils insulina (Taula 24).

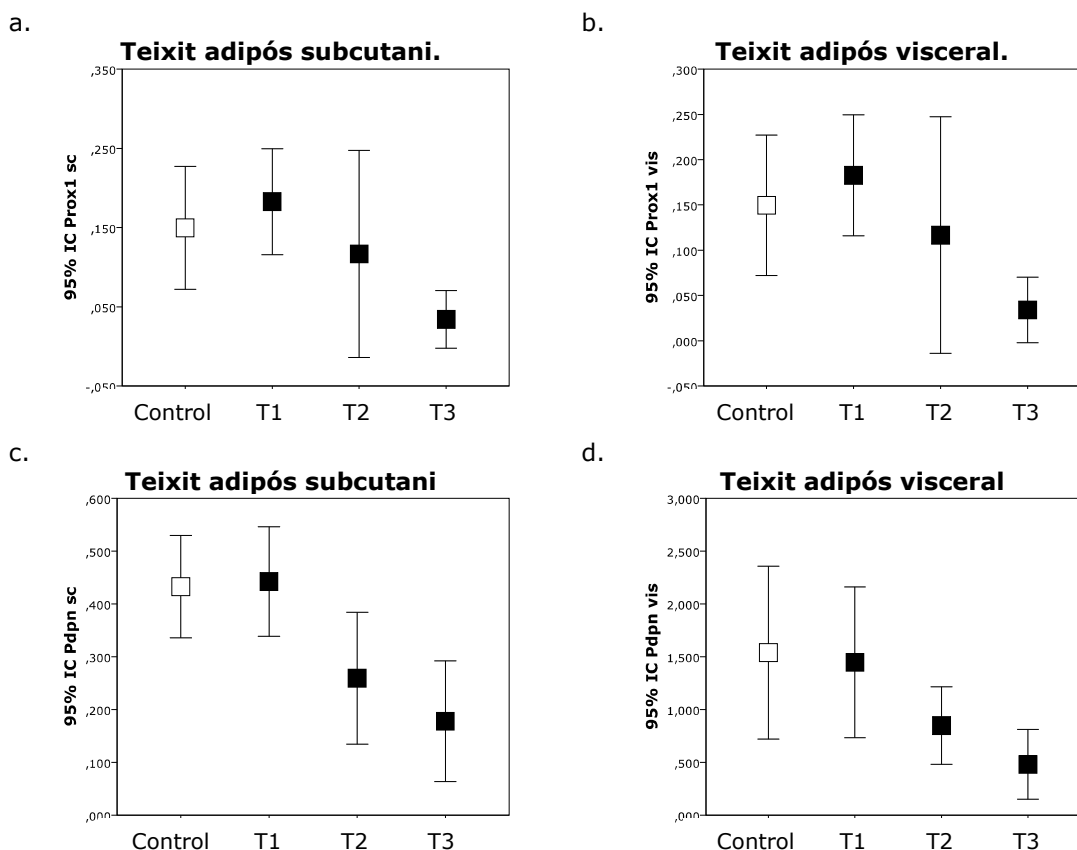
Com es pot apreciar els nivells d'expressió dels gens d'interès disminueixen de manera significativa a mesura que el nivell d'insulina augmenta (taula 24; figura 26)

Taula 24. Expressió de *prox1* (a i b) i *pdpn* (c i d) en funció del nivell d'insulina.

	control	nivell d'insulina (tercils insulina)			P
	0	T1	T2	T3	
N	15	17	18	18	
Prox1 sc	0,1065(0,0332-0,2696)	0,1307(0,0665-0,3189)	0,0085(0,0022-0,0916)	0,0050(0,0023-0,0225)	<0,001
Prox1 vis	0,2312(0,1185-0,4219)	0,2344(0,0906-0,8903)	0,1677(0,0240-0,5269)	0,0245(0,0177-0,0965)	0,002
Pdpn sc	0,4327±0,1755	0,4423±0,2017	0,2593±0,2510	0,1777±0,2300	0,001
Pdpn vis	0,8400(0,4600-2,5800)	0,8900(0,4400-2,0050)	0,6800(0,2560-1,2750)	0,1934(0,1307-0,4357)	0,001

Les dades s'expressen com mitjana ± DE (distribució normal); mediana (RIQ) (distribució no normal); p de la prova de Kruskal-Wallis.

Figura 26. Expressió de *prox1* (a i b) i *pdpn* (c i d) en funció del nivell d'insulina.



Una altra possible característica fisiopatològica de l'alteració metabòlica que es pot considerar és PAD. Per a fer-ho s'ha agafat l'expressió dels gens d'interès en funció dels nivells de PAD en la cohort 3, tercils de PAD (taula 25).

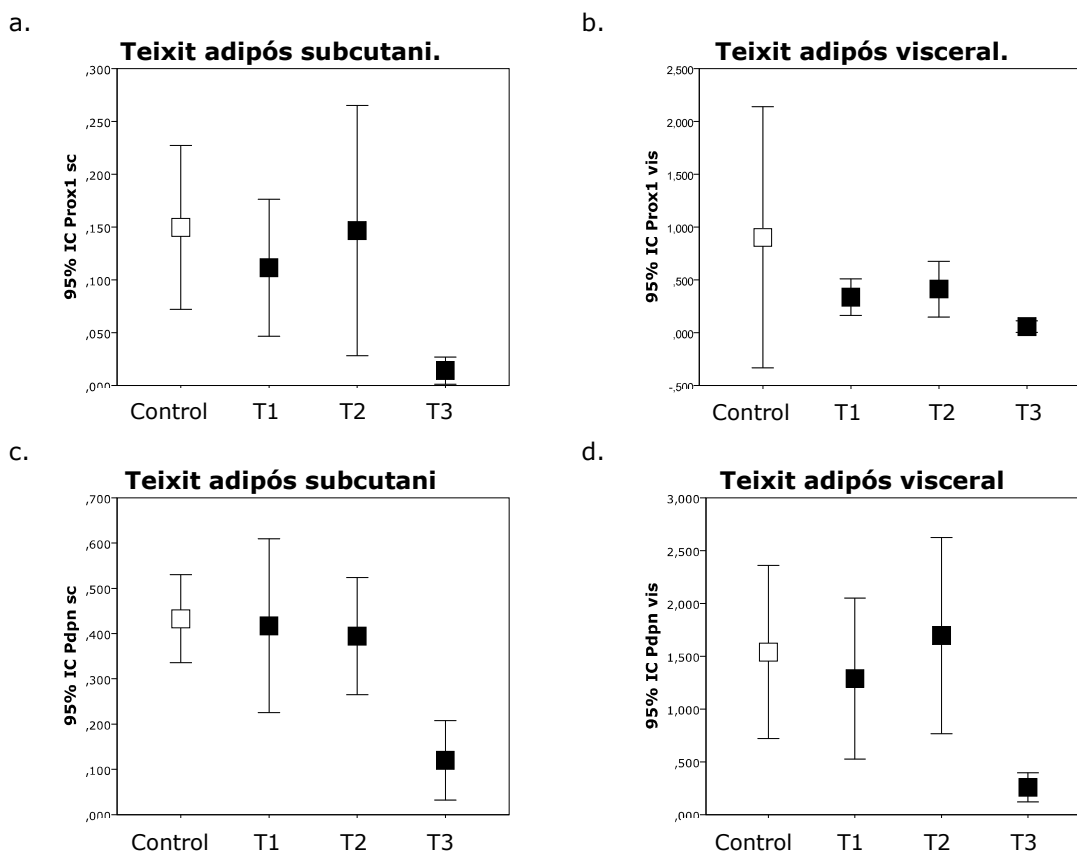
Taula 25. Expressió de *prox1* (a i b) i *pdpn* (c i d) en funció de la PAD.

	control	PAD (tercils)			P
	0	T1	T2	T3	
N	15	15	14	14	
Prox1 sc	0,1065(0,0332-0,2696)	0,0906(0,0062-0,193)	0,0521(0,0075-0,2069)	0,0052(0,0031-0,0117)	0,002
Prox1 vis	0,2312(0,1185-0,4219)	0,3059(0,0290-0,5291)	0,2177(0,0695-0,6523)	0,0233(0,0173-0,0554)	0,001
Pdpn sc	0,4327±0,1755	0,4171±0,3470	0,3944±0,2245	0,1200±0,1518	0,004
Pdpn vis	0,8400(0,4600-2,5800)	0,7300(0,2400-2,2100)	1,1650(0,3125-3,0675)	0,2110(0,1152-0,3178)	0,001

Les dades s'expressen com mitjana ± DE (distribució normal); mediana (RIQ) (distribució no normal); p de la prova de Kruskal-Wallis.

Com es pot apreciar els nivells d'expressió dels gens d'interès disminueixen en relació al control de manera significativa en tant que la PAD augmenta, destacant-ne que el valor més baix d'expressió correspon amb el més alt de PAD (taula 25; figura 27).

Figura 27. Expressió de *prox1* (a i b) i *pdpn* (c i d) en funció del nivell de PAD.



RESULTATS

Més enllà de la valoració feta en funció dels graus d'obesitat segons la IMC feta inicialment s'estima important tenir en consideració el comportament de manera específica de les variables d'interès en funció del pes. Per fer-ho s'ha agafat l'expressió dels gens d'interès en funció dels tercils del pes en la cohort 3 (taula 26).

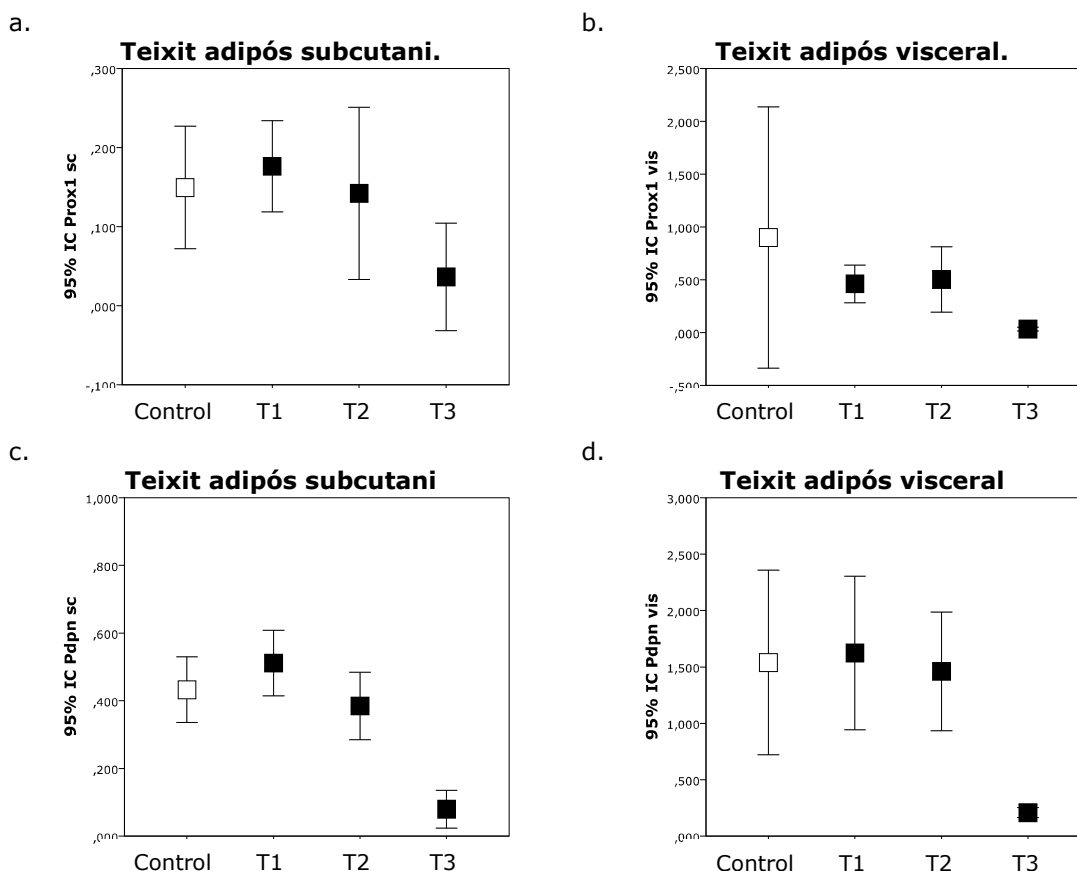
Taula 26. Expressió de *prox1* (a i b) i *pdpn* (c i d) en funció del pes.

	control	PES (tercils)			P
	0	T1	T2	T3	
N	15	20	21	21	
<i>Prox1 sc</i>	0,1065(0,0332-0,2696)	0,1567(0,0675-0,2804)	0,0558(0,0211-0,1194)	0,0031(0,0019-0,0060)	<0,001
<i>Prox1 vis</i>	0,2312(0,1185-0,4219)	0,3981(0,1722-0,6282)	0,2593(0,0895-0,7522)	0,0199 (0,0161-0,0391)	<0,001
<i>Pdpn sc</i>	0,4327±0,1755	0,5115±0,2076	0,3845±0,2199	0,0796±0,1221	<0,001
<i>Pdpn vis</i>	0,8400(0,4600-2,5800)	0,9300(0,3725-2,8250)	1,2700(0,6400-1,9550)	0,1931(0,1276-0,3063)	<0,001

Les dades s'expressen com mitjana ± DE (distribució normal); mediana (RIQ) (distribució no normal); p de la prova de Kruskal-Wallis.

Com es pot observar l'expressió dels gens d'interès disminueix a mesura que augmenta el pes. Sent l'expressió més baixa quan hi ha el màxim de pes (taula 26; figura 28)

Figura 28. Expressió de *prox1* (a i b) i *pdpn* (c i d) en funció del pes.



Estudi 4 – Estudi d'expressions gèniques associades al LPA en relació a l'expressió gènica de *prox1* i *pdpn*

En la cohort 1 es valora la relació que poden tenir les variables d'interès, *prox1* i *pdpn*, amb les expressions gèniques de 16 gens vinculats a la formació i/o a l'acció de LPA.

Taula 27. Expressions dels gens que tenen relació amb la síntesi i funció del LPA que correlacionen amb les variables d'interès *prox1* i *pdpn*.

	gen	N	Correlació de Pearson		Regressió lineal		
			r	p	R ²	β	p
<i>prox1</i> subcutani	<i>Cd36 sc</i>	55	-0,269	0,047	0,072	-0,269	0,047
	<i>Lpcat1 sc</i>	55	0,516	<0,001	0,266	0,516	<0,001
	<i>Lpcat1 vis</i>	55	0,405	0,002	0,164	0,405	0,002
	<i>Lpcat2 sc</i>	55	0,606	<0,001	0,367	0,606	<0,001
	<i>Lpcat2 vis</i>	55	0,426	0,001	0,181	0,426	0,001
	<i>Lpcat3 sc</i>	55	0,552	<0,001	0,304	0,552	<0,001
	<i>Lpcat3 vis</i>	55	0,437	0,001	0,191	0,437	<0,001
	<i>Lpcat4 sc</i>	55	0,513	<0,001	0,263	0,513	<0,001
	<i>Lpcat4 vis</i>	55	0,340	0,011	0,116	0,340	0,011
	<i>Pld6 sc</i>	55	0,378	0,004	0,143	0,378	0,004
	<i>Ppap2b sc</i>	55	0,595	<0,001	0,354	0,595	<0,001
	<i>Ppap2b vis</i>	55	0,392	0,003	0,154	0,392	0,003
	<i>Ppap2c sc</i>	55	0,581	<0,001	0,337	0,581	<0,001
<i>prox1</i> visceral	<i>Cd36 vis</i>	54	-0,355	0,008	0,126	-0,355	0,008
	<i>Fabp4 vis</i>	54	-0,287	0,035	0,082	-0,287	0,035
	<i>Lpcat1 vis</i>	55	0,360	0,007	0,129	0,360	0,007
	<i>Lpcat2 vis</i>	55	0,344	0,010	0,119	0,344	0,010
	<i>Lpcat3 vis</i>	55	0,519	<0,001	0,270	0,519	<0,001
	<i>Lpcat4 vis</i>	55	0,395	0,003	0,156	0,395	0,003
	<i>Ppap2c vis</i>	55	0,427	0,001	0,182	0,427	0,001
<i>pdpn</i> subcutani	<i>Lpcat4 sc</i>	55	0,304	0,024	0,093	0,304	0,024
	<i>Rgs1 vis</i>	55	0,290	0,032	0,084	0,290	0,032
<i>pdpn</i> visceral	<i>Cd36 vis</i>	54	-0,398	0,003	0,159	-0,398	0,003
	<i>Fabp4 vis</i>	54	-0,289	0,034	0,084	-0,289	0,034
	<i>Rgs1 sc</i>	55	0,313	0,020	0,098	0,313	0,020
	<i>Rgs1 vis</i>	55	0,394	0,003	0,155	0,394	0,003

RESULTATS

Aquests resultats indiquen de per se una major relació dels gens relacionats amb LPA amb *prox1* que en relació a *pdpn*. El 75% dels gens considerats mantenen un vincle amb *prox1* subcutani i un 50% amb *prox1* visceral. *Pdpn* subcutània només es vincula amb un sol gen (6%) mentre que la visceral manté relació amb el 31% dels gens.

Totes les variables reafirmen la seva relació amb les variables d'interès per la seva significació en l'estudi de regressió lineal (taula 27).

Expressions gèniques en funció de l'expressió *prox1* (alta/baixa)

Les taules 28 i 29 mostren les expressions dels gens relacionats amb LPA dels pacients de la cohort 1 que han estat classificats en funció del seu nivell d'expressió de *prox1* (baixa o alta) en teixit adipós subcutani (taula 28) i en teixit adipós visceral (taula 29).

Taula 28. Expressions gèniques en funció de la condició de *prox1* subcutània.

	<i>prox1</i> sc baixa <0,1065		<i>prox1</i> sc alta ≥0,1065		p
	N		N		
<i>Agpat3 sc</i>	27	2,1122 ± 1,1698	28	1,8014 ± 1,0711	0,229
<i>Agpat3 vis</i>	27	2,0628 ± 1,1454	28	1,4866 ± 0,6919	0,065
<i>Agpat4 sc</i>	27	0,8226 ± 0,3815	28	0,8808 ± 0,4532	0,717
<i>Agpat4 vis</i>	27	1,1838 ± 0,6078	28	0,9189 ± 0,5007	0,136
<i>Agpat5 sc</i>	27	0,7875 ± 0,3153	28	0,7963 ± 0,2684	0,880
<i>Agpat5 vis</i>	27	1,2490 ± 0,8314	28	1,0295 ± 0,3574	0,501
<i>Agpat9 sc</i>	27	1,2103 ± 2,0547	28	1,0241 ± 0,9865	0,341
<i>Agpat9 vis</i>	27	1,6384 ± 1,3537	28	1,5978 ± 1,4853	0,762
<i>Ampk sc</i>	27	0,9404 ± 0,1526	28	0,9347 ± 0,1472	0,973
<i>Ampk vis</i>	26	0,8900 ± 0,1695	28	0,8844 ± 0,1220	0,665
<i>Cd36 sc</i>	27	2,6612 ± 0,4583	28	2,2229 ± 0,6254	0,001
<i>Cd36 vis</i>	26	1,6352 ± 0,7162	28	1,7244 ± 1,1255	0,628
<i>Fabp4 sc</i>	27	1,7299 ± 0,6715	28	1,4521 ± 0,5872	0,064
<i>Fabp4 vis</i>	26	1,2009 ± 0,6598	28	1,2476 ± 0,8333	0,876
<i>Lpcat1 sc</i>	27	0,2802 ± 0,3196	28	0,5617 ± 0,3125	<0,001
<i>Lpcat1 vis</i>	27	0,3136 ± 0,1824	28	0,5352 ± 0,3375	0,006
<i>Lpcat2 sc</i>	27	0,3874 ± 0,1651	28	0,6772 ± 0,2709	<0,001
<i>Lpcat2 vis</i>	27	0,4155 ± 0,2237	28	0,6047 ± 0,2472	0,002
<i>Lpcat3 sc</i>	27	0,3397 ± 0,2232	28	0,6265 ± 0,2463	<0,001
<i>Lpcat3 vis</i>	27	0,3330 ± 0,1463	28	0,5225 ± 0,2218	0,002
<i>Lpcat4 sc</i>	26	0,2535 ± 0,2064	26	0,5755 ± 0,2774	0,000
<i>Lpcat4 vis</i>	27	0,3971 ± 0,3126	28	0,6094 ± 0,3860	0,013
<i>Pld6 sc</i>	27	0,4445 ± 0,4713	28	0,7045 ± 0,5275	0,004
<i>Pld6 vis</i>	27	0,4458 ± 0,3919	28	0,5322 ± 0,3294	0,173
<i>Ppap2a sc</i>	27	1,0974 ± 0,2518	28	1,0307 ± 0,3251	0,152
<i>Ppap2a vis</i>	27	1,0780 ± 0,2460	28	1,0961 ± 0,3105	0,853
<i>Ppap2b sc</i>	27	0,3708 ± 0,3627	28	0,8313 ± 0,4730	<0,001
<i>Ppap2b vis</i>	27	0,3380 ± 0,1938	28	0,7012 ± 0,5906	0,002
<i>Ppap2c sc</i>	27	1,0152 ± 0,6322	28	1,8902 ± 0,8819	<0,001
<i>Ppap2c vis</i>	27	1,4188 ± 0,8283	28	1,7817 ± 0,9138	0,080
<i>Rgs1 sc</i>	27	15,7490 ± 18,2040	28	10,892 ± 10,3393	0,501
<i>Rgs1 vis</i>	27	11,7551 ± 30,8550	28	8,6947 ± 20,3114	0,037

Les dades s'expressen com mitjana ± DE; p de la prova de U de Mann-Whitney.

Aquests resultats indiquen que el grup de pacients amb expressió alta de *prox1* en l'àmbit subcutani tenen nivells significativament disminuïts de *cd36 sc* i *Rgs1 vis* respecte al grup de pacients amb l'expressió baixa de *prox1 sc*. D'altra banda totes les *lpcat* (1,2,3 i 4) en ambdós teixits, *pld6 sc*, *ppap2bsc*, *ppap2bvis* i *ppap2csc*, veuen augmentada la seva expressió de forma significativa en el grup amb *prox1 sc* alta en relació amb els que tenen l'expressió baixa de *prox1 sc*.

Taula 29. Expressions gèniques en funció de la condició de *prox1* visceral.

	<i>prox1 vis</i> baixa		<i>prox1 vis</i> alta		p
	N	<0,3966	N	≥0,3966	
<i>Agpat3 sc</i>	35	2,0165 ± 1,0366	20	1,8446 ± 1,2767	0,332
<i>Agpat3 vis</i>	35	1,7888 ± 1,0105	20	1,7356 ± 0,9416	0,930
<i>Agpat4sc</i>	35	0,8721 ± 0,4473	20	0,8174 ± 0,3653	0,861
<i>Agpat4 vis</i>	35	1,0254 ± 0,5638	20	1,0901 ± 0,5838	0,624
<i>Agpat5sc</i>	35	0,7870 ± 0,3289	20	0,8006 ± 0,2115	0,576
<i>Agpat5vis</i>	35	1,1440 ± 0,6867	20	1,1253 ± 0,564	0,986
<i>Agpat9 sc</i>	35	1,1061 ± 1,0506	20	1,1321 ± 2,2825	0,382
<i>Agpat9 vis</i>	35	1,7541 ± 1,4671	20	1,3792 ± 1,3031	0,506
<i>Ampksc</i>	35	0,9623 ± 0,1629	20	0,894 ± 0,1098	0,104
<i>Ampkvis</i>	34	0,9180 ± 0,1627	20	0,8346 ± 0,0915	0,055
<i>Cd36sc</i>	35	2,5393 ± 0,5536	20	2,2610 ± 0,6180	0,167
<i>Cd36 vis</i>	34	1,8950 ± 0,9755	20	1,3185 ± 0,7794	0,020
<i>Fabp4 sc</i>	35	1,7062 ± 0,6881	20	1,3826 ± 0,4956	0,041
<i>Fabp4 vis</i>	34	1,3926 ± 0,7962	20	0,9404 ± 0,5696	0,039
<i>Lpcat1sc</i>	35	0,4438 ± 0,3749	20	0,3880 ± 0,2869	0,806
<i>Lpcat1vis</i>	35	0,3551 ± 0,2703	20	0,5513 ± 0,2940	0,005
<i>Lpcat2sc</i>	35	0,5340 ± 0,2837	20	0,5366 ± 0,2416	0,552
<i>Lpcat2vis</i>	35	0,4578 ± 0,2228	20	0,6063 ± 0,2785	0,069
<i>Lpcat3sc</i>	35	0,4845 ± 0,2672	20	0,4877 ± 0,2935	0,986
<i>Lpcat3vis</i>	35	0,3747 ± 0,1945	20	0,5253 ± 0,2055	0,011
<i>Lpcat4sc</i>	32	0,3970 ± 0,2969	20	0,4424 ± 0,2882	0,560
<i>Lpcat4vis</i>	35	0,4011 ± 0,3035	20	0,6873 ± 0,3979	0,002
<i>Pld6sc</i>	35	0,5449 ± 0,5515	20	0,6327 ± 0,446	0,137
<i>Pld6vis</i>	35	0,4258 ± 0,3799	20	0,6018 ± 0,3014	0,017
<i>Ppap2asc</i>	35	1,0419 ± 0,3144	20	1,1011 ± 0,2469	0,263
<i>Ppap2avis</i>	35	1,0651 ± 0,2926	20	1,1258 ± 0,2539	0,382
<i>Ppap2bsc</i>	35	0,6418 ± 0,5309	20	0,5413 ± 0,3746	0,713
<i>Ppap2bvis</i>	35	0,4764 ± 0,5334	20	0,6043 ± 0,3500	0,014
<i>Ppap2csc</i>	35	1,5010 ± 0,9320	20	1,3900 ± 0,8023	0,806
<i>Ppap2cvis</i>	35	1,3461 ± 0,7698	20	2,0540 ± 0,9081	0,003
<i>Rgs1sc</i>	35	15,1975 ± 17,0969	20	9,9142 ± 8,9823	0,310
<i>Rgs1vis</i>	35	8,7806 ± 27,4919	20	12,6761 ± 23,0902	0,083

Les dades s'expressen com mitjana ± DE; p de la prova de U de Mann-Whitney.

En la taula 29 s'observa que l'expressió de *cd36 vis* està disminuïda en pacients amb nivell d'expressió de *prox1* visceral més alta mentre que l'expressió de *lpcat1 vis*, *lpcat3 vis*, *lpcat4 vis*, *pld6 vis*, *ppap2b vis* i *ppap2c vis* està augmentada.

L'expressió de *fabp4* en teixit adipós subcutani i visceral està disminuïda en pacients amb nivell d'expressió de *prox1* visceral elevada.

Estudi 5 - Estudi d'expressions gèniques associades a l'expressió dels gens *prox1* i *pdpn*

1. Cohorts d'estudi

La taula 30 mostra la descripció de les tres cohorts d'estudi 1, 2, i 3 (taula 30)

Taula 30. Descripció cohorts d'estudi.

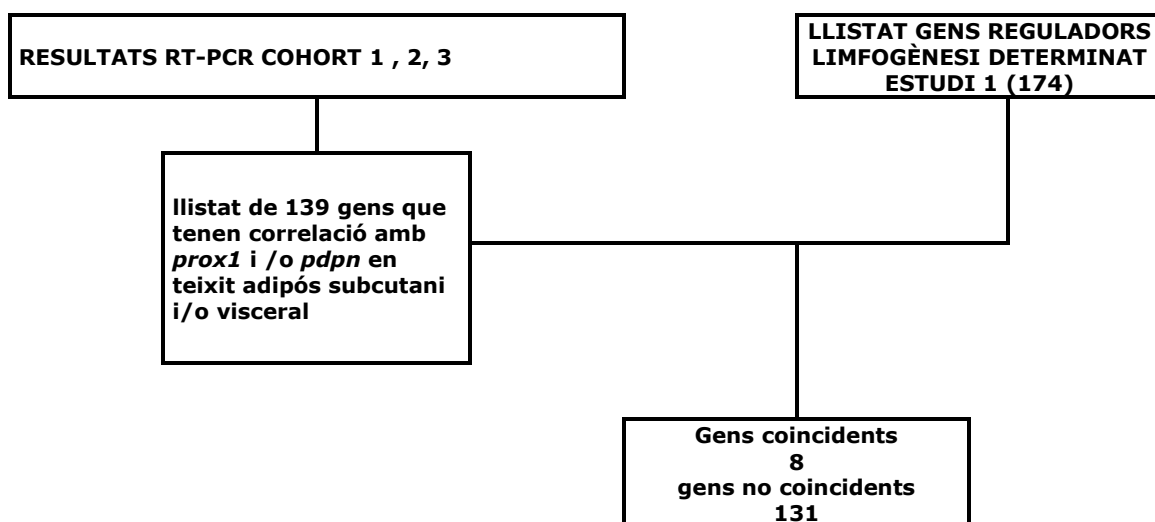
	COHORT (1)	COHORT (2)	COHORT (3)
N	55	24	79
Gènere (Home / dona)	31 / 24	8 / 16	39 / 40
Edat (anys)	58 ±14	39 ± 11	52 ±16
Pes (Kg)	74,2 ± 13,1	149,1 ± 29,3	79,5 (68,0-115,3)
IMC (kg / m ²)	27,3 ± 3,7	56,8 ± 8,7	28,6 (25,5 - 45,0)
PAS (mmHg)	130 ± 17	138 ± 20	132 ± 18
PAD (mmHg)	73 ± 12	83 ±14	76 ± 13
Diabetis (%)	14	29	18
HTA (%)	23	50	22

* n=6; Les dades s'expressen com mitjana ± DE (distribució normal); mediana (RIQ) (distribució no normal)

2. Comparació entre els gens que correlacionen amb *prox1* i *pdpn* amb els gens vinculats a la regulació de la limfogènesi

En cada cohort es determinen quines variables, antropomètriques, bioquímiques i gèniques, es correlacionen amb les variables d'interès, *prox1* i *pdpn* en cada tipus de teixit adipós. D'aquesta anàlisi sorgeix un llistat de 139 gens que correlacionen amb les variables d'interès en teixit adipós subcutani i/o visceral amb *prox1* i/o *pdpn* en teixit adipós subcutani i/o visceral. Aquest llistat es compara amb un llistat de 174 gens reguladors de la limfogènesi obtingut com a resultat de l'estudi 1 (figura 29) (taula 3).

Figura 29. Sumari estudi comparatiu dels resultats de correlació cohort 1, 2 i 3 (RT-PCR) amb un llistat de gens relacionats amb la regulació de la limfogènesi.



3. Nous gens vinculats a la regulació de la limfogènesi.

Fruit de la confluència dels dos llistats sorgeixen dos resultats possibles: Gens coincidents que responen a la confirmació d'un vincle entre certs gens ja reconeguts com vinculats a la limfogènesi. I gens no coincidents que es poden erigir com a nous possibles gens de vinculació amb la limfogènesi donat que mantenen una manifesta correlació amb *prox1* i/o *pdpn*.

Entre els gens que correlacionen amb *prox1* i *pdpn* que confirmen la seva relació ja descrita en la limfogènesi hi ha, més enllà del mateix *prox1* i *pdpn*, els gens *fiaf*, *il1b*, *lcn2*, *rorc*, *tgfbr1* i *vegfa*.

De gens que correlacionen amb *prox1* i *pdpn* però que no són reconeguts com gens vinculats amb la limfogènesi n'hi ha 131. Els quals poden esdevenir gens potencialment interessants d'estudi en el context de la limfogènesi i el metabolisme (taula 31).

Taula 31. Gens que correlacionen amb *prox1* i/o *pdpn* però que no s'han relacionat amb la limfogènesi.

<i>Acs1</i>	<i>Cd36</i>	<i>Glp1r</i>	<i>Munc</i>	<i>Prkar1a</i>
<i>Acss2</i>	<i>Cdk4</i>	<i>Grp78</i>	<i>Ncoa6</i>	<i>Prkar2b</i>
<i>Adilipcs</i>	<i>Cdkn1a</i>	<i>Grp94</i>	<i>Nucb2</i>	<i>Pthlh</i>
<i>Adipon</i>	<i>Cds1</i>	<i>Gsk3b</i>	<i>Obes</i>	<i>Pthrp0</i>
<i>Adipsin</i>	<i>Cept1</i>	<i>Gys1</i>	<i>Omn</i>	<i>Pth</i>
<i>Adrbk1</i>	<i>Chka</i>	<i>Hif</i>	<i>Osteoc</i>	<i>Pygm</i>
<i>Agl</i>	<i>Cnr1</i>	<i>Hyou1</i>	<i>Pai1</i>	<i>Pyg</i>
<i>Akt</i>	<i>Cntnap2</i>	<i>Il1b</i>	<i>Pcyt2</i>	<i>Rbfox2</i>
<i>Apm</i>	<i>Cpt1a</i>	<i>Irs1</i>	<i>Pde3b</i>	<i>Rgs1</i>
<i>Aqp7</i>	<i>Cpt1b</i>	<i>Irs2</i>	<i>Pemt</i>	<i>Snare</i>
<i>Arb1</i>	<i>Ctdnep1</i>	<i>Isyna1</i>	<i>Pgm5</i>	<i>Sqle</i>
<i>Arrb1</i>	<i>Ddit3</i>	<i>Jnk</i>	<i>Pld6</i>	<i>Stat3</i>
<i>Arrb2</i>	<i>Dgat1</i>	<i>Kiaa1199</i>	<i>Plin</i>	<i>Stx4</i>
<i>Atg10</i>	<i>Dlk1</i>	<i>Lipe</i>	<i>Ppap2b</i>	<i>Stxbp3</i>
<i>Atg16l2</i>	<i>Dram1</i>	<i>Lipolips</i>	<i>Ppap2c</i>	<i>Tnfalp</i>
<i>Atg3</i>	<i>Ergp78s</i>	<i>Lipopcks</i>	<i>Ppara</i>	<i>Ucp1</i>
<i>Atg7</i>	<i>Esrra</i>	<i>Lpcat1</i>	<i>Ppard</i>	<i>Ucp2</i>
<i>Atgl</i>	<i>Fabp4</i>	<i>Lpcat1</i>	<i>Pparg</i>	<i>Ucp3</i>
<i>Bcl2</i>	<i>Fasn</i>	<i>Lpcat2</i>	<i>Pparg1gp</i>	<i>Ulk1</i>
<i>Becn1</i>	<i>Fiaf</i>	<i>Lpcat3</i>	<i>Pparg2</i>	<i>Vamp2</i>
<i>Bmp7</i>	<i>Fis1</i>	<i>Lpcat4</i>	<i>Pparg2gp</i>	<i>Vegfb</i>
<i>Casp1</i>	<i>Fst</i>	<i>Lpin1</i>	<i>Ppargc1b</i>	<i>Xbp1</i>
<i>Casp3</i>	<i>Gabarapl1</i>	<i>Lpin3</i>	<i>Ppp1r3b</i>	<i>Zag</i>
<i>Casp7</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Lpl</i>	<i>Ppp1r3c</i>	
<i>Cav1</i>	<i>Gbe1</i>	<i>Mcp1</i>	<i>Ppp1r3d</i>	
<i>Ccnd3</i>	<i>Gipr</i>	<i>Mmp15</i>	<i>Ppp1r3e</i>	
<i>Cd11b</i>	<i>Gk</i>	<i>Mstn</i>	<i>Prdm16</i>	

Hi ha una gran quantitat de gens vinculats amb *prox1* i *pdpn* que de per se podrien esdevenir un objecte d'estudi propi. Atenint-nos al fet que els vasos limfàtics requereixen de l'expressió simultània de *prox1* i *pdpn* per estructurar-se fa que només siguin considerats aquells gens que manifesten correlació amb els dos gens d'interès, *prox1* i *pdpn*, ja sigui en tot tipus de

RESULTATS

teixit adipós o només en un dels dos. En aquesta tessitura només els resultats de les cohorts 1 i 3 presenten gens que responguin a aquesta condició. De manera general, considerant els resultats d'aquestes cohorts de manera conjunta, podem considerar que els gens *adipsin*, *apm*, *aqp7*, *atg3*, *atg7*, *atgl*, *bcl2*, *cav1*, *cd36*, *cpt1a*, *dgat1*, *fabp4*, *fiaf*, *pde3b*, *plin*, *ppara*, *ppp1r3e* i *vegfa* són els gens que a compleixen aquesta condició d'associació amb ambdós gens d'interès.

De manera específica cal considerar si el vincle entre aquests gens i els gens d'interès es dona des de l'expressió d'un sol tipus de teixit adipós, des de la dels dos o si és indiferent en quin tipus de teixit es doni. Així tenim que en la cohort 3 hi ha els gens de *apm*, *aqp7*, *bcl2*, *cpt1a*, *dgat1*, *atg7* i *vegfa* que es relacionen amb *prox1* subcutani i visceral així com amb *pdpn* subcutània i visceral tant des de la seva expressió en teixit adipós subcutani com visceral. Després hi ha els gens de *plin* i *atg3* que es relacionen amb *prox1* subcutani i visceral i *pdpn* subcutània i visceral només des de la seva expressió en teixit adipós subcutani. Mentre que els gens de *adipsin*, *cav1*, *fiaf*, *atgl*, *ppara* i *fabp4* només ho fan des de la seva expressió en teixit adipós visceral. En la cohort 1 hi ha una sèrie de gens, *adipsin*, *apm*, *cav1*, *cd36*, *fabp4*, *fiaf*, *pde3b*, *plin*, *sqle* i *ppp1r3e*, que només es vinculen amb *prox1* i *pdpn* visceral des de la seva expressió en teixit adipós visceral.

RESUM DELS RESULTATS

- φ Gens relacionats amb la limfogènesi es manifesten diferenciats en condicions d'alteració metabòlica. L'obesitat és la condició d'alteració metabòlica que més associació significativa té amb la limfogènesi. El teixit adipós visceral en l'obesitat manifesta més associació amb la limfogènesi que el subcutani.
- φ L'expressió de *prox1* i *pdpn* es dona de manera diferenciada en el teixit adipós. L'expressió de *prox1* i *pdpn* en teixit adipós visceral és més alta que la seva expressió en teixit adipós subcutani.
- φ L'expressió gènica de *prox1* i *pdpn* baixa en presència d'alteració metabòlica tant en teixit adipós subcutani com visceral.
- φ L'estudi de la relació entre l'expressió de les variables antropomètriques i bioquímiques amb l'expressió de *prox1* i *pdpn* en situació d'alteració metabòlica indica que les variables amb qui es dona correlació són l'edat, el pes, IMC, el perímetre de cintura, el perímetre de maluc, el colesterol HDL, la PCR, la insulina, la GPT, els NEFA i la PAD.
- φ La relació que tenen les variables pes, IMC, perímetre cintura, perímetre maluc, PCR, GPT i PAD amb l'expressió de *prox1* i *pdpn* és inversa.
- φ L'expressió dels gens de *apm*, *bcl2*, *cpt1a*, *fabp4*, *vegfa*, *atg3* i *atg7*, tant des del teixit adipós subcutani com visceral, correlacionen amb l'expressió de *prox1* i *pdpn* en teixit adipós subcutani i visceral en situació d'alteració metabòlica. *Aqp7* també manifesta la mateixa correlació salvant *prox1* subcutani i *atgl* també manifesta la mateixa correlació salvant *pdpn* visceral. Els gens de *apm*, *aqp7*, *atgl* i *fabp4* tenen una relació inversa amb l'expressió de *prox1* i *pdpn*, els altres manifesten directa.
- φ Considerant la coexpressió de les variables gèniques i les variables d'interès en el mateix tipus de teixit adipós s'obté que *plin* sc correlaciona amb *prox1* i *pdpn* subcutània. *Adipsin*, *cav1*, *fiaf*, *lipe* i *plin* visceral correlacionen amb *prox1* i *pdpn* visceral. L'expressió del gen *plin* en teixit adipós subcutani es relaciona de manera inversa amb l'expressió de *prox1* i *pdpn* en teixit adipós subcutani. L'expressió dels gens de *adipsin*, *cav1*, *fiaf*, *lipe*, *plin* en teixit adipós visceral s'associen de manera inversa amb l'expressió de *prox1* i *pdpn* en teixit adipós visceral.
- φ L'edat i l'índex de la massa corporal són les variables antropomètriques i bioquímiques que justifiquen més la variabilitat de l'expressió de *prox1* i *pdpn*.
- φ De les variables gèniques, el gen *atg7* subcutani i visceral justifica la variabilitat de l'expressió de *prox1* subcutània. El gen *atg7* visceral justificaria la variabilitat de l'expressió de *prox1* visceral. *Bcl2*, *atg3* i *aqp7* subcutània justificarien la variabilitat de l'expressió de *pdpn* sc. En aquest cas també ho faria l'expressió de *atg3* visceral. *Pdpn* visceral

únicament justificaria la variabilitat de la seva expressió per la de *atg3* visceral.

- φ Atenint-nos solament als resultats de coexpressió de les variables gèniques i les variables d'interès en el mateix tipus de teixit adipós. *prox1* i *pdpn* visceral justifica la variabilitat en la seva expressió majoritàriament per *cav1* visceral
- φ Valorant de manera conjunta les variables antropomètriques i bioquímiques amb les variables gèniques es determina que les variables que justifiquen major variabilitat de l'expressió de *prox1* i *pdpn* són les expressions gèniques de *atg7* en l'àmbit d'expressió *prox1* i *atg3* en l'àmbit de *pdpn*.
- φ L'expressió de *prox1* i *pdpn* baixen amb l'increment d'hores de dedicació a l'activitat física.
- φ No hi ha associació entre el colesterol i l'expressió de *prox1* i *pdpn*, però sí amb el HDL colesterol, tal i com es dona en model animal. No hi ha associació entre la glucosa i l'expressió de *prox1* i *pdpn*. No hi ha associació entre els triglicèrids i l'expressió de *prox1* i *pdpn*.
- φ L'expressió de *prox1* i *pdpn* disminueix a mesura que augmenta el grau d'obesitat.
- φ L'augment del IMC, de la PCR, de la insulina, de la PAD o del pes, considerats marcadors metabòlics, està associat a una disminució significativa en l'expressió de *prox1* i *pdpn* quan hi ha alteració metabòlica.
- φ Existeix correlació entre l'expressió de certs gens vinculats al LPA amb l'expressió de *prox1* i *pdpn*, majoritàriament amb *prox1*. La relació és desigual entre tipus de teixit adipós però tanmateix es mantenen moltes similituds.
- φ Un conjunt de 131 gens poden ser considerats com nous potencials indicadors de la relació entre l'entramat dels vasos limfàtics i el metabolisme.

DISCUSSIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EVIDÈNCIES EN TEIXIT ADIPÓS D'ALTERACIONS GÈNIQUES DELS VASOS LIMFÀTICS EN L'OBESITAT

Alfons Horra Pueyo

Aquesta tesi té com objectiu general analitzar el paper de dos gens, *prox1* i *pdpn*, requerits per a l'estructuració dels vasos limfàtics en el teixit adipós en l'àmbit de l'obesitat. La qüestió de base és la de determinar si l'alteració en el drenatge intersticial limfàtic del teixit adipós és causa d'alteració metabòlica, és a dir, definir l'existència o no d'associacions entre, d'una banda, la regulació metabòlica i, d'altra banda, l'estructuració i funció dels vasos limfàtics. Per determinar de forma indirecta el nivell d'estructuració dels vasos limfàtics, entenent la limitació que suposa aquest punt a l'hora de interpretar les dades obtingudes, es va pensar en analitzar el nivell d'expressió de dos gens determinants pel seu desenvolupament: *prox1*, que determina l'inici diferenciador de les cèl·lules endotelials en cèl·lules endotelials limfàtiques; i *pdpn*, que conclou el procés de distinció fenotípica entre els vasos sanguinis i els vasos limfàtics (13). Altres proteïnes haguessin pogut ser valorades de manera específica, com VEGFC i VEGFR3, però, més enllà del cost econòmic i metodològic que hagués suposat abordar aquesta anàlisi, la informació obtinguda no hagués estat prou específica com per aportar conclusions definitòries a l'estudi i sí moltes incògnites independentment dels resultats que s'haguessin obtingut. No es descarta però, en el desenvolupament de nous projectes, valorar aquestes dues molècules, a més a més de PROX1 i PDPN.

Establir la relació funcional dels vasos limfàtics amb el metabolisme és molt complex. Des de punt de vista metodològic això implica disposar d'un mètode d'estudi reproducible, estandarditzat, que avaluï la funció limfàtica de manera simultània a la situació metabòlica. Aquesta via d'estudi es va descartar inicialment per la complexitat logística i metodològica que comportava. Es va doncs optar per estudiar el teixit adipós. Es va fer així per la pròpia experiència del laboratori i per l'adequació entre el reconeixement del propi metabolisme a través de la caracterització funcional / disfuncional del teixit adipós i la mateixa estructuració dels vasos limfàtics a través de l'expressió de *prox1* i *pdpn*. Així doncs, es va avaluar el teixit adipós de manera global mitjançant l'estudi de *microarrays* i de manera específica mitjançant RT-PCR.

Estudi 1- Limfogènesi i alteració metabòlica (estudi dels *microarrays*).

L'estudi dels *microarrays* del teixit adipós va permetre identificar d'inici la vinculació que hi podia haver entre els determinants de la limfogènesi reconeguts bibliogràficament i els gens que es mostraven alterats en cada situació d'alteració metabòlica (IR; Ob; DM). De manera general els resultats indiquen que, en cada situació d'alteració plantejada (IR, Ob, i DM), hi ha una relació més marcada de gens infra expressats que no pas de gens sobre expressats si ho comparem amb la condició de normalitat. Al mateix temps, la relació del teixit adipós visceral i el subcutani posa en evidència que hi ha més gens manifestament sobre expressats que infra expressats. La confluència dels dos llistats de gens ha permès determinar

DISCUSSIÓ

quins gens són comuns a ambdues situacions: a les plantejades com alterades (IR, Ob, i DM) i a la de limfogènesi. D'inici destaca que al voltant del 50% dels gens associats a la limfogènesi varien en totes les situacions estudiades d'alteració metabòlica, independentment de la seva significació i del sentit de la seva variació. Això indica que de per se no són aliens a l'alteració metabòlica tot i que inicialment no fossin escollits per a determinar la mateixa. De totes les situacions d'alteració metabòlica contemplades és l'obesitat la que manifesta major relació significativa de canvi en l'expressió, en comparació a la de no alteració metabòlica, no obesitat (14% dels gens relacionats amb la limfogènesi).

Obesitat

En situacions d'obesitat el teixit adipós visceral es mostra més vinculat a la limfogènesi (13%) que no pas el subcutani (1%), el que indica que hi ha més gens relacionats amb la limfogènesi al teixit adipós visceral que al subcutani que veuen alterada la seva expressió. Aquest resultat es pot explicar a causa de les diferències estructurals que hi ha entre l'entramat limfàtic visceral i el subcutani. També es podria justificar pels diferents requeriments funcionals als que estan exposats els entramats limfàtics en cada tipus de teixit, principalment relacionats amb la inflamació; d'altra banda la inflamació també està molt vinculada a l'obesitat (249). Tampoc es pot obviar que el teixit adipós visceral té major superfície de interacció que el teixit adipós subcutani; això determina, al mateix temps, en condicions normals, que l'entramat limfàtic en el teixit adipós visceral es manifesti més exposat que el subcutani a modificacions induïdes per la inflamació.

Aquests resultats només ens indiquen que la relació limfogènesi – teixit adipós és desigual en funció de les condicions d'alteració metabòlica que estiguem considerant. Així, la condició d'obesitat és la que manifesta més relació i és possiblement per les diferències estructurals i funcionals de l'entramat limfàtic en els dos tipus de teixit adipós.

L'únic lligam manifest en aquests resultats entre els dos tipus de teixit adipós en relació a la limfogènesi es dona entorn dels gens *cc12* i *cc17* que són paralogues (250-252). En el teixit adipós visceral està augmentada l'expressió de *cc12*, citocina que afavoreix el reclutament de monòcits, cèl·lules T de memòria i cèl·lules dendrítiques. En el teixit adipós subcutani està augmentada l'expressió de *cc17*, citocina que atrau els monòcits i activa als macròfags. Ambdues citocines són secretades per les LEC i es vinculen a la resposta immune i possiblement a nivells de resolució diferenciats de la mateixa (233).

El 83% dels gens modificats en teixit adipós visceral en situacions d'obesitat ho són en sentit de la sobre expressió i correspondrien a processos relacionats amb inflamació, immunitat o apoptosi. Destaca el gen *ptgs2*, anomenat també *cox2*, que veu augmentada la seva expressió en els *microarrays* fins a 60 vegades. Aquest és un enzim que es vincula a la síntesi dels prostanoides. Els prostanoides són un grup d'àcids grassos que

deriven de l'àcid araquidònic que inclou l'àcid prostanòic, les prostaglandines i els tromboxans. Aquestes molècules incideixen de manera directa en la regulació de la inflamació. Un punt a destacar és el paper que juga aquest enzim en el procés de la limfogènesi: l'LPA entra en l'interior de la cèl·lula endotelial limfàtica i per mediació de l'activació de PTGS2 desencadena un procés que conclourà amb la síntesi de VEGFC i la proliferació de les cèl·lules endotelials limfàtiques (104). A l'LPA se li vinculen efectes sobre la reorganització del citoesquelet, la morfologia cel·lular i canvis relacionats amb la comunicació cel·lular i la interacció amb la matriu extracel·lular, el que li comporta un paper en la proliferació, la supervivència i la migració (253). Destacar el fet que part de la formació de PTGS2, a través de l'àcid araquidònic i de l'LPA deriva de la degradació dels fosfolípids. Els fosfolípids són elements constitutius de la membrana cel·lular, el que pot implicar que la seva degradació comporti senyals a nivell de l'interstici que derivin en l'estimulació de la proliferació, la supervivència o la migració. La qüestió que es planteja al llarg de la discussió, la de saber si la condició hidrodinàmica de l'interstici, en aquest cas valorada indirectament des de l'estructuració dels vasos limfàtics, pot ser o no un paràmetre clínic d'evolució de les afectacions metabòliques apareixeria doncs com una possibilitat a tenir en consideració. En un context alterat, com és el del càncer, la sobre expressió de *ptgs2*, tal i com s'observa en els resultats dels *microarrays*, s'ha associat a un augment de les cèl·lules d'adhesió, a canvis fenotípics, a la resistència a l'apoptosi i a l'angiogènesi tumoral.

El gen *il1β* veu augmentada la seva expressió fins a 50 vegades en l'obesitat. Aquest gen (250-252) codifica una proteïna que s'activa per mediació de la caspasa 1. Aquesta citocina intervé de manera determinant en la resposta inflamatòria i es vincula a processos de proliferació, diferenciació i apoptosi. La relació que es contempla amb els vasos limfàtics va associada a què aquesta citocina es pot secretar des de les LEC (233).

Diabetis

Pel que fa a la condició de diabetis en relació a la de no diabetis podem considerar que el nombre de gens relacionats amb la limfogènesi és feble, 7% pel teixit adipós subcutani i 8% pel visceral i amb nivells de variabilitat d'expressió que no es mostren molt alts. La majoria dels gens es troben infra expressats. En teixit adipós visceral els gens reprimits estarien majoritàriament vinculats a inflamació mentre que en teixit adipós subcutani ho estarien amb la formació de nous vasos, la inflamació i l'apoptosi. Només els gens *tnfrsf1b* i *nfκb2* estarien modificats significativament de manera diferenciada en ambdós teixits alhora. *Tnfrsf1b* és un gen vinculat a la regulació de l'apoptosi. Aquest receptor del TNF (250-252) forma part d'un heterocomplex que permet el reclutament de dos proteïnes que amb la seva fixació generen efectes anti apoptòtics. El gen de NFκB2 està relacionat amb processos d'inflamació, immunitat, diferenciació,

DISCUSSIÓ

creixement cel·lular, tumorigènesi i apoptosi (250-252). Ambdós gens pertanyen a famílies amb vies de senyalització cel·lular relacionades. Cal recordar que la via d'inducció de la limfogènesi mitjançant LPA associa l'acció també de NFκB (104).

Resistència a la insulina

Pel que fa referència a la resistència a la insulina els resultats no fan pensar que hi hagi una relació entre limfogènesi i teixit adipós molt marcada en aquesta condició. Un màxim del 4 % dels gens es mostren alterats i ho fan en percentatges de canvi no gaire elevats. En situacions d'obesitat, la presència de IR es vincula al gen de HGF augmentada tant en teixit adipós subcutani com en teixit adipós visceral tot i que a nivells de modificació febles, no donant-se en absència d'obesitat. El gen de HGF està vinculat amb la mitogènesi, la mobilitat cel·lular i la formació de la matriu el que permet associar-lo a l'angiogènesi, la tumorigènesi i la regeneració del teixit (250-252).

Teixit adipós visceral – teixit adipós subcutani en obesitat

Quan es valoren els gens vinculats a la regulació de la limfogènesi que coincideixen amb els modificats en el teixit adipós visceral en relació al teixit adipós subcutani en l'obesitat trobem que la majoria de gens estan reprimits (69 %) i que majoritàriament són gens vinculats a la inflamació i més concretament a la via de les quimiocines en la inflamació. Aquesta relació concorda amb la idea que el teixit adipós visceral té més tendència a estar, en relació al subcutani, més afectat per la inflamació. És de notar, en aquest sentit, que en global tots els resultats que venen de teixit adipós visceral associat a la resistència a la insulina i a l'obesitat tenen un grau de canvi més alt que els que venen de teixit adipós subcutani. Destacar que entre els gens que es sobre expressen en el teixit adipós visceral en relació al subcutani hi ha *pitx2* el qual augmenta la seva expressió 14 vegades. La proteïna que es deriva d'aquest gen actua com a factor de transcripció. En model animal, s'ha palesat com a determinant en la morfogènesi asimètrica dels òrgans (254). La regulació de la seva transcripció està associada a la via de la Wnt/β-catenin (255). Aquesta via facilita l'estabilització del seu ARN missatger com ho fa amb d'altres: c-jun, Ciclina D1, Ciclina D2 (256). Pel que ha descrit Baek et al (257) en relació als mamífers seria β-catenina qui indicaria, a Wnt i a factors de creixement que en dependrien, els processos de proliferació que s'han de portar a terme pel desenvolupament. Això ho faria induint la inhibició de diversos repressors i per l'activació de *pitx2* que a la vegada regularia diversos gens de control del creixement. Tal com s'ha considerat en la introducció, la via de la Wnt/β-catenina també s'ha relacionat amb el desenvolupament dels vasos limfàtics i *pitx2* amb el desenvolupament dels vasos limfàtics a nivell intestinal des d'una associació arterial (258). *Pitx2*, en humans, s'ha relacionat amb el desenvolupament dels ulls, de les dents i dels òrgans abdominals (259). Aquestes referències

porten a especular que estem davant d'un procés comú de desenvolupament, d'estructuració i de funcionament que aniria associat a la via de Wnt/ β -catenina.

Entre els gens vinculats a la limfogènesi que disminueixen la seva expressió en teixit adipós visceral en relació al subcutani hi ha *ccl21*, *cxcl6* i *cxcr4* que baixen la seva expressió 12, 10 i 7 vegades respectivament. *Ccl21* i *cxcl6* són citocines secretades per l'endoteli limfàtic (233) que es vinculen a la migració de cèl·lules mitjançant un efecte quimiotàctic. *Ccl21* ho faria sobre cèl·lules que disposessin del receptor *cxcr7* i *cxcl6* ho faria sobre cèl·lules que disposessin dels receptors *cxcr1* o *cxcr2*. *Cxcr4* s'ha relacionat amb la limfogènesi durant el desenvolupament embrionari (258). Els angioblasts que disposaven d'aquest receptor eren atrets per la secreció de *cxcl12* vers les zones de desenvolupament. Això es faria per mediació de *pitx2*. Altres gens de la limfogènesi que estan disminuïts en el teixit adipós visceral en relació al subcutani són els que directament estan vinculats a la estructuració dels vasos, aquests són, entre altres: *prox1*, *vegfc*, *vegfr3* (*flt4*). D'inici aquests resultats poden indicar d'una banda una alteració en gens que regulen pròpiament la formació dels vasos o la seva funció immunitària.

Una de les característiques que la bibliografia planteja i que ha estat àmpliament abordada en la introducció és que la proliferació del teixit adipós, sigui hipertròfia i/o hiperplàsia, està associada a una disminució de l'estructuració limfàtica. Aquest fet es confirmaria en la mesura que el teixit adipós visceral es mostra molt més procliu a augmentar el seu volum que el subcutani. Una altra característica és la que s'ha associat a la funció immune, que en els resultats també es veuria afectada.

Aquests primers estudis mostren doncs que hi ha relació entre el teixit adipós i l'estructuració dels vasos limfàtics, i que aquesta està molt més marcada en l'obesitat que en qualsevol altra situació d'alteració metabòlica. A més a més, es contempla que la vinculació de la limfogènesi en relació a les diferències d'expressió que hi ha entre el teixit adipós visceral i el subcutani es manifesta entorn a gens reguladors de la morfogènesi limfàtica i d'altres òrgans, com són *pitx2* (\uparrow) i *prox1* (\downarrow), *vegfc* (\downarrow), *vegfr3* (*flt4*) (\downarrow) entre altres gens o a gens relacionats amb la pròpia funció immunitària. Podem contemplar doncs la idea que sí que existeix la possibilitat d'un vincle entre el metabolisme i l'estructuració/funció limfàtica però que no podem establir de moment quina és la dinàmica del procés observat, si l'alteració limfàtica és causa o conseqüència de la dinàmica metabòlica o ambdues coses simultàniament .

Estudi 2 – Valoració de l'expressió gènica de *prox1* i *pdpn* en funció del tipus de teixit adipós.

L'expressió gènica de les sondes dels *microarrays* corresponents als gens que determinen l'estructuració limfàtica, *prox1* i *pdpn*, en pacients obesos mostren que aquests gens s'expressen diferencialment entre tipus de teixit

DISCUSSIÓ

adipós (taula 9). El teixit adipós subcutani veu disminuïda la seva expressió en relació al visceral. En cadascuna de les sondes utilitzades ambdós gens tenen disminuïda la seva expressió sent únicament significativa aquesta disminució en les sondes de *prox1*. En el mateix sentit l'expressió gènica determinada per RT-PCR de *prox1* i *pdpn* és significativament menor en teixit adipós subcutani en relació al teixit adipós visceral en totes les cohorts estudiades, sent l'expressió de *prox1* en teixit adipós subcutani un 27 % més baixa en la cohort 1, un 16 % en la cohort 2 i un 26 % en la cohort 3 en relació a la respectiva expressió de *prox1* a nivell del teixit adipós visceral. En el cas del gen *pdpn* la seva expressió també disminueix de manera significativa quan comparem la seva expressió en teixit adipós subcutani en relació al teixit adipós visceral (31, 28 i 55 % respectivament per cadascuna de les cohorts estudiades)(taula 10). Els resultats obtinguts amb *microarrays* i RT-PCR indiquen que els gens *prox1* i *pdpn* tenen un comportament desigual en el teixit adipós. El fet que tots els resultats vagin en el mateix sentit, és a dir que manifestin una menor expressió d'aquests gens en teixit adipós subcutani en relació al visceral, ve a indicar un comportament homogeni del teixit adipós en relació a aquests gens en cada tipus de teixit. En l'estudi fet per Procino (260) en el qual s'analitza l'expressió de *prox1* en teixit adipós subcutani i visceral així com en adipòcits diferenciats dels mateixos teixits en pacients sans, *prox1* s'expressa més en teixit adipós visceral que en subcutani i més en els adipòcits provinents del teixit adipós visceral que els provinents del subcutani. El conjunt dels resultats, els de l'estudi 2 i els de Procino, van en la mateixa direcció i ens encaminen a pensar que aquests gens s'expressen de manera diferenciada en el teixit adipós. La qüestió que es manté oberta ara és la de saber què determina aquesta diferència entre tipus de teixit adipós. Si considerem VEGFC com l'inductor final, no únic, de l'expressió de *prox1* i *pdpn* podríem considerar que els resultats d'expressió de *vegfc* poden ser paral·lels als de *prox1* i *pdpn* en condicions no patològiques. Aquesta consideració s'escau en la mesura que hi ha un estudi de Tinahones et al (261) que valora l'expressió de *vegfc* en condicions normals i s'observa que l'expressió està disminuïda en teixit adipós subcutani en relació al visceral.

Tot i l'homogeneïtat dels resultats en *microarrays* i RT-PCR i la confirmació dels mateixos a nivell bibliogràfic la quantificació de PDPN no confirma la relació desigual entre teixits adiposos en la cohort 4. No hi ha diferències significatives quan comparem els valors d'expressió proteica de PDPN entre el teixit adipós subcutani i el visceral (figura 22). Aquest resultat no té perquè desencorajar-nos en la determinació de la validesa de la hipòtesi d'estudi. Moltes raons podrien justificar aquest resultat: consideracions particulars de la mateixa cohort, número de pacients limitat, no disposar de valors de referència hidrodinàmics de cada pacient, el que permetria classificar els pacients d'acord a aquest criteri; consideracions pròpies a cada pacient, com la seva dieta, la seva situació immunològica,... Molts són

els factors que poden definir la hidrodinàmica i en la mesura que no es pugui fer una anàlisi en funció del criteri hidrodinàmic podem trobar-nos amb diferències no objectivables.

A més a més, cal tenir present que la podoplanina marca la consolidació d'una estabilitat estructural dels vasos limfàtics però no indica en quina situació metabòlica es dona aquesta estabilitat. La majoria de pacients que són analitzats manifesten patrons clínics, antropomètrics i bioquímics propis. Això fa pensar que podem trobar-nos amb pacients amb hidrodinàmiques semblants i característiques clíniques, antropomètriques i bioquímiques molt diferents. Això genera la idea que la hidrodinàmica no tindria perquè ser un paràmetre que es pugui estandarditzar, donat que és la resposta que dona cada individu a la seva manera de viure, al que menja, a l'activitat física que fa, a la seva genètica... entre molts altres factors que hi poden incidir.

Estudi 3 – Valoració de l'expressió de *prox1* i *pdpn* en presència d'alteració metabòlica.

Els resultats d'expressió gènica de *prox1* i *pdpn* en funció de la presència o no d'alteració metabòlica (No:IMC < 25 i sense diabetis; Si:IMC ≥ 25 amb o sense diabetis) mostren que l'expressió és més baixa tant en teixit adipós subcutani com visceral en aquells pacients que presenten alteració metabòlica en relació amb els que no en presenten (taula 12). Però és tant sols l'expressió de *prox1* subcutani qui manifesta les diferències de manera significativa, no la resta.

La idea que l'expressió d'aquests gens disminueixi en condicions metabòliques alterades es pot interpretar com l'evidència d'una compensació a la situació provocada per l'alteració metabòlica o com una condició afegida en el mateix procés fisiopatològic de l'alteració metabòlica. I també es pot donar la interpretació que sigui una condició conjunta de causa i efecte de tot el procés d'alteració metabòlica.

Donades aquestes possibilitats es plantejà determinar quines variables vinculades al metabolisme eren susceptibles d'estar relacionades amb *prox1* i *pdpn*. Al fer-ho (taula 13 i taula 14) es constatà que hi ha una gran quantitat de variables que es vinculen a aquests dos gens en la condició d'alteració metabòlica. Els resultats es van diferenciar en funció de si responien a paràmetres clínics, bioquímics o antropomètrics per una banda o d'expressió gènica per l'altra.

El grup de variables antropomètriques i bioquímiques que presentaren correlació significativa amb totes les variables d'interès està compost per: edat, pes, IMC, perímetre cintura, perímetre maluc, PCR, GPT i PAD. Salvant HDL colesterol amb *prox1* *vis* i NEFA amb *prox1* *sc*, aquestes variables també correlacionen amb totes les variables d'interès.

DISCUSSIÓ

Destacar que les úniques variables antropomètriques i bioquímiques que mantenen associació amb totes les variables d'interès en l'anàlisi de regressió lineal són: edat, pes, IMC, perímetre cintura i perímetre maluc. I destaca també que hi ha GPT que manté associació amb totes les variables d'interès menys *prox1* vis i NEFA que manifesta associació amb totes les variables d'interès amb qui té correlació, és a dir totes, menys *prox1* sc.

És de destacar que la relació que tenen les variables IMC, perímetre cintura, perímetre maluc, PCR, insulina, GPT i PAD amb les variables d'interès és inversa. Quan els valors d'aquestes variables antropomètriques augmenten, els gens d'interès baixen la seva expressió. Podem considerar que IMC, pes, perímetre cintura i perímetre maluc són variables que es poden associar a un mateix factor d'associació que és el sobrepès / obesitat. El que indicaria que a major sobrepès menor *prox1* i *pdpn* (menor estructuració limfàtica). Alhora, la PCR és utilitzada com a marcador d'inflamació, a major nivell d'inflamació menor expressió de *prox1* i *pdpn*. I la PCR només manté regressió lineal amb la podoplanina, no amb *prox1*.

Tanmateix s'ha de destacar que l'estructura limfàtica es defineix per la *pdpn* i que el fet que com a mínim la inflamació mantingui una associació significativa amb *pdpn* és destacable. Aquest resultat s'emmarcaria en el vincle entre l'estructuració limfàtica i la hidrodinàmica intersticial, en aquest cas del teixit adipós.

És interessant considerar de manera particular la relació entre les variables d'interès i la insulina. L'efecte de la insulina en el teixit adipós comporta un augment de la síntesi d'àcids grassos, un augment de la captació dels lípids de la sang i un augment de l'esterificació d'àcids grassos, el que permet formar més triglicèrids, i una disminució de la lipòlisi. Tot plegat són estímuls que advoquen per retenir els lípids en el teixit adipós.

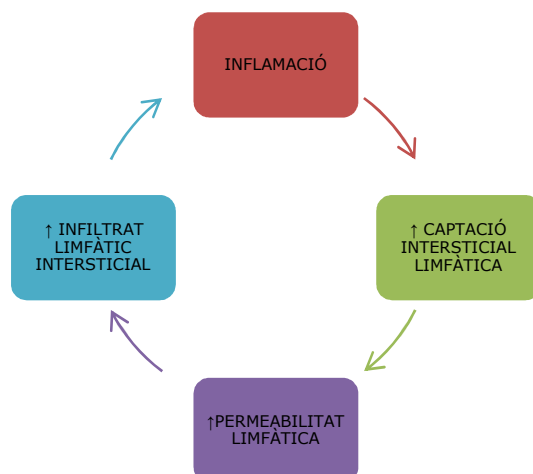
L'associació detectada entre la insulina i els gens estudiats, tot i no ser concloent, pot ser reflex de la mateixa relació entre el teixit adipós i l'estructuració limfàtica, expressió de *prox1* i *pdpn*, que es vehicula, entre altres per una molècula determinant en la regulació de la glucèmia com és la insulina. Si analitzem els vincles associats entre la glucèmia i l'estructuració limfàtica veurem com és de plausible el plantejament que es proposa.

Cal considerar que la insulina s'ha relacionat directament amb la regulació del flux limfàtic i amb la captació del líquid intersticial (151) tal i com s'ha comentat en la introducció. El subministrament d'insulina va implicar un augment del flux limfàtic i de la captació del líquid intersticial en model animal. Cal tenir present també que l'estructuració dels vasos limfàtics està alterada per la diabetis (152). La diabetis afecta la permeabilitat dels vasos limfàtics a través del NO i precisa de la fosfodiesterasa 3 per mantenir la seva integritat, enzim amb qui correlacionen de manera inversa totes les variables d'interès menys *prox1* sc. La relació de la insulina amb els gens relacionats amb l'estructuració limfàtica no és doncs tan excepcional. És

significativa també l'observació feta per Arngrim et al (201) on es posa de manifest que la ingesta de glucosa augmenta el flux limfàtic en pacients primis però no en obesos. El conjunt d'aquestes consideracions funcionals es poden enllaçar amb la hipòtesi plantejada sobre la hidrodinàmica intersticial. Si analitzem tot el procés d'associació pas a pas quedarà més clara la idea plantejada. L'estímul que genera la ingesta de glúcids provoca la secreció de la insulina i aquesta a la vegada l'absorció de la glucosa per part dels teixits. En aquest punt la glucosa i la insulina augmentarien el flux limfàtic en la mesura que la captació de la glucosa per part dels teixits fos possible. Si la glucèmia es veu augmentada durant molt de temps veurem estimulada la retenció de lípids a nivell del teixit adipós per efecte directe de la insulina sobre el teixit adipós. En la mesura que el teixit adipós pugui assumir aquest increment de lípids mitjançant la hipertrofia / hiperplàsia l'organisme podrà compensar la situació i mantenir nivells de glucèmia estables, una hidrodinàmica discontinuament estable però disminuïda en amplitud de discontinuïtat i nivells de lipotoxicitat continguts. A mesura que l'estímul de contenció lipídica en el teixit adipós fos insostenible, per la raó que fos, apareixerien estímuls pro inflamatoris per intentar reconduir l'excés de lípids intersticials que es generarien a una zona protegida com són els vasos limfàtics. En aquest punt es passaria, fruit d'una retenció hidrostàtica i d'un augment de la mateixa pressió hidrostàtica, a una hidrodinàmica d'amplitud d'alternança molt més baixa, a un flux limfàtic disminuït i a una distensió dels vasos limfàtics cada vegada més gran. En el cas que la situació no es revertís de manera més o menys ràpida entrariem en la situació que el cúmul pro inflamatori saturaria la capacitat funcional dels vasos limfàtics col·lapsant l'alternança hidrodinàmica, minimitzant la conducció limfàtica i dilatant tant els vasos limfàtics que s'acabaria afectant la seva estructura i augmentant la seva permeabilitat. Els excessos de la filtració derivats de l'augment de la permeabilitat en aquell moment haurien de ser amortits pel teixit adipós perilimfàtic tot esperant una millora funcional de l'organisme a través del sistema immune, de la funció limfàtica i/o una disminució en la ingesta de sucres i greixos que disminuís les exigències compensatòries sobre el sistema. Altrament s'entraria en una seqüència d'alteració en bucle cada vegada més difícil de reconduir (figura 30) que associaria nivells desiguals de fibrosi, retenció hídrica i adipositat en funció del context hidrodinàmic específic a cada persona i jo diria inclús que a cada regió de l'organisme del pacient.

DISCUSSIÓ

Figura 30. Bucle disfuncional de la hidrodinàmica intersticial limfàtica



La pressió arterial diastòlica pot ser un indicador en certa mesura de la rigidesa arterial, de la capacitat de dilatació dels vasos sanguinis. La relació entre l'estructuració limfàtica i la pressió arterial diastòlica, tot i no ser confirmada per la regressió lineal amb les variables d'interès, pot ser atribuïble a la continuïtat funcional entre l'entramat vascular i el limfàtic a través de l'espai intersticial. No és d'estranyar doncs que existeixi un lligam entre ambdós paràmetres d'estudi i que, a més a més, es doni de manera inversa. La deficiència en la captació limfàtica tindria com efecte una retenció de líquid intersticial, una major resistència a la filtració capil·lar i un augment de la pressió arterial diastòlica. La deficient estructuració limfàtica s'acompanyaria d'un augment de la pressió arterial diastòlica.

La gpt (ALT) és un marcador de funcionament hepàtic que si està fortament elevat indica afectació hepàtica. En aquest context l'alteració del fetge aniria associada a la disminució de l'expressió de *prox1* i *pdpn* que podria ser associada a la pròpia funció del teixit adipós. Cert és que la sobrecarrega funcional del fetge es podria generar des de la inflamació de l'intestí i de la seva incapacitat de reconduir els lípids pel canal toràcic a la circulació sanguínia. En la mesura que el cúmul de teixit adipós anés associat a aquesta derivació hepàtica no seria d'estranyar aquesta associació detectada.

Si considerem els resultats de les associacions en l'estudi de regressió lineal de les variables antropomètriques i bioquímiques, l'edat i l'índex de la massa corporal són les variables que es mostren més lligades a tot el procés d'estudi. L'edat ha quedat establert que genera canvis en l'estructuració i funcionament dels vasos limfàtics (227, 262), el que justifica per se que si estem analitzant efectes sobre els gens que determinen l'estructuració dels vasos limfàtics aquests es vegin associats a l'edat.

Pel que fa a l'índex de massa corporal comentar que Greene et al (263) descriuen una disminució del drenatge intersticial limfàtic i del flux limfàtic en relació a l'augment de l'índex de massa corporal. L'índex de massa corporal està lligada en la majoria de casos a la condició d'obesitat. L'obesitat s'ha manifestat com inductora d'alteració limfàtica (264). En model animal es va comprovar que la dieta inductora de l'obesitat tenia explícita una pèrdua de funció limfàtica a mesura que augmentava l'obesitat.

Els resultats confirmen doncs que l'estructuració limfàtica està afectada per l'obesitat.

Cal destacar, en el mateix sentit, que l'alteració limfàtica vinculada a l'obesitat es manifesta de manera desigual en les diferents parts de l'organisme però que tanmateix afecta a tot l'organisme (265). La hipòtesi d'una diferent hidrodinàmica intersticial en les diferents parts de l'organisme i la d'una inducció genèrica de desajustament amb una resposta específica en funció de cada zona és cada vegada més plausible.

En la introducció ja es va abordar aquesta idea estesesament i es va considerar que la desestructuració dels vasos limfàtics, l'alteració de la seva funció o ambdues coses comportaria un alentiment del flux intersticial i el contorn propici per a la retenció de lípids a nivell del teixit adipós.

El grup de variables corresponents a l'expressió gènica relacionats amb *prox1* i *pdpn* és també molt ampli i es podria analitzar cada vinculació de manera única. L'abordatge d'aquest anàlisi no respondria a l'objectiu plantejat en aquest estudi però no s'ha de menystenir el contingut dels resultats de cara a posteriors estudis.

Destaquem d'aquest conjunt de gens aquells que la seva expressió es vincula, independentment d'on es doni, amb tots els gens d'interès i en tots els tipus de teixit adipós. Aquest requisit es dona en la mesura que és el requeriment de l'estructuració dels vasos limfàtics l'expressió continua i simultània de *prox1* i *pdpn*.

D'aquests gens cal destacar que hi ha *bcl2*, *cpt1a*, *vegfa*, *atg3* i *atg7* que mantenen una relació directa amb *prox1* i *pdpn*, és a dir, que quan augmenten o disminueixen la seva expressió els gens d'interès també ho fan. El gen *bcl2* (250-252) és un gen que codifica una proteïna de la membrana externa de les mitocòndries que permet controlar la seva permeabilitat i intervenir d'aquesta forma en la regulació de l'apoptosi en algunes cèl·lules. El gen *cpt1a* (250-252) és un gen que codifica un enzim que intervé en el transport dels àcids grassos de cadena llarga a través de les membranes mitocondrials i en la seva subseqüent β -oxidació, tenint un paper important en el metabolisme dels triglicèrids. El gen *vegfa* (250-252) s'ha relacionat amb l'angiogènesi, la vasculogènesi i amb el creixement de les cèl·lules endotelials. També se li atribueix un paper en la proliferació de les cèl·lules endotelials, en la migració cel·lular, en la inhibició de l'apoptosi i en l'augment de la permeabilitat dels vasos sanguinis. El gen *atg3* (250-252) és un gen que codifica una proteïna involucrada en la regulació de

DISCUSSIÓ

l'autofàgia dins el procés de mort cel·lular. El gen *atg7* (250-252) és un gen que codifica una proteïna que està involucrada en la regulació de la mort cel·lular en el context d'estrès metabòlic. Intervé també en el manteniment de l'homeòstasi axonal, en la prevenció de la seva degeneració, en el manteniment de les cèl·lules mare hematopoètiques, en la formació dels grànuls de cèl·lules de Paneth i en la diferenciació del teixit adipós.

La resta dels gens, *apm*, *aqp7*, *atgl* i *fabp4* tindrien una relació inversa amb l'expressió de *prox1* i *pdpn*, és a dir, que quan aquests gens augmentessin la seva expressió els gens d'interès farien el contrari, la disminuirien o viceversa quan els gens disminuïssin la seva expressió els gens d'interès l'augmentarien. El gen *apm* (250-252) respon a un gen que s'expressa en teixit adipós i està vinculat al control del metabolisme dels greixos i a la sensibilitat a la insulina tenint efecte directe en processos anti diabètics, anti aterogènics i anti inflamatoris. El gen *aqp7* (250-252) és un gen que sintetitza una proteïna de membrana transportadora de glicerol i aigua que s'ha associat a una alteració hidrodinàmica de l'oïda interna i a l'obesitat mòrbida. El gen *atgl* (250-252) és un gen que sintetitza un enzim vinculat a la hidròlisi de les gotes lipídiques tant en adipòcits com en altres tipus de cèl·lules. També s'ha associat a la transacilació de l'acil glicerol. Se li atorga un rol important en l'homeòstasi energètica. *Fabp4* (250-252) és un gen que deriva en una proteïna citoplasmàtica associada al transport dels àcids grassos de cadena llarga, d'altres lligands hidrofòbics i de l'àcid retinoic. Cal mencionar també que és transportador intracel·lular de l'àcid lisofosfatídic, reconegut estimulador de la proliferació de les cèl·lules endotelials limfàtiques per mediació de l'activació de la via de *prox1* que a la vegada afavoreix la síntesi de VEGFC.

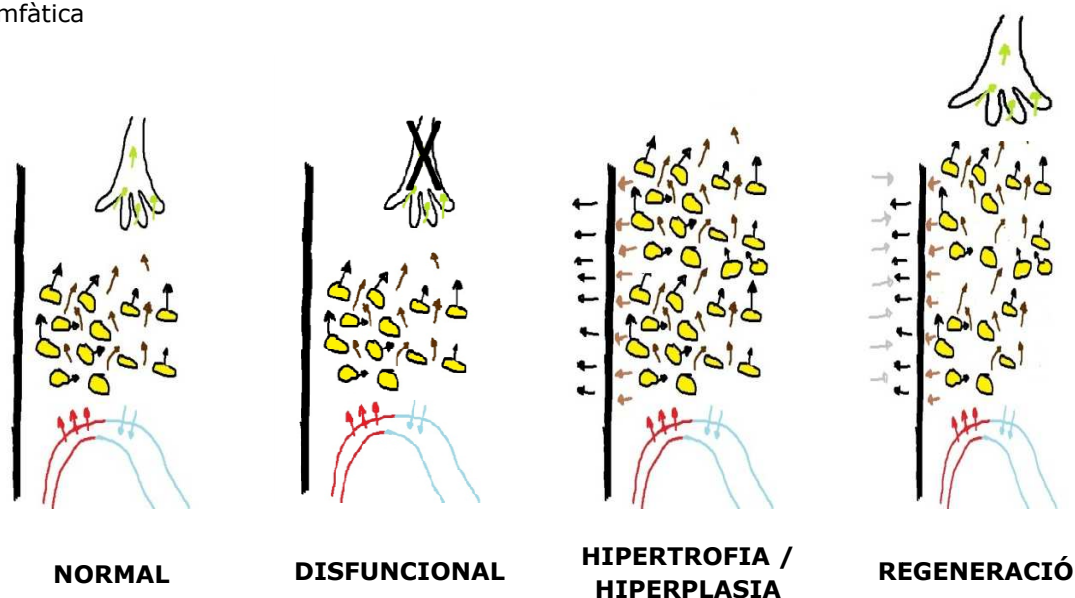
Aquests resultats de vinculació gènica porten a pensar que els gens que es relacionen amb els gens d'interès de manera directa són gens relacionats d'una banda amb la regulació de la mort cel·lular, l'apoptosi i l'autofàgia, i de l'altra, per part de *cpt1a*, amb el transport d'àcids grassos de cadena llarga, el que no ens hauria de sorprendre donat que els vasos limfàtics són captadors majoritaris dels lípids de cadena llarga.

Fruit d'aquests resultats sorgeix la idea, en el context de l'estudi de la hidrodinàmica intersticial limfàtica, que l'interstici sigui el mitjà de regulació de la mort cel·lular i que ho faci a través de l'estructuració dels vasos limfàtics. Aquesta idea contemplaria la situació que en la mesura que hi ha estructuració limfàtica s'estimula la proliferació. El procés d'estimulació de la proliferació cel·lular mitjançant l'estructuració limfàtica es basa en certes consideracions. La primera consideració és que l'LPA intersticial és un estímul de proliferació dels vasos limfàtics. Una altra consideració a tenir present és que la membrana cel·lular està formada per fosfolípids i que aquests en ser degradats formen LPA i l'àcid araquidònic, és a dir un inductor de l'estructuració limfàtica mitjançant *prox1* i un inductor del flux intersticial mitjançant la inflamació. I una tercera consideració a tenir en

compte és que PROX1 és considerat un supressor tumoral, com ja s'ha esmentat en la introducció.

Partint d'aquestes consideracions podem contemplar que l'equilibri ideal de l'interstici respondria a un equilibri estable entre el nombre de cèl·lules formades i el nombre de cèl·lules destruïdes (proliferació - apoptosi), entre els requeriments d'evacuació del líquid intersticial i el seu drenatge limfàtic (necessitats drenants - drenatge intersticial limfàtic) i entre els senyals dels diferents processos en que l'interstici estigui involucrat. La realitat funcional de l'interstici estableix que contínuament estem incidint en la mort de cèl·lules i contínuament estem restituint aquesta destrucció. Aquest equilibri es manté gràcies a la presència d'estímuls de proliferació i a estímuls d'apoptosi que en cada circumstància marquen el sentit del canvi (figura 31).

Figura 31. Procés d'estimulació de la proliferació cel·lular mitjançant l'estructuració i funció limfàtica



En aquest punt sorgeix la qüestió de considerar que passaria si la pròpia senyalització de la situació de drenatge no fos real, no correcta: si estigués indicant al teixit que les condicions són òptimes quan en realitat són tot el contrari. Imaginem la situació que un cert nombre de cèl·lules s'han mort i han desencadenat la formació de LPA i àcid araquidònic en l'interstici.

L'LPA format entraria a les LEC i la limfogènesi s'activaria. L'àcid araquidònic augmentaria la filtració capil·lar i afavoriria el flux intersticial i la seva captació limfàtica. Si aquesta situació no respongués a la realitat, si l'estructuració limfàtica no s'associés a una capacitat drenant real el que passaria és que el líquid intersticial seria retingut, que contínuament estaríem enviant senyals de limfogènesi, que contínuament estaríem indicant que hi ha hagut molta mort cel·lular perquè cada vegada hi hauria més LPA i àcid araquidònic. A partir d'aquest moment entrariem en aquell

DISCUSSIÓ

bucle disfuncional comentat precedentment. Hem de saber en aquest punt que totes les situacions inflamatòries tenen associada un augment de la densitat dels vasos limfàtics i un augment de la secció dels vasos, és a dir, una limfogènesi augmentada. I que si la inflamació es manté en el temps acaba desestructurant els vasos limfàtics. L'LPA se sap que està vinculat a la proliferació cel·lular mitjançant diverses vies (108, 266). Alguna d'aquesta també s'ha relacionat amb l'expressió de *prox1*. La disminució de l'expressió de *prox1* per alguna d'aquestes vies donaria arguments per creure en la viabilitat d'aquesta hipòtesi, ja que quedaria justificada la deriva vers el càncer en tant que *prox1* no pogués exercir com a supressor tumoral. Aquesta idea no està mancada d'arguments quan es detecta que molts càncers estan associats a una baixa expressió de *prox1* com ja s'ha descrit en la introducció i que també s'associa a la presència de l'LPA (266).

Una altra via d'estudi que caldria valorar és la influència del flux sobre l'expressió de *prox1* sobre les cèl·lules tumorals. Com s'ha descrit en la introducció es coneix de la incidència del flux intersticial sobre l'expressió de *prox1* en les LEC.

En el context del teixit adipós un fenomen semblant es podria valorar amb la particularitat que el teixit adipós quan prolifera no associa malignitat, possiblement perquè es veu mancat de vasos limfàtics. En aquest sentit cal saber, tal i com s'ha comentat en la introducció, que l'LPA incideix en la diferenciació dels preadipòcits en adipòcits.

Passada la descripció d'aquesta hipòtesi que afavoria poder entendre els resultats fins ara obtinguts prosseguim comentant la resta dels mateixos.

Pel que fa als gens que es vinculen en sentit invers amb les variables d'interès, aquests estan relacionats amb la regulació del metabolisme lipídic i també correspon a la relació manifesta descrita en la introducció que vincula l'alteració en la conducció dels lípids per part dels vasos limfàtics a una retenció dels mateixos a nivell del teixit adipós.

Aprofundint en la determinació de quins gens tenen més pes en l'expressió de les variables d'interès es van vincular aquests gens a un estudi de regressió lineal. En ell es pot observar que la incidència màxima sobre l'expressió de *prox1* subcutània l'agafa l'expressió del gen *atg7* subcutània i visceral juntament amb el de *atg3* visceral. En *prox1* visceral, *pdpn* subcutània i *pdpn* visceral l'agafa majoritàriament l'expressió del gen *atg3* visceral.

Així doncs, podem considerar que el gen *atg3* és el que més vinculació presenta amb *prox1* i *pdpn*. Vinculació mai descrita anteriorment.

Vam considerar també l'estudi d'aquells gens que manifestaven lligam amb les variables de interès només des de l'expressió del propi teixit adipós on s'expressaven. Aquesta circumstància només es va observar a nivell de teixit adipós visceral. És a dir, que si s'expressaven en teixit adipós visceral

es vinculaven amb les *prox1* i *pdpn* del teixit adipós visceral. Aquest subgrup de gens són i es vinculen a (250-252):

Adipsin, sintetitza una proteïna vinculada a la supressió humoral d'agents infecciosos. Els adipòcits secreten aquesta proteïna. La seva alta concentració en el greix ha fet pensar en la relació del teixit adipós amb el sistema immune.

Cav1, genera una proteïna constitutiva de les membranes de les caveoles, sent elements constitutius de les *lipids rafts* que les constitueixen. Està relacionada amb la progressió del cycle cel·lular, d'aquí la consideració del seu paper en la supressió tumoral.

Fiaf, també anomenada *angptl4*, forma una proteïna que es induïda per la hipòxia en les cèl·lules endotelials. Es manifesta com reguladora de l'angiogènesi i moduladora de la tumorigènesi. Inhibeix l'estructuració dels vasos per part de les cèl·lules endotelials i redueix la filtració vascular. Està involucrada directament amb l'homeòstasi de la glucosa, en el metabolisme lipídic i en la sensibilitat a la insulina.

Lipe, facilita una proteïna que hidrolitza els triglicèrids facilitant l'alliberament dels àcids grassos, fent-los lliures.

Plin, forma una proteïna que intervé en el metabolisme dels lípids en els adipòcits. Intervé en la limitació de l'acció de la lipasa hormona sensible així com en la formació i engrandiment de les gotes lipídiques esdevenint un modulador de la lipòlisi i dels nivells de triglicèrids

El conjunt d'aquests gens es vincula també a la regulació del metabolisme lipídic i ho fa de manera inversa amb les variables d'interès. Aquest fet va en el sentit ja comentat reiteradament que l'afectació de l'estructuració limfàtica aniria en consonància amb una proliferació del teixit adipós.

En aquest moment de l'estudi es considerà pertinent avaluar l'efecte de l'exercici en l'expressió de les variables d'interès. Donat que l'exercici físic dinamitza i augmenta el flux intersticial i limfàtic (144) vam considerar interessant saber si aquest podria tenir vinculació amb l'expressió dels gens d'interès. Els resultats (taula 20) reflecteixen que l'expressió de *prox1* subcutània i de *pdpn* visceral baixa a mesura que augmenta l'exercici però que no ho fa de manera significativa. En la condició d'activitat física totes les variables baixen la seva expressió amb l'increment d'hores de dedicació a l'activitat. Malgrat que el resultat és desigual entre gens i teixits és destacable el fet que l'activitat per se estigui vinculada a modificacions de l'expressió dels gens independentment del sentit de la modificació. Podem considerar totes les limitacions tècniques associades al control del pacient en la seva activitat física, com la realitat o no de la seva notificació, com la seva intensitat, com el tipus d'activitat... que certament condicionen l'efecte sobre la limfogènesi. Gehlert et al (267) sense anar més lluny van mostrar diferències en la limfogènesi en teixit muscular esquelètic en funció de l'exercici. Greiwe et al (268) van valorar a més a més els canvis en la limfogènesi muscular i cardíaca en funció del tipus de contracció muscular i

DISCUSSIÓ

van constatar que la contracció excèntrica genera un augment de la densitat de vasos limfàtics en el múscul esquelètic i una disminució en el cardíac. Hi ha molts factors que poden tenir a veure. Cal tenir en compte que l'exercici no defineix una resposta hidrodinàmica intersticial i limfàtica estable. Al contrari, la hidrodinàmica sempre es veurà modificada per l'exercici i fruit de la variabilitat de la mateixa dinàmica d'activitat ens podem trobar associades variabilitats dins el mateix individu i entre individus. Només la constància d'una dinàmica d'exercici concreta, tipus d'exercici, intensitat, horaris,...podria facilitar-nos un descriptiu real del que és associable a l'exercici.

És interessant, també, considerar la manca de relació que hi ha entre els gens d'estudi, *prox1* i *pdpn*, i el colesterol, la glucosa i els triglicèrids. El colesterol no s'ha relacionat directament amb l'estructuració limfàtica i el seu funcionament. El que sí que s'ha descrit és que la situació de hipercolesterolemia, en model animal, va associada a una desestructuració i alteració funcional dels vasos limfàtics que és reversible en la mesura que es reverteix la hipercolesterolemia. La relació es dona a través del HDL colesterol en el RCT (134, 166).

El fet que HDL colesterol sí manifesti correlació amb la majoria dels gens d'estudi, només amb *prox1* visceral no la té, confirmaria la idea que la regulació del colesterol per part dels vasos limfàtics es fa a través de la interacció amb el HDL colesterol. I que l'estructuració dels vasos limfàtics, valorada per l'expressió de *prox1* i *pdpn* està lligada al propi HDL colesterol i no al colesterol tal i com s'havia demostrat en model animal.

Molts són els estudis que mostraven associació de certes variants de *prox1* amb la diabetis i amb els nivells de glucosa en dejuni; també hi ha exemples dels efectes de la glucosa sobre la funció limfàtica comentats precedentment però tanmateix no hi ha relació directa entre la glucosa i els gens d'interès estudiats, *prox1* i *pdpn*. Mantenir la glucosa a nivells estables és un requeriment global de l'organisme en el qual la insulina hi juga un paper determinant però no únic. En la mesura que la glucosa s'ha de mantenir a nivells més o menys estables podem considerar que és normal que l'associació no s'hagi de produir en situacions hidrodinàmiques únicament associables a la glucosa, situacions, al meu entendre, inèdites. Això només podria donar-se en desajustaments vinculats a la glucosa, com seria el cas de la diabetis. I com ja s'ha comentat la diabetis afecta l'estructuració limfàtica.

En els triglicèrids es podria donar quelcom de semblant al que passa amb la glucosa però sense disposar en aquest cas d'evidències d'alteració estructural o funcional limfàtiques conegudes que avalin de moment aquesta hipòtesi.

L'anàlisi de l'expressió de *prox1* i *pdpn* en funció dels diferents graus d'obesitat, definida pel IMC ens indica que a major nivell d'obesitat menor

expressió dels gens d'interès. Tanmateix les associacions de les variables amb les variables d'interès no són tan evidents ara que es segmenta la cohort de manera específica, per l'índex de massa corporal en aquest cas, que quan no es fa aquesta segmentació. La distinció de l'obesitat en diferents graus dilueix els resultats en la mesura que amplia la variabilitat entre les situacions metabòliques i fa més difícil associar la realitat hidrodinàmica intersticial, mesurada en aquest cas per una situació metabòlica concreta i l'expressió de *prox1* i *pdpn*. En altres paraules una situació hidrodinàmica no respon a una situació metabòlica concreta però qualsevol situació metabòlica sí que té associada una situació hidrodinàmica concreta.

L'explicació més plausible que s'ha anat argumentant a mesura que considerem els resultats, i justificaria el conjunt de resultats fins ara considerats, és la que uneix la mateixa hidrodinàmica intersticial a l'estructuració dels vasos limfàtics (269, 270). Aquesta consideració respon al fet que en la mesura que un individu té com referència de funcionament òptim una hidrodinàmica intersticial concreta qualsevol desajustament de la hidrodinàmica aniria associada a canvis que comportessin el manteniment d'aquesta hidrodinàmica de referència. Assumint que qualsevol manifestació compensatòria portada a l'extrem aniria associada a una manifestació clínica pròpia, això implicaria que moltes malalties, les degeneratives sobretot, podrien tenir el seu origen en un mateix punt, en la hidrodinàmica intersticial en part atribuïble a l'estructuració i funcionament de l'entramat limfàtic.

L'estudi de l'expressió de *prox1* i *pdpn* en funció dels nivells de certs marcadors metabòlics dóna arguments per creure que existeix una vinculació específica entre l'estructuració limfàtica i la regulació metabòlica associada a aquests marcadors. Aquests marcadors, la PCR, la insulina, la pressió arterial diastòlica o el pes van ser escollits com característics del ventall clínic de l'alteració metabòlica, tot i que n'hi podria haver-ne més vam considerar que eren prou representatius. Els resultats han sigut rotunds. Sigui quin sigui el marcador considerat hi ha diferències significatives en l'expressió de *prox1* i *pdpn* en funció del grau de presència de cadascun dels marcadors. A mesura que augmenta la presència del marcador metabòlic l'expressió de *prox1* i *pdpn* disminueix.

Aquests resultats il·lustren doncs que l'alteració metabòlica tant en conjunt com de manera específica afecta l'expressió de *prox1* i *pdpn*. Creixen doncs els arguments que reforcen la hipòtesi que la hidrodinàmica intersticial és la que defineix el patró disfuncional metabòlic i que ho fa en gran mesura gràcies a l'estructuració i funció de l'entramat limfàtic.

Estudi 4- Expressions gèniques associades al LPA en relació a l'expressió gènica de *prox1* i *pdpn*.

Arribats a aquest punt de l'estudi es va considerar interessant valorar de manera indirecta la possible associació entre gens vinculats a l'LPA i la pròpia estructuració limfàtica ja que no disposàvem de mesures directes de LPA. L'LPA s'ha vinculat de manera directa a l'expressió de *prox1* i a la limfogènesi (104). Els gens estudiats majoritàriament s'associen a l'expressió de *prox1* més que a l'expressió de *pdpn* fet que podríem esperar donat que la interacció reconeguda de LPA es dona amb *prox1* i no amb *pdpn*.

Destaca com a més comú el gen de *cd36*. Aquest es relaciona amb totes les expressions possibles de *prox1* i només amb *pdpn* visceral. *CD36* és una glicoproteïna força present que està relacionada amb funcions d'adhesió. També intervé en la mobilització dels àcids grassos, fet que el relaciona amb la regulació dels mateixos. Intervindria en processos antiangiogènics i es vincula a la promoció de la inflamació per incidència, entre altres, sobre NF- κ B i la consegüent formació de molècules pro-inflamatòries, CXCL1, CXCL2 i CCL9, així com sobre la secreció de IL1B.

LPA incideix en el funcionament de CD36 (271). LPA causa una disminució de l'expressió de *cd36* de manera dosi depenent i temporo depenent. En aquest procés de repressió estarien involucrats receptors de l'LPA i la proteïna kinase D. Els resultats obtinguts concorden amb aquest vincle entre *cd36* i LPA. D'una banda hi ha els gens relacionats amb LPA, que incidirien en augmentar la presència del LPA i que s'associen de manera directa amb l'expressió de *prox1* i de l'altra banda hi ha *cd36* que ho fa de manera inversa, és a dir, que a mesura que *prox1* augmenta per l'acció de LPA, *cd36* baixa.

Cal destacar també una sèrie de gens que es vinculen separadament amb l'expressió de *prox1* i *pdpn* en acord al tipus de teixit on aquests s'expressen. Així, el gen expressat en teixit adipós subcutani es relacionaria com a mínim amb *prox1* o *pdpn* subcutani mentre que el que ho fa en teixit adipós visceral ho fa com a mínim amb *prox1* i *pdpn* visceral. Els gens de *lpcat1*, *lpcat2*, *lpcat3*, *lpcat4* i *ppap2c* són els gens que es vinculen amb l'expressió de *prox1* subcutània i visceral separadament. Pel que fa a *pdpn* subcutània i visceral és *ppargc1b* l'únic gen amb qui es relaciona de manera separada en funció del tipus de teixit adipós.

Les LPCATs són enzims que permeten la transferència de grups acils afavorint la conversió d'unes molècules en unes altres. Això el que afavoreix, en un sentit o altre, és la formació de l'LPA.

PPAP2C (250-252) està involucrada en la catàlisi de l'àcid fosfatídic, entre altres molècules. Incideix en la hidròlisi de l'LPA de manera depenent a la concentració dels derivats immediats a l'àcid fosfatídic.

Així els nivells de catàlisi induïts per aquest gen es graduen d'aquesta forma:

l'àcid fosfatídic > Ceramida-1-fosfat > àcid lisofosfatídic > Esfingosina-1-fosfat.

Pel que fa als gens que es vinculen a la *pdpn* dir que la proteïna que deriva del gen *ppargc1b* (250-252) està vinculada a l'estimulació de diversos factors de transcripció i receptors nuclears. S'ha relacionat amb l'oxidació dels greixos, amb el metabolisme no oxidatiu de la glucosa i amb la regulació de la despesa d'energia.

Cal destacar que hi ha un cert nombre de variables vinculades a l'LPA que no correlacionen ni amb *prox1* ni amb *pdpn*. Són *agpat3*, *agpat4*, *agpat5*, *agpat9*; tots aquests gens estan vinculats a la transformació de LPA en fosfolípids, és a dir, en revertir la formació de l'LPA.

No es pot deixar de mencionar la relació manifesta que té *fabp4* amb *prox1* i *pdpn* a nivell del teixit adipós visceral i que no es manifesta a nivell subcutani. Cal tenir present que *fabp4*, més enllà de ser un transportador de lípids en els adipòcits, és un transportador intracel·lular de LPA. Aquesta proteïna fixa àcids grassos de cadena llarga i àcid retinoic cap els seus receptors en el nucli. Se li associen funcions en la captació, transport i metabolisme dels àcids grassos.

Tots aquests resultats mostren que la relació entre LPA (valorat de manera indirecta pels gens inductors) i *prox1* existeix en la cohort 1 i confirmen l'associació inversa entre *cd36* i *prox1*.

Seguint amb l'estudi es va considerar pertinent abordar aquesta vinculació considerant les expressions gèniques dels gens vinculats al LPA en funció de l'expressió *prox1* (expressió alta i baixa).

De l'observació d'aquests resultats es valora la similitud que manifesten certs gens en el seu comportament. Els gens que manifesten diferències significatives en la seva expressió en funció de la seva relació amb el nivell de *prox1* subcutània i/o visceral són bàsicament els mateixos. Aquests són els gens *cd36*, *lpcat1*, *lpcat3*, *lpcat4*, *pld6*, *ppap2b* i *ppap2c*. Tot i així, cal tenir present que l'expressió de *lpcat1*, *lpcat3*, *lpcat4* i *ppap2b* a nivell visceral manifesta també diferències significatives en funció del nivell de *prox1* subcutani tot i tractar-se de la seva expressió en teixit adipós visceral. Propis al condicionant del nivell d'expressió de *prox1* subcutani hi ha el gen *lpcat2* en la seva expressió en teixit adipós subcutani i visceral i *rgs1* en la seva expressió visceral que manifesten diferències significatives en la seva expressió.

En funció del nivell d'expressió de *prox1* visceral hi ha la particularitat del gen de *fabp4* que manifesta diferències significatives en la seva expressió en teixit adipós subcutani i visceral, i que no es donen en relació a l'expressió de *prox1* subcutani. Destaca que l'expressió *fabp4* en teixit adipós subcutani i visceral està disminuïda en pacients amb nivell d'expressió de *prox1* vis elevada. Aquests resultats suggereixen que en

DISCUSSIÓ

teixit adipós, tant subcutani com visceral, baixen els requeriments de mobilització d'àcids grassos quan l'inductor major d'estructuració limfàtica, *prox1*, està elevat en teixit adipós visceral. Mentre que quan l'expressió de *prox1* està elevada a nivell subcutani l'expressió de *fabp4* tant subcutània com visceral no es veu alterada, donant-se un estímul en ambdós teixits de síntesi de LPA. En sí el que es manifestaria és que la estimulació proliferativa dels limfàtics es donaria en els dos teixits però que la mobilització dels àcids grassos només s'estimularia en relació a l'expressió de *prox1* a nivell visceral no a nivell subcutani.

La manera com s'han analitzat aquests resultats pretén evidenciar que la relació és desigual entre tipus de teixit adipós per certs gens però que manté moltes similituds. Això porta a pensar que la pròpia distinció entre teixits adipós pot ser la mateixa resposta adaptativa a realitats hidrodinàmiques diferents. Això permet que ens reafirmem en la noció d'afectació metabòlica comuna d'expressió disfuncional desigual.

Estudi 5 – Estudi d'expressions gèniques associades a l'expressió dels gens *prox1* i *pdpn*.

La confluència dels dos llistats de gens creats pel desenvolupament d'aquest projecte, un definatori de la regulació de la limfogènesi i l'altre fruit de la valoració de la relació estadística entre l'expressió d'una sèrie de gens vinculats a la regulació del metabolisme i l'expressió de *prox1* i/o *pdpn*, ha permès obtenir un llistat de gens que poden ser considerats com potencials indicadors, a l'espera de nous estudis que ho confirmin, de vies de relació entre l'entramat limfàtic i la regulació del metabolisme.

Limitacions dels estudis

Aquesta tesi no està mancada de certes limitacions que deriven de la mateixa temàtica abordada així com de la mateixa capacitat tècnica per desenvolupar un procediment d'avaluació directa estandarditzat. Un estudi hidrodinàmic es pot fer in vivo utilitzant procediments d'avaluació invasius (biomarcadors) o no invasius però, en tot cas, no estan definits sobre un protocol clínic estandaritzat. Donades les pròpies limitacions que deriven de la mateixa singularitat hidrodinàmica de cada individu, així com de la singularitat de cada òrgan dins de cada individu, aquests tipus de procediments requereixen arguments previs que ho justifiquin i avui per avui no considerem que hi siguin. La voluntat d'aquest estudi va ser, des de bon inici, el començar a definir possibles arguments.

La forma que hem considerat d'avaluar l'estructuració limfàtica mitjançant l'expressió de *prox1* i *pdpn* és indirecta, el que pot no reflectir la realitat de la situació en el teixit adipós. Tanmateix hem de tenir molt present que l'estructuració limfàtica precisa de l'expressió continua d'aquests gens per a mantenir el seu fenotip i per aquest motiu vam considerar que era una bona

forma d'avaluar si l'afectació de l'estructuració limfàtica podia identificar-se en certa mesura amb l'alteració metabòlica i més concretament amb l'obesitat.

Al ser un estudi transversal es fa evident que la connotació de casualitat és més que assumible i que difícilment podem entrar en una consideració de causalitat definida. Tanmateix cal destacar que podem valorar, d'acord amb el publicat a dia d'avui, que el patró causal potser no existeix de manera unívoca i precisa. M'explico, no té perquè ser necessàriament única i reconoscible una causa. El que vull dir és que la idea de què la causa i la conseqüència deriven de la mateixa circumstància pot donar peu a considerar que en realitat no és assumible una definició causal. El que implicaria que la dinamització de l'organisme seria la causa i conseqüència de tot el procés de desequilibri. Aquesta dinàmica podria ser generada i influenciada per factors externs el que indica que serien modificables o per factors interns menys susceptibles de ser modificats però tanmateix reconoscibles clínicament en l'actualitat que són els que acaben marcant el reconeixement de les malalties.

De manera específica podríem considerar que una limitació present en aquests estudis és la població estudiada. La quantitat de mostres estudiades en els *microarrays* és baix i això pot haver esbiaixat els resultats. El mateix és susceptible de ser valorat en els estudis amb RT-PCR. Cohorts amb més població segurament ens haguessin definit una inferència més sòlida vers un sentit o altre dels resultats.

L'altra limitació que es fa evident d'aquests estudis és que no han sigut confirmats amb l'expressió de proteïna. Aquest és un límit que s'assumeix i que respon en part a la gran quantitat d'expressions gèniques analitzades i a la limitació temporal de l'execució d'aquesta tesi. Certament, ulteriors estudis haurien d'anar encaminats a valorar de manera específica aquelles associacions més significatives quantificant l'expressió proteica.

Una altra limitació que es pot considerar de l'estudi és l'associada al propi anàlisi estadístic. Quan es fan tantes comparacions, la probabilitat de trobar associacions fortuïtes augmenta molt. Per contrarestar aquesta possibilitat s'hagués pogut baixar la significació, la p per sota de 0,05, o aplicar el Bonferroni en les comparacions. Tanmateix en els resultats podem valorar que hi ha un gran nombre de resultats que associen p per sota de 0,001.

Moltes precisions podrien fer-se a aquests estudis, tècniques, metodològiques, etc, però tanmateix les assumim en tant que estem confrontant un àmbit d'estudi poc comú i uns plantejaments d'estudi pioners, el que no està mancat de riscos ni de crítiques. Assumint aquests riscos no em puc estar de comentar que el coneixement només creix des de la crítica. Si aquesta és constructiva benvinguda sigui.

Reflexions finals i futures recerques

Aquest treball ha posat en evidència de manera indirecta la possibilitat que hi hagi una relació entre el teixit adipós i el nivell d'estructuració dels vasos limfàtics considerat pel nivell d'expressió de *prox1* i *pdpn*. Tanmateix aquest àmbit de relació no és homogeni entre el teixit adipós subcutani i el visceral. A més a més, cada situació metabòlica té un àmbit de relació particular amb la limfogènesi sent la condició d'obesitat amb la que hi ha clarament més relació. I és en aquesta condició on es constata que l'increment dels nivells de certs marcadors associats a l'alteració metabòlica es relaciona directament amb l'estructuració limfàtica de tal manera que a major alteració major afectació de l'estructuració limfàtica. Així doncs, l'alteració metabòlica tant en conjunt com de manera específica afecta l'expressió de *prox1* i *pdpn*. Una altra dada que destaca és que els gens que es relacionen amb l'àcid lisofosfatídic de manera directa o inversa estan associats amb la pròpia expressió de *prox1* i *pdpn* sent la relació amb l'expressió de *prox1* la que mostra més lligams. Nous gens relacionats amb el metabolisme s'han pogut associar a la mateixa estructuració limfàtica. Fet que obre un nou ventall de possibilitats d'estudi. El vincle entre l'alteració limfàtica i els estímuls de proliferació cel·lular i/o d'inhibició de l'apoptosi ha fet pensar en la possibilitat que sigui la mateixa alteració en l'estructuració limfàtica conseqüència de la seva pròpia alteració funcional causant al mateix temps una incorrecta senyalització proliferativa a nivell intersticial. L'alteració, des d'aquest punt de vista, no està en les conseqüències que es manifesten a nivell de l'interstici (acumulació hídrica, lipídica o fibròtica) o a nivell dels teixits del voltant mitjançant estímuls de proliferació o d'inhibició de l'apoptosi sinó en l'alteració del sistema a l'hora de definir quina és la realitat hidrodinàmica de l'interstici. Al llarg de la discussió s'ha considerat que aquesta realitat disfuncional podria estar associada a un error de senyalització induït per l'LPA en relació a la hidrodinàmica intersticial. La realitat és que malgrat els vincles notables que s'han descrit entre l'LPA i el càncer no n'hi ha cap estudi que vinculi els dos aspectes des del punt de vista hidrodinàmic i penso que s'hauria d'abordar des d'aquesta perspectiva. Tanmateix aquest plantejament no tindria per què ser propi i únic a l'LPA. De fet, si analitzem les diferències existents entre el contingut plasmàtic i el limfàtic per proteòmica (272) ja es mostra que la limfa es nodreix de proteïnes d'origen cel·lular més pròpies al parènquima que al plasma. Aquestes són proteïnes del nucli (histones), factors de tall i unió, factors de transcripció i de proteïnes involucrades en la mateixa síntesi de proteïnes així com proteïnes que deriven del citosol i d'òrgànuls. Totes aquestes molècules s'alliberen en el moment de la mort cel·lular, en condicions tant fisiològiques (apoptosi cel·lular) com patològiques (necrosi cel·lular). El que pot donar peu a considerar que la relació amb la mort cel·lular podria ser associada a qualsevol de les molècules vinculades a la mateixa cèl·lula.

També es podrien considerar els elements propis de la matriu extracel·lular. Hi ha també una major presència d'aquests elements en limfa en comparació amb el plasma (272). Això sí, amb un grau de variabilitat lligat a les pròpies circumstàncies funcionals de la matriu extracel·lular en termes de localització i d'activitat proteolítica que es relaciona amb el propi procés fisiològic com fisiopatològic en la que es pot trobar. Qualsevol element del proteoma, peptidoma o degradoma present a nivell limfàtic podria esdevenir potencialment un senyal funcional hidrodinàmic que en el cas de no correspondre's amb la realitat podria derivar en desajustaments irreversibles del sistema. Les proteïnes presents en la limfa canvien en funció del seu origen però també com a reflex d'una alteració sistèmica a la qual està sotmès l'organisme o com a reflex del procés adaptatiu al mateix. Moltes de les qüestions sorgides es podrien agrupar sota la noció de "tolerància funcional de sistema". Qualsevol sistema, tant des del punt de vista estructural com funcional, té uns límits de desajustament, uns límits que marquen un interval de tolerància al canvi. Ultrapassats aquests límits el sistema ha de compensar funcionalment el desajustament i/o reestructurar-se. En el supòsit que el sistema no ho pogués aconseguir la viabilitat del sistema com a tal es trobaria compromesa i s'exposaria a la seva destrucció. Aquesta idea de tolerància funcional de sistema podria ser associada en l'àmbit metabòlic al mateix concepte de "*metabolic set point*" (273) ja que concep la singularitat de la resposta metabòlica com característica a la mateixa variabilitat de l'alteració metabòlica. Aquest "*metabolic set point*", des del meu punt de vista, podria ser la hidrodinàmica global. Aquest reconeixement metabòlic es podria donar tant a nivell del sistema nerviós central, per la hidrodinàmica del líquid cefaloraquidi, com a nivell perifèric a través de la hidrodinàmica intersticial dels teixits perifèrics. Així, la hidrodinàmica del líquid cefaloraquidi, la de l'oïda interna, la dels músculs, la de qualsevol òrgan, esdevenen en sí mateixes referència de com està funcionant el sistema.

En els mamífers en general i en els humans en particular s'ha de tenir present que entre els factors determinants d'aquest equilibri hidrodinàmic hi ha, tal i com s'ha intentat transmetre al llarg de la tesi, la capacitat drenant de l'interstici per part dels vasos limfàtics. L'alteració d'aquesta capacitat drenant, per persistència d'un excés (inflamació crònica) (232) o d'un dèficit (dejuni prolongat) (274), esdevé a llarg termini causa i conseqüència de la mateixa alteració drenant. Fruit d'aquesta consideració apareix la hipòtesi que la disfunció limfàtica, estructural i/o funcional, esdevé en sí mateixa una raó fisiopatològica major de diferents malalties que a dia d'avui no s'associen a una causa única i que són comuns al propi procés d'envelliment. Es contempla la idea que l'alteració en la capacitat drenant intersticial limfàtica esdevé causa i efecte de diferents malalties: malalties neurodegeneratives, malaltia de Ménière, malalties inflamatòries cròniques, malalties metabòliques com la diabetis, malalties cardiovasculars com l'aterosclerosi, malalties oftalmològiques i càncer. Des d'aquest punt de

DISCUSSIÓ

vista hi ha la possibilitat de considerar que, en general, les malalties no responen únicament a disfuncions moleculars específiques sinó a l'alteració funcional de l'organisme en relació a la seva pròpia hidrodinàmica. Aquesta teoria, que he volgut anomenar "teoria hidrodinàmica global", planteja que el desordre inicial que es dona a nivell intersticial, respon a la pròpia hidrodinàmica de l'interstici. Aquest desordre intersticial seria induït des de la pròpia estructuració del interstici o per la deficient estructuració i/o funcionament de l'entramat capil·lar i/o limfàtic. Aquest desordre dinamitzaria el sistema vers una alteració funcional que provocaria la malaltia. La diferent hidrodinàmica intersticial entre individus, en el context d'un depassament del límit de tolerància, seria per se la responsable del desigual comportament que una mateixa malaltia pot generar en diferents individus tot i manifestar un patró disfuncional semblant. I és el considerar com necessari l'abordatge del drenatge intersticial limfàtic com a paràmetre clínic descriptiu propi del procés fisiopatològic d'aquestes malalties el canvi substancial que es vol estimular des d'aquest treball.

En la projecció de possibles recerques futures es valora la possibilitat de validar de manera directa les hipòtesis plantejades així com quines opcions terapèutiques es podrien desenvolupar atenint-nos a aquesta perspectiva. Qualsevol projecte encarat a validar la teoria plantejada hauria de considerar la mesura de la hidrodinàmica intersticial com una premissa necessària. Tot i la dificultat d'establir quin és el millor procediment d'estudi cal prendre consciència de la necessitat de desenvolupar-lo. Vàries opcions d'estudi apareixen (275, 276), sent l'escintil·lografia una de les tècniques més comunament emprades.

Pel que fa a les vies terapèutiques anirien encaminades a augmentar o disminuir la filtració, a augmentar o disminuir el flux intersticial i a augmentar o disminuir l'estructuració i funcionament dels vasos limfàtics. Des de la vessant abordada en aquesta tesi, l'estructuració i funcionament dels vasos limfàtics se sospesa, en el cas de l'estructuració, que la incidència hauria d'anar encaminada a l'estimulació o inhibició de VEGFC o del seu receptor VEGFR3. Pel que fa al funcionament dels vasos limfàtics penso en totes aquelles molècules que se sap que incideixen de manera directa o inversa en la contractilitat dels vasos limfàtics o en el mateix flux limfàtic (277). Aquestes podrien ser considerades terapèuticament en un sentit o altre en funció de la necessitat. Sense voler entrar en molt de detall en cada un dels factors considerats estimo interessant valorar l'efecte que es deriva del consum de lípids: si hi ha un consum baix de lípids hi ha un alentiment del flux limfàtic, si hi ha un consum alt s'augmenta.

L'aplicació d'aquestes possibles vies terapèutiques passaria per reconèixer quin seria el millor procediment a aplicar en cada circumstància, en quin dosatge, quan s'hauria d'aplicar, durant quant de temps i amb quina freqüència.

Des de la mateixa perspectiva valoro els efectes que es deriven del consum de certs aliments sobre la permeabilitat intestinal i l'efecte sistèmic que se'n

pot derivar en fer-ho (278-280). També valoro que l'efecte preventiu de les malalties cardiovasculars associat a la dieta mediterrània constatat amb l'estudi PREDIMED (281) es podria justificar des d'aquesta perspectiva hidrodinàmica. La idea seria que amb la dieta mediterrània hi hauria una millora en la hidrodinàmica intestinal, el que acabaria contrarestant els estímuls proinflamatoris que es poguessin desencadenar des de la ingesta. Una explicació plausible és que el consum d'oli d'oliva característic de la dieta mediterrània augmenta el drenatge per part dels vasos limfàtics (200) i l'altra explicació plausible és que el propi consum en lípids associat en aquest cas al consum de fruits secs, també característic de la dieta mediterrània, millorarien el flux limfàtic intersticial (282). Tot això aniria més enllà d'altres efectes, que jo no discuteixo ara que es puguin atribuir a aquest tipus de dieta, que certament anirien enfocats a disminuir la inflamació i que, segons el que s'ha exposat, podrien justificar una millor estructuració i funcionament dels vasos limfàtics i una millora qualitativa i funcional de l'interstici intestinal.

Una altra via terapèutica a estudiar és l'efecte de l'activitat física sobre la limfogènesi. Com s'ha descrit, els efectes de l'exercici en la limfogènesi en el teixit muscular esquelètic o cardíac van associats al tipus d'exercici i la durada (267, 268, 283). Cert és que moltes de les malalties considerades dins la teoria hidrodinàmica global disminueixen el grau d'evolució amb la introducció de l'exercici físic.

Els resultats de les observacions que aquesta tesi ha donat han volgut ser compresos i confrontats a la realitat del coneixement actual. I fruit d'aquesta confrontació han sorgit noves hipòtesis que donen peu a una possible millor explicació. Avui per avui no podem afirmar la veracitat d'aquestes noves hipòtesis però cert és també que la ciència només avança en la mesura que ens confrontem davant la possible falsedat dels nostres propis arguments i jo assumeixo el risc d'equivocar-me, en la mesura que no assumir aquest risc és no assumir l'obligació humana de créixer en el coneixement sigui des dels seus encerts com des dels seus errors.

DISCUSSIÓ

CONCLUSIONS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EVIDÈNCIES EN TEIXIT ADIPÓS D'ALTERACIONS GÈNIQUES DELS VASOS LIMFÀTICS EN L'OBESITAT

Alfons Horra Pueyo

- φ Es descriu un patró de gens diferencialment expressats relacionats amb la limfogènesi en condicions de disfunció metabòlica, especialment en el context de l'obesitat.
- φ L'expressió de *prox1* i *pdpn* varia en funció de la localització de teixit adipós sent més alta en teixit adipós visceral que subcutani.
- φ S'ha observat una disminució en l'expressió gènica de *prox1* i *pdpn* en presència d'alteració metabòlica, tant en teixit adipós subcutani com visceral.
- φ La variació de l'expressió de *prox1* i *pdpn* va associada a la variació d'una sèrie de variables de tipus antropomètriques, bioquímiques i gèniques en l'obesitat. El colesterol, la glucosa i els triglicèrids, no es vinculen amb l'expressió d'aquests gens però sí que ho fa el colesterol HDL.
- φ De les variables associades significativament amb *prox1* i *pdpn*, *atg7* justifica la variabilitat de l'expressió de *prox1* i *atg3* la de *pdpn*.
- φ L'expressió de *prox1* i *pdpn* disminueix a mesura que augmenta el grau d'obesitat i augmenten els marcadors propis de l'alteració metabòlica (adipositat, inflamació, alteració metabolisme de la glucosa, la pressió arterial)
- φ Gens vinculats a la síntesi i funció de l'LPA estan associats amb l'expressió de *prox1* i *pdpn*, majoritàriament amb l'expressió de *prox1*.
- φ Creiem que, malgrat que les evidències són indirectes, el teixit adipós en situacions d'obesitat manifesta la limfogènesi alterada. Sense poder precisar si aquesta alteració és cauaa o conseqüència, o ambdós fets alhora, de l'alteració metabòlica subjacent.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EVIDÈNCIES EN TEIXIT ADIPÓS D'ALTERACIONS GÈNIQUES DELS VASOS LIMFÀTICS EN L'OBESITAT

Alfons Horra Pueyo

BIBLIOGRAFIA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EVIDÈNCIES EN TEIXIT ADIPÓS D'ALTERACIONS GÈNIQUES DELS VASOS LIMFÀTICS EN L'OBESITAT

Alfons Horra Pueyo

1. Sadler TW. Langman Embriologia Medica: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
2. Sabin FR. The lymphatic system in human embryos, with a consideration of the morphology of the system as a whole. American Journal of Anatomy. 1909;IX(1):43-91.
3. Jaffredo T. [Venous origin of the lymphatic vasculature in mammals: Sabin's hypothesis verified]. Med Sci (Paris). 2008 Jun-Jul;24(6-7):567-9.
4. Srinivasan RS, Dillard ME, Lagutin OV, Lin FJ, Tsai S, Tsai MJ, et al. Lineage tracing demonstrates the venous origin of the mammalian lymphatic vasculature. Genes Dev. 2007 Oct 1;21(19):2422-32.
5. Yang Y, Garcia-Verdugo JM, Soriano-Navarro M, Srinivasan RS, Scallan JP, Singh MK, et al. Lymphatic endothelial progenitors bud from the cardinal vein and intersomitic vessels in mammalian embryos. Blood. 2012 Sep 13;120(11):2340-8.
6. Hagerling R, Pollmann C, Andreas M, Schmidt C, Nurmi H, Adams RH, et al. A novel multistep mechanism for initial lymphangiogenesis in mouse embryos based on ultramicroscopy. Embo J. 2013 Mar 6;32(5):629-44.
7. Zumsteg A, Christofori G. Myeloid cells and lymphangiogenesis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Jun;2(6):a006494.
8. Carramolino L, Fuentes J, Garcia-Andres C, Azcoitia V, Riethmacher D, Torres M. Platelets play an essential role in separating the blood and lymphatic vasculatures during embryonic angiogenesis. Circ Res. 2010 Apr 16;106(7):1197-201.
9. Martinez-Corral I, Ulvmar MH, Stanczuk L, Tatin F, Kizhatil K, John SW, et al. Nonvenous origin of dermal lymphatic vasculature. Circ Res. 2015 May 8;116(10):1649-54.
10. Klotz L, Norman S, Vieira JM, Masters M, Rohling M, Dube KN, et al. Cardiac lymphatics are heterogeneous in origin and respond to injury. Nature. 2015 Jun 4;522(7554):62-7.
11. Koltowska K, Betterman KL, Harvey NL, Hogan BM. Getting out and about: the emergence and morphogenesis of the vertebrate lymphatic vasculature. Development. 2013 May;140(9):1857-70.
12. Bescompte J, Luque B. Evolució i complexitat. Alzira: Publicacions Universtitat de Valencia - Edicions Bromera; 2011.
13. Oliver G, Srinivasan RS. Endothelial cell plasticity: how to become and remain a lymphatic endothelial cell. Development. 2010 Feb;137(3):363-72.
14. Schulte-Merker S, Sabine A, Petrova TV. Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. J Cell Biol. 2011 May 16;193(4):607-18.
15. Wigle JT, Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. Cell. 1999 Sep 17;98(6):769-78.
16. Johnson NC, Dillard ME, Baluk P, McDonald DM, Harvey NL, Frase SL, et al. Lymphatic endothelial cell identity is reversible and its maintenance requires Prox1 activity. Genes Dev. 2008 Dec 1;22(23):3282-91.

BIBLIOGRAFIA

17. Oliver G. Lymphatic vasculature development. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jan;4(1):35-45.
18. Francois M. [Sox18 orchestrates the commitment of the lymphatic vessels]. *Med Sci (Paris)*. 2009 Feb;25(2):127-9.
19. Deng Y, Atri D, Eichmann A, Simons M. Endothelial ERK signaling controls lymphatic fate specification. *J Clin Invest*. 2013 Feb 8.
20. Deng Y, Simons M. Lymphatic fate determination: playing RAF with ERK. *Cell Cycle*. 2013 Apr 15;12(8):1157-8.
21. Zhou F, Chang Z, Zhang L, Hong YK, Shen B, Wang B, et al. Akt/Protein kinase B is required for lymphatic network formation, remodeling, and valve development. *Am J Pathol*. 2010 Oct;177(4):2124-33.
22. Simons M, Eichmann A. Physiology. Lymphatics are in my veins. *Science*. 2013 Aug 9;341(6146):622-4.
23. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development*. 1996 Dec;122(12):3829-37.
24. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*. 2004 Jan;5(1):74-80.
25. Dixon JB. Lymphatic lipid transport: sewer or subway? *Trends Endocrinol Metab*. 2010 Aug;21(8):480-7.
26. Fu J, Gerhardt H, McDaniel JM, Xia B, Liu X, Ivanciu L, et al. Endothelial cell O-glycan deficiency causes blood/lymphatic misconnections and consequent fatty liver disease in mice. *J Clin Invest*. 2008 Nov;118(11):3725-37.
27. Cermenati S, Moleri S, Neyt C, Bresciani E, Carra S, Grassini DR, et al. Sox18 Genetically Interacts With VegfC to Regulate Lymphangiogenesis in Zebrafish. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2013 March 21, 2013.
28. You LR, Lin FJ, Lee CT, DeMayo FJ, Tsai MJ, Tsai SY. Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity. *Nature*. 2005 May 5;435(7038):98-104.
29. Yamazaki T, Yoshimatsu Y, Morishita Y, Miyazono K, Watabe T. COUP-TFII regulates the functions of Prox1 in lymphatic endothelial cells through direct interaction. *Genes Cells*. 2009 Mar;14(3):425-34.
30. Srinivasan RS, Geng X, Yang Y, Wang Y, Mukatira S, Studer M, et al. The nuclear hormone receptor Coup-TFII is required for the initiation and early maintenance of Prox1 expression in lymphatic endothelial cells. *Genes Dev*. 2010 Apr 1;24(7):696-707.
31. Lee S, Kang J, Yoo J, Ganesan SK, Cook SC, Aguilar B, et al. Prox1 physically and functionally interacts with COUP-TFII to specify lymphatic endothelial cell fate. *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1856-9.
32. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human

- pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Apr 30;192(2):553-60.
33. Zudaire E, Martinez A, Cuttitta F. Adrenomedullin and cancer. *Regul Pept.* 2003 Apr 15;112(1-3):175-83.
 34. Tsuruda T, Kato J, Hatakeyama K, Masuyama H, Cao YN, Imamura T, et al. Antifibrotic effect of adrenomedullin on coronary adventitia in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 2005 Mar 1;65(4):921-9.
 35. Ichikawa-Shindo Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Iinuma N, Yoshizawa T, et al. The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity. *J Clin Invest.* 2008 Jan;118(1):29-39.
 36. Koyama T, Ochoa-Callejero L, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Iinuma N, et al. Vascular endothelial adrenomedullin-RAMP2 system is essential for vascular integrity and organ homeostasis. *Circulation.* 2013 Feb 19;127(7):842-53.
 37. Fritz-Six KL, Dunworth WP, Li M, Caron KM. Adrenomedullin signaling is necessary for murine lymphatic vascular development. *J Clin Invest.* 2008 Jan;118(1):40-50.
 38. Kahn ML. Blood is thicker than lymph. *J Clin Invest.* 2008 Jan;118(1):23-6.
 39. Weijts BG, van Impel A, Schulte-Merker S, de Bruin A. Atypical E2fs Control Lymphangiogenesis through Transcriptional Regulation of Ccbe1 and Flt4. *PLoS One.* 2013;8(9):e73693.
 40. Planas-Paz L, Strilic B, Goedecke A, Breier G, Fassler R, Lammert E. Mechanoinduction of lymph vessel expansion. *Embo J.* 2012 Feb 15;31(4):788-804.
 41. Brendolan A, Caamano JH. Mesenchymal cell differentiation during lymph node organogenesis. *Front Immunol.* 2012 dec 3:381.
 42. Cha YR, Fujita M, Butler M, Isogai S, Kochhan E, Siekmann AF, et al. Chemokine signaling directs trunk lymphatic network formation along the preexisting blood vasculature. *Dev Cell.* 2012 Apr 17;22(4):824-36.
 43. Norrmén C, Ivanov KI, Cheng J, Zangger N, Delorenzi M, Jaquet M, et al. FOXC2 controls formation and maturation of lymphatic collecting vessels through cooperation with NFATc1. *J Cell Biol.* 2009 May 4;185(3):439-57.
 44. Norrmén C. Lymphatic vascular maturation: Roles of FOXC2, NFATc1 and Liprin β 1 [Helsinki University Biomedical Dissertations No. 123]. Helsinki: University of Helsinki; 2009.
 45. Bazigou E, Xie S, Chen C, Weston A, Miura N, Sorokin L, et al. Integrin- α 9 is required for fibronectin matrix assembly during lymphatic valve morphogenesis. *Dev Cell.* 2009 Aug;17(2):175-86.
 46. Sabine A, Agalarov Y, Maby-El Hajjami H, Jaquet M, Hagerling R, Pollmann C, et al. Mechanotransduction, PROX1, and FOXC2 cooperate to control connexin37 and calcineurin during lymphatic-valve formation. *Dev Cell.* 2012 Feb 14;22(2):430-45.
 47. Planas-Paz L, Lammert E. Mechanical forces in lymphatic vascular development and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2013 May 12.

BIBLIOGRAFIA

48. Vondenhoff MF, van de Pavert SA, Dillard ME, Greuter M, Goverse G, Oliver G, et al. Lymph sacs are not required for the initiation of lymph node formation. *Development*. 2009 Jan;136(1):29-34.
49. Cupedo T, Mebius RE. Cellular interactions in lymph node development. *J Immunol*. 2005 Jan 1;174(1):21-5.
50. Zinovieva RD, Duncan MK, Johnson TR, Torres R, Polymeropoulos MH, Tomarev SI. Structure and chromosomal localization of the human homeobox gene *Prox 1*. *Genomics*. 1996 Aug 1;35(3):517-22.
51. EMBL-EBI. EBI search: PROX1. The EMBL-European Bioinformatics Institute <http://www.ebi.ac.uk>; 2015
52. Genomicus v72.01 - PhyloView: PROX1. The EMBL-European Bioinformatics Institute 2015.
53. GTExConsortium. Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science*. 2015 May 8;348(6235):648-60.
54. GTExConsortium. GTExPortal: *Prox1*. <http://www.gtportal.org/home/gene/PDPN>; 2015.
55. Rodriguez-Niedenfuhr M, Papoutsi M, Christ B, Nicolaidis KH, von Kaisenberg CS, Tomarev SI, et al. *Prox1* is a marker of ectodermal placodes, endodermal compartments, lymphatic endothelium and lymphangioblasts. *Anat Embryol (Berl)*. 2001 Nov;204(5):399-406.
56. Bermingham-McDonogh O, Oesterle EC, Stone JS, Hume CR, Huynh HM, Hayashi T. Expression of *Prox1* during mouse cochlear development. *J Comp Neurol*. 2006 May 10;496(2):172-86.
57. Miyashita T, Burford JL, Hong YK, Gevorgyan H, Lam L, Hoshikawa H, et al. *Prox1* expression in the endolymphatic sac revealed by whole-mount fluorescent imaging of *Prox1*-GFP transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Jan 30;457(1):19-22.
58. Burke Z, Oliver G. *Prox1* is an early specific marker for the developing liver and pancreas in the mammalian foregut endoderm. *Mech Dev*. 2002 Oct;118(1-2):147-55.
59. Wang J, Kilic G, Aydin M, Burke Z, Oliver G, Sosa-Pineda B. *Prox1* activity controls pancreas morphogenesis and participates in the production of "secondary transition" pancreatic endocrine cells. *Dev Biol*. 2005 Oct 1;286(1):182-94.
60. Elsir T, Smits A, Lindstrom MS, Nister M. Transcription factor PROX1: its role in development and cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2012 Dec;31(3-4):793-805.
61. Elkouris M, Balaskas N, Poulou M, Politis PK, Panayiotou E, Malas S, et al. *Sox1* maintains the undifferentiated state of cortical neural progenitor cells via the suppression of *Prox1*-mediated cell cycle exit and neurogenesis. *Stem Cells*. 2011 Jan;29(1):89-98.
62. Kaltezioti V, Kouroupi G, Oikonomaki M, Mantouvalou E, Stergiopoulos A, Charonis A, et al. *Prox1* regulates the notch1-mediated inhibition of neurogenesis. *PLoS Biol*. 2010;8(12):e1000565.

63. Wigle JT, Chowdhury K, Gruss P, Oliver G. Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation. *Nat Genet.* 1999 Mar;21(3):318-22.
64. Sosa-Pineda B, Wigle JT, Oliver G. Hepatocyte migration during liver development requires Prox1. *Nat Genet.* 2000 Jul;25(3):254-5.
65. Stein S, Oosterveer MH, Matakci C, Xu P, Lemos V, Havinga R, et al. SUMOylation-dependent LRH-1/PROX1 interaction promotes atherosclerosis by decreasing hepatic reverse cholesterol transport. *Cell Metab.* 2014 Oct 7;20(4):603-13.
66. Risebro CA, Searles RG, Melville AA, Ehler E, Jina N, Shah S, et al. Prox1 maintains muscle structure and growth in the developing heart. *Development.* 2009 Feb;136(3):495-505.
67. Harvey NL, Srinivasan RS, Dillard ME, Johnson NC, Witte MH, Boyd K, et al. Lymphatic vascular defects promoted by Prox1 haploinsufficiency cause adult-onset obesity. *Nat Genet.* 2005 Oct;37(10):1072-81.
68. Mouta Carreira C, Nasser SM, di Tomaso E, Padera TP, Boucher Y, Tomarev SI, et al. LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res.* 2001 Nov 15;61(22):8079-84.
69. Dadras SS, North PE, Bertoncini J, Mihm MC, Detmar M. Infantile hemangiomas are arrested in an early developmental vascular differentiation state. *Mod Pathol.* 2004 Sep;17(9):1068-79.
70. Nagai H, Li Y, Hatano S, Toshihito O, Yuge M, Ito E, et al. Mutations and aberrant DNA methylation of the PROX1 gene in hematologic malignancies. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003 Sep;38(1):13-21.
71. Versmold B, Felsberg J, Mikeska T, Ehrentraut D, Kohler J, Hampl JA, et al. Epigenetic silencing of the candidate tumor suppressor gene PROX1 in sporadic breast cancer. *Int J Cancer.* 2007 Aug 1;121(3):547-54.
72. Benton MC, Johnstone A, Eccles D, Harmon B, Hayes MT, Lea RA, et al. An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss. *Genome Biol.* 2015;16:8.
73. Petrova TV, Nykanen A, Norrmen C, Ivanov KI, Andersson LC, Haglund C, et al. Transcription factor PROX1 induces colon cancer progression by promoting the transition from benign to highly dysplastic phenotype. *Cancer Cell.* 2008 May;13(5):407-19.
74. Hong YK, Foreman K, Shin JW, Hirakawa S, Curry CL, Sage DR, et al. Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Genet.* 2004 Jul;36(7):683-5.
75. Herbeck JT, Gottlieb GS, Winkler CA, Nelson GW, An P, Maust BS, et al. Multistage genomewide association study identifies a locus at 1q41 associated with rate of HIV-1 disease progression to clinical AIDS. *J Infect Dis.* 2010 Feb 15;201(4):618-26.
76. Shimoda M, Takahashi M, Yoshimoto T, Kono T, Ikai I, Kubo H. A homeobox protein, prox1, is involved in the differentiation, proliferation, and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006 Oct 15;12(20 Pt 1):6005-11.

BIBLIOGRAFIA

77. Laerm A, Helmbold P, Goldberg M, Dammann R, Holzhausen HJ, Ballhausen WG. Prospero-related homeobox 1 (PROX1) is frequently inactivated by genomic deletions and epigenetic silencing in carcinomas of the biliary system. *J Hepatol.* 2007 Jan;46(1):89-97.
78. Hu C, Zhang R, Wang C, Wang J, Ma X, Hou X, et al. Variants from GIPR, TCF7L2, DGKB, MADD, CRY2, GLIS3, PROX1, SLC30A8 and IGF1 are associated with glucose metabolism in the Chinese. *PLoS One.* 2010;5(11):e15542.
79. Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, Saxena R, Soranzo N, Jackson AU, et al. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat Genet.* 2010 Feb;42(2):105-16.
80. Ingelsson E, Langenberg C, Hivert MF, Prokopenko I, Lyssenko V, Dupuis J, et al. Detailed physiologic characterization reveals diverse mechanisms for novel genetic Loci regulating glucose and insulin metabolism in humans. *Diabetes.* 2010 May;59(5):1266-75.
81. Boesgaard TW, Grarup N, Jorgensen T, Borch-Johnsen K, Hansen T, Pedersen O. Variants at DGKB/TMEM195, ADRA2A, GLIS3 and C2CD4B loci are associated with reduced glucose-stimulated beta cell function in middle-aged Danish people. *Diabetologia.* 2010 Aug;53(8):1647-55.
82. Fontaine-Bisson B, Renstrom F, Rolandsson O, Payne F, Hallmans G, Barroso I, et al. Evaluating the discriminative power of multi-trait genetic risk scores for type 2 diabetes in a northern Swedish population. *Diabetologia.* 2010 Oct;53(10):2155-62.
83. Renstrom F, Shungin D, Johansson I, Florez JC, Hallmans G, Hu FB, et al. Genetic predisposition to long-term nondiabetic deteriorations in glucose homeostasis: Ten-year follow-up of the GLACIER study. *Diabetes.* 2011 Jan;60(1):345-54.
84. Liu C, Li H, Qi L, Loos RJ, Qi Q, Lu L, et al. Variants in GLIS3 and CRY2 are associated with type 2 diabetes and impaired fasting glucose in Chinese Hans. *PLoS One.* 2011;6(6):e21464.
85. Ohshige T, Iwata M, Omori S, Tanaka Y, Hirose H, Kaku K, et al. Association of new loci identified in European genome-wide association studies with susceptibility to type 2 diabetes in the Japanese. *PLoS One.* 2011;6(10):e26911.
86. Fujita H, Hara K, Shojima N, Horikoshi M, Iwata M, Hirota Y, et al. Variations with modest effects have an important role in the genetic background of type 2 diabetes and diabetes-related traits. *J Hum Genet.* 2012 Dec;57(12):776-9.
87. Jensen AC, Barker A, Kumari M, Brunner EJ, Kivimaki M, Hingorani AD, et al. Associations of common genetic variants with age-related changes in fasting and postload glucose: evidence from 18 years of follow-up of the Whitehall II cohort. *Diabetes.* 2011 May;60(5):1617-23.
88. Pierce BL, Austin MA, Ahsan H. Association study of type 2 diabetes genetic susceptibility variants and risk of pancreatic cancer: an analysis of PanScan-I data. *Cancer Causes Control.* 2011 Jun;22(6):877-83.

89. Florez JC, Jablonski KA, McAteer JB, Franks PW, Mason CC, Mather K, et al. Effects of genetic variants previously associated with fasting glucose and insulin in the Diabetes Prevention Program. *PLoS One*. 2012;7(9):e44424.
90. Lecompte S, Pasquetti G, Hermant X, Grenier-Boley B, Gonzalez-Gross M, De Henauw S, et al. Genetic and molecular insights into the role of PROX1 in glucose metabolism. *Diabetes*. 2013 May;62(5):1738-45.
91. Horra A, Salazar J, Ferre R, Vallve JC, Guardiola M, Rosales R, et al. Prox-1 and FOXC2 gene expression in adipose tissue: A potential contributory role of the lymphatic system to familial combined hyperlipidaemia. *Atherosclerosis*. 2009 Oct;206(2):343-5.
92. Stancakova A, Paananen J, Soininen P, Kangas AJ, Bonnycastle LL, Morken MA, et al. Effects of 34 risk loci for type 2 diabetes or hyperglycemia on lipoprotein subclasses and their composition in 6,580 nondiabetic Finnish men. *Diabetes*. 2011 May;60(5):1608-16.
93. Kim HJ, Yoo YJ, Ju YS, Lee S, Cho SI, Sung J, et al. Combined linkage and association analyses identify a novel locus for obesity near PROX1 in Asians. *Obesity (Silver Spring)*. 2013 Nov;21(11):2405-12.
94. Dufour CR, Levasseur MP, Pham NH, Eichner LJ, Wilson BJ, Charest-Marcotte A, et al. Genomic convergence among ERRalpha, PROX1, and BMAL1 in the control of metabolic clock outputs. *PLoS Genet*. 2011 Jun;7(6):e1002143.
95. EMBL-EBI. EBI search: PDPN. The EMBL-European Bioinformatics Institute www.ebi.ac.uk; 2015.
96. Genomicus v72.01 - PhyloView: PDPN. <http://www.genomicus.biologie.ens.fr>; 2015.
97. GTExConsortium. GTExPortal: *Pdpn*. <http://www.gtexportal.org/home/gene/PDPN>; 2015.
98. Pan Y, Xia L. Emerging roles of podoplanin in vascular development and homeostasis. *Front Med*. 2015 Oct 23.
99. EMBL-EBI. Expression atlas: *pdpn*. The EMBL-European Bioinformatics Institute <http://www.ebi.ac.uk/gxa>; 2015.
100. Dang Q, Liu J, Li J, Sun Y. Podoplanin: a novel regulator of tumor invasion and metastasis. *Med Oncol*. 2014 Sep;31(9):24.
101. Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, et al. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *Embo J*. 2003 Jul 15;22(14):3546-56.
102. Pan Y, Wang WD, Yago T. Transcriptional regulation of podoplanin expression by Prox1 in lymphatic endothelial cells. *Microvasc Res*. 2014 Jul;94:96-102.
103. Srinivasan RS, Escobedo N, Yang Y, Interiano A, Dillard ME, Finkelstein D, et al. The Prox1-Vegfr3 feedback loop maintains the identity and the number of lymphatic endothelial cell progenitors. *Genes Dev*. 2014 Oct 1;28(19):2175-87.

BIBLIOGRAFIA

104. Lin CI, Chen CN, Huang MT, Lee SJ, Lin CH, Chang CC, et al. Lysophosphatidic acid upregulates vascular endothelial growth factor-C and tube formation in human endothelial cells through LPA(1/3), COX-2, and NF-kappaB activation- and EGFR transactivation-dependent mechanisms. *Cell Signal*. 2008 Oct;20(10):1804-14.
105. Gustin C, Van Steenbrugge M, Raes M. LPA modulates monocyte migration directly and via LPA-stimulated endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Oct;295(4):C905-14.
106. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):868-74.
107. D'Aquilio F. Activatory properties of LPA on human THP-1 monocytes. Roma: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"; 2007.
108. Moolenaar WH, van Meeteren LA, Giepmans BN. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays*. 2004 Aug;26(8):870-81.
109. Aoki J, Taira A, Takanezawa Y, Kishi Y, Hama K, Kishimoto T, et al. Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem*. 2002 Dec 13;277(50):48737-44.
110. Pages C, Simon MF, Valet P, Saulnier-Blache JS. Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2001 Apr;64(1-4):1-10.
111. Valet P, Pages C, Jeanneton O, Daviaud D, Barbe P, Record M, et al. Alpha2-adrenergic receptor-mediated release of lysophosphatidic acid by adipocytes. A paracrine signal for preadipocyte growth. *J Clin Invest*. 1998 Apr 1;101(7):1431-8.
112. Pages G, Girard A, Jeanneton O, Barbe P, Wolf C, Lafontan M, et al. LPA as a paracrine mediator of adipocyte growth and function. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 Apr;905:159-64.
113. Siess W, Zangl KJ, Essler M, Bauer M, Brandl R, Corrinth C, et al. Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 8;96(12):6931-6.
114. Goetzl EJ, Wang W, McGiffert C, Huang MC, Graler MH. Sphingosine 1-phosphate and its G protein-coupled receptors constitute a multifunctional immunoregulatory system. *J Cell Biochem*. 2004 Aug 15;92(6):1104-14.
115. Sengupta S, Wang Z, Tipps R, Xu Y. Biology of LPA in health and disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2004 Oct;15(5):503-12.
116. Saulnier-Blache JS. [Lysophosphatidic acid: a "bioactive" phospholipid]. *Med Sci (Paris)*. 2004 Aug-Sep;20(8-9):799-803.
117. Ferry G, Tellier E, Try A, Gres S, Naime I, Simon MF, et al. Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem*. 2003 May 16;278(20):18162-9.

118. Simon MF, Daviaud D, Pradere JP, Gres S, Guigne C, Wabitsch M, et al. Lysophosphatidic acid inhibits adipocyte differentiation via lysophosphatidic acid 1 receptor-dependent down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *J Biol Chem.* 2005 Apr 15;280(15):14656-62.
119. Tigyi G, Parrill AL. Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action. *Prog Lipid Res.* 2003 Nov;42(6):498-526.
120. McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, et al. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan 7;100(1):131-6.
121. Chang CL, Hsu HY, Lin HY, Chiang W, Lee H. Lysophosphatidic acid-induced oxidized low-density lipoprotein uptake is class A scavenger receptor-dependent in macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2008 Dec;87(1-4):20-5.
122. Boord JB, Fazio S, Linton MF. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2002 Apr;13(2):141-7.
123. Bot M, Bot I, Lopez-Vales R, van de Lest CH, Saulnier-Blache JS, Helms JB, et al. Atherosclerotic lesion progression changes lysophosphatidic acid homeostasis to favor its accumulation. *Am J Pathol.* 2010 Jun;176(6):3073-84.
124. Xu A, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem.* 2006 Mar;52(3):405-13.
125. Ferrell RE, Kimak MA, Lawrence EC, Finegold DN. Candidate gene analysis in primary lymphedema. *Lymphat Res Biol.* 2008;6(2):69-76.
126. Yea K, Kim J, Lim S, Park HS, Park KS, Suh PG, et al. Lysophosphatidic acid regulates blood glucose by stimulating myotube and adipocyte glucose uptake. *J Mol Med.* 2008 Feb;86(2):211-20.
127. Yea K, Kim J, Lim S, Kwon T, Park HS, Park KS, et al. Lysophosphatidylserine regulates blood glucose by enhancing glucose transport in myotubes and adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jan 23;378(4):783-8.
128. Machnik A, Neuhofer W, Jantsch J, Dahlmann A, Tammela T, Machura K, et al. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat Med.* 2009 May;15(5):545-52.
129. Aukland K, Reed RK. Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. *Physiol Rev.* 1993 Jan;73(1):1-78.
130. Maruyama K, Ii M, Cursiefen C, Jackson DG, Keino H, Tomita M, et al. Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. *J Clin Invest.* 2005 Sep;115(9):2363-72.
131. Kerjaschki D. The crucial role of macrophages in lymphangiogenesis. *J Clin Invest.* 2005 Sep;115(9):2316-9.
132. Angeli V, Randolph GJ. Inflammation, lymphatic function, and dendritic cell migration. *Lymphat Res Biol.* 2006;4(4):217-28.

BIBLIOGRAFIA

133. Angeli V, Llodra J, Rong JX, Satoh K, Ishii S, Shimizu T, et al. Dyslipidemia associated with atherosclerotic disease systemically alters dendritic cell mobilization. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):561-74.
134. Lim HY, Rutkowski JM, Helft J, Reddy ST, Swartz MA, Randolph GJ, et al. Hypercholesterolemic mice exhibit lymphatic vessel dysfunction and degeneration. *Am J Pathol*. 2009 Sep;175(3):1328-37.
135. Cederberg A, Gronning LM, Ahren B, Tasken K, Carlsson P, Enerback S. FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell*. 2001 Sep 7;106(5):563-73.
136. Pajukanta P, Allayee H, Krass KL, Kuraishy A, Soro A, Lilja HE, et al. Combined analysis of genome scans of dutch and finnish families reveals a susceptibility locus for high-density lipoprotein cholesterol on chromosome 16q. *Am J Hum Genet*. 2003 Apr;72(4):903-17.
137. Fang J, Dagenais SL, Erickson RP, Arlt MF, Glynn MW, Gorski JL, et al. Mutations in FOXC2 (MFH-1), a forkhead family transcription factor, are responsible for the hereditary lymphedema-distichiasis syndrome. *Am J Hum Genet*. 2000 Dec;67(6):1382-8.
138. Xue Y, Cao R, Nilsson D, Chen S, Westergren R, Hedlund EM, et al. FOXC2 controls Ang-2 expression and modulates angiogenesis, vascular patterning, remodeling, and functions in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 22;105(29):10167-72.
139. Boardman KC, Swartz MA. Interstitial flow as a guide for lymphangiogenesis. *Circ Res*. 2003 Apr 18;92(7):801-8.
140. Swartz MA, Fleury ME. Interstitial flow and its effects in soft tissues. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007;9:229-56.
141. Leak LV. Studies on the permeability of lymphatic capillaries. *J Cell Biol*. 1971 Aug;50(2):300-23.
142. Leak LV. The structure of lymphatic capillaries in lymph formation. *Fed Proc*. 1976 Jun;35(8):1863-71.
143. Cooke CJ, Nanjee MN, Stepanova IP, Olszewski WL, Miller NE. Variations in lipid and apolipoprotein concentrations in human leg lymph: effects of posture and physical exercise. *Atherosclerosis*. 2004 Mar;173(1):39-45.
144. Lane K, Worsley D, McKenzie D. Exercise and the lymphatic system: implications for breast-cancer survivors. *Sports Med*. 2005;35(6):461-71.
145. Xiao C, Hsieh J, Adeli K, Lewis GF. Gut-liver interaction in triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011 Sep;301(3):E429-46.
146. D'Alessio D, Lu W, Sun W, Zheng S, Yang Q, Seeley R, et al. Fasting and postprandial concentrations of GLP-1 in intestinal lymph and portal plasma: evidence for selective release of GLP-1 in the lymph system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Dec;293(6):R2163-9.
147. Lu WJ, Yang Q, Sun W, Woods SC, D'Alessio D, Tso P. The regulation of the lymphatic secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) by intestinal absorption of fat and carbohydrate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Nov;293(5):G963-71.

148. Qin X, Shen H, Liu M, Yang Q, Zheng S, Sabo M, et al. GLP-1 reduces intestinal lymph flow, triglyceride absorption, and apolipoprotein production in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005 May;288(5):G943-9.
149. Ruttimann EB, Arnold M, Hillebrand JJ, Geary N, Langhans W. Intrameal hepatic portal and intraperitoneal infusions of glucagon-like peptide-1 reduce spontaneous meal size in the rat via different mechanisms. *Endocrinology*. 2009 Mar;150(3):1174-81.
150. Wang PY, Caspi L, Lam CK, Chari M, Li X, Light PE, et al. Upper intestinal lipids trigger a gut-brain-liver axis to regulate glucose production. *Nature*. 2008 Apr 24;452(7190):1012-6.
151. Moriguchi P, Sannomiya P, Lara PF, Oliveira-Filho RM, Greco KV, Sudo-Hayashi LS. Lymphatic system changes in diabetes mellitus: role of insulin and hyperglycemia. *Diabetes Metab Res Rev*. 2005 Mar-Apr;21(2):150-7.
152. Scallan JP, Hill MA, Davis MJ. Lymphatic vascular integrity is disrupted in type 2 diabetes due to impaired nitric oxide signalling. *Cardiovasc Res*. 2015 Jul 1;107(1):89-97.
153. Manning RD, Jr. Chronic lymph flow responses to hyperproteinemia. *Am J Physiol*. 1998 Jul;275(1 Pt 2):R135-40.
154. Manning RD, Jr. Dynamics of extracellular fluid volume changes during hyperproteinemia. *Am J Physiol*. 1998 Dec;275(6 Pt 2):R1878-84.
155. Reed RK, Rubin K. Transcapillary exchange: role and importance of the interstitial fluid pressure and the extracellular matrix. *Cardiovasc Res*. 2010 Jul 15;87(2):211-7.
156. Heer M, Baisch F, Kropp J, Gerzer R, Drummer C. High dietary sodium chloride consumption may not induce body fluid retention in humans. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000 Apr;278(4):F585-95.
157. Titze J, Maillet A, Lang R, Gunga HC, Johannes B, Gauquelin-Koch G, et al. Long-term sodium balance in humans in a terrestrial space station simulation study. *Am J Kidney Dis*. 2002 Sep;40(3):508-16.
158. Titze J, Lang R, Ilies C, Schwind KH, Kirsch KA, Dietsch P, et al. Osmotically inactive skin Na⁺ storage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Dec;285(6):F1108-17.
159. Titze J, Shakibaei M, Schafflhuber M, Schulze-Tanzil G, Porst M, Schwind KH, et al. Glycosaminoglycan polymerization may enable osmotically inactive Na⁺ storage in the skin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Jul;287(1):H203-8.
160. Schafflhuber M, Volpi N, Dahlmann A, Hilgers KF, Maccari F, Dietsch P, et al. Mobilization of osmotically inactive Na⁺ by growth and by dietary salt restriction in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 May;292(5):F1490-500.
161. Machnik A, Dahlmann A, Kopp C, Goss J, Wagner H, van Rooijen N, et al. Mononuclear phagocyte system depletion blocks interstitial tonicity-responsive enhancer binding protein/vascular endothelial growth factor C expression and induces salt-sensitive hypertension in rats. *Hypertension*. 2010 Mar;55(3):755-61.

BIBLIOGRAFIA

162. Wiig H, Schroder A, Neuhofer W, Jantsch J, Kopp C, Karlsen TV, et al. Immune cells control skin lymphatic electrolyte homeostasis and blood pressure. *J Clin Invest*. 2013 Jul 1;123(7):2803-15.
163. Swell L, Trout EC, Jr., Field H, Jr., Treadwell CR. The role of lymph cholesterol in the regulation of endogenous cholesterol and cholesterol ester synthesis. *J Biol Chem*. 1958 Feb;230(2):631-41.
164. Kellner A. The lipid and protein content of tissue fluid in normal and hyperlipemic rabbits. Symposium on atherosclerosis; 1955; Washington, DC: National Academy of Science -National Research Council; 1955. p. 42-9.
165. Sloop CH, Dory L, Roheim PS. Interstitial fluid lipoproteins. *J Lipid Res*. 1987 Mar;28(3):225-37.
166. Lim HY, Thiam CH, Yeo KP, Bissoendial R, Hii CS, McGrath KC, et al. Lymphatic vessels are essential for the removal of cholesterol from peripheral tissues by SR-BI-mediated transport of HDL. *Cell Metab*. 2013 May 7;17(5):671-84.
167. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Dec 1;54(23):2129-38.
168. Kaji H. High-density lipoproteins and the immune system. *J Lipids*. 2013;2013:684903.
169. Tall AR. CETP inhibitors to increase HDL cholesterol levels. *N Engl J Med*. 2007 Mar 29;356(13):1364-6.
170. Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, Chaitman BR, Desvignes-Nickens P, Koprowicz K, et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med*. 2011 Dec 15;365(24):2255-67.
171. HPS2-THRIVE randomized placebo-controlled trial in 25 673 high-risk patients of ER niacin/laropiprant: trial design, pre-specified muscle and liver outcomes, and reasons for stopping study treatment. *Eur Heart J*. 2013 May;34(17):1279-91.
172. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, Jensen MK, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet*. 2012 Aug 11;380(9841):572-80.
173. Martel C, Randolph GJ. Atherosclerosis and transit of HDL through the lymphatic vasculature. *Curr Atheroscler Rep*. 2013 Sep;15(9):354.
174. Martel C, Li W, Fulp B, Platt AM, Gautier EL, Westerterp M, et al. Lymphatic vasculature mediates macrophage reverse cholesterol transport in mice. *J Clin Invest*. 2013 Apr 1;123(4):1571-9.
175. Fernandez-Hernando C. Lymphatic vessels clean up your arteries. *J Clin Invest*. 2013 Apr 1;123(4):1417-9.
176. Kholova I, Dragneva G, Cermakova P, Laidinen S, Kaskenpaa N, Hazes T, et al. Lymphatic vasculature is increased in heart valves, ischaemic and inflamed hearts and in cholesterol-rich and calcified atherosclerotic lesions. *Eur J Clin Invest*. 2011 May;41(5):487-97.

177. Syvaranta S, Helske S, Lappalainen J, Kupari M, Kovanen PT. Lymphangiogenesis in aortic valve stenosis--novel regulatory roles for valvular myofibroblasts and mast cells. *Atherosclerosis*. 2012 Apr;221(2):366-74.
178. Dieterich LC, Seidel CD, Detmar M. Lymphatic vessels: new targets for the treatment of inflammatory diseases. *Angiogenesis*. 2013 Nov 9.
179. Huggenberger R, Siddiqui SS, Brander D, Ullmann S, Zimmermann K, Antsiferova M, et al. An important role of lymphatic vessel activation in limiting acute inflammation. *Blood*. 2011 Apr 28;117(17):4667-78.
180. Olszewski WL. Contractility patterns of human leg lymphatics in various stages of obstructive lymphedema. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1131:110-8.
181. Jang JY, Koh YJ, Lee SH, Lee J, Kim KH, Kim D, et al. Conditional ablation of LYVE-1+ cells unveils defensive roles of lymphatic vessels in intestine and lymph nodes. *Blood*. 2013 Sep 26;122(13):2151-61.
182. Hong YK. Protective role of the lymphatics from sepsis. *Blood*. 2013 Sep 26;122(13):2143-4.
183. Lau DC, Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 May;288(5):H2031-41.
184. Nordskog BK, Phan CT, Nutting DF, Tso P. An examination of the factors affecting intestinal lymphatic transport of dietary lipids. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Aug 23;50(1-2):21-44.
185. Matsuzaki T, Tajika Y, Ablimit A, Aoki T, Hagiwara H, Takata K. Aquaporins in the digestive system. *Med Electron Microsc*. 2004 Jun;37(2):71-80.
186. Tso P, Balint JA. Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics. *Am J Physiol*. 1986 Jun;250(6 Pt 1):G715-26.
187. Levy E, Menard D. Developmental aspects of lipid and lipoprotein synthesis and secretion in human gut. *Microsc Res Tech*. 2000 May 15;49(4):363-73.
188. Porter CJ, Charman WN. Intestinal lymphatic drug transport: an update. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Aug 23;50(1-2):61-80.
189. Ockner RK, Hughes FB, Isselbacher KJ. Very low density lipoproteins in intestinal lymph: origin, composition, and role in lipid transport in the fasting state. *J Clin Invest*. 1969 Nov;48(11):2079-88.
190. Phan CT, Tso P. Intestinal lipid absorption and transport. *Front Biosci*. 2001 Mar 1;6:D299-319.
191. Hussain MM. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis*. 2000 Jan;148(1):1-15.
192. Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Jun;296(6):E1183-94.
193. Ockner RK, Hughes FB, Isselbacher KJ. Very low density lipoproteins in intestinal lymph: role in triglyceride and cholesterol transport during fat absorption. *J Clin Invest*. 1969 Dec;48(12):2367-73.

BIBLIOGRAFIA

194. Black DD. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. I. Development of intestinal lipid absorption: cellular events in chylomicron assembly and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Sep;293(3):G519-24.
195. Azzali G. Transendothelial transport and migration in vessels of the apparatus lymphaticus periphericus absorbens (ALPA). *Int Rev Cytol.* 2003;230:41-87.
196. Gallagher H, Garewal D, Drake RE, JC G. « Estimation of lymph flow by relating lymphatic pump function to passive flow curves. ». *Lymphologie* 1993;26:56-60.
197. Azzali G. The ultrastructural basis of lipid transport in the absorbing lymphatic vessel. *J Submicrosc Cytol.* 1982 Jan;14(1):45-54.
198. Dixon JB. Mechanisms of chylomicron uptake into lacteals. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Oct;1207 Suppl 1:E52-7.
199. Choe K, Jang JY, Park I, Kim Y, Ahn S, Park DY, et al. Intravital imaging of intestinal lacteals unveils lipid drainage through contractility. *J Clin Invest.* 2015 Oct 5.
200. Miura S, Sekizuka E, Nagata H, Oshio C, Minamitani H, Suematsu M, et al. Increased lymphocyte transport by lipid absorption in rat mesenteric lymphatics. *Am J Physiol.* 1987 Nov;253(5 Pt 1):G596-600.
201. Arngrim N, Simonsen L, Holst JJ, Bulow J. Reduced adipose tissue lymphatic drainage of macromolecules in obese subjects: a possible link between obesity and local tissue inflammation? *Int J Obes (Lond).* 2013 May;37(5):748-50.
202. Ceperuelo-Mallafre V, Miranda M, Chacon MR, Vilarrasa N, Megia A, Gutierrez C, et al. Adipose tissue expression of the glycerol channel aquaporin-7 gene is altered in severe obesity but not in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Sep;92(9):3640-5.
203. Miranda M, Escote X, Ceperuelo-Mallafre V, Alcaide MJ, Simon I, Vilarrasa N, et al. Paired subcutaneous and visceral adipose tissue aquaporin-7 expression in human obesity and type 2 diabetes: differences and similarities between depots. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Jul;95(7):3470-9.
204. Maeda N, Funahashi T, Shimomura I. Metabolic impact of adipose and hepatic glycerol channels aquaporin 7 and aquaporin 9. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008 Nov;4(11):627-34.
205. Lewis GD, Farrell L, Wood MJ, Martinovic M, Arany Z, Rowe GC, et al. Metabolic signatures of exercise in human plasma. *Sci Transl Med.* 2010 May 26;2(33):33ra7.
206. Lebeck J, Ostergard T, Rojek A, Fuchtbauer EM, Lund S, Nielsen S, et al. Gender-specific effect of physical training on AQP7 protein expression in human adipose tissue. *Acta Diabetol.* 2012 Dec;49 Suppl 1:S215-26.
207. Pond CM. The Evolution of Mammalian Adipose Tissue. In: Symonds ME, editor. *Adipose Tissue Biology.* New York: Springer-Verlag New York; 2012. p. VI, 414.

208. Ryan TJ. Lymphatics and adipose tissue. *Clin Dermatol.* 1995 Sep-Oct;13(5):493-8.
209. Friedrichs N, Hahne JC, Pepper MS, Rommerscheidt-Fuss U, Stelzner F, Buettner R, et al. Immunohistochemical quantification of lymph vessels, VEGF-C and VEGF receptor 3 in human sarcomas. *Histopathology.* 2006 Jul;49(1):87-8.
210. Zampell JC, Aschen S, Weitman ES, Yan A, Elhadad S, De Brot M, et al. Regulation of adipogenesis by lymphatic fluid stasis: part I. Adipogenesis, fibrosis, and inflammation. *Plast Reconstr Surg.* 2012 Apr;129(4):825-34.
211. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008 Jan;214(2):199-210.
212. Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis--A Common Pathway to Organ Injury and Failure. *N Engl J Med.* 2015 Jul 2;373(1):96.
213. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol.* 2004 Aug;4(8):583-94.
214. Markhus CE, Karlsen TV, Wagner M, Svendsen OS, Tenstad O, Alitalo K, et al. Increased interstitial protein because of impaired lymph drainage does not induce fibrosis and inflammation in lymphedema. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Feb;33(2):266-74.
215. Brorson H. lecture:Liposuction in lymphedema treatment: what is removed? XXXth Scientific Meeting of the European Lymphology Group Brussels October 16-17th 2004; October 16-17th 2004.
216. Fumière E, Leduc O, Montenet J, R. D. lecture: Usefulness of proton MR spectroscopy in lymphedema. XXXth Scientific Meeting of the European Lymphology Group Brussels October 16-17th ,2004; October 16-17th ,2004.
217. Brorson H, Svensson H. Complete reduction of lymphoedema of the arm by liposuction after breast cancer. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1997 Jun;31(2):137-43.
218. Brorson H, Svensson H. Liposuction combined with controlled compression therapy reduces arm lymphedema more effectively than controlled compression therapy alone. *Plast Reconstr Surg.* 1998 Sep;102(4):1058-67; discussion 68.
219. Fourcade S. Etude par échographie, imagerie par résonance magnétique, spectroscopie et histologie de biopsies cutanéograsseuses chez des patients lymphoedémateux chroniques. [Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de Licenciée en Kinésithérapie]. Bruxelles: Haute Ecole Paul-Henri Spaak I.S.E.K. Section kinésithérapie; 2007.
220. Joe AW, Yi L, Even Y, Vogl AW, Rossi FM. Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. *Stem Cells.* 2009 Oct;27(10):2563-70.
221. Nougues J, Reyne Y, Dulor JP. Differentiation of rabbit adipocyte precursors in primary culture. *Int J Obes.* 1988;12(4):321-33.
222. Rosen ED. The molecular control of adipogenesis, with special reference to lymphatic pathology. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Dec;979:143-58; discussion 88-96.

BIBLIOGRAFIA

223. Konrad D, Wueest S. The gut-adipose-liver axis in the metabolic syndrome. *Physiology (Bethesda)*. 2014 Sep;29(5):304-13.
224. Aschen S, Zampell JC, Elhadad S, Weitman E, De Brot M, Mehrara BJ. Regulation of adipogenesis by lymphatic fluid stasis: part II. Expression of adipose differentiation genes. *Plast Reconstr Surg*. 2012 Apr;129(4):838-47.
225. Schmid-Schonbein GW. Analysis of inflammation. *Annu Rev Biomed Eng*. 2006;8:93-131.
226. da Silva EZ, Jamur MC, Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem*. 2014 Oct;62(10):698-738.
227. Gashev AA, Chatterjee V. Aged lymphatic contractility: recent answers and new questions. *Lymphat Res Biol*. 2013 Mar;11(1):2-13.
228. Unger RH. Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med*. 2002;53:319-36.
229. Ding S, Chi MM, Scull BP, Rigby R, Schwerbrock NM, Magness S, et al. High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PLoS One*. 2010;5(8):e12191.
230. Kuan EL, Ivanov S, Bridenbaugh EA, Victora G, Wang W, Childs EW, et al. Collecting lymphatic vessel permeability facilitates adipose tissue inflammation and distribution of antigen to lymph node-homing adipose tissue dendritic cells. *J Immunol*. 2015 Jun 1;194(11):5200-10.
231. Aebischer D, Iolyeva M, Halin C. The inflammatory response of lymphatic endothelium. *Angiogenesis*. 2014 Apr;17(2):383-93.
232. Liao S, von der Weid PY. Inflammation-induced lymphangiogenesis and lymphatic dysfunction. *Angiogenesis*. 2014 Apr;17(2):325-34.
233. Card CM, Yu SS, Swartz MA. Emerging roles of lymphatic endothelium in regulating adaptive immunity. *J Clin Invest*. 2014 Mar;124(3):943-52.
234. Johnson LA, Jackson DG. Control of dendritic cell trafficking in lymphatics by chemokines. *Angiogenesis*. 2014 Apr;17(2):335-45.
235. Scallan JP, Davis MJ, Huxley VH. Permeability and contractile responses of collecting lymphatic vessels elicited by atrial and brain natriuretic peptides. *J Physiol*. 2013 Oct 15;591(Pt 20):5071-81.
236. Lee WL, Slutsky AS. Sepsis and endothelial permeability. *N Engl J Med*. 2010 Aug 12;363(7):689-91.
237. Chelazzi C, Villa G, Mancinelli P, De Gaudio AR, Adembri C. Glycocalyx and sepsis-induced alterations in vascular permeability. *Crit Care*. 2015;19:26.
238. Hutchins NA, Unsinger J, Hotchkiss RS, Ayala A. The new normal: immunomodulatory agents against sepsis immune suppression. *Trends Mol Med*. 2014 Apr;20(4):224-33.
239. Kilarski WW, Muchowicz A, Wachowska M, Mezyk-Kopec R, Golab J, Swartz MA, et al. Optimization and regeneration kinetics of lymphatic-specific photodynamic therapy in the mouse dermis. *Angiogenesis*. 2013 Apr;17(2):347-57.

240. Kilarski WW, Samolov B, Petersson L, Kvanta A, Gerwins P. Biomechanical regulation of blood vessel growth during tissue vascularization. *Nat Med.* 2009 Jun;15(6):657-64.
241. Peters AL, Schriger DL. The new diagnostic criteria for diabetes: the impact on management of diabetes and macrovascular risk factors. *Am J Med.* 1998 Jul 6;105(1A):15S-9S.
242. Esteghamati A, Ashraf H, Esteghamati AR, Meysamie A, Khalilzadeh O, Nakhjavani M, et al. Optimal threshold of homeostasis model assessment for insulin resistance in an Iranian population: the implication of metabolic syndrome to detect insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract.* 2009 Jun;84(3):279-87.
243. Bonora E, Kiechl S, Willeit J, Oberhollenzer F, Egger G, Targher G, et al. Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders: the Bruneck Study. *Diabetes.* 1998 Oct;47(10):1643-9.
244. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985 Jul;28(7):412-9.
245. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care.* 2004 Jun;27(6):1487-95.
246. Tinahones FJ, Garrido-Sanchez L, Miranda M, Garcia-Almeida JM, Macias-Gonzalez M, Ceperuelo V, et al. Obesity and insulin resistance-related changes in the expression of lipogenic and lipolytic genes in morbidly obese subjects. *Obes Surg.* 2010 Nov;20(11):1559-67.
247. Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat Protoc.* 2013 Aug;8(8):1551-66.
248. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2000;894:i-xii, 1-253.
249. Alitalo K. The lymphatic vasculature in disease. *Nat Med.* 2011;17(11):1371-80.
250. A Gene Network for Navigating the Literature. Hoffmann, R., Valencia, A. *Nature Genetics* 36, 664 (2004)- iHOP - <http://www.ihop-net.org/> -.
251. GeneCards® Human genes database. Weizmann Institute of Science 2015.
252. EMBL-EBI. EBI search. The EMBL-European Bioinformatics Institute; 2015.
253. Barbayianni E, Kaffe E, Aidinis V, Kokotos G. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, as a promising therapeutic target in chronic inflammation and cancer. *Prog Lipid Res.* 2015 Apr;58:76-96.
254. Logan M, Pagan-Westphal SM, Smith DM, Paganessi L, Tabin CJ. The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell.* 1998 Aug 7;94(3):307-17.
255. Kioussi C, Briata P, Baek SH, Rose DW, Hamblet NS, Herman T, et al. Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell.* 2002 Nov 27;111(5):673-85.

BIBLIOGRAFIA

256. Briata P, Ilengo C, Corte G, Moroni C, Rosenfeld MG, Chen CY, et al. The Wnt/beta-catenin-->Pitx2 pathway controls the turnover of Pitx2 and other unstable mRNAs. *Mol Cell*. 2003 Nov;12(5):1201-11.
257. Baek SH, Kioussi C, Briata P, Wang D, Nguyen HD, Ohgi KA, et al. Regulated subset of G1 growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Mar 18;100(6):3245-50.
258. Mahadevan A, Welsh IC, Sivakumar A, Gludish DW, Shilvock AR, Noden DM, et al. The left-right Pitx2 pathway drives organ-specific arterial and lymphatic development in the intestine. *Dev Cell*. 2014 Dec 22;31(6):690-706.
259. Gage PJ, Suh H, Camper SA. Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development*. 1999 Oct;126(20):4643-51.
260. Procino A. Overexpression of Prox-1 gene in omental adipose tissue and adipocytes compared with subcutaneous adipose tissue and adipocytes in healthy patients. *Cell Biol Int*. 2014 Jul;38(7):888-91.
261. Tinahones FJ, Coin-Araguez L, Mayas MD, Garcia-Fuentes E, Hurtado-Del-Pozo C, Vendrell J, et al. Obesity-associated insulin resistance is correlated to adipose tissue vascular endothelial growth factors and metalloproteinase levels. *BMC Physiol*. 2012;12:4.
262. Gashev AA, Zawieja DC. Hydrodynamic regulation of lymphatic transport and the impact of aging. *Pathophysiology*. 2010 Sep;17(4):277-87.
263. Greene AK, Grant FD, Slavin SA. Lower-extremity lymphedema and elevated body-mass index. *N Engl J Med*. 2012 May 31;366(22):2136-7.
264. Weitman ES, Aschen SZ, Farias-Eisner G, Albano N, Cuzzone DA, Ghanta S, et al. Obesity impairs lymphatic fluid transport and dendritic cell migration to lymph nodes. *PLoS One*. 2013;8(8):e70703.
265. Greene AK, Maclellan RA. Obesity-induced Upper Extremity Lymphedema. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2013 Oct;1(7):e59.
266. Willier S, Butt E, Grunewald TG. Lysophosphatidic acid (LPA) signalling in cell migration and cancer invasion: a focussed review and analysis of LPA receptor gene expression on the basis of more than 1700 cancer microarrays. *Biol Cell*. 2013 Aug;105(8):317-33.
267. Gehlert S, Theis C, Weber S, Schiffer T, Hellmich M, Platen P, et al. Exercise-induced decline in the density of LYVE-1-positive lymphatic vessels in human skeletal muscle. *Lymphat Res Biol*. 2010 Sep;8(3):165-73.
268. Greiwe L, Vinck M, Suhr F. The muscle contraction mode determines lymphangiogenesis differentially in rat skeletal and cardiac muscles by modifying local lymphatic extracellular matrix microenvironments. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015 Nov 25.
269. Ng CP, Helm CL, Swartz MA. Interstitial flow differentially stimulates blood and lymphatic endothelial cell morphogenesis in vitro. *Microvasc Res*. 2004 Nov;68(3):258-64.
270. Goldman J, Conley KA, Raehl A, Bondy DM, Pytowski B, Swartz MA, et al. Regulation of lymphatic capillary regeneration by interstitial flow in skin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 May;292(5):H2176-83.

271. Ren B, Hale J, Srikanthan S, Silverstein RL. Lysophosphatidic acid suppresses endothelial cell CD36 expression and promotes angiogenesis via a PKD-1-dependent signaling pathway. *Blood*. 2011 Jun 2;117(22):6036-45.
272. Hansen KC, D'Alessandro A, Clement CC, Santambrogio L. Lymph formation, composition and circulation: a proteomics perspective. *Int Immunol*. 2015 May;27(5):219-27.
273. Virtue S, Vidal-Puig A. It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS Biol*. 2008 Sep 23;6(9):e237.
274. Habold C, Reichardt F, Foltzer-Jourdainne C, Lignot JH. Morphological changes of the rat intestinal lining in relation to body stores depletion during fasting and after refeeding. *Pflugers Arch*. 2007 Nov;455(2):323-32.
275. Munn LL, Padera TP. Imaging the lymphatic system. *Microvasc Res*. 2014 Nov;96:55-63.
276. Xiong L, Engel H, Gazyakan E, Rahimi M, Hunerbein M, Sun J, et al. Current techniques for lymphatic imaging: State of the art and future perspectives. *Eur J Surg Oncol*. 2014 Mar;40(3):270-6.
277. Fanous MY, Phillips AJ, Windsor JA. Mesenteric lymph: the bridge to future management of critical illness. *Jop*. 2007;8(4):374-99.
278. Lee SH. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest Res*. 2015 Jan;13(1):11-8.
279. Lerner A, Matthias T. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmun Rev*. 2015 Jun;14(6):479-89.
280. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, et al. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol*. 2014;14:189.
281. Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Aros F, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med*. 2013 Apr 4;368(14):1279-90.
282. Frank BW, Kern F, Jr. Intestinal and liver lymph and lymphatics. *Gastroenterology*. 1968 Sep;55(3):408-22.
283. Kivela R, Silvennoinen M, Lehti M, Kainulainen H, Vihko V. Effects of acute exercise, exercise training, and diabetes on the expression of lymphangiogenic growth factors and lymphatic vessels in skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Oct;293(4):H2573-9.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EVIDÈNCIES EN TEIXIT ADIPÓS D'ALTERACIONS GÈNIQUES DELS VASOS LIMFÀTICS EN L'OBESITAT

Alfons Horra Pueyo

ANNEXOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EVIDÈNCIES EN TEIXIT ADIPÓS D'ALTERACIONS GÈNIQUES DELS VASOS LIMFÀTICS EN L'OBESITAT

Alfons Horra Pueyo

Annex 1: Metodologia *microarray*

Informe IMG^M: Gene expression analysis of human adipose tissue samples derived from two different locations with five different treatments each using the Agilent Whole Human Genome Microarray

RS-102

2 Material and methods

2.1 Samples

In total 40 RNA samples were entrusted to IMG^M Laboratories comprising quadruplicates of 10 different groups composed of human adipose tissue samples taken from two different locations (OM and SC) and five groups (C1, C2, Ob1, Ob2, and Ob3) each. The total RNA samples were shipped on dry ice from Hospital Virgen de la Victoria in Málaga, Spain (Dr. Lola Mayas) to IMG^M Laboratories.

In accordance with IMG^M's quality management system, IMG^M-internal IDs which include the study number were assigned to the samples, in order to guarantee unambiguous sample identification throughout the analysis process. The table below lists the sample information provided by the customer.

Tab. 1: Sample information for 40 initial samples (1st shipment)

Information provided by customer	Tube label (customer)	Group	IMG ^M -internal sample ID
OM-C1 (1.5 µg RNA, 1.66 µl of 903.6 ng/µl)	OM1	1	RS-102_01
OM-C1 (1.5 µg RNA, 2.29 µl of 655.0 ng/µl)	OM2		RS-102_02
OM-C1 (1.5 µg RNA, 4.05 µl of 370.4 ng/µl)	OM3		RS-102_03
OM-C1 (1.5 µg RNA, 1.75 µl of 857.1 ng/µl)	OM4		RS-102_04
OM-C2 (1.5 µg RNA, 3.98 µl of 376.9 ng/µl)	OM5	2	RS-102_05
OM-C2 (1.5 µg RNA, 3.22 µl of 465.8 ng/µl)	OM6		RS-102_06
OM-C2 (1.5 µg RNA, 2.66 µl of 563.9 ng/µl)	OM7		RS-102_07
OM-C2 (1.5 µg RNA, 3.78 µl of 396.8 ng/µl)	OM8		RS-102_08
OM-Ob 1 (1.5 µg RNA, 14.94 µl of 100.4 ng/µl)	9	3	RS-102_09
OM-Ob 1 (1.5 µg RNA, 15.00 µl of 100.0 ng/µl)	10		RS-102_10
OM-Ob 1 (1.5 µg RNA, 8.20 µl of 182.9 ng/µl)	11		RS-102_11
OM-Ob 1 (1.5 µg RNA, 6.06 µl of 247.5 ng/µl)	12		RS-102_12
OM-Ob 2 (1.5 µg RNA, 13.2 µl of 113.6 ng/µl)	13	4	RS-102_13
OM-Ob 2 (1.5 µg RNA, 8.71 µl of 172.2 ng/µl)	14		RS-102_14
OM-Ob 2 (1.5 µg RNA, 7.53 µl of 199.2 ng/µl)	15		RS-102_15
OM-Ob 2 (1.5 µg RNA, 5.97 µl of 251.3 ng/µl)	16		RS-102_16
OM-Ob 3 (1.5 µg RNA, 7.01 µl of 214.0 ng/µl)	17	5	RS-102_17
OM-Ob 3 (1.5 µg RNA, 8.35 µl of 179.6 ng/µl)	18		RS-102_18
OM-Ob 3 (1.5 µg RNA, 9.40 µl of 159.6 ng/µl)	19		RS-102_19
OM-Ob 3 (1.5 µg RNA, 1.38 µl of 1087.0 ng/µl)	20		RS-102_20

RS-102

SC-C1 (1.0 µg RNA, 2.14 µl of 467.3 ng/µl)	SC21	6	RS-102_21
SC-C1 (1.0 µg RNA, 3.06 µl of 326.8 ng/µl)	SC22		RS-102_22
SC-C1 (1.5 µg RNA, 3.04 µl of 493.4 ng/µl)	SC23		RS-102_23
SC-C1 (1.5 µg RNA, 2.19 µl of 684.9 ng/µl)	SC24		RS-102_24
SC-C2 (1.5 µg RNA, 3.69 µl of 406.5 ng/µl)	SC25	7	RS-102_25
SC-C2 (1.5 µg RNA, 4.77 µl of 314.5 ng/µl)	SC26		RS-102_26
SC-C2 (1.5 µg RNA, 3.59 µl of 417.8 ng/µl)	SC27		RS-102_27
SC-C2 (1.5 µg RNA, 5.50 µl of 272.7 ng/µl)	SC28		RS-102_28
SC-Ob 1 (1.5 µg RNA, 14.98 µl of 100.1 ng/µl)	29	8	RS-102_29
SC-Ob 1 (1.5 µg RNA, 14.97 µl of 100.2 ng/µl)	30		RS-102_30
SC-Ob 1 (1.5 µg RNA, 8.83 µl of 169.9 ng/µl)	31		RS-102_31
SC-Ob 1 (1.5 µg RNA, 10.52 µl of 142.6 ng/µl)	32		RS-102_32
SC-Ob 2 (1.5 µg RNA, 13.20 µl of 113.6 ng/µl)	33	9	RS-102_33
SC-Ob 2 (1.5 µg RNA, 15.00 µl of 100.0 ng/µl)	34		RS-102_34
SC-Ob 2 (1.5 µg RNA, 11.50 µl of 130.4 ng/µl)	35		RS-102_35
SC-Ob 2 (1.5 µg RNA, 11.11 µl of 135.0 ng/µl)	36		RS-102_36
SC-Ob 3 (1.5 µg RNA, 10.26 µl of 146.2 ng/µl)	37	10	RS-102_37
SC-Ob 3 (1.5 µg RNA, 9.29 µl of 161.5 ng/µl)	38		RS-102_38
SC-Ob 3 (1.5 µg RNA, 12.62 µl of 118.9 ng/µl)	39		RS-102_39
SC-Ob 3 (1.5 µg RNA, 3.45 µl of 434.8 ng/µl)	40		RS-102_40

As 17 of the 40 samples did not pass the RNA integrity control (see 3.3), new RNA samples of the concerned groups were entrusted to IMG M Laboratories to replace the samples of poor quality (see next page).

Unfortunately there were no further samples available for group 7 (SC-C2), meaning that only 9 groups remained for comparisons.

Although sample with tube label 30 was ok in RNA integrity control, it was sent a second time. Dr. Lola Mayas said they made a new extraction from OM and SC in order to keep the same conditions.

RS-102

Tab. 2: Sample information for replacement samples (2nd shipment)

Information provided by customer	Tube label (customer)	Group	IMGM-internal sample ID
OM-C1 (1.5 µg RNA, 5.59 µl of 268.3 ng/µl)	2	1	RS-102_02_1*
OM-C1 (1.5 µg RNA, 2.90 µl of 517.2 ng/µl)	3		RS-102_03_1*
OM-C1 (1.5 µg RNA, 5.55 µl of 270.3 ng/µl)	4		RS-102_04_1*
OM-C2 (1.5 µg RNA, 8.16 µl of 183.8 ng/µl)	5	2	RS-102_05_1*
OM-C2 (1.5 µg RNA, 8.20 µl of 182.9 ng/µl)	6		RS-102_06_1*
OM-C2 (1.5 µg RNA, 5.58 µl of 174.8 ng/µl)	7		RS-102_07_1*
OM-C2 (1.5 µg RNA, 6.29 µl of 238.5 ng/µl)	8		RS-102_08_1*
OM-Ob 1 (1.5 µg RNA, 3.08 µl of 487.0 ng/µl)	10	3	RS-102_10_1*
SC-C1 (1.5 µg RNA, 7.51 µl of 199.7 ng/µl)	22	6	RS-102_22_1*
SC-C1 (1.5 µg RNA, 5.97 µl of 251.3 ng/µl)	23		RS-102_23_1*
SC-C1 (1.5 µg RNA, 2.93 µl of 511.9 ng/µl)	24		RS-102_24_1*
SC-Ob 1 (1.5 µg RNA, 9.58 µl of 156.6 ng/µl)	30	8	RS-102_30_1*
SC-Ob 3 (1.5 µg RNA, 5.56 µl of 269.8 ng/µl)	40	10	RS-102_40_1*

* Samples replacing previous samples that did not pass RNA integrity control.

2.2 Determination of RNA concentration and purity

Total RNA samples have been diluted to concentrations between 100 – 200 ng/µl. An aliquot of the diluted total RNA samples was used to determine RNA concentration and purity on the NanoDrop ND-1000 spectral photometer (peqlab).

2.3 RNA integrity control

The 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) allows for analysis of total RNA samples by capillary electrophoresis. The RNA is separated according to fragment size, and results are returned as electropherograms and virtual gel images.

An index for RNA quality, the so-called RIN (RNA integrity number), is derived from the electrophoretic profile. The RIN scale ranges from 1 to 10. A RIN of 10 denotes an excellent RNA quality, while a RIN value of 1 indicates massive degradation. For RIN calculation, the algorithm does not rely on the 28S/18S-rRNA ratio alone, but takes into account the entire electrophoretic profile (e.g. the fraction of short degraded RNA species).

RS-102

All samples were analyzed using RNA 6000 Nano LabChip Kits (Agilent Technologies). In the following some example electropherograms are shown.

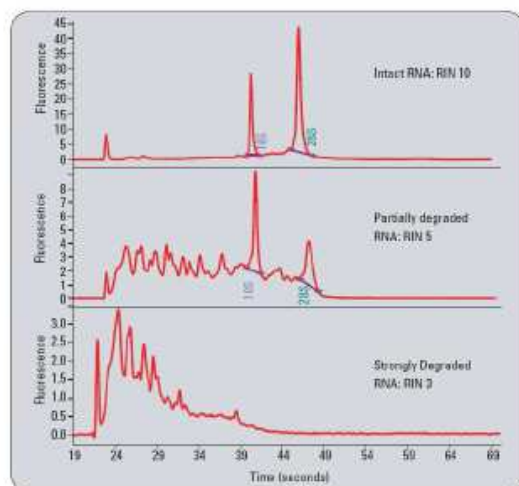


Fig. 1: Example electropherograms of total RNA analyzed on 2100 Bioanalyzer

2.4 Preparation of Cyanine-3 labeled cRNA

400 ng total RNA per sample were introduced into an RT-IVT reaction. Prior to RT-IVT, the total RNA samples were spiked with *in-vitro* synthesized polyadenylated transcripts (One-Color RNA Spike-In Mix, Agilent Technologies) which serve as an internal labeling control for linearity, sensitivity and accuracy.

The spiked total RNA was reverse transcribed into cDNA and then converted into labeled cRNA by *in-vitro* transcription (Quick-Amp Labeling Kit One-Color, Agilent Technologies) incorporating Cyanine-3-CTP.

RS-102

2.5 Quantification and quality control of labeled cRNA samples

2.5.1 Analysis of labeled cRNA using the NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer

cRNA concentration (ng/μl), RNA absorbance ratio (260nm/280nm) and Cyanine-3 dye concentration (pmol/μl) were recorded for all cRNA samples using NanoDrop ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer. Yield and specific activity of each reaction were determined.

The cRNA yield was determined based on following calculation:

$$\text{cRNA yield } [\mu\text{g}] = \text{concentration of cRNA } [\text{ng}/\mu\text{l}] * \text{volume of eluate } [\mu\text{l}] / 1000$$

The specific activity of dye incorporated in cRNA was calculated as described below:

$$\text{specific activity } [\text{pmol}/\mu\text{g}] = \text{concentration of Cyanine-3 } [\text{pmol}/\mu\text{l}] / \text{concentration of cRNA } [\text{ng}/\mu\text{l}] * 1000$$

Agilent proposes not to proceed to the hybridization step, if the yield is below 1.65 μg and the specific activity is below 9.0 pmol Cyanine-3 per μg cRNA.

2.5.2 cRNA control on the 2100 Bioanalyzer

The RNA 6000 Nano LabChip Kit (Agilent Technologies) was used on the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) to analyze the quality of labeled non-fragmented cRNA. A small initial hump followed by a round curve with a few small peaks indicates successful amplification and labeling for the total RNA samples (see next page for an example).

RS-102

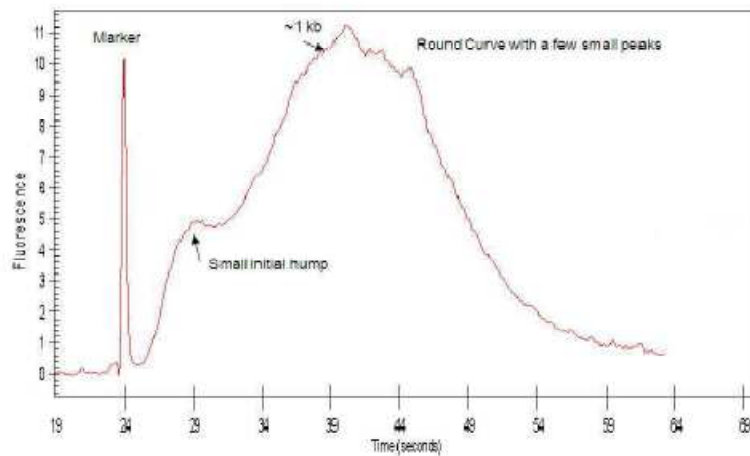


Fig. 2: Example electropherogram of Cyanine-3 cRNA analyzed on 2100 Bioanalyzer

2.6 Microarray hybridization

Following cRNA clean-up and quantification (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, peqlab) 1.65 μg of each Cyanine-3-labeled cRNA sample was fragmented and prepared for One-Color based hybridization (Gene Expression Hybridization Kit, Agilent). Therefore, each single cRNA sample was hybridized at 65°C for 17hrs on separate Whole Human Genome Oligo Microarrays (4x44K format). Each microarray consists of 41,000 target-gene-specific probes (60-mers) and numerous control probes.

The microarrays have been washed with increasing stringency using Gene Expression Wash Buffers (Agilent Technologies) followed by drying in acetonitrile (SIGMA). Fluorescent signal intensities were detected with Scan Control 7.0 Software (Agilent Technologies) on the Agilent DNA Microarray Scanner and extracted from the images using Feature Extraction 9.5.3.1 Software (Agilent Technologies).

RS-102

2.7 Bioinformatic data analysis

2.7.1 Software applied for bioinformatic data analysis

The software Feature Extraction 9.5.3.1, GeneSpring GX 10.0 as well as the software Spotfire Decision Site 9.1.1 was used for quality control, statistical data analysis, Gene ontology annotation and visualization. The Gene Expression Data Analysis tool of Panther database (www.pantherdb.org) was applied for enrichment analysis.

2.7.2 Normalization

Data normalization is the first essential step for microarray data analysis. Normalization compensates for varying global signal intensities of the microarrays and adjusts them to a uniform level, thus making the individual microarrays comparable for downstream analysis.

Quantile normalization was applied to the data set. The goal of this non-parametric approach is to impose the same distribution of probe signal intensities for each array. It is suggested that quantile normalization performs especially well when the expression of most genes is not altered across conditions (Bolstad, et. al.¹), which can be assumed for the applied human adipose tissue samples. Quantile normalization shifts all intensities in such a way that the median value and intensity distributions are the same for all arrays.

After normalization, data is returned as \log_2 transformed values and filtered based on flags. The values can either be visualized \log_2 transformed (after normalization) or as raw data (before normalization).

In the result files, the quantile normalized \log_2 transformed probe signals are included in the columns with the header suffix *normalized*.

2.7.3 Filtering on “present” calls

After normalization Probe IDs were filtered according to the flag information provided by Feature Extraction Software 9.5.3.1. Probe IDs of an array are flagged and annotated as

¹ Bolstad, B. M., Irizarry R. A., Astrand, M, and Speed, T. P. (2003). A Comparison of Normalization Methods for High Density Oligonucleotide Array Data Based on Bias and Variance. *Bioinformatics* 19(2) pp 185-193.

RS-102

"absent" if they are not distinguishable from the array background (not significantly detectable) or as "marginal" if the shape of the spot does not fit to the expectations (unequal saturation, non-uniformity). Probe IDs filtering on flags is carried out in a way that at least one out of all samples are "present".

2.7.4 Correlation analysis

The relationship based on global gene expression profiles of different samples within each group was assessed by correlation analysis. The Pearson's correlation coefficients are calculated for all pair wise comparisons of the samples in the experiment. Samples representing the same experimental condition should be more similar to each other than to samples representing different experimental conditions. Thus, correlation coefficients calculated for pairs of samples representing the same experimental condition should be higher than for pairs in which the samples represent different experimental conditions.

2.7.5 Average calculation

The quantile normalized, log₂ transformed data were averaged across replicates, resulting in the columns *[group #] (normalized)* (see result files). 9 of the 10 initially planned groups remained for bioinformatic analysis, as no samples of high quality were available for group 7. In total 18 comparisons have been analyzed.

- a) The group of samples from location OM treated as C1 (group 1) was used as reference group, and gene expression of tissue samples treated as C2 (group 2), Ob1 (group 3), Ob2 (group 4) and Ob3 (group 5) as well as the tissue samples from location SC treated as C1 (group 6), respectively, were compared to this baseline.
- b) The group of samples from location OM treated as C2 (group 2) was used as reference group, and gene expression of tissue samples treated as Ob2 (group 4) were compared to this baseline.
- c) The group of samples from location OM treated as Ob1 (group 3) was used as reference group, and gene expression of tissue samples treated as Ob2 (group 4) and Ob3 (group 5) as well as the tissue samples from location SC treated as Ob1 (group 8), respectively, were compared to this baseline.
- d) The group of samples from location OM treated as Ob2 (group 4) was used as refer-

RS-102

ence group, and gene expression of tissue samples treated as Ob3 (group 5) as well as the tissue samples from location SC treated as Ob2 (group 9), respectively, were compared to this baseline.

- e) The group of samples from location OM treated as Ob3 (group 5) was used as reference group, and gene expression of tissue samples from location SC treated as Ob3 (group 10) were compared to this baseline.
- f) The group of samples from location SC treated as C1 (group 6) was used as reference group, and gene expression of tissue samples treated as Ob1 (group 8), Ob2 (group 9) and Ob3 (group 10), respectively, were compared to this baseline.
- g) The group of samples from location SC treated as Ob1 (group 8) was used as reference group, and gene expression of tissue samples treated as Ob2 (group 9) and Ob3 (group 10), respectively, were compared to this baseline.
- h) The group of samples from location SC treated as Ob2 (group 9) was used as reference group, and gene expression of tissue samples treated as Ob3 (group 10) were compared to this baseline.

2.7.6 Statistical evaluation

Welch's approximate t-test ("unpaired unequal variance", parametric) was applied to the comparison of the different groups. The Welch's approximate t-test produces a p-value (Column p value).

Since the number of hypotheses (= probes on the microarray) is much higher than the number of analyzed samples, a substantial **multiple testing error** can occur. It is therefore recommended to apply a correction to the original p-value. A well-established method for this adjustment is the algorithm devised by **Benjamini and Hochberg**², which is based on a control of the false discovery rate (FDR). The p-value adjusted for multiple testing is usually several orders of magnitude higher than the unadjusted p-value.

The Welch's approximate t-test based p-value was therefore corrected for multiple testing using the algorithm of Benjamini and Hochberg. The resulting adjusted p-value can be found in the column **corrected p value** in the result files.

² Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, 57, 289–300.

RS-102

2.7.7 Fold Change calculation

In total 9 groups were compared in 18 different comparisons (see 2.7.5). The extent and direction of differential expression between the groups was determined by calculating the ratio between their average signal values, resulting in a **Fold Change (FC)** value.

For example, for gene *i* the FC is calculated as described below:

$$FC = (FC_group2_vs_group1) = (Avg_group2) / (Avg_group1)$$

This way of calculation has the effect that the up-regulated genes have Fold Change (FC) values ranging from > 1 to $+\infty$. For the down-regulated genes, however, the range of FC values is compressed between 0 and < 1 .

To achieve FC values with an equal order of magnitude for both, up- and down-regulation, FC values were subjected to a further transformation, resulting in so-called **linearized Fold Changes** (column *Fold change* in the result files). FC values greater than 1 are still identical to the linearized FC values.

Examples:

- a (linearized) FC value of 2 indicates a two-fold induction in group 2 compared to group 1
- a (linearized) FC value of 3 indicates a three-fold induction
- a FC value of 0.5 indicates a two-fold repression in group 2 compared to group 1; this is equivalent to a linearized FC value of -2
- a FC value of 0.33 indicates a three-fold repression; this is equivalent to a linearized FC value of -3

RS-102

2.7.8 Identification of differentially expressed genes

To filter for genes with a robust differential expression between two comparator groups, several parameters are taken into account:

- **Robust detection:** A probe is only considered if it is reliably or marginally detectable in at least one out of all samples of the two comparator groups. Traceability is based on the flag information given from the Feature Extraction software.
- **Statistical significance:**
Two filtering approaches were used, which apply a different level of stringency to the data set:

a) Stringent filtering:

A probe is only classified as **induced** in a specific comparison if its **FDR-adjusted p-value is below 0.01** and it has a **Fold Change value ≥ 2** . Analogously, a probe is classified as **repressed** if its **FDR-adjusted p-value is below 0.01** and its **linearized Fold Change is ≤ -2** .

By using this filtering, the multiple testing error is taken into account, and the false discovery rate is controlled at a maximum level of 1%.

b) Non-stringent filtering:

A probe is only classified as **induced** in a specific comparison if its **p-value (unadjusted) is below 0.01 (or 0.05)** and it has a **Fold Change value ≥ 1** . Conversely, a probe is classified as **repressed** if the **p-value (unadjusted) is below 0.01 (or 0.05)** and its **linearized Fold Change is ≤ -1** .

This filtering approach does not account for the multiple testing error³.

³ Please note that if more stringent filtering was applied (e.g. FDR-adjusted p-value below 0.1), virtually no probes would be left for downstream analysis.

RS-102

2.7.9 Identification of differentially regulated processes and pathways

Furthermore, several analysis tools from the Panther website (accessible through <http://www.pantherdb.org>) were applied for functional evaluation of differential regulation.

The Panther ontology is divided into the realms of Biological Processes, Molecular Functions and Pathways. Both Biological Processes and Molecular Functions are hierarchically organized into many classes and subclasses. Their hierarchical structure is summarized in the file [Panther BP and MF - Hierarchical Structure.xls](#), which contains all classes and subclasses of the Panther ontology's Biological Processes and Molecular Functions.

In particular, enrichment analysis is performed by comparing a list of differentially regulated genes with a reference list, which is the complete list of genes represented on the 4x44K Whole Human Genome Microarrays (Agilent Technologies).

Functional analysis was carried out in December 2008; therefore the results are based on the version of the Panther data base effective during this time period.

RS-102

3 Results

3.1 Total RNA dilution

Volumes of entrusted samples ranged from 1.4 – 15.0 µl for the amount of 1.5 µg total RNA. In order to have available manageable volumes for RNA integrity control (2100 Bioanalyzer) and sample labeling, total RNA dilutions were calculated at 150 ng/µl and original samples diluted with nuclease-free water. Samples with concentrations between 100 – 200 ng/µl were left untouched. The dilution scheme is indicated in the table below.

Tab. 3: Dilution scheme for 40 initial total RNA samples

Information provided by customer	IMG-M-internal sample ID	H ₂ O added (µl)	Expected conc. (ng/µl)
OM-C1 (1.5 µg RNA, 1.66 µl of 903.6 ng/µl)	RS-102_01	8.30	150.0
OM-C1 (1.5 µg RNA, 2.29 µl of 655.0 ng/µl)	RS-102_02	7.79	150.0
OM-C1 (1.5 µg RNA, 4.05 µl of 370.4 ng/µl)	RS-102_03	6.08	150.0
OM-C1 (1.5 µg RNA, 1.75 µl of 857.1 ng/µl)	RS-102_04	8.23	150.0
OM-C2 (1.5 µg RNA, 3.98 µl of 376.9 ng/µl)	RS-102_05	5.97	150.0
OM-C2 (1.5 µg RNA, 3.22 µl of 465.8 ng/µl)	RS-102_06	6.76	150.0
OM-C2 (1.5 µg RNA, 2.66 µl of 563.9 ng/µl)	RS-102_07	7.45	150.0
OM-C2 (1.5 µg RNA, 3.78 µl of 396.8 ng/µl)	RS-102_08	6.05	150.0
OM-Ob 1 (1.5 µg RNA, 14.94 µl of 100.4 ng/µl)	RS-102_09	-	100.4
OM-Ob 1 (1.5 µg RNA, 15.00 µl of 100.0 ng/µl)	RS-102_10	-	100.0
OM-Ob 1 (1.5 µg RNA, 8.20 µl of 182.9 ng/µl)	RS-102_11	-	182.9
OM-Ob 1 (1.5 µg RNA, 6.06 µl of 247.5 ng/µl)	RS-102_12	4.24	150.0
OM-Ob 2 (1.5 µg RNA, 13.2 µl of 113.6 ng/µl)	RS-102_13	-	113.6
OM-Ob 2 (1.5 µg RNA, 8.71 µl of 172.2 ng/µl)	RS-102_14	-	172.2
OM-Ob 2 (1.5 µg RNA, 7.53 µl of 199.2 ng/µl)	RS-102_15	-	199.2
OM-Ob 2 (1.5 µg RNA, 5.97 µl of 251.3 ng/µl)	RS-102_16	4.18	150.0
OM-Ob 3 (1.5 µg RNA, 7.01 µl of 214.0 ng/µl)	RS-102_17	2.80	150.0
OM-Ob 3 (1.5 µg RNA, 8.35 µl of 179.6 ng/µl)	RS-102_18	-	179.6
OM-Ob 3 (1.5 µg RNA, 9.40 µl of 159.6 ng/µl)	RS-102_19	-	156.9
OM-Ob 3 (1.5 µg RNA, 1.38 µl of 1087.0 ng/µl)	RS-102_20	8.56	150.0
SC-C1 (1.0 µg RNA, 2.14 µl of 467.3 ng/µl)	RS-102_21	4.49	150.0
SC-C1 (1.0 µg RNA, 3.06 µl of 326.8 ng/µl)	RS-102_22	3.67	150.0
SC-C1 (1.5 µg RNA, 3.04 µl of 493.4 ng/µl)	RS-102_23	6.99	150.0
SC-C1 (1.5 µg RNA, 2.19 µl of 684.9 ng/µl)	RS-102_24	7.88	150.0

RS-102

SC-C2 (1.5 µg RNA, 3.69 µl of 406.5 ng/µl)	RS-102_25	6.27	150.0
SC-C2 (1.5 µg RNA, 4.77 µl of 314.5 ng/µl)	RS-102_26	5.25	150.0
SC-C2 (1.5 µg RNA, 3.59 µl of 417.8 ng/µl)	RS-102_27	6.46	150.0
SC-C2 (1.5 µg RNA, 5.50 µl of 272.7 ng/µl)	RS-102_28	4.40	150.0
SC-Ob 1 (1.5 µg RNA, 14.98 µl of 100.1 ng/µl)	RS-102_29	-	100.1
SC-Ob 1 (1.5 µg RNA, 14.97 µl of 100.2 ng/µl)	RS-102_30	-	100.2
SC-Ob 1 (1.5 µg RNA, 8.83 µl of 169.9 ng/µl)	RS-102_31	-	169.9
SC-Ob 1 (1.5 µg RNA, 10.52 µl of 142.6 ng/µl)	RS-102_32	-	142.6
SC-Ob 2 (1.5 µg RNA, 13.20 µl of 113.6 ng/µl)	RS-102_33	-	113.6
SC-Ob 2 (1.5 µg RNA, 15.00 µl of 100.0 ng/µl)	RS-102_34	-	100.0
SC-Ob 2 (1.5 µg RNA, 11.50 µl of 130.4 ng/µl)	RS-102_35	-	130.4
SC-Ob 2 (1.5 µg RNA, 11.11 µl of 135.0 ng/µl)	RS-102_36	-	135.0
SC-Ob 3 (1.5 µg RNA, 10.26 µl of 146.2 ng/µl)	RS-102_37	-	146.2
SC-Ob 3 (1.5 µg RNA, 9.29 µl of 161.5 ng/µl)	RS-102_38	-	161.5
SC-Ob 3 (1.5 µg RNA, 12.62 µl of 118.9 ng/µl)	RS-102_39	-	118.9
SC-Ob 3 (1.5 µg RNA, 3.45 µl of 434.8 ng/µl)	RS-102_40	6.56	150.0

The scheme for the 17 replacement samples of 2nd shipment is shown in the following table.

Tab. 4: Dilution scheme for 13 replacement total RNA samples

Information provided by customer	IMGM-internal sample ID	H ₂ O added (µl)	Expected conc. (ng/µl)
OM-C1 (1.5 µg RNA, 5.59 µl of 268.3 ng/µl)	RS-102_02_1*	4.47	150.0
OM-C1 (1.5 µg RNA, 2.90 µl of 517.2 ng/µl)	RS-102_03_1*	6.96	150.0
OM-C1 (1.5 µg RNA, 5.55 µl of 270.3 ng/µl)	RS-102_04_1*	4.44	150.0
OM-C2 (1.5 µg RNA, 8.16 µl of 183.8 ng/µl)	RS-102_05_1*	-	183.8
OM-C2 (1.5 µg RNA, 8.20 µl of 182.9 ng/µl)	RS-102_06_1*	-	182.9
OM-C2 (1.5 µg RNA, 5.58 µl of 174.8 ng/µl)	RS-102_07_1*	-	174.8
OM-C2 (1.5 µg RNA, 6.29 µl of 238.5 ng/µl)	RS-102_08_1*	3.77	150.0
OM-Ob 1 (1.5 µg RNA, 3.08 µl of 487.0 ng/µl)	RS-102_10_1*	6.78	150.0
SC-C1 (1.5 µg RNA, 7.51 µl of 199.7 ng/µl)	RS-102_22_1*	-	199.7
SC-C1 (1.5 µg RNA, 5.97 µl of 251.3 ng/µl)	RS-102_23_1*	4.18	150.0
SC-C1 (1.5 µg RNA, 2.93 µl of 511.9 ng/µl)	RS-102_24_1*	7.03	150.0
SC-Ob 1 (1.5 µg RNA, 9.58 µl of 156.6 ng/µl)	RS-102_30_1*	-	156.6
SC-Ob 3 (1.5 µg RNA, 5.56 µl of 269.8 ng/µl)	RS-102_40_1*	4.45	150.0

* Samples replacing previous samples that did not pass RNA integrity control.

RS-102

3.2 Total RNA concentration and purity

Total RNA concentrations and A260/280 ratios were determined by spectral photometry on the NanoDrop ND-1000 instrument. The results as well as the approximate total RNA yields are indicated in the table below. The replacement samples are sorted apart the corresponding samples of the 1st shipment.

Tab. 5: NanoDrop ND-1000 results for the 40 initial and 13 replacement total RNA samples

IMG-internal sample ID	Volume after dilution (µl)	RNA conc. (ng/µl)	A260/280-Ratio	RNA yield (µg)
RS-102_01	9.96	126.08	1.74	1.26
RS-102_02	10.08	177.83	1.97	1.79
RS-102_02_1*	10.06	149.08	2.06	1.32
RS-102_03	10.13	105.45	2.04	1.07
RS-102_03_1*	9.86	152.13	2.10	1.61
RS-102_04	9.98	183.58	1.91	1.83
RS-102_04_1*	9.99	150.15	2.07	1.39
RS-102_05	9.95	203.47	2.01	2.02
RS-102_05_1*	8.16	183.82	2.00	1.36
RS-102_06	9.98	155.40	2.02	1.55
RS-102_06_1*	8.20	182.93	1.99	1.27
RS-102_07	10.11	183.73	1.99	1.86
RS-102_07_1*	8.58	174.83	2.01	1.36
RS-102_08	9.83	146.47	2.04	1.44
RS-102_08_1*	10.06	149.05	2.04	1.27
RS-102_09	14.94	134.22	2.11	2.01
RS-102_10	15.00	4.09	7.74	0.06
RS-102_10_1*	9.86	152.13	2.11	1.45
RS-102_11	8.20	220.00	2.06	1.80
RS-102_12	10.30	72.80	2.11	0.75
RS-102_13	13.20	117.04	2.12	1.54
RS-102_14	8.71	181.86	2.09	1.58
RS-102_15	7.53	220.23	2.05	1.66
RS-102_16	10.15	164.11	2.06	1.67
RS-102_17	9.81	199.17	2.06	1.95
RS-102_18	8.35	196.28	2.07	1.64
RS-102_19	9.40	146.98	2.04	1.38
RS-102_20	9.94	217.08	1.87	2.16
RS-102_21	6.63	150.02	1.97	1.00

RS-102

RS-102_22	6.73	165.39	2.00	1.11
RS-102_22_1*	7.51	199.73	2.04	0.91
RS-102_23	10.03	110.63	1.97	1.11
RS-102_23_1*	10.15	147.80	2.08	0.67
RS-102_24	10.07	130.26	1.96	1.31
RS-102_24_1*	9.96	150.57	1.70	1.77
RS-102_25	9.96	149.16	2.00	1.49
RS-102_26	10.02	90.89	2.06	0.91
RS-102_27	10.05	109.79	2.04	1.10
RS-102_28	9.90	129.04	2.05	1.28
RS-102_29	14.98	76.89	2.15	1.15
RS-102_30	14.97	101.85	2.09	1.52
RS-102_30_1*	9.58	156.58	1.97	1.33
RS-102_31	8.83	159.83	2.05	1.41
RS-102_32	10.52	67.01	2.09	0.70
RS-102_33	13.20	109.55	2.10	1.45
RS-102_34	15.00	82.04	2.07	1.23
RS-102_35	11.50	91.84	2.04	1.06
RS-102_36	11.11	67.33	2.08	0.75
RS-102_37	10.26	102.41	2.06	1.05
RS-102_38	9.29	146.07	2.07	1.36
RS-102_39	12.62	88.79	2.07	1.12
RS-102_40	10.01	41.89	1.98	0.42
RS-102_40_1*	10.01	149.88	2.07	1.37

* Samples replacing previous samples that did not pass RNA integrity control.

For 6 out of 53 sent samples the observed amount of total RNA was less than the expected amount of 1 µg, whereas amount of samples RS-102_10 and RS-102_40 (shaded blue) was not enough for RNA quality control and labeling.

In addition, for 10 out of 53 sent samples the measured concentration of total RNA was below the expected concentration of 100 ng/µl.

The A260/A280-Ratio ranges from 1.70 – 2.15 and indicates quite pure total RNA.

RS-102

3.3 RNA integrity

3.3.1 Overview of RNA integrity results

The results of the RNA quality check using the 2100 Bioanalyzer instrument (Agilent) are summarized in the table below.

Tab. 6: 2100 Bioanalyzer results for the 40 initial and 13 replacement total RNA samples

IMG M-internal sample ID	28S/18S-Ratio	RIN	IMG M-internal sample ID	28S/18S-Ratio	RIN
RS-102_01	1.0	7.5	RS-102_19	1.6	8.4
RS-102_02	0.7	5.4	RS-102_20	1.6	9.2
RS-102_02_1*	0.9	7.0	RS-102_21	0.7	7.0
RS-102_03	0.7	6.1	RS-102_22	0.7	6.7
RS-102_03_1*	1.4	8.6	RS-102_22_1*	1.6	8.7
RS-102_04	0.8	6.0	RS-102_23	0.7	6.0
RS-102_04_1*	1.5	9.0	RS-102_23_1*	1.5	9.0
RS-102_05	0.6	5.2	RS-102_24	0.6	5.8
RS-102_05_1*	1.5	8.1	RS-102_24_1*	1.6	7.9
RS-102_06	0.7	5.5	RS-102_25	0.8	6.1
RS-102_06_1*	1.5	8.1	RS-102_26	0.7	3.9
RS-102_07	0.6	4.2	RS-102_27	1.2	6.9
RS-102_07_1*	1.5	7.7	RS-102_28	0.6	6.0
RS-102_08	0.3	3.1	RS-102_29	1.6	9.0
RS-102_08_1*	1.6	9.1	RS-102_30	1.6	8.8
RS-102_09	1.6	9.1	RS-102_30_1*	1.7	8.7
RS-102_10	0.0	N/A	RS-102_31	1.6	9.1
RS-102_10_1*	1.6	9.1	RS-102_32	1.4	8.5
RS-102_11	1.5	7.8	RS-102_33	1.4	8.2
RS-102_12	1.4	8.3	RS-102_34	1.5	8.9
RS-102_13	1.6	9.0	RS-102_35	1.6	8.9
RS-102_14	1.4	8.8	RS-102_36	1.5	9.0
RS-102_15	1.5	8.8	RS-102_37	1.7	8.9
RS-102_16	1.6	9.3	RS-102_38	1.5	8.4
RS-102_17	1.3	9.6	RS-102_39	1.6	9.2
RS-102_18	1.2	8.0	RS-102_40	1.6	8.6
			RS-102_40_1*	1.5	9.1

* Samples replacing previous samples that did not pass RNA integrity control.

RS-102

RIN values for the 40 samples of 1st shipment have a range of 3.1 – 9.6.

16 out of the 40 samples (shaded blue) have RIN values below 7.0, indicating worse RNA quality. It can be concluded that these samples are not suitable for whole genome microarray analysis.

18 out of the 40 samples have RIN values between 7.5 and 9.0, indicating good RNA quality whereas 6 out of the 40 samples have RIN values of 9.1 and higher, indicating excellent RNA quality. It can be concluded that all these 24 samples are suitable for whole genome microarray analysis.

Since RIN values show a huge variability, comparability of the samples in microarray analysis cannot be ensured. In combination with the results of RNA concentration measurement (see 3.2), 17 samples (shaded in Tab. 5 and Tab. 6) of the 1st shipment have been excluded from further processing.

RIN values for the 13 samples of 2nd shipment have a range of 7.0 – 9.1.

1 out of the 13 samples (shaded blue) has a RIN value of 7.0, indicating worse RNA quality. It can be concluded that this sample is not suitable for whole genome microarray analysis.

1 out of the 13 samples (shaded blue) has a RIN value of 7.3, indicating questionable RNA quality. It cannot be excluded that this sample is not suitable for whole genome microarray analysis.

11 out of the 13 samples have RIN values between 7.9 and 9.1, indicating well to excellent RNA quality. It can be concluded that these samples are suitable for whole genome microarray analysis.

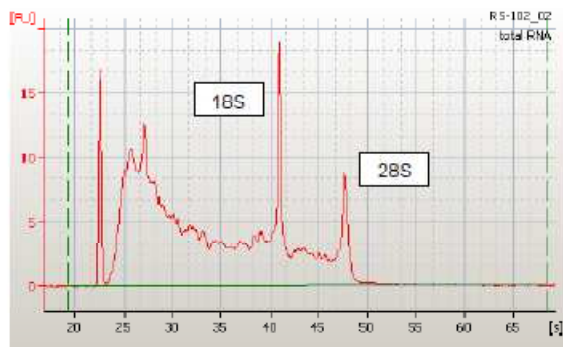
Again two samples (RS-102_02_1* and RS-102_07_1*) have been excluded from further processing because of worse RNA quality. At the end 34 samples out of two shipments have been qualified for whole genome microarray analysis.

The electropherograms of 10 total RNA samples (1 sample per group) are shown as examples together with the virtual gel images in the following sections.

RS-102

3.3.2 2100 Bioanalyzer electropherograms

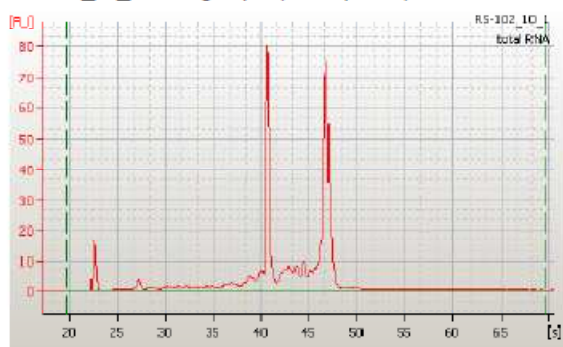
RS-102_02: group 1 (1st shipment) RIN 5.4



RS-102_08: group 2 (1st shipment) RIN 3.1

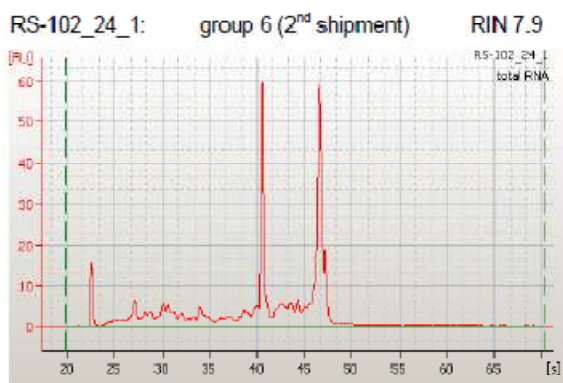
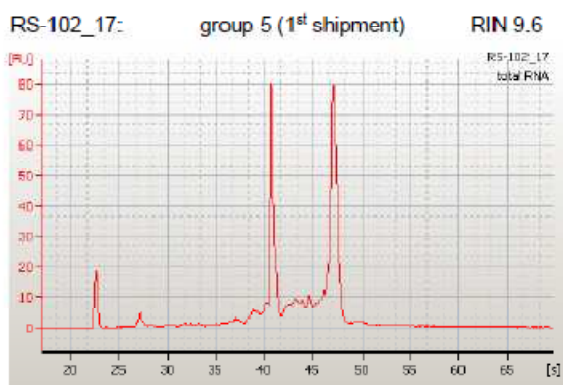
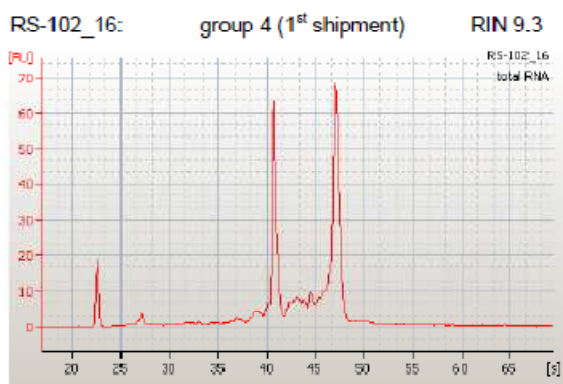


RS-102_10_1: group 3 (2nd shipment) RIN 9.1

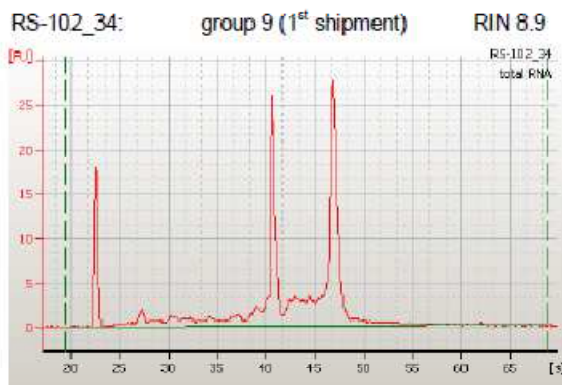
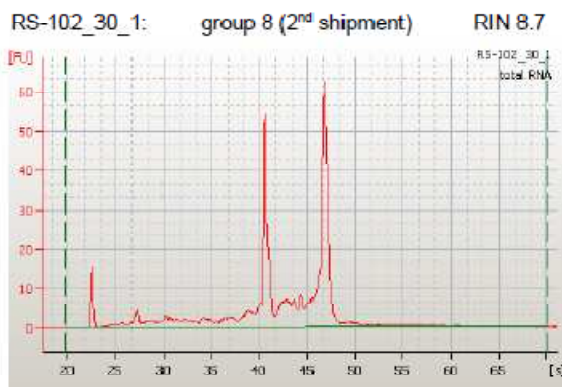
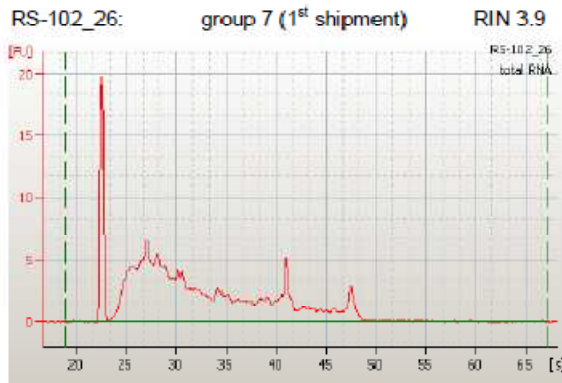


ANNEXOS

RS-102



RS-102



RS-102

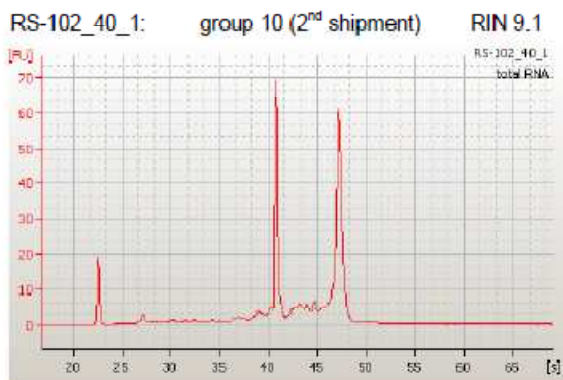
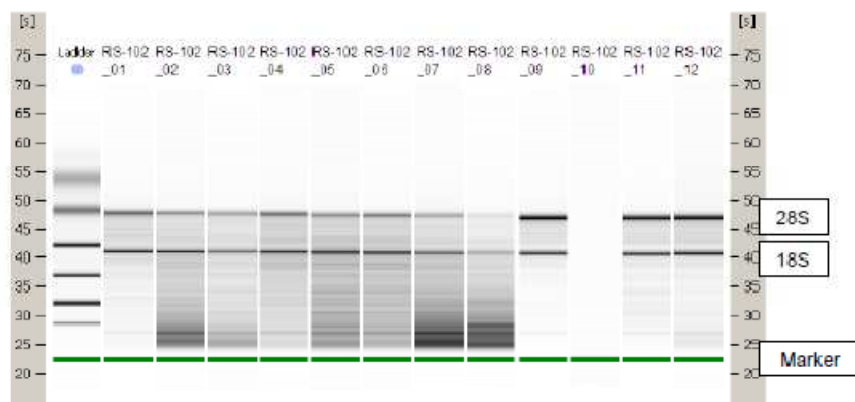


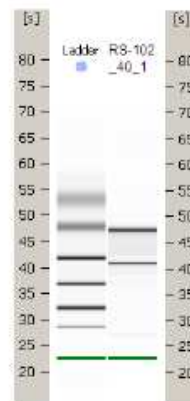
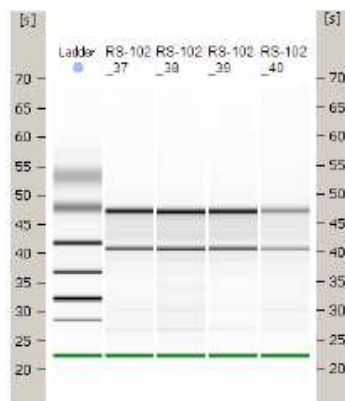
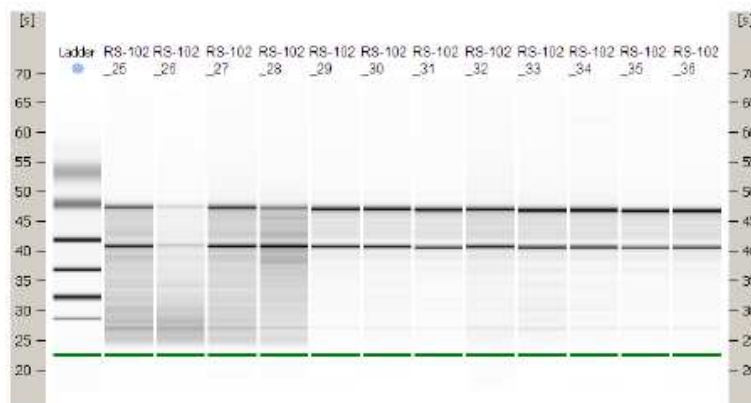
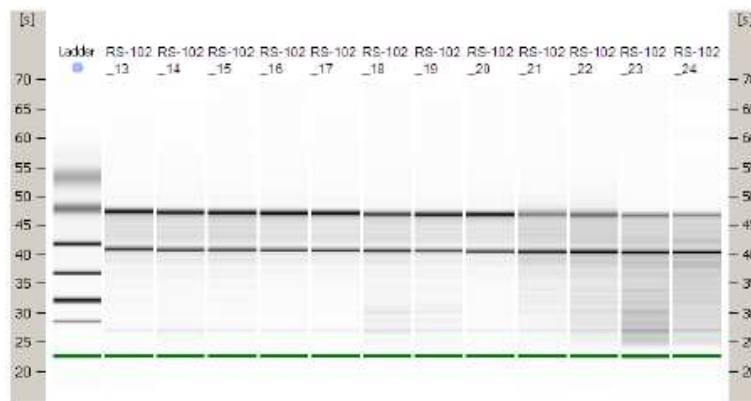
Fig. 3: 10 selected total RNA electropherograms out of 53 analyzed samples

3.3.3 2100 Bioanalyzer virtual gel images

The virtual gel images of all samples are shown in the following figure.



RS-102



RS-102



Fig. 4: Virtual gel images for 40 initial and 12 replacement total RNA samples

3.3.4 Overview of qualified and selected samples

34 out of 53 delivered total RNA samples have been qualified for downstream processing with Whole Human Genome Oligo Microarrays. Due to the 4x44K format of the microarray slides, the number of samples that were selected for labeling and hybridization was reduced to 32 (8 x 4 samples) in agreement with you. They are listed in the table below.

Tab. 7: 32 samples fulfilling RNA quality control criteria and being selected for labeling

IMGM-internal sample ID	Group	RNA conc. (ng/µl)	RIN
RS-102_01	1 (OM-C1)	126.08	7.5
RS-102_03_1*		152.13	8.6
RS-102_04_1*		150.15	9.0
RS-102_05_1*	2 (OM-C2)	183.82	8.1
RS-102_06_1*		182.93	8.1
RS-102_08_1*		149.05	9.1
RS-102_09	3 (OM-Ob 1)	134.22	9.1
RS-102_10_1*		152.13	9.1
RS-102_11		220.00	7.8
RS-102_12		72.80	8.3

RS-102

RS-102_13	4 (OM-Ob 2)	117.04	9.0
RS-102_14		181.86	8.8
RS-102_15		220.23	8.8
RS-102_16		164.11	9.3
RS-102_17	5 (OM-Ob 3)	199.17	9.6
RS-102_18		196.28	8.0
RS-102_19		146.98	8.4
RS-102_20		217.08	9.2
RS-102_22_1*	6 (SC-C1)	199.73	8.7
RS-102_23_1*		147.80	9.0
RS-102_24_1*		150.57	7.9
RS-102_29	8 (SC-Ob 1)	76.89	9.0
RS-102_30_1*		156.58	8.7
RS-102_31		159.83	9.1
RS-102_32		67.01	8.5
RS-102_33	9 (SC-Ob 2)	109.55	8.2
RS-102_34		82.04	8.9
RS-102_36		67.33	9.0
RS-102_37	10 (SC-Ob 3)	102.41	8.9
RS-102_38		146.07	8.4
RS-102_39		88.79	9.2
RS-102_40_1*		149.88	9.1

* Samples replacing previous samples that did not pass RNA integrity control.

3.4 Quantification and quality control of labeled cRNA

3.4.1 cRNA analysis on NanoDrop Spectrophotometer

400 ng total RNA from 32 samples was reverse transcribed in separate reactions. The standard amount of 500 ng total RNA could not be used, as concentrations of 8 samples were below 100ng/ μ l and volume of total RNA input in labeling reaction is limited.

Each labeled cRNA sample was purified and eluted in 30 μ l. Concentration of labeled cRNA and incorporated Cyanine-3 was detected using NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer and the *Microarray measurement* tool. cRNA yield (μ g) and specific activity (pmol dye / μ g cRNA) have been calculated as described earlier.

RS-102

The achieved cRNA yield ranged from 4.88 – 12.03 µg. 24 out of 32 samples have a specific activity of more than 9.0 pmol Cyanine-3 per µg cRNA and fulfill the quality criteria defined by Agilent Technologies.

For 8 cRNA samples the specific activity ranged from 7.43 – 8.96 pmol Cyanine-3 per µg cRNA (red letters). In combination with the good results of the cRNA quality control using the Agilent 2100 Bioanalyzer (see 3.4.2) it was decided that all of these 8 cRNA samples have been nevertheless qualified for microarray hybridization.

Tab. 8: NanoDrop ND-1000 quality control parameters for labeled cRNA samples

IMGM-internal Sample ID	cRNA conc. (ng/µl)	260/280-Ratio	Dye conc. (pmol/µl)	cRNA yield (µg)	Specific activity (pmol/µg)
RS-102_01	202.99	2.43	1.67	6.09	8.23
RS-102_03_1*	219.54	2.36	2.30	6.59	10.48
RS-102_04_1*	238.94	2.35	1.98	7.17	8.29
RS-102_05_1*	209.96	2.34	2.32	6.30	11.05
RS-102_06_1*	180.11	2.32	1.93	5.40	10.72
RS-102_08_1*	277.43	2.40	2.43	8.32	8.76
RS-102_09	228.45	2.38	2.33	6.85	10.20
RS-102_10_1*	307.44	2.33	3.27	9.22	10.64
RS-102_11	185.68	2.47	1.38	5.57	7.43
RS-102_12	241.25	2.34	2.74	7.24	11.36
RS-102_13	231.75	2.39	1.95	6.95	8.41
RS-102_14	306.27	2.39	3.02	9.19	9.86
RS-102_15	395.36	2.36	4.66	11.86	11.79
RS-102_16	279.04	2.41	2.50	8.37	8.96
RS-102_17	279.61	2.36	3.23	8.39	11.55
RS-102_18	255.85	2.42	2.08	7.68	8.13
RS-102_19	290.76	2.39	3.21	8.72	11.04
RS-102_20	370.20	2.31	4.83	11.11	13.05
RS-102_22_1*	240.60	2.36	2.34	7.22	9.73
RS-102_23_1*	400.84	2.37	3.72	12.03	9.28
RS-102_24_1*	241.33	2.33	2.95	7.24	12.22
RS-102_29	212.28	2.36	2.24	6.37	10.55
RS-102_30_1*	292.86	2.32	3.48	8.79	11.88
RS-102_31	244.37	2.42	2.26	7.33	9.25
RS-102_32	277.44	2.41	3.01	8.32	10.85
RS-102_33	214.11	2.38	2.15	6.42	10.04

RS-102

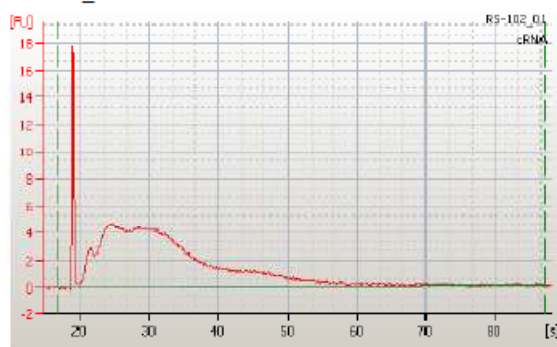
RS-102_34	222.78	2.37	2.11	6.68	9.47
RS-102_36	231.13	2.34	2.16	6.93	9.35
RS-102_37	162.76	2.42	1.61	4.88	9.89
RS-102_38	184.00	2.35	1.59	5.52	8.64
RS-102_39	280.53	2.36	3.50	8.42	12.48
RS-102_40_1*	278.11	2.39	2.88	8.34	10.36

* Samples replacing previous samples that did not pass RNA integrity control.

3.4.2 cRNA analysis on 2100 Bioanalyzer

The quality of labeled cRNA was controlled using the 2100 Bioanalyzer. Results indicate successful amplification and labeling for all 32 cRNA samples. The electropherograms of 9 cRNA samples (1 sample per group) are shown below as examples.

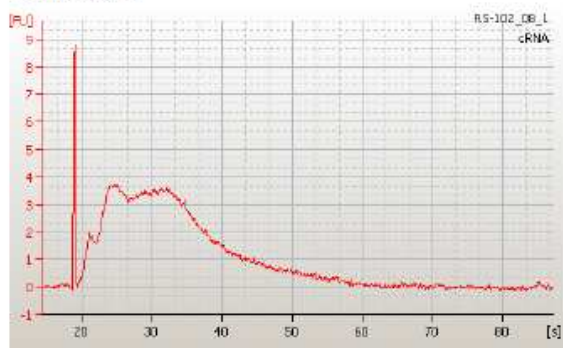
RS-102_01



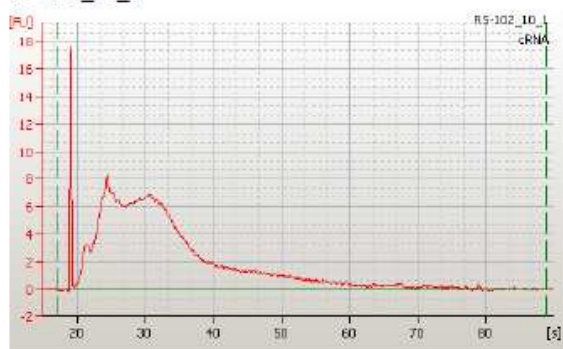
ANNEXOS

RS-102

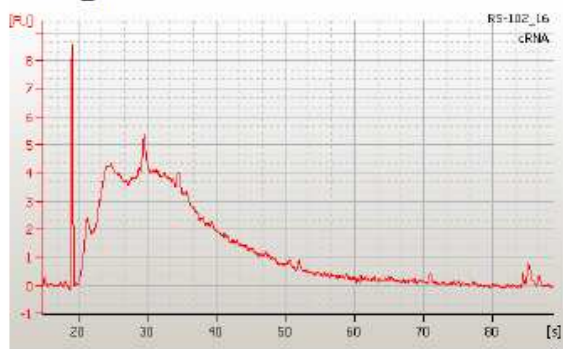
RS-102_08_1



RS-102_10_1

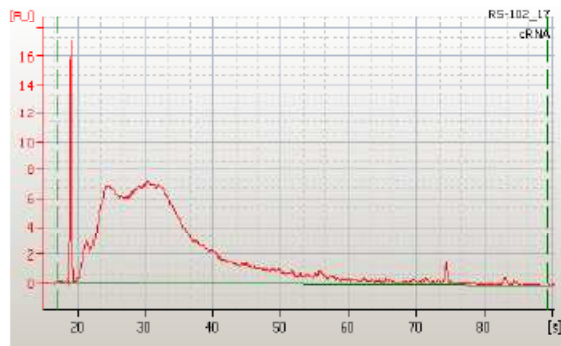


RS-102_16

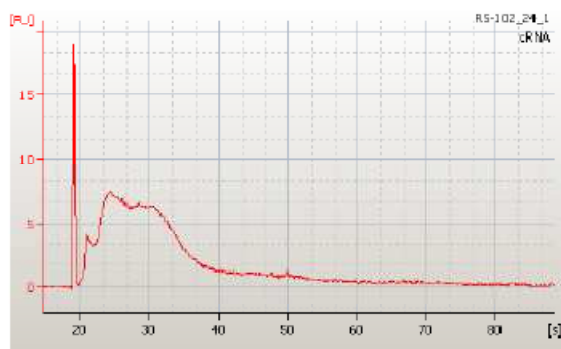


RS-102

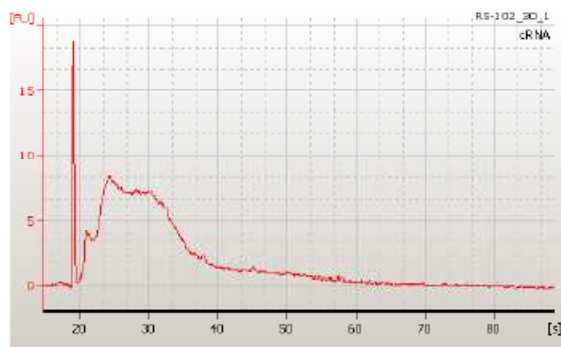
RS-102_17



RS-102_24_1

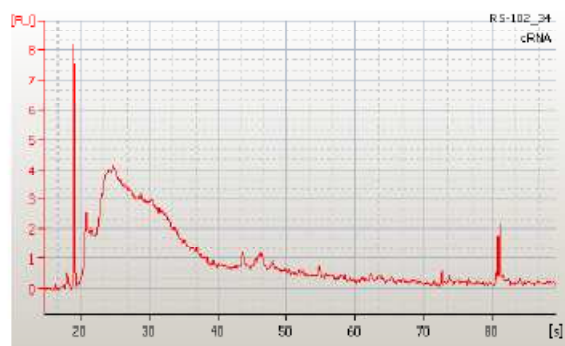


RS-102_30_1



RS-102

RS-102_34



RS-102_40_1

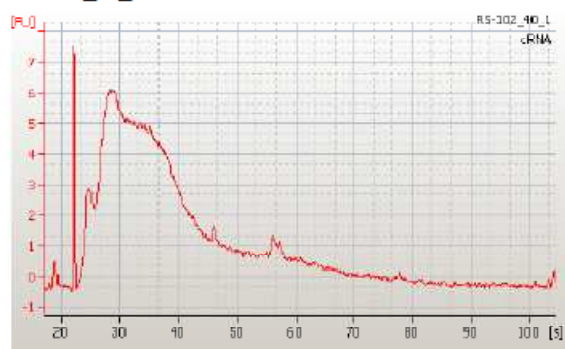


Fig. 5: 9 selected cRNA electropherograms out of 32 analyzed samples

RS-102

The electropherograms have been converted into virtual gel images.

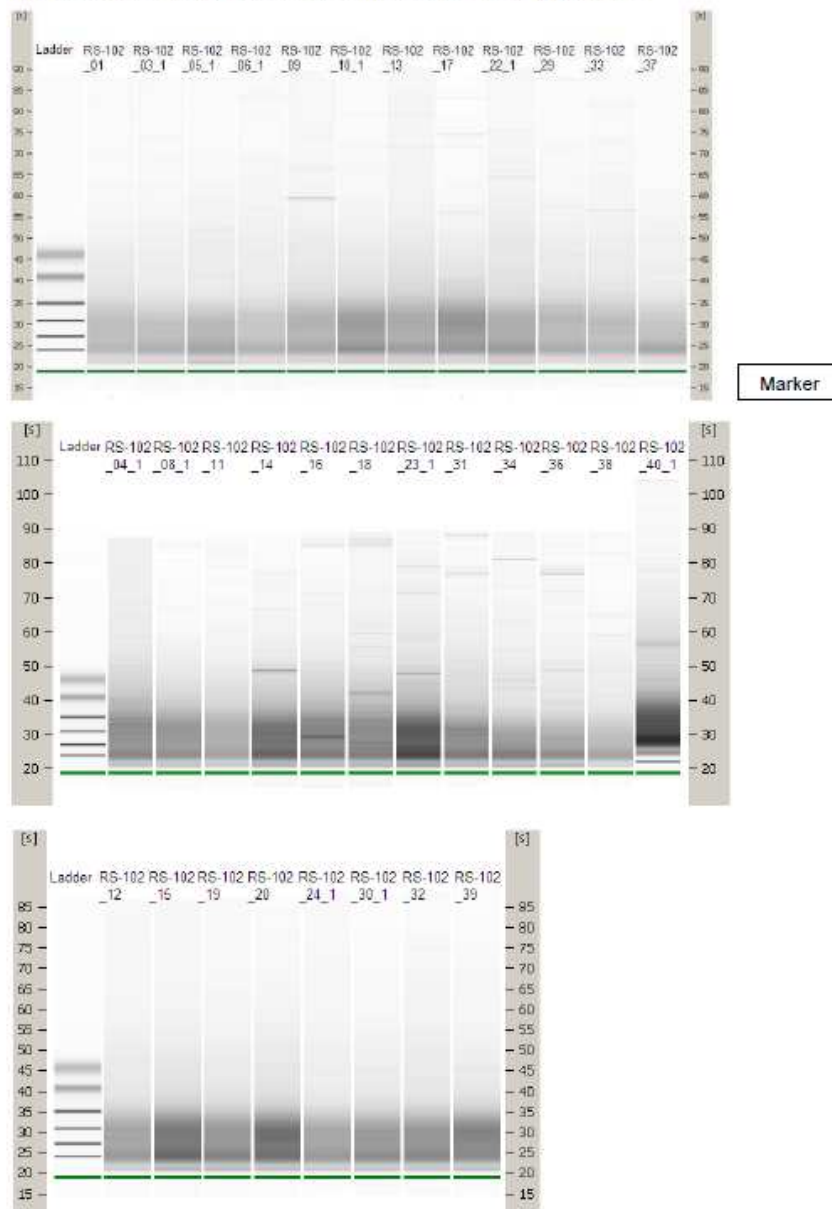


Fig. 6: Virtual gel images for 32 cRNA samples

RS-102

3.5 Microarray quality parameters

3.5.1 Feature Extraction 9.5.3.1 quality parameters

The QC Reports, generated by Feature Extraction software for each single array, can be used to evaluate array results. One can verify reliability of image processing results and detect common microarray hybridization or wash artifacts. The following QC reports were generated:

- *RS-102_01 (760_1_1).pdf*
- *RS-102_03_1 (760_1_2).pdf*
- *RS-102_04_1 (763_1_1).pdf*
- *RS-102_05_1 (760_1_3).pdf*
- *RS-102_06_1 (760_1_4).pdf*
- *RS-102_08_1 (763_1_2).pdf*
- *RS-102_09 (761_1_1).pdf*
- *RS-102_10_1 (761_1_2).pdf*
- *RS-102_11 (763_1_3).pdf*
- *RS-102_12 (766_1_1).pdf*
- *RS-102_13 (761_1_3).pdf*
- *RS-102_14 (763_1_4).pdf*
- *RS-102_15 (766_1_2).pdf*
- *RS-102_16 (764_1_1).pdf*
- *RS-102_17 (761_1_4).pdf*
- *RS-102_18 (764_1_2).pdf*
- *RS-102_19 (766_1_3).pdf*
- *RS-102_20 (766_1_4).pdf*
- *RS-102_22_1 (762_1_1).pdf*
- *RS-102_23_1 (764_1_3).pdf*
- *RS-102_24_1 (767_1_1).pdf*
- *RS-102_29 (762_1_2).pdf*
- *RS-102_30_1 (767_1_2).pdf*
- *RS-102_31 (764_1_4).pdf*
- *RS-102_32 (767_1_3).pdf*
- *RS-102_33 (762_1_3).pdf*
- *RS-102_34 (765_1_1).pdf*
- *RS-102_36 (765_1_2).pdf*
- *RS-102_37 (762_1_4).pdf*
- *RS-102_38 (765_1_3).pdf*
- *RS-102_39 (767_1_4).pdf*
- *RS-102_40_1 (765_1_4).pdf*

Visual control of the corner spots in the reports of each array confirmed correct automatic corner finding and grid placing for all 32 arrays analyzed in this study.

Analysis of the Agilent One-Color RNA Spike-In Plot demonstrated equal and good performance of each single labeling and hybridization experiment. When plotting the logarithmic concentration versus the logarithmic green processed signal, 8 out of 10 Spike-In transcripts showed linear behavior over 5 orders of magnitude for all except one array.

A linear Spike-In behavior for the samples RS-102_01 and RS-102_23_1 (shaded blue in Tab. 9) was only given for 7 and 5 out of 10 Spike-In transcripts, respectively. In addition the distribution of signal intensities was diminished. Therefore, these samples were excluded from further analysis. Both samples are members of control groups.

RS-102

In the following table the major quality parameters on outlier spots (data points or features), error correction and spike-in correlation are shown.

Tab. 9: Feature Extraction quality parameters

IMGM-internal Sample ID	Feature Non-Uniformity Outlier	Feature Population Outlier	Bkg Non-Uniformity Outlier	Bkg Population Outlier	Additive Error	R ² -Value Spike-In RNA
RS-102_01	5	120	13	514	2	0.99
RS-102_03_1*	14	60	34	910	1	1.00
RS-102_04_1*	7	65	0	559	2	0.99
RS-102_05_1*	11	85	24	1,561	2	1.00
RS-102_06_1*	17	99	9	1,171	2	1.00
RS-102_08_1*	34	68	11	958	2	1.00
RS-102_09	13	71	5	732	2	1.00
RS-102_10_1*	7	71	10	904	2	1.00
RS-102_11	3	89	12	1,398	2	1.00
RS-102_12	4	81	0	802	2	1.00
RS-102_13	5	86	11	1,421	2	1.00
RS-102_14	6	69	1	1,376	2	1.00
RS-102_15	6	81	13	893	2	1.00
RS-102_16	1	78	0	1,024	1	1.00
RS-102_17	1	90	7	1,524	2	1.00
RS-102_18	1	83	0	1,256	1	1.00
RS-102_19	8	75	10	764	2	1.00
RS-102_20	7	74	0	667	2	1.00
RS-102_22_1*	4	64	0	556	1	0.99
RS-102_23_1*	0	117	91	2,011	5	0.98
RS-102_24_1*	6	92	3	896	2	1.00
RS-102_29	20	101	11	1,099	2	1.00
RS-102_30_1*	23	80	21	962	2	1.00
RS-102_31	3	85	2	1,782	2	1.00
RS-102_32	8	73	5	937	2	1.00
RS-102_33	59	108	12	1,582	2	1.00
RS-102_34	3	67	0	756	2	1.00
RS-102_36	17	86	17	850	2	0.99
RS-102_37	55	94	4	1,255	3	1.00
RS-102_38	20	75	12	837	2	1.00
RS-102_39	13	92	0	751	2	1.00
RS-102_40_1*	5	73	2	748	2	1.00

RS-102

Spots are marked as **Feature Outliers** when its appearance is not circular like expected. They are marked as **Background (Bkg) Outlier** when the surrounding background is striking. **Non-Uniformity** indicates major differences in shape whereas **Population** denotes varieties in contrast to the surrounding area.

The number of Feature Non-Uniformity Outliers is the most powerful criteria and should be below 1% (411), whereas there is no limitation for the other ones. For all 32 arrays this criteria was fulfilled.

As defined for One-Color based hybridizations, the Additive Error is below 10 for each array.

The R²-Value mentioned in the table reflects the linearity of the One-Color RNA Spike-In Plot. The closer the R²-value is to 1, the better the linearity.

3.5.2 Microarray raw data

Raw data for extracted signal intensities is stored in*.txt format in the following files:

- *RS-102_01 (760_1_1).txt*
- *RS-102_03_1 (760_1_2).txt*
- *RS-102_04_1 (763_1_1).txt*
- *RS-102_05_1 (760_1_3).txt*
- *RS-102_06_1 (760_1_4).txt*
- *RS-102_08_1 (763_1_2).txt*
- *RS-102_09 (761_1_1).txt*
- *RS-102_10_1 (761_1_2).txt*
- *RS-102_11 (763_1_3).txt*
- *RS-102_12 (766_1_1).txt*
- *RS-102_13 (761_1_3).txt*
- *RS-102_14 (763_1_4).txt*
- *RS-102_15 (766_1_2).txt*
- *RS-102_16 (764_1_1).txt*
- *RS-102_17 (761_1_4).txt*
- *RS-102_18 (764_1_2).txt*
- *RS-102_19 (766_1_3).txt*
- *RS-102_20 (766_1_4).txt*
- *RS-102_22_1 (762_1_1).txt*
- *RS-102_23_1 (764_1_3).txt*
- *RS-102_24_1 (767_1_1).txt*
- *RS-102_29 (762_1_2).txt*
- *RS-102_30_1 (767_1_2).txt*
- *RS-102_31 (764_1_4).txt*
- *RS-102_32 (767_1_3).txt*
- *RS-102_33 (762_1_3).txt*
- *RS-102_34 (765_1_1).txt*
- *RS-102_36 (765_1_2).txt*
- *RS-102_37 (762_1_4).txt*
- *RS-102_38 (765_1_3).txt*
- *RS-102_39 (767_1_4).txt*
- *RS-102_40_1 (765_1_4).txt*

RS-102

3.5.3 Quality control metrics sets

The following figure on the next page visualizes the **quality control metrics sets** recorded by Feature Extraction Software. Within this set several quality parameters generated during processing of the scans and extraction of the signals are summarized.

In general, IMG M uses the predefined QC metrics set (Agilent Feature Extraction) called GE1_QCM_Feb07 including 9 different parameters that are described in the following table.

Tab. 10: Description of parameters used in quality control metrics set

GeneSpring Status	Feature Extraction Status	Description / Measures
eQCOneColorLinFitLog-LowConc	eQCOneColor LinFitLog-LowConc	Log of lowest detectable concentration from fit of Signal vs. Concentration of E1a probes
gNonCtrlMedCVPProcSignal	rNonCtrlMedPrnt CVBGSubSig(red channel)	The median percent CV of background-subtracted signals for inlier noncontrol probes
gE1aMedCVPProcSignal	geQCMedPrntCVBG Sub-Sig	Median CV of replicated E1a probes: Green Bkgd-subtracted signals
gSpatialDetrendRMSFilteredMinusFit	gSpatialDetrend RMSFilteredMinusFit	Residual of background detrending fit
absGE1E1aSlope	Abs(eQCOneColorLinFitSlope)	Absolute of slope of fit for Signal vs. Concentration of E1a probes
gNegCtrlAveBGSUBSig	gNegCtrlAve BGSUBSig	Avg of NegControl Bkgd-subtracted signals (Green)
Any-ColorPrntBGNonUnifOL	AnyColorPrnt BGNonUnifOL	Percentage of LocalBkgdRegions that are NonUniformity outlier in either channel
gNegCtrlSDevBGSUBSig	gNegCtrlSDev BGSUBSig	StDev of NegControl Bkgd-subtracted signals (Green)
Any-ColorPrntFeatNonUnifOL	AnyColorPrnt FeatNonUnifOL	Percentage of Features that are NonUniformity outliers

RS-102

All measured quality parameters of the QC metrics set GE1_QCM_Feb07 are comparable for all except two samples within and between the hybridized microarrays notwithstanding a slight variability (see Fig. 7 generated with GeneSpring GX 10 software).

Samples RS-102_04_1, RS-102_16 and RS-102_22_1 show a minor deviation from the other samples for the parameter 'gE1aMedCVProcSignal'. This is not a crucial factor.

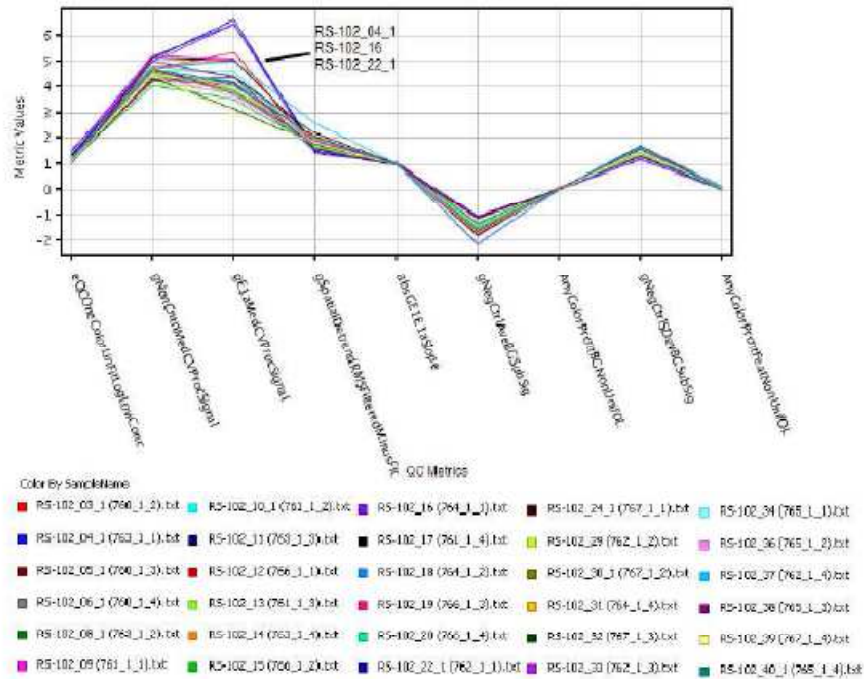


Fig. 7: Visualization of QC metrics set parameters

RS-102

3.5.4 Effects of normalization

The following box plot (Fig. 8) demonstrates the effect of quantile normalization.

Box plots are a visualization of data distribution: The middle 50% of the data lie within the colored boxes ("interquartile range" between the 25th and 75th percentile), and the horizontal line within the box indicates the median. Quantile normalization adjusts all microarray samples to an identical data distribution.

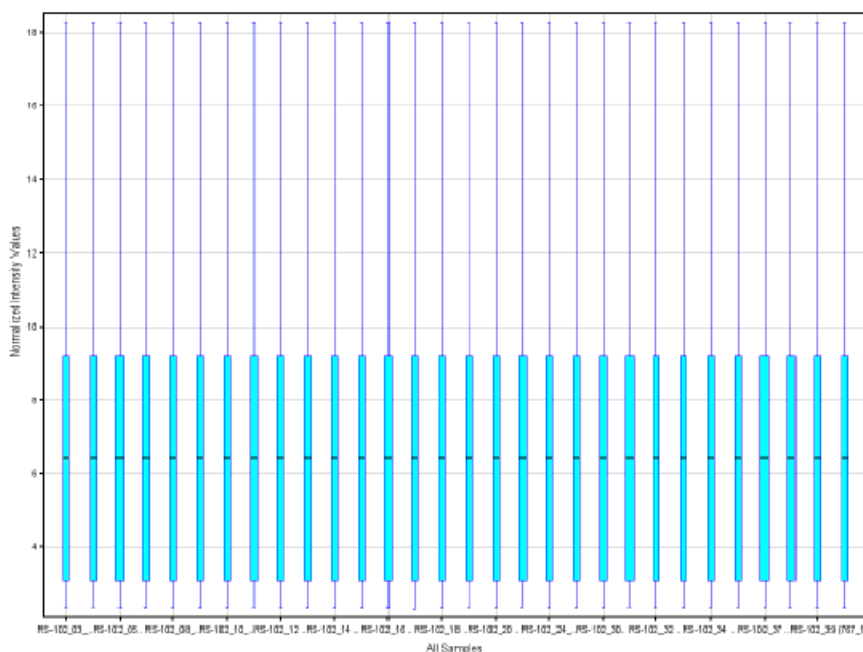


Fig. 8: Visualization of quantile normalization – BoxWhisker plot

RS-102

3.5.5 Filtering on flags

Present calls after filtering on flag information are summarized in the following table.

Tab. 11: Flag information for 36,273 out of 41,078 Probe IDs represented in at least one out of all 30 analyzed samples

IMGM-internal Sample ID	present	marginal	absent
RS-102_03_1*	32,022	12	4,239
RS-102_04_1*	30,278	5	5,990
RS-102_05_1*	30,626	10	5,637
RS-102_06_1*	31,184	15	5,074
RS-102_08_1*	31,363	27	4,883
RS-102_09	30,403	11	5,859
RS-102_10_1*	31,252	7	5,014
RS-102_11	30,243	3	6,027
RS-102_12	30,805	4	5,464
RS-102_13	31,400	5	4,868
RS-102_14	30,759	6	5,508
RS-102_15	30,807	5	5,461
RS-102_16	31,401	1	4,871
RS-102_17	31,642	1	4,630
RS-102_18	31,185	1	5,087
RS-102_19	31,503	8	4,762
RS-102_20	31,915	6	4,352
RS-102_22_1*	30,411	4	5,858
RS-102_24_1*	30,400	6	5,867
RS-102_29	30,294	18	5,961
RS-102_30_1*	29,883	21	6,369
RS-102_31	29,171	3	7,099
RS-102_32	30,801	8	5,464
RS-102_33	31,465	47	4,761
RS-102_34	29,608	3	6,662
RS-102_36	29,705	14	6,554
RS-102_37	28,433	49	7,791
RS-102_38	30,371	17	5,885
RS-102_39	31,506	8	5,209
RS-102_40_1*	29,840	4	6,429

RS-102

3.5.6 Correlation analysis

Similarity of the expression profiles of samples within and between the study groups was analyzed by determining Pearson's correlation coefficient r .

This analysis indicates that:

- The biological replicate samples within each group have a low to high correlation:
 - o correlation coefficient within group OM-C1 is 0.875
 - o correlation coefficients within group OM-C2 range from 0.896 to 0.965
 - o correlation coefficients within group OM-Ob1 range from 0.907 to 0.978
 - o correlation coefficients within group OM-Ob2 range from 0.867 to 0.966
 - o correlation coefficients within group OM-Ob3 range from 0.809 to 0.933
 - o correlation coefficients within group SC-C1 is 0.930
 - o correlation coefficients within group SC-Ob1 range from 0.900 to 0.974
 - o correlation coefficients within group SC-Ob2 range from 0.914 to 0.972
 - o correlation coefficients within group SC-Ob3 range from 0.911 to 0.981

- The similarity between samples from different groups lay in the same range.

Heterogeneities of each sample seem to have an influence on global gene expression. Furthermore, the correlation between samples of different treatments as well as samples from different locations suggests that their global gene expression profiles differ only slightly. The correlation values are visualized in Tab. 12 and Fig. 9.

ANNEXOS

RS-102

Tab. 42: Correlation matrix for all 30 samples

Group	Sample Name	OM-C1		OM-C2		OM-Ob1		OM-Ob2		OM-Ob3		SC-C1		SC-Ob1		SC-Ob2		SC-Ob3												
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2											
OM-C1	RI-101_06_1	1.000																												
	RI-101_04_1	0.875	1.000																											
OM-C2	RI-101_06_1	0.959	0.958	1.000																										
	RI-101_06_3	0.947	0.989	0.964	1.000																									
	RI-101_08_1	0.901	0.953	0.896	0.927	1.000																								
OM-Ob1	RS-102_08	0.873	0.892	0.880	0.904	0.923	1.000																							
	RI-102_10_1	0.915	0.870	0.947	0.952	0.933	0.952	1.000																						
	RS-102_11	0.871	0.927	0.857	0.902	0.942	0.917	0.907	1.000																					
	RS-102_12	0.927	0.857	0.956	0.957	0.929	0.937	0.971	0.918	1.000																				
UM-Ob2	RS-102_13	0.841	0.885	0.854	0.907	0.943	0.947	0.938	0.929	0.936	1.000																			
	RS-102_14	0.849	0.843	0.858	0.898	0.917	0.958	0.948	0.996	0.913	0.964	1.000																		
	RS-102_16	0.823	0.790	0.850	0.875	0.972	0.927	0.972	0.919	0.935	0.943	0.933	1.000																	
	RS-102_18	0.835	0.906	0.812	0.858	0.936	0.937	0.891	0.919	0.882	0.917	0.919	0.867	1.000																
UM-Ob3	RS-102_17	0.903	0.887	0.886	0.931	0.947	0.909	0.948	0.935	0.938	0.924	0.940	0.893	0.941	1.000															
	RS-102_18	0.824	0.909	0.826	0.873	0.919	0.853	0.865	0.931	0.852	0.903	0.867	0.848	0.885	0.907	1.000														
	RS-102_19	0.905	0.870	0.939	0.955	0.928	0.921	0.968	0.916	0.973	0.948	0.925	0.926	0.874	0.933	0.927	1.000													
	RS-102_20	0.907	0.905	0.929	0.913	0.923	0.920	0.906	0.922	0.914	0.918	0.957	0.929	0.922	0.895	0.909	0.910	1.000												
SC-C1	RI-101_22_1	0.915	0.876	0.966	0.933	0.995	0.863	0.925	0.889	0.921	0.884	0.929	0.813	0.795	0.858	0.793	0.918	0.838	1.000											
	RI-101_24_1	0.930	0.877	0.951	0.949	0.992	0.863	0.941	0.883	0.946	0.874	0.863	0.873	0.815	0.892	0.884	0.959	0.912	0.930	1.000										
SC-Ob1	RS-102_28	0.854	0.883	0.882	0.895	0.920	0.939	0.930	0.921	0.936	0.955	0.923	0.896	0.888	0.905	0.889	0.928	0.795	0.917	0.887	1.000									
	RI-101_30_1	0.931	0.877	0.970	0.948	0.901	0.890	0.934	0.866	0.943	0.867	0.848	0.837	0.812	0.873	0.812	0.938	0.884	0.966	0.954	0.900	1.000								
	RS-102_31	0.920	0.905	0.956	0.948	0.932	0.890	0.934	0.908	0.938	0.907	0.869	0.844	0.847	0.891	0.835	0.937	0.848	0.974	0.930	0.941	0.963	1.000							
	RS-102_32	0.929	0.891	0.951	0.949	0.916	0.890	0.947	0.901	0.911	0.907	0.881	0.881	0.846	0.902	0.862	0.962	0.884	0.957	0.966	0.937	0.974	0.966	1.000						
SC-Ob2	RS-102_33	0.921	0.912	0.948	0.955	0.944	0.907	0.946	0.928	0.951	0.923	0.898	0.872	0.865	0.919	0.873	0.963	0.879	0.954	0.946	0.945	0.955	0.976	0.969	1.000					
	RS-102_34	0.863	0.932	0.878	0.888	0.991	0.935	0.915	0.884	0.937	0.947	0.943	0.920	0.871	0.888	0.825	0.924	0.814	0.865	0.871	0.958	0.879	0.906	0.914	0.914	1.000				
	RS-102_38	0.845	0.834	0.879	0.893	0.888	0.921	0.915	0.894	0.923	0.944	0.914	0.918	0.866	0.889	0.862	0.932	0.789	0.880	0.885	0.964	0.877	0.914	0.926	0.914	0.972	1.000			
	RS-102_37	0.888	0.892	0.886	0.918	0.910	0.849	0.870	0.906	0.894	0.897	0.844	0.830	0.842	0.878	0.889	0.916	0.811	0.888	0.906	0.912	0.905	0.932	0.939	0.936	0.913	0.932	1.000		
	RS-102_38	0.905	0.904	0.908	0.927	0.928	0.896	0.885	0.917	0.912	0.903	0.859	0.840	0.851	0.867	0.891	0.922	0.827	0.898	0.911	0.917	0.915	0.939	0.938	0.938	0.924	0.931	0.981	1.000	
	RS-102_38	0.919	0.885	0.959	0.936	0.920	0.892	0.960	0.891	0.919	0.898	0.878	0.872	0.847	0.899	0.837	0.960	0.896	0.965	0.950	0.924	0.972	0.967	0.970	0.964	0.909	0.900	0.911	0.925	1.000
RI-101_40_1	0.924	0.901	0.945	0.941	0.921	0.898	0.913	0.905	0.932	0.895	0.854	0.846	0.835	0.886	0.872	0.943	0.847	0.952	0.947	0.931	0.988	0.967	0.978	0.960	0.913	0.932	0.965	0.969	0.956	1.000

RS-102

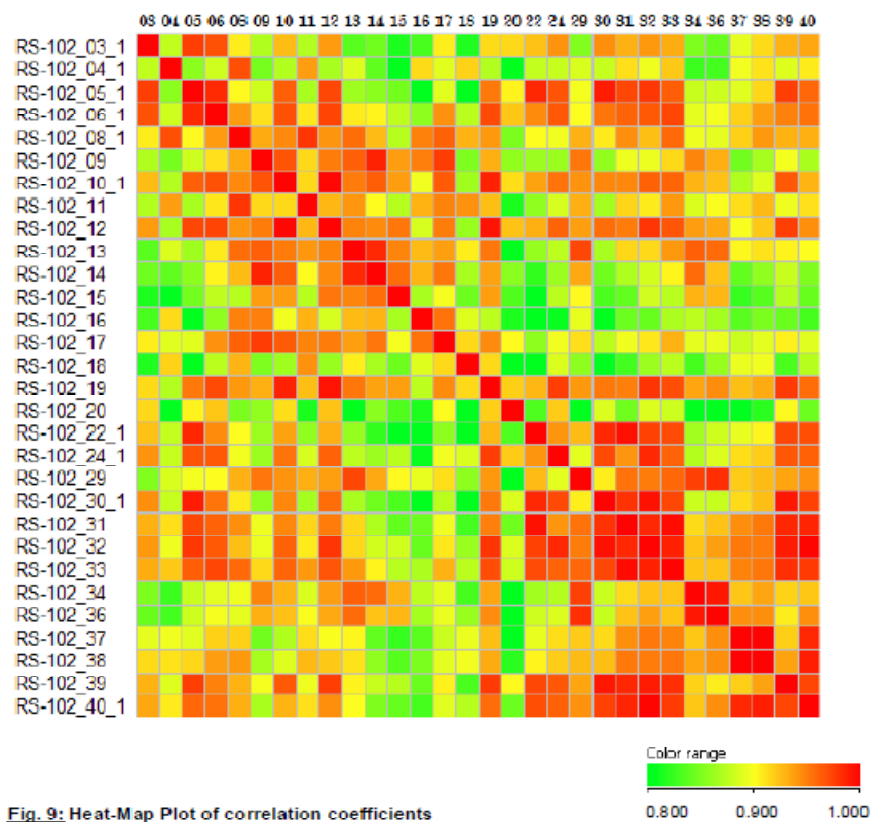


Fig. 9: Heat-Map Plot of correlation coefficients

ANNEXOS

Annex 2: Primers RT-PCR

Taula descriptiva *primers* emprats en l'anàlisi per RT-PCR de les mostres de teixit adipós.

Gen	Sonda	Gen	Sonda	Gen	Sonda	Gen	Sonda
<i>Adrbk1</i>	Hs00176395_m1	<i>Ctdnep1</i>	Hs00819400_s1	<i>Mogat3</i>	Hs00698325_m1	<i>Ppp1r3e</i>	Hs00397738_m1
<i>Agf</i>	Hs00240568_m1	<i>Dlk1 (pref1)</i>	Hs00171584_m1	<i>MSTN (miostatin)</i>	Hs00976237_m1	<i>Prdm16</i>	Hs00922674_m1
<i>Arrb1</i>	Hs00244527_m1	<i>Dram1</i>	Hs00218048_m1	<i>Nrip1</i>	Hs00942766_s1	<i>Prkar1a</i>	Hs00267597_m1
<i>Arrb2</i>	Hs01034135_m1	<i>Esrra</i>	Hs01067166_g1	<i>PDPN (podoplanina)</i>	Hs00366766_m1	<i>Prkar2b</i>	Hs00176966_m1
<i>Atg10</i>	Hs00228073_m1	<i>Fabp4</i>	Hs01086177_m1	<i>Pgm5</i>	Hs00222671_m1	<i>Prox1</i>	Hs00896294_m1
<i>Atg16l2</i>	Hs00400565_m1	<i>Fst (follistatin)</i>	Hs00246256_m1	<i>Pld6</i>	Hs00381651_m1	<i>Pygm</i>	Hs00989942_m1
<i>Atg3</i>	Hs00223937_m1	<i>Gabarapl1</i>	Hs00744468_s1	<i>Ppap2a</i>	Hs00170356_m1	<i>Rbfox2</i>	Hs00204814_m1
<i>Atg7</i>	Hs00197348_m1	<i>Gapdh</i>	Hs99999905_m1	<i>Ppap2b</i>	Hs00170359_m1	<i>Rgs1</i>	Hs01023772_m1
<i>Becn1</i>	Hs00186838_m1	<i>Gbe1</i>	Hs00609186_m1	<i>Ppap2c</i>	Hs00186575_m1	<i>Rip140</i>	Hs00940781_m1
<i>Bmp7</i>	Hs00233476_m1	<i>Gipr</i>	Hs00609210_m1	<i>Ppara</i>	Hs00947539_m1	<i>Slc2a4</i>	Hs00168966_m1
<i>Ccnd3</i>	Hs00236949_m1	<i>Gsk3b</i>	Hs01047719_m1	<i>Pparg</i>	Hs01115513_m1	<i>Stx4</i>	Hs00190266_m1
<i>Cept1</i>	Hs00196061_m1	<i>Gys1</i>	Hs00157863_m1	<i>Ppargc1a</i>	Hs01016719_m1	<i>Stxbp3</i>	Hs01029364_m1
<i>Chka</i>	Hs00608045_m1	<i>Lpcat1</i>	Hs00227357_m1	<i>Ppargc1b</i>	Hs00991677_m1	<i>TGFBR1 (avindin)</i>	Hs00610320_m1
<i>Chkb</i>	Hs01925200_s1	<i>Lpcat2</i>	Hs00215225_m1	<i>Ppia</i>	Hs99999904_m1	<i>Ucp1</i>	Hs00222453_m1
<i>Cnr1</i>	Hs00275634_m1	<i>Lpcat3</i>	Hs00195039_m1	<i>Ppia</i>	Hs99999904_m1	<i>Ucp2</i>	Hs01075227_m1
<i>Cntnap2</i>	Hs00204255_m1	<i>Lpcat4</i>	Hs00405723_m1	<i>Ppp1r3b</i>	Hs00226322_m1	<i>Ucp3</i>	Hs01106052_m1
CPT1A	Hs00912671_m1	MOGAT1	Hs00369695_m1	<i>Ppp1r3c</i>	Hs01921501_s1	<i>Ulk1</i>	Hs00177504_m1
CPT1B	Hs00189258_m1	MOGAT2	Hs00228268_m1	<i>Ppp1r3d</i>	Hs00901540_s1	<i>Vamp2</i>	Hs00360269_m1