

TESIS DOCTORAL

PROTEINA TRANSPORTADORA DE RETINOL TIPO 4 (RBP4) EN LA OBESIDAD.

Trabajo elaborado por
D. Rafael Ramírez Montesinos,
Licenciado en Medicina y Cirugía,
para optar al grado de Doctor.

El Dr. Cristóbal Richart Jurado, Jefe de Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Joan XXIII de Tarragona y Catedrático de Medicina Interna de la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona certifica que:

La Tesis Doctoral titulada "Proteína transportadora de retinol tipo 4 (RBP4) en la obesidad", presentada por D. Rafael Ramírez Montesinos, ha sido realizada bajo su dirección y cumple los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en Medicina.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma.

Dr. Cristóbal Richart Jurado.

Tarragona, Noviembre de 2008

Agradecimientos:

Al Dr. Richart Jurado, por su dirección clara y sin dudas.

A la Dra. Auguet Quintillà, por ser fuente inspiración y continuo aliento.

A la Dra. Broch Montaner, por su inestimable ayuda.

A la Dra. Olona Cabases por su orientación en el análisis estadístico.

A los compañeros del H. U. Joan XXIII por su colaboración y en especial al Servicio de Cirugía General por su labor en la recogida de muestras.

A la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, donde me enseñaron que a ser Médico se aprende cada día.

A la Facultad de Medicina de la Universidad de Tarragona, que me brinda la oportunidad de este continuo aprendizaje.

A D. Rafael Ramírez Vadillo, mi padre,
sin él nada habría sido posible.

Abreviaturas:

Å: amstrong.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AMPc: adenosin monofosfato cíclico.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ATP III: Adult treatment panel III.

cm: centímetro.

CD36: proteína de membrana 36.

CD68: proteína de membrana 68.

CRABP1: proteína transportadora de ácido retinoico celular tipo 1.

CRABP2: proteína transportadora de ácido retinoico celular tipo 2.

CRALBP: prtotína transportadora de retinal celular.

CRBP1: proteína transportadora de retinol celular tipo 1.

CRBP2: proteína transportadora de retinol celular tipo 2.

Da: dalton.

D-glucosa: isómero dextro de la glucosa.

dl: decilitro.

DLP: dislipemia.

DM: diabetes mellitus.

DM2: diabetes mellitus tipo 2.

ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

EGH: enfermedad grasa hepática.

FEV: fracción estromovascular.

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos.

GH: hormona del crecimiento.

GLUT 4: receptor de glucosa tipo 4.

gr: gramo.

h: hora.

Hb A1c: hemoglobina glicosilada.

HDLc: colesterol de lipoproteínas de alta densidad.

HG: hígado graso.

HOMA: modelo homeostático de insulinoresistencia.

HTA: hipertensión arterial.

IAM: infarto agudo de miocardio.

IC: índice de cintura.

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular tipo 1.

ICC: índice de cintura-cadera.

IG: intolerancia a la glucosa.

Il-2: interleuquina 2.

Il-4: interleuquina 4.

Il-6: interleuquina 6.

Il-10: interleuquina 10.

IMC: índice de masa corporal.

IR: insulinoresistencia.

IRBP: proteína transportadora de retinol de los interfotoreceptores .

kDa: kilodalton.

kg: kilogramos.

l: litro.

LDLc: colesterol de lipoproteínas de baja densidad.

LPS: lipopolisacárido.

m: metros.

m²: metro al cuadrado.

mg: microgramo.

ml: mililitro.

mm Hg: milímetro de mercurio.

mM: milimolar.

M: molar.

M 199: medio de cultivo M 199.

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1.

ng: nanogramo.

NTG: normotolerancia a la glucosa.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PAI-1: factor activador del plasminógeno tipo 1.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PEPCK: fosfatidil inositol 3 fosfato carboxi kinasa.

pg: picogramo.

PIP3: fosfatidil inositol 3 fosfato kinasa.

PNA: péptido natriurético auricular.

PPAR γ : receptor activador de proliferación de los peroxisomas tipo γ .

Prot C: proteína C reactiva.

RAR: receptor de ácido retinoico.

RAR α : receptor de ácido retinoico tipo α .

RAR α : receptor de ácido retinoico tipo α .

RAR β : receptor de ácido retinoico tipo β .

RAR β : receptor de ácido retinoico tipo β .

RAR γ : receptor de ácido retinoico tipo γ .

RAR γ : receptor de ácido retinoico tipo γ .

RBP: proteína transportadora de retinoides.

RBP4: proteína transportadora de retinol tipo 4.

RPMI: medio de cultivo RPMI.

SM: síndrome metabólico.

STRA6: receptor de membrana específico de RBP4.

sTNFR1: receptor soluble del factor de necrosis tumoral tipo 1.

sTNFR2: receptor soluble del factor de necrosis tumoral tipo 2.

TAs: tensión arterial sistólica.

TAd: tensión arterial diastólica.

TG: triglicérido.

TNF α : factor de necrosis tumoral tipo α .

TSH: hormona estimulante del tiroides.

TTR: transtirretina.

µg: microgramo.

µUI: microunidades internacionales.

UI: unidades internacionales.

VCAM-1: molécula de adhesión vascular tipo 1.

VIH: virus de inmunodeficiencia humana.

WB: western blot.

Índice:

<u>INTRODUCCIÓN</u>	Páginas 11-45
1- <i>Obesidad y diabetes mellitus tipo 2</i>	Página 11
2- <i>Adipocitoquinas en la obesidad</i>	Página 14
3- <i>Retinol binding proteins. Proteína transportadora de retinol tipo 4 (RBP4).</i>	
3.1 <i>RBP4 y otros metabolitos activos</i>	Página 17
3.2 <i>RBP4: Aspectos moleculares</i>	Página 18
3.3 <i>RBP4: Aspectos funcionales</i>	Página 19
3.4 <i>Primeros vínculos del RBP4 con el adipocito y la diabetes mellitus</i>	Página 21
3.5 <i>RBP4, una nueva adipoquina</i>	Página 24
4- <i>Asociación del RBP4 a parámetros de síndrome metabólico, obesidad e insulinoresistencia.</i>	
4.1 <i>Evidencias desfavorables</i>	Página 30
4.2 <i>Evidencias favorables</i>	Página 35
5- <i>Otras asociaciones del RBP4.</i>	
5.1 <i>RBP4 y función renal</i>	Página 42
5.2 <i>RBP4 y función hepática</i>	Página 43
<u>OBJETIVOS DEL ESTUDIO</u>	Páginas 46-47

METODOLOGÍA.....Páginas 48-54

6- *Selección de pacientes y procedimientos*.....Página 48

7- *Metodología de laboratorio*.....Página 50

8- *Estudio estadístico*.....Página 54

RESULTADOS.....Páginas 55-76

9- *Niveles séricos y expresión de ARNm de RBP4 en normopeso, sobrepeso y obesidad no mórbida*.....Página 55

10- *Niveles séricos y expresión de ARNm de RBP4 en la obesidad mórbida*.....Página 63

11- *Resultados sobre expresión de ARNm de RBP4 y otras adipocitoquinas en las diferentes fracciones del tejido graso subcutáneo*.....Página 71

12- *Resultados de expresión de ARNm de RBP4 en monocitos de sangre periférica y durante su diferenciación a macrófagos. Cultivos celulares tras la exposición a distintos estímulos proinflamatorios*.....Página 73

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.....Páginas 77-86

RESUMEN Y CONCLUSIONES.....Página 87

BIBLIOGRAFÍA.....Páginas 89-103

Introducción:

1 Obesidad y diabetes mellitus tipo 2.

La obesidad es una enfermedad crónica y multifactorial que presenta un componente de inflamación sistémica. Su incidencia está en un continuo y alarmante aumento desde hace años, llegando a ser definida por la OMS como la epidemia del siglo XXI.

Se define en función del índice de masa corporal (IMC), que estima el exceso de peso para una determinada altura. Resulta del cociente entre el peso en kg. y la talla en metros elevada al cuadrado. Así, hablamos de obesidad cuando el IMC es superior a 30 Kg/m², de sobrepeso cuando se halla entre 25 y 29'9 y de normopeso cuando se halla entre 18 y 24'9¹.

En España la prevalencia de obesidad es de un 15 % en adultos², mientras que en las personas de más de 65 años supera el 35 %³. Estimaciones recientes indican que la obesidad y el sobrepeso podrían ser responsables de un 6 % de los gastos sanitarios directos en algunos países europeos⁴.

A su creciente incidencia se han de añadir las consecuencias clínicas que conlleva. La obesidad está asociada a una reducción en la esperanza de vida y es un factor de riesgo de hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipercolesterolemia, riesgo cardiovascular general, litiasis biliar, síndrome de apnea del sueño, osteoartritis y diferentes neoplasias⁵. De hecho, se estima que las personas con obesidad presentan un incremento de mortalidad con respecto a aquellos con normopeso⁶.

Por su parte la DM2 es una condición metabólica compleja y heterogénea caracterizada por la elevación de los niveles de glucosa en suero, debido principalmente a la disminución en la acción y secreción de insulina.

La diabetes mellitus (DM) ejerce una influencia enorme en el deterioro de las condiciones de salubridad de la población mundial. Una evaluación reciente

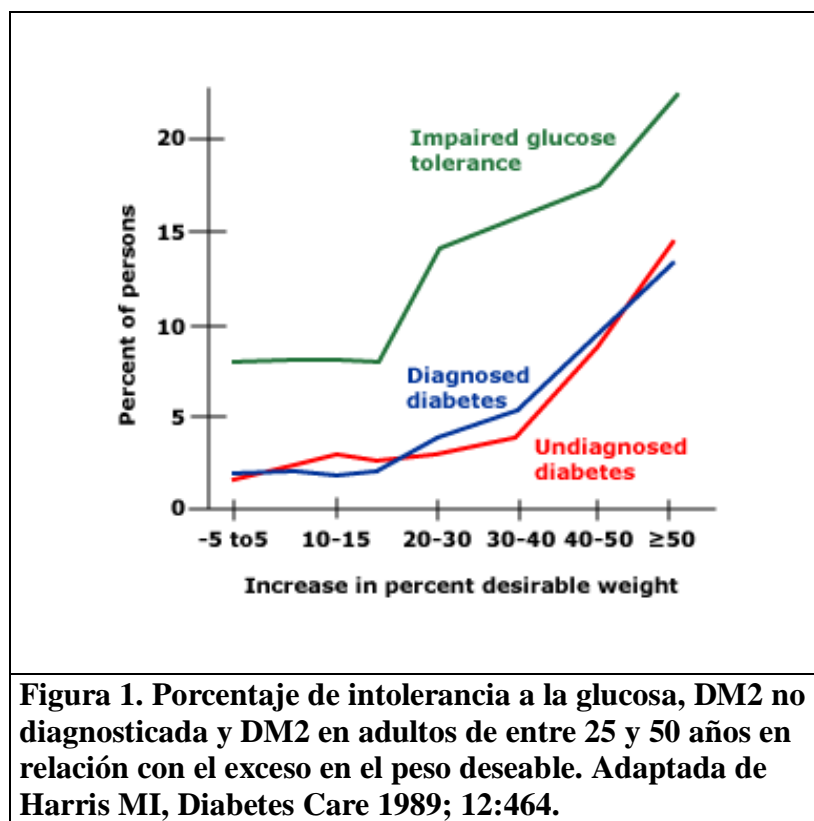
usando un modelo genérico automatizado de la enfermedad reveló que el exceso de la mortalidad global debido a la DM en el año 2000 era equivalente aproximadamente a un 5.2 % de todas las muertes en el mundo, siendo probablemente la quinta causa principal de muerte ⁷.

La prevalencia de la DM en el mundo fue estimada en el año 2000 en torno a un 2.8 %, y se prevé que en el año 2030 podría alcanzar un 4.4 % (la mayoría sería DM2). Así existen expectativas de que el número total de personas con DM en el mundo ascienda de 171 millones en el año 2000 a 366 millones en el 2030 ⁸.

En términos económicos, la DM2 supone importantes despesas dentro del presupuesto total sanitario en muchos países. En los Estados Unidos, según la asociación americana de la diabetes el coste total del manejo de la enfermedad en 2002 supuso aproximadamente un 1.3 % del producto interior bruto de dicho país ⁹.

En España, la reciente revisión de Ruiz Ramos et al. ¹⁰ ha estimado una prevalencia de DM2 de entre el 4'8 y el 18'7 % de la población, con una incidencia de nuevos casos de entre 146 y 820 por cada 100.000 habitantes. Los gastos ocasionados por la DM2 en nuestro país oscilarían entre los 381 y los 2560 euros por paciente y año.

El incremento en la incidencia mundial de DM2 se acompaña en paralelo de un incremento en la incidencia de obesidad ¹¹. De hecho, el porcentaje de pacientes con intolerancia a los hidratos de carbono o DM2 aumenta a medida que nos excedemos en nuestro peso ideal. Esto se puede apreciar en la figura 1.



Esta relación se basa en el papel cardinal que representan los hábitos en el estilo de vida en la patogenia de la DM2. Tanto la inactividad física como la adiposidad están asociadas independientemente tanto al riesgo de DM2, como al de padecer complicaciones derivadas de ésta ¹².

En fases precoces de la DM2 se produce una disminución en la sensibilidad a la insulina. Así, se define la insulinoresistencia (IR) como el estado en el cual existe una respuesta inferior a la normal ante una concentración dada de insulina exógena o endógena. Esta IR, que es posiblemente el mejor predictor de DM2, se halla estrechamente relacionada con la obesidad. Además es un factor de riesgo cardiovascular independiente, siendo el riesgo cardiovascular una de las principales causas de mortalidad globales tanto en diabéticos como en no diabéticos ¹³.

Entre los diferentes mecanismos involucrados en la patogenia de la obesidad y de la IR asociada a ella se encuentran las adipoquinas.

2 Adipocitoquinas en la obesidad.

El tejido adiposo, denominado también tejido graso, se divide en tejido adiposo blanco (la casi totalidad del mismo) y pardo (prácticamente exclusivo del periodo fetal). El 80 % del tejido adiposo corporal se distribuye en localización subcutánea, siendo sólo un 10 % visceral.

El tejido adiposo blanco se compone de adipocitos (85 %) rodeados de un tejido conectivo vascularizado e innervado que se denomina fracción estromovascular. En la fracción estromovascular se encuentran diferentes tipos celulares como macrófagos, fuente de citoquinas y mediadores de la inflamación, los fibroblastos y los precursores de adipocitos. Este tejido adiposo, cuya función clásica fue la de almacén de energía, juega hoy un reconocido papel en la homeostasis energética y otros múltiples procesos ¹⁴.

La identificación en tejido adiposo de la lipoprotein lipasa (enzima que hidroliza los triglicéridos) y posteriormente de la adiposina (proteína del complemento) fueron los primeros hallazgos que confirmaban que el tejido adiposo no cumple un mero papel de depósito energético. Posteriormente, la descripción del factor de necrosis tumoral tipo α (TNF α) y fundamentalmente de la leptina, han modificado definitivamente la concepción actual del tejido adiposo, precipitando la descripción de múltiples moléculas de secreción grasa. A estas moléculas se las denomina indistintamente adipocitoquinas o adipocitoquinas, si bien el segundo término es más amplio, al hacer mención a la secreción de la molécula por cualquier tipo celular del tejido graso, y no sólo por el adipocito. La mayoría de las adipocitoquinas han sido identificadas en base a la detección de su expresión genética en muestras de tejido adiposo o a su presencia en cultivos adipocitarios. Su diversidad hasta la fecha es amplia, diferenciándose enzimas, hormonas, proteínas transportadoras, factores de crecimiento, proteínas estructurales...La siguiente tabla, adaptada de una reciente revisión sobre la materia ¹⁵ muestra las adipocitoquinas descritas hasta la fecha, clasificadas según su mecanismo de acción.

Tabla 1. Factores producidos por el tejido adiposo blanco.

Proteínas secretoras	Receptores	Enzimas y transportadores
Leptina Adiponectina Resistina Angiotensinógeno TNF α Interleuquina 6 (Il-6) Adipsina Proteína estimuladora de la acetilación Factor adiposo inducido por el ayuno Visfastina PAI-1 Factor tisular Factor transformante de crecimiento tipo β Proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1 Vaspina Proteína transportadora de retinol tipo 4 (RBP4)	Péptidos y glucoproteínas	Metabolismo lipídico
	Insulina Glucagón Hormonas estimulante del tiroides (TSH) Hormona de crecimiento (GH) Gastrina/colecistoquinina β Adiponectina Angiotensina II	Lipoprotein lipasa Apolipoproteína E Proteína transportadora de ésteres de colesterol Proteína adipocitaria transportadora de ácidos grasos CD 36
	Citoquinas	Metabolismo glucídico
	TNF α Leptina Il-6	Sustrato del receptor de insulina 1,2 Fosfatidil inositol 3 kinasa (PIP3) Glucógeno sintetasa kinasa 3 α GLUT 4 Protein kinasa $\lambda\zeta$ Protein kinasa
	Nucleares	Metabolismo esteroideo
Glucocorticoides Estrógenos Progesterona Andrógenos Hormonas tiroideas Vitamina D Factor nuclear $\kappa\beta$ Receptor activador de la proliferación de los peroxisomas tipo γ (PPAR γ)	Aromatasa 11 β hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 1 17 β hidroxisteroide deshidrogenasa	

A pesar de que muchas de las adipocitoquinas están implicadas en diferentes procesos fisiológicos, en general se podrían clasificar las funciones adipocitoquímicas en:

- *Procesos inflamatorios:*
 - TNF α : Conocido reactante de fase aguda, producido por macrófagos.
 - Il-6: También reactante de fase aguda proinflamatorio. Producida también por los macrófagos. Ambas alaboran en la IR (inhiben la autofosforilación del receptor de insulina tipo 1).

- Monocyte chemoattractant protein type 1 (MCP-1).
- Intracellular adhesion mollecula tipe 1.
- Platelet endotelial cell adhesion tipe 1.
 - *Función enzimática hormonal:*
- 11 β hidroxilasa: Convierte en activos diferentes metabolitos corticoideos.
- 17 β hidroxisterioide deshidrogenasa: Convierte esteroides sexuales débiles en fuertes (ej. estrona a estradiol).
 - *Regulación de la tensión arterial:*
- Angiotensinógeno: Precursor de angiotensina II, eleva la presión arterial.
- Factor inhibidor del plasminógeno: Inhibe la fibrinólisis.
 - *Función inmunológica- respuesta de estrés:*
- Adipsina: Componente de la vía alternativa de activación del complemento.
 - *Metabolismo lipídico:*
- Lipoprotein lipasa: Hidroliza triglicéridos a ácidos grasos y glicerol.
 - *Metabolismo de hidratos de carbono:*
- Leptina: Suprime el apetito, inhibe la síntesis de insulina y estimula la oxidación de ácidos grasos. Además disminuye la función tiroidea, la activación nerviosa simpática y la termogénesis.
- Adiponectina: Mejora la sensibilidad a la insulina. Además tiene funciones hipolipemiantes y antiaterogénicas.
- Resistina: Ligada a IR en roedores, hecho no probado en humanos.
- Visfastina: Puede unirse al receptor de la insulina compartiendo las funciones de ésta.
- RBP4: Recientes estudios le otorgan un papel ligado a la IR y a la obesidad.

3 Retinol binding proteins. Proteína transportadora de retinol tipo 4 (RBP4).

3.1. RBP4 y otros metabolitos activos.

El ácido retinoico (vitamina A) mantiene en el organismo unos niveles constantes para sintetizar sus metabolitos activos, los retinoides. Entre éstos se encuentran el cis y el trans retinol, los ácidos 9 cis retinoico y transretinoico, el 11 cis retinal y el trans retinal entre otros. El retinol es un alcohol lipídico (procedente de la vitamina A) de 20 carbonos y que se asemeja al colesterol en algunas de sus propiedades. Así, igual que otros lípidos circula en el organismo formando lipoproteínas con una densidad respecto a la del agua de 1'21 (igual que algunas de las lipoproteínas transportadoras de colesterol). Estas lipoproteínas de retinol, desarrollan distintas funciones en la regulación del transporte, metabolismo y acciones de los retinoides a los que se asocian.

Desde la primera definición de la retinol binding protein (RBP) por Kanai, Raz y Goodman ¹⁶, se han descrito distintos tipos de RBP, tanto en compartimentos intracelulares como extracelulares ¹⁷. Así, además de la RBP originaria, hoy se conocen las retinol binding proteins celulares (CRBP I y II), las retinal binding proteins celulares, las retinol binding proteins de interfotorreceptores (CRALBP e IRBP) y las ácido retinoico binding proteínas (CRABP I y II). Según su nomenclatura genética existe la tendencia de denominar a la RBP como RBP4 (proteína transportadora de retinol tipo 4).

Tabla 2. Proteínas transportadoras de retinoides.

Proteína	Familia	Peso molecular (kDa)	Ligando principal
RBP (RBP4)	Lipocalina	21	All-tras-retinol
CRBP-I	Proteínas transportadoras de lípidos intercelulares (iLBP)	15	All-trans-retinol/all-trans-retinal
CRBP-II	Proteínas transportadoras de lípidos intercelulares (iLBP)	15	All-trans-retinol/all-trans-retinal
CRABP-I	Proteínas transportadoras de lípidos intercelulares (iLBP)	14	Ácido all-trans-retinoico
CRABP-II	Proteínas transportadoras de lípidos intercelulares (iLBP)	14	Ácido all-trans-retinoico
CRALBP	Desconocida	36	11 cis-retinol/11 cis-retinal
IRBP	Desconocida	136	All-trans-retinol/11 cis-retinal
Proteína transportadora de retinol tipo 4 (RBP4). Retinol binding proteins celulares (CRBP-I y CRBP-II). Retinal binding proteins celular (CRALBP). Retinol binding proteins de interfotorreceptores (IRBP). Ácido retinoico binding proteins celulares tipo I y II (CRABP-I y CRABP-II).			

3.2. RBP4: Aspectos moleculares.

El RBP4 es un polipéptido de 21000 Da con una velocidad de sedimentación de 2'26 S y unos 40 Å. de diámetro. Codificado en el cromosoma 10q 23-24, sus niveles plasmáticos oscilan en torno a los 40 - 60 ug/ml ¹⁸, siendo posiblemente más elevados en los varones.

Su estructura genética fue descrita por primera vez en el hepatocito ¹⁹, e incluye 6 exones relativamente cortos y 5 intrones. Los mismos autores identificaron al

menos 3 regiones reguladoras de la expresión. Estas regiones incluían 2 promotores de la expresión no específicos (ya que regulaban la expresión de otras líneas celulares) y un represor de la expresión.

Su estructura primaria se compone de 182 aminoácidos formando 8 cadenas β dispuestas de un modo antiparalelo unidas entre sí por puentes de hidrógeno y 2 cadenas α . En su estructura secundaria, el extremo amino terminal de la proteína le hace adoptar una forma de cúpula y la presencia de una serie de aminoácidos bastante constante le confiere un dominio hidrofóbico al interior de la estructura, lo que permite alojar en su interior al trans retinol ²⁰. La conformación terciaria se estabiliza mediante puentes disulfuro, adoptando una morfología de cilindro octogonal con forma de cáliz que da nombre a una superfamilia de lipoproteínas, las lipocalinas ²¹.

Las lipocalinas son unas proteínas ampliamente distribuidas tanto en el reino animal como vegetal, cuya característica fundamental es la de transportar y distribuir pequeñas moléculas hidrofóbicas. Juegan un importante papel en diferentes procesos inmunológicos y del desarrollo, estando también implicadas en las reacciones del organismo a situaciones de estrés y en la transducción de señales ²².

3.3. RBP4: Aspectos funcionales.

Tras su absorción intestinal, los ésteres de retinol son transportados en quilomicrones hacia el hígado, principal localización de síntesis de RBP4. No obstante, en modelos animales se conocen otros lugares de secreción de RBP4 como el tejido adiposo, los riñones, los pulmones, el corazón, el músculo esquelético, el bazo, las células de Sertoli del testículo, los plexos coroideos del cerebro y la retina.

La secreción de RBP4 está estrechamente regulada por la disponibilidad de retinol. En ausencia de éste se inhibe la secreción de RBP4, acumulándose la proteína en el retículo endoplasmático. En presencia de retinol, el RBP4 se une a él en el aparato de Golgi, y es segregado como holo-RBP4 (RBP4 con retinol),

como se puede apreciar en la figura 2. De este modo se encuentra generalmente en plasma, si bien también puede encontrarse como apo-RBP4 (RBP4 sin retinol).

En ambos casos circula unido a la transtirretina (TTR) antes conocida como prealbúmina transportadora de tiroxina. Cada TTR se une a 2 moléculas de RBP4 resultando una molécula final de 80000 Da. El mayor tamaño protege al RBP4 de su filtración renal y su extravasación al espacio intercelular.

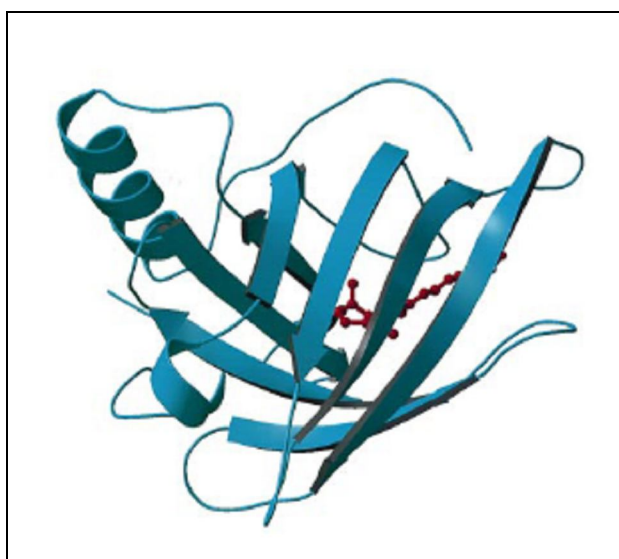


Figura 2. Imagen tridimensional del RBP4 transportando en su interior retinol (holoRBP4).

La liberación del retinol al citosol celular, dado su carácter lipídico, podría realizarse por difusión pasiva a través de la membrana celular. De hecho en la mayoría de las células el pool de retinol plasmático y citosólico está cercano al equilibrio. Además, es conocida la capacidad de transportar holoRBP4 del receptor Megalin GP 330, si bien se trata de un transporte inespecífico²³.

En el citosol, el retinol puede esterificarse por la retinol lecitil acyl transeferasa para su almacenamiento u oxidarse a ácido retinoico. El ácido retinoico se une a sus receptores nucleares, que se denominan RAR. Se distinguen RAR α , RAR β y RAR γ y RAR α RAR β y RAR γ , actuando todos ellos como factores de regulación de la transcripción. De este modo algunos de estos receptores

promueven y otros inhiben la expresión de diferentes genes. Este es el mecanismo de acción retinol dependiente del RBP4.

Recientemente ha sido descrita la posibilidad de un mecanismo de acción retinol independiente, directamente derivado de la unión del RBP4 a un receptor de membrana. En este sentido, es de trascendental importancia la identificación y codificación genética en el año 2007 del STRA6, primer receptor específico de RBP4 en humanos ²⁴.

La función transportadora de retinol con el mecanismo de acción retinol dependiente ha sido clásicamente la única reconocida para el RBP4. De este modo, el papel del RBP4 en la oftalmología, por ejemplo, se debe al aporte de retinol al epitelio retiniano y a la activación de algunos de los factores de transcripción mencionados. No obstante, se ha sugerido un papel metabólico del RBP4 más allá de la distribución de retinol, relacionándolo con la IR y la obesidad. Para ello han sido determinantes el conocimiento clásico de la relación existente entre los retinoides y la DM y el descubrimiento en el año 2006 de la capacidad del adipocito humano de expresión y secreción del RBP4 ⁴⁵.

Pese a todo, los únicos casos de déficit de RBP4 descritos en humanos tan sólo expresaron ceguera nocturna y signos de carotenodermia (coloración anaranjada cutánea) ^{25, 26}. De igual modo recientemente han sido descritos 2 casos de mutación del gen del STRA6, los cuales se presentaron con anoftalmia y diversas malformaciones congénitas, pero sin alteraciones metabólicas ²⁷.

3.4. RBP4: Primeros vínculos con el adipocito y con la diabetes mellitus.

RBP4 y adipocito.

Antes incluso de la descripción de las primeras adipoquinas, distintos estudios en animales demostraron ya la existencia de una expresión adipocitaria del RBP4.

Los primeros en identificar ácido ribonucleico (ARN) de RBP4 en adipocito de rata fueron Makover et al.²⁸ en el año 1989. Posteriormente Tsutumi et al. profundizaron en el papel del tejido adiposo en el metabolismo del RBP4²⁹. Objetivaron por primera vez que la expresión y secreción del RBP4 corresponde fundamentalmente al propio adipocito y no a la fracción estromovascular, ocurriendo principal y casi exclusivamente en el adipocito maduro. Además diferenciaron niveles de expresión distintos en función del origen del tejido adipocitario estudiado (grasa parda, epidídimo, inguinal, perinéfrico...). Incluso estimaron que el tejido adiposo expresaba un 20 % del RBP4 que expresa el hígado con lo que probablemente colabore de modo considerable a la cantidad total de RBP4 en roedores.

Sus resultados fueron corroborados por Zovich et al. quienes demostraron en cultivos de preadipocitos sometidos a diferenciación y marcados con metionina que el adipocito, además de expresar, segrega RBP4³⁰. La presencia de RAR tanto en preadipocito como en adipocito les hizo postular además que los retinoides pueden jugar un papel en la diferenciación del tejido adiposo.

En este sentido, también utilizando modelos de adipocitos de rata, Okuno et al. demostraron que la regulación de la expresión del RBP4 es diferente de la de otros retinoides³¹. En su trabajo, la expresión de RBP4 no se vió influenciada por el retinol o por la dexametasona ni en el hepatocito ni en el adipocito de rata como en cambio si ocurre con el resto de los retinoides.

De hecho, además de las diferencias en la regulación de la expresión en roedores del RBP4 con respecto a los demás retinoides, también existen variaciones de ésta en función del tejido estudiado. Al menos esto se infiere del estudio de Whitmann et al.³². Estos autores, basándose en que previamente se habían reportado variaciones en los niveles humanos de RBP4 durante los cambios puberales³³, analizaron el influjo estrogénico en su expresión en riñón o en hígado de rata. Objetivaron que el tratamiento con estrógenos incrementaba los niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de RBP4 en el riñón pero no en el hígado. Además el tratamiento hormonal con hidroxitamoxifeno

(antiestrógeno) bloqueaba la expresión de RBP4 estrógeno-inducida en el riñón. Esto sugería que la expresión renal del RBP4 podría modularse mediante el receptor nuclear estrogénico, difiriendo así de la hepática.

Similares conclusiones podemos extraer del trabajo de Rosales et al ³⁴. En él, compararon la expresión hepática y renal de RBP4, en ratas con inflamación inducida (con la inyección de lipopolisacárido (LPS)) o sin ella (con la inyección de suero). En ambas localizaciones objetivaron una disminución de la expresión de ARNm de RBP4 tras el estímulo proinflamatorio. Además esta disminución, difería entre órganos, siendo mayor en el hígado que en el riñón. De este modo corroboraron que la regulación del metabolismo del RBP4 en roedores presenta posiblemente diferentes mecanismos en el hígado y en el riñón.

En resumen, la expresión de RBP4 en adipocito de modelos animales es conocida desde hace años. De estos trabajos se infiere que es diferente a la de otros retinoides y que varía en función del origen del tejido graso del que proceda. Además la regulación del metabolismo del RBP4 difiere en función de cual sea el órgano implicado, riñón o hígado. En cualquier caso parece que disminuye ante estímulos proinflamatorios.

RBP4 y diabetes mellitus.

Por otra parte, ya desde finales de los años 80 han sido reportadas concentraciones plasmáticas y urinarias de RBP4 elevadas tanto en adultos como en niños con DM ^{35,36}.

Dicha relación fue cuestionada inicialmente por Sasaki et al. quienes estudiaron el RBP4 plasmático en diabéticos sin microalbuminuria o nefropatía hallándolo indistinto del que presentaban los sujetos sanos ³⁷.

Posteriormente, Basualdo et al. volvieron a reevaluar la relación entre el RBP4 circulante y la DM2 ³⁸. Para ellos las concentraciones de RBP4 fueron nuevamente superiores en la DM2. De hecho, el mal control metabólico fue

predictor de niveles superiores de RBP4 en los diabéticos, insinuando que dichos niveles podrían estar relacionados con la hiperinsulinemia.

Los resultados previos ^{35, 36, 38} fueron corroborados en 1999 por Abahusain et al ³⁹. En su trabajo, tanto RBP4 sérico como urinario fueron mayores en los diabéticos. Además la excreción urinaria de RBP4 era mayor en aquellos diabéticos con insuficiencia renal.

En conjunto, estas referencias aportan consistencia a la existencia de un vínculo entre el RBP4 plasmático y la DM2, posiblemente mayor en el mal control diabético y en la insuficiencia renal. No obstante, no podemos extraer conclusiones acerca de dicha relación en estadios prediabéticos o en DM de corta evolución, aún sin microalbuminuria.

3.5. RBP4, una nueva adipoquina.

Una vez probada la expresión adipocitaria de RBP4 en modelos animales y teniendo en consideración las referencias mencionadas ^{35, 36, 38, 39} que constataban la existencia de una relación del RBP4 circulante con la DM2 en humanos, se desarrollaron dos trabajos que resultaron determinantes para la nueva concepción de esta molécula ^{40, 42}.

En el primero de ellos, Abel et al. plantearon la posibilidad de que en roedores la expresión y secreción adipocitaria de alguna sustancia pudiera conferir IR sistémica ⁴⁰.

Para ello estudiaron ratones con delección selectiva de GLUT4 en adipocito y los compararon con controles. El GLUT 4 es un importante receptor para la captación de glucosa en el organismo y se halla disminuido precozmente en estados de IR, en el adipocito pero no en el músculo esquelético ⁴¹. Teniendo en cuenta el importante papel del músculo en la captación de glucosa y el escaso papel del adipocito en este sentido, el significado de la baja expresión adipocitaria de GLUT 4 en los estados de IR resultaba intrigante.

Estos ratones desarrollaron IR tanto en músculo como en hígado. Además, el grado de IR en ratones con déficit selectivo de GLUT 4 adipocitario fue similar al que presentaban otro grupo de ratones con ablación selectiva de GLUT 4 muscular.

El mecanismo molecular parecía ser la disminución en la estimulación de fosfatidil inositol 3 fosfato por parte de la insulina. De hecho, esta estimulación se encontraba disminuida tanto en el músculo como en el hígado de los roedores. En resumen, la delección de GLUT 4 y consecuentemente del transporte de glucosa en adipocito podía causar IR sistémica e incrementar el riesgo de padecer DM2. De aquí se podía inferir que el adipocito podría actuar como un sensor de glucosa y modular su metabolismo sistémico mediante la liberación de algunas sustancias en respuesta a sus niveles.

En el segundo trabajo, Yang et al. identificaron el posible papel del RBP4 como sustancia capaz de producir IR sistémica, al menos en roedores ⁴². Para ello estudiaron el mismo tipo de ratones con delección de GLUT 4 adipocitaria. Éstos, además de desarrollar IR en hígado y músculo, presentaron un incremento en la expresión de ARN de RBP4 adipocitario y en sus niveles plasmáticos.

Posteriormente, al tratarlos con rosiglitazona, disminuían la expresión y los niveles plasmáticos de RBP4, mejorando su sensibilidad a la insulina. Ante el escaso papel del adipocito en la regulación de los niveles de glucosa y la estrecha relación entre obesidad e IR, plantearon la hipótesis de que el RBP4 podía ser la molécula que, segregada en el adipocito, confiriera IR a músculo e hígado.

Con esta hipótesis manipularon genéticamente algunos ratones para que sobreexpresaran RBP4 o les inyectaron RBP4 recombinante, objetivando que se convertían en insulinoresistentes. Del mismo modo, a ratones con obesidad inducida, el hecho de disminuir sus niveles de RBP4 administrándoles fenretinide (análogo retinoide que aumenta la eliminación renal de RBP4), les hacía mejorar su IR.

Por último, al investigar el mecanismo por el cual el RBP4 provocaba IR en hígado y músculo hallaron que la sobreexpresión de RBP4 en músculo reducía la

fosforilación de la subunidad 1 del receptor de la insulina, dificultando su activación (vía fosfatidil inositol 3 fosfato). En hígado promovía la expresión de la fosfoenol piruvato carboxi quinasa, con la consecuente hiperglucemia (curiosamente la expresión de esta enzima está estimulada por los retinoides).

De este modo Yang et al.⁴² demostraban que el RBP4 está implicado en el mecanismo por el cual se desarrolla IR en roedores. Además este fue el primer estudio en este campo que incluyó un pequeño grupo de humanos, en el que se hallaron niveles plasmáticos de RBP4 mayores en obesos diabéticos que en obesos no diabéticos. Ambos eran mayores que los de delgados.

La siguiente figura (Fig.3) ilustra el mecanismo de acción del RBP4 como adipoquina propuesto por estos autores.

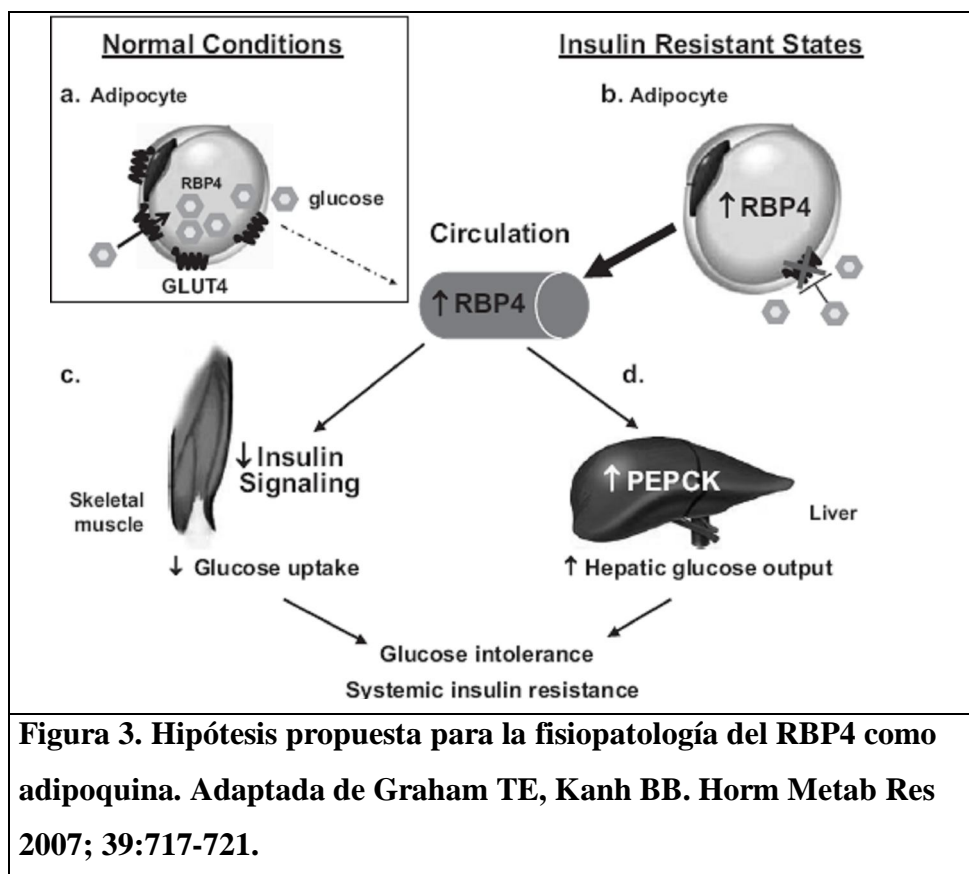


Figura 3. Hipótesis propuesta para la fisiopatología del RBP4 como adipoquina. Adaptada de Graham TE, Kanh BB. Horm Metab Res 2007; 39:717-721.

Posteriormente fue publicado en New England Journal of Medicine el primer estudio dirigido específicamente a analizar en humanos la relación del RBP4 con la IR y la obesidad⁴³. En dicho trabajo Graham et al. determinaron los niveles

circulantes de RBP4 en 3 grupos poblacionales, incluyendo sujetos delgados, obesos no diabéticos y obesos diabéticos.

Los niveles de RBP4 se correlacionaron con la magnitud de la IR en obesos no diabéticos, obesos diabéticos, intolerantes a la glucosa (IG) e incluso en sanos delgados pero con antecedentes familiares de DM2.

También se correlacionaron con IMC, índice cintura cadera (ICC) y diferentes factores de riesgo cardiovascular como triglicéridos (TG), HTA sistólica (TAs) y descenso en el colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDLc).

En un segundo tiempo, promovieron activamente el ejercicio físico en un subgrupo de pacientes, objetivando una disminución en los niveles circulantes de RBP4 tan sólo en aquellos en los que existió un incremento en la sensibilidad a la insulina. La expresión de GLUT 4 en los adipocitos de estos pacientes se correlacionó negativamente con los niveles plasmáticos de RBP4.

En conclusión, este trabajo vinculaba estrechamente al RBP4 con la IR en humanos ya que aparecía elevado en plasma incluso antes de que ésta se desarrollara. En cambio, la coexistencia de una asociación con la adiposidad parece ser menos consistente dado que, a pesar de hallar relación entre IMC y RBP4, el vínculo entre RBP4 e IR se presentaba de igual modo en delgados sanos.

De hecho, en el posterior trabajo de Cho et al.⁴⁴ no fue posible corroborar la relación entre RBP4 y a obesidad. El RBP4 se correlacionó con glucosa, insulina y perímetro de cintura, pero no con IMC o peso. En cambio sí que corroboraron unos niveles plasmáticos de RBP4 mayores en los diabéticos y los intolerantes a la glucosa que en los normotolerantes a la glucosa.

Tampoco para Janke et al.⁴⁵ el RBP4 tenía un papel cardinal en relación a la obesidad. Al menos esto podemos extraer de su estudio que, además, fue el primero en identificar expresión de RBP4 en adipocito humano confirmándolo como una nueva adipoquina.

Estos autores, teniendo en cuenta que el modelo propuesto en roedores de disminución de GLUT 4/aumento de RBP4 no había sido validado en humanos, determinaron la expresión de RBP4 y GLUT 4 en grasa subcutánea y los niveles circulantes de RBP4 en mujeres con diferentes IMC. En contra de lo descrito con anterioridad en animales ⁴², hallaron la expresión de RBP4 disminuida en las obesas y sus niveles plasmáticos similares en todos los grupos. De hecho, lejos de identificar una correlación inversa entre la expresión de GLUT4 y de RBP4 objetivaron entre ambas una fuerte correlación positiva, independientemente de otros factores (IMC, edad).

De este modo, parece que podrían existir profundas diferencias entre los roedores y los humanos en cuanto a la regulación del RBP4 adiposo o circulante.

Es más, en un subgrupo en el que promovió la reducción ponderal sólo existió un discreto descenso en la expresión de RBP4, sin significado en sus niveles plasmáticos. En cambio el HOMA sí mejoró considerablemente. Estos datos no corroboraban lo hallado por Graham et al. ⁴³, con lo que la controversia en cuanto a la relación entre RBP4 y obesidad, se hacía también extensible a la relación entre RBP4 e IR, al menos en sujetos sanos.

En cualquier caso, el conjunto de los trabajos previos confirma al RBP4 como una nueva adipocina humana que podría estar relacionada con la IR en la DM2 y quizás también asociarse a la obesidad o a determinados índices de adiposidad. No obstante, dichas asociaciones parecen menos consistentes en la obesidad aislada o en sujetos sanos. De cualquier modo, estas nuevas perspectivas funcionales del RBP4 han generado en la actualidad un debate científico de creciente interés.

Tabla 3. Estudios iniciales acerca del RBP4 circulante y sus correlaciones con índices de obesidad e insulinoresistencia.

Variable	Yang	Graham	Cho	Janke
N	ND	107	154	74
Obesidad	+	+	No	No
IMC	ND	+	No	No
Distribución grasa (IC/ICC)	ND	+	+	ND
DM2	+	+	+	ND
Índices de IR (HOMA)	ND	+	+ ^Ψ	No

ND: No disponible. No: Ausencia de correlación. +: Correlación positiva.
^Ψ: IR evaluada mediante insulina y glucosa.

4 Asociación del RBP4 a parámetros de síndrome metabólico, obesidad e insulinoresistencia.

4.1. Evidencias desfavorables.

La ausencia de asociación del RBP4 con la obesidad en los trabajos de Cho et al.⁴⁴ y de Janke et al.⁴⁵, y con la IR en el segundo de ellos diferían de lo reportado inicialmente en roedores y humanos^{42, 43}. En este sentido, estudios más recientes han coincidido de igual modo en refutar dichas asociaciones.

Las primeras evidencias desfavorables en este sentido fueron publicadas a modo de cartas al director del mismo New England Journal of Medicine a colación del trabajo previo de Graham et al.⁴³. En la primera de ellas Takashima et al.⁴⁶ en su estudio de 473 pacientes normotolerantes a la glucosa hallaron que los niveles plasmáticos de RBP4 no se correlacionaron ni con IMC o ICC ni con HTA, insulina o glucosa. Sólo coincidían en la correlación entre niveles circulantes de RBP4 y TG. No obstante se deben tener en consideración las diferencias étnicas de la población estudiada, asiática en lugar de caucásica.

En la segunda tampoco Erikstrup et al.⁴⁷, que estudiaron pacientes de etnia caucásica con DM2, IG o normotolerancia a la glucosa (NTG), demostraron correlación alguna entre los niveles plasmáticos de RBP4 y el grado de IR. En cambio si hallaron nuevamente una correlación con los TG y el colesterol total.

Nuestro propio grupo de trabajo trató de evaluar la secreción y la sensibilidad a insulina en relación con los niveles circulantes de RBP4 en varones sanos con distinto grado de obesidad⁴⁸. Tampoco para nosotros la concentración de RBP4 difirió en función de IMC, ICC o parámetros del metabolismo glucídico. En cambio, sí se correlacionó el RBP4 con la secreción de insulina, especialmente en el grupo de obesos.

Por su parte, Von Eynatten et al.⁴⁹ determinaron el RBP4 plasmático en diabéticos, pacientes con enfermedad coronaria y controles, sin hallar en ninguno de los grupos relación ni con el HOMA ni con el IMC. En cambio la adiponectina si que mostró correlaciones positivas con HDLc y negativas con IMC, HOMA y TG.

Tampoco para Silha et al.⁵⁰ al comparar composición corporal, IR y adipoquinas inflamatorias en 2 poblaciones étnicamente distintas de mujeres sanas, existió relación de alguna de éstas variables con el RBP4. Por el contrario, la IR sí se correlacionó de modo directo con la leptina e inversamente con la adiponectina.

Igualmente Min Jeong Shin et al.⁵¹ estudiaron el RBP4 circulante y otras adipoquinas en 67 dislipémicos, sin obesidad ni DM2. Para ellos, tanto la glucosa como de nuevo los TG se asociaron al RBP4. En cambio con la insulina o el HOMA no existió relación alguna. En cuanto al resto de adipoquinas se asoció negativamente el RBP4 con la adiponectina con independencia de edad, sexo o IMC.

Resulta interesante esta relación negativa teniendo en cuenta que la adiponectina promueve la captación de glucosa y la oxidación de ácidos grasos mediante la estimulación de la adenosin monofosfato cíclico (AMPc) protein kinasa⁵², con lo que tendría una función contraria a la propuesta para el RBP4. En este sentido, el RBP4 induce la expresión de la fosfoenolpiruvato carboxi quinasa, sobre cuya transcripción ejerce un efecto negativo la AMPc protein kinasa.

Tabla 4. Estudios en contra de la relación del RBP4 circulante con la obesidad y la insulinorresistencia.

Variable	Takashima	Erikstrüp	Silha	Broch	Min Jeong	Von Eynatten
N	473	234	263	107	67	356
IMC	No	No	No	No	ND	ND
Parám. de distribución grasa (ICC)	No	No	ND	No	ND	ND
Parám. de IR (HOMA)	No ^ψ	No	No	No	No	No
Perfil lipídico	+	+	ND	ND	+	+

ND: No disponible. No: Ausencia de correlación. +: Correlación positiva.
^ψ: IR evaluada mediante insulina y glucosa.

Teniendo en cuenta la contraposición de estos trabajos con los estudios iniciales en animales y humanos ^{42, 43, 44} hemos de considerar la posibilidad de que la relación del RBP4 con la IR o la obesidad no sea tan estrecha como parecía inicialmente, al menos en determinados grupos poblacionales.

Se debe tener en cuenta también la posible variabilidad en función de la metodología de determinación del RBP4 circulante. De hecho Graham et al. ⁵³ tras comparar diferentes métodos para determinar el RBP4 alertaron sobre la existencia en todos ellos de un solapamiento entre los valores de RBP4 en pacientes con IG y con NTG. Por otra parte, este trabajo nos mostró por primera vez la necesidad de corregir los valores circulantes del RBP4 en función de determinados parámetros bioquímicos como la TTR o de fármacos como el acenocumarol.

En otro orden de cosas, diversos trabajos han analizado igualmente la expresión adipocitaria de ARNm de RBP4 en diferentes situaciones de obesidad e IR.

Inicialmente Aiwei Yao-Borengasser et al.⁵⁴ determinaron los niveles plasmáticos y la expresión de RBP4 en tejido adiposo visceral, subcutáneo y muscular de pacientes con IG o NTG y distintos IMC. En dicho trabajo, ni los niveles plasmáticos ni la expresión en ninguno de los tejidos analizados mostraron relación con IMC o sensibilidad a insulina.

En cuanto a la relación entre expresión de RBP4 y de GLUT 4 en el adipocito, ésta resultó positiva, tal como habían descrito previamente Janke et al.⁴⁵, y refutando los estudios iniciales en roedores⁴². Además, en los pacientes con IG iniciaron tratamiento con metformina o pioglitazona, hallando que el segundo de los fármacos, pese a mejorar la sensibilidad a la insulina, inesperadamente incrementaba la expresión de RBP4. En cambio no modificaba sus niveles plasmáticos. El tratamiento *in vitro* de cultivos adipocitarios con pioglitazona obtuvo el mismo efecto, lo que les hizo postular que el fármaco podía tener un efecto directo sobre el adipocito.

Por último, resulta significativa la estrecha correlación positiva que objetivaron entre la expresión de RBP4 y diferentes parámetros del infiltrado inflamatorio del tejido graso como son el MCP-1 y la proteína CD68.

Por su parte Tam et al.⁵⁵ analizaron la expresión en grasa subcutánea de RBP4 y GLUT 4, y sus niveles plasmáticos y proteicos en 20 mujeres (10 de ellas con ovario poliquístico).

Sus resultados mostraron tanto en mujeres con sobrepeso como con ovario poliquístico un incremento en la expresión adipocitaria de RBP4 y un descenso en la de GLUT4. Además los niveles plasmáticos de RBP4 fueron significativamente mayores en estos grupos. No obstante, a pesar de reproducir por primera vez en humanos la correlación negativa entre expresión adipocitaria de RBP4 y de GLUT 4 descrita en roedores, no pudieron reproducir su significado, al no hallar relación entre el RBP4 plasmático y el HOMA.

Vitkova et al.⁵⁶ también analizaron los niveles plasmáticos y la expresión adipocitaria de RBP4 en relación con la sensibilidad a insulina. Lo interesante de

este estudio es que, con la hipótesis de la existencia de una posible relación entre el RBP4 circulante y el perfil nutricional, sometió a 24 mujeres obesas a una dieta hipocalórica.

Tanto los niveles plasmáticos de RBP4 como su expresión adipocitaria disminuyeron durante la fase de dieta, aunque ni estos niveles ni su variación inducida por la dieta difirieron en función del grado de obesidad o de sensibilidad a la insulina. Así, el RBP4 podría estar regulado en función de la reducción calórica o la pérdida ponderal, pero es cuestionable la regulación en función de la sensibilidad a la insulina o de la obesidad. De este modo, su comportamiento se podría ajustar más al de un marcador nutricional, que al de un marcador de IR. La expresión de GLUT 4 se volvió a comportar igual que la de RBP4, de acuerdo con trabajos previos^{45, 54} y refutando nuevamente los resultados en modelos animales.

Por último, el estudio sobre la regulación de la expresión de RBP4 llevados a cabo por Sell et al.⁵⁷ cuestiona también el presunto papel del RBP4 en la IR.

En él, los preadipocitos de grasa mamaria (muy similar a la subcutánea) de mujeres con normopeso o con sobrepeso fueron tratados con adiponectina, troglitazona o TNF α . Mientras el TNF α disminuía la expresión de RBP4 y la adiponectina no la alteraba, la troglitazona, la aumentaba hasta casi un 100 %. Este dato, ya reportado previamente⁵⁴, se oponía al hallazgo de que la rosiglitazona en roedores disminuye la expresión y los niveles de RBP4 y, por ende, mejora su IR⁴². Además, el hecho de que la expresión adipocitaria de RBP4 disminuya con el estímulo del TNF α (el cual a su vez está asociado a la IR) induce a cuestionar el papel del RBP4 en la sensibilidad a insulina.

En este sentido, recientemente se ha descrito también que la secreción de RBP4 disminuye con la influencia del péptido natriurético auricular⁵⁸ (PNA). Teniendo en cuenta que tanto PNA como TNF α estimulan la lipólisis, la expresión de RBP4 podría estar ligada a ésta. De hecho, es de llamativa importancia la consistente asociación existente entre el RBP4 y los TG^{43, 46, 47, 49, 51, 59, 72, 75}. En consonancia, debemos señalar que en modelos animales manipulados

genéticamente para inhibir la expresión del gen de RBP4 existe una importante disminución de ácidos grasos, precursores de los TG ⁴¹.

Tabla 5. Estudios sobre expresión genética en tejido graso subcutáneo y niveles plasmáticos de RBP4. Correlaciones con obesidad e insulinoresistencia.

Estudio	Yao	Tam	Vitkova
N	86	20	36
Parámetros de IR (HOMA)	No	No	No ^ψ
Obesidad	No	No ^ᵇ	No
Relación entre expresión y RBP4 plasmáticos	No	No	No

ND: No disponible. No: Ausencia de correlación.
^ψ: IR evaluada mediante clamp euglucémico-hiperinsulinémico.
^ᵇ: Relación con los niveles plasmáticos de RBP4.

En conjunto, parece que existen también importantes diferencias entre humanos y roedores en cuanto a la expresión adipocitaria de RBP4. Tanto la contribución de ésta a la IR sistémica en humanos como su asociación con la obesidad o los índices de adiposidad requieren de posteriores trabajos a fin de ser confirmadas. De hecho podría tratarse de un marcador de estado nutricional o simplemente reflejar alteraciones en el metabolismo lipídico. En cualquier caso, su posible papel como marcador precoz de dichas alteraciones así como su asociación a algunos componentes del síndrome metabólico (SM) está por definir.

4.2. Evidencias favorables.

Numerosos autores han corroborado un papel del RBP4 relacionado con la IR, la obesidad y diferentes parámetros de adiposidad y de SM, a pesar de las referencias mencionadas previamente ^{45, 46, 47, 48, 49, 50, 51}.

Duk Chul Lee et al. ⁵⁹ analizaron el papel del RBP4 plasmático en jóvenes sanos. Los niveles de RBP4 eran mayores en los más obesos y se correlacionaron positivamente con los índices de adiposidad (IMC, ICC e IC), TAs y tensión

arterial diastólica (TAd), HOMA y perfil lipídico (colesterol total y TG). Además estos autores hallaron nuevamente una correlación del RBP4 plasmático con diferentes índices inflamatorios sistémicos (proteína C y recuento leucocitario).

Por su parte, Shai Gavi et al.⁶⁰ diseñaron su estudio para determinar si en delgados sanos sin antecedentes familiares de DM2 se confirmaba la relación entre niveles plasmáticos de RBP4 e IR hallada por Graham et al. en delgados sanos que sí tenían antecedentes familiares⁴³.

Si bien consiguieron reproducir dicha asociación entre RBP4 e IR, ésta se perdía tras ajustar por IMC y edad (de hecho objetivaron una correlación positiva del RBP4 con la edad). Por otra parte, pese a no hallar relación entre RBP4 plasmático e IMC, sí la hallaron con el porcentaje de grasa troncal, postulando que el RBP4 no se segrega de un modo uniforme por todos los adipocitos, sino que podría estar relacionado con la distribución de grasa entre central (troncal) o periférica (extremidades).

En este sentido se desarrolló el posterior trabajo Klöting et al.⁶¹. En él profundizaron acerca de la relación entre RBP4 y adiposidad visceral, teniendo en cuenta que esta última se asocia con la DM2 y la IR^{62, 63, 64}, y que su reducción mediante omentectomía mejora la sensibilidad a la insulina en sujetos obesos⁶⁵.

Globalmente, la expresión de RBP4 en grasa visceral fue 5 veces mayor que en subcutánea. De igual modo esta expresión fue mayor en la grasa visceral de los obesos comparados con la de los delgados y en la de los diabéticos o intolerantes a la glucosa comparados con los normotolerantes. Como ocurría en modelos animales, se correlacionó de modo negativo con la expresión adipocitaria de GLUT 4 en grasa visceral. Así, este trabajo corroboraba por primera vez en humanos tanto la hipótesis de descenso de GLUT4/incremento de RBP4 como su significado en cuanto a la IR. En cambio esta correlación no se reprodujo en el tejido graso subcutáneo. Hemos de recordar que en éste, diferentes trabajos

previos^{44, 54, 56} habían fracasado al tratar reproducir la correlación negativa entre ambas variables.

En lo que respecta al RBP4 circulante, también era mayor en diabéticos o intolerantes a la glucosa que en normotolerantes a la glucosa y en obesos que en delgados. Se correlacionó inversamente con el índice de disponibilidad de glucosa y el HDLc, y positivamente con IMC, IC, glucosa, colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDLc) y TG. Además, se halló una correlación positiva e independiente entre el área de grasa abdominal y el RBP4 plasmático, siendo esta correlación mayor que la hallada con otras adipoquinas (leptina, Il-6, visfagina o adiponectina, esta última negativa).

Por su parte, la relación entre el RBP4 y diferentes componentes del SM apreciada con anterioridad⁴³, se ha consolidado tras el trabajo Quibin Qi et al.⁶⁶, hasta la fecha es uno de los estudios con mayor número de sujetos incluidos. Estos autores evaluaron la distribución de RBP4 plasmático y su relación con SM definido por los criterios del Adult Treatment Panel III (ATP III)⁶⁷ en un total de 3289 pacientes. Dichos niveles se asociaron positivamente a IMC, TG, LDLc y colesterol total, HOMA e insulina y negativamente con HDLc y adiponectina. Aumentaban progresivamente a medida que se sumaban componentes del SM, de modo que los pacientes en el cuartil superior de RBP4 presentaban el doble de riesgo de presentar SM que los del cuartil inferior, incluso a pesar de que éstos se hallaran en el cuartil inferior de HOMA. Esto sugería que la elevación de los niveles de RBP4 por sí misma podría incrementar el riesgo de SM, de un modo independiente de la IR.

De igual modo, los pacientes en el cuartil superior de RBP4 presentaron un incremento en la odds ratio de hipertrigliceridemia de 5´61, francamente superior a los de obesidad central (2´08), TA elevada (1´85), HDLc disminuido (1´5) o hiperglucemia (1´13). Esta fuerte asociación entre RBP4 e hipertrigliceridemia, como ya hemos analizado, constante en múltiples referencias previas^{43, 46, 47, 49, 51, 59, 72, 75}, podría plantear nuevas perspectivas en cuanto al papel del metabolismo de retinol en la patogénesis del SM. De hecho se conoce el efecto del tratamiento

con 13 cis-retinoico en determinadas enfermedades dermatológicas aumentando el riesgo de padecer SM ^{68,69}.

También en el terreno del SM infantil el RBP4 podría tener cierta implicación. En este sentido, Aeberli et al. ⁷⁰ analizaron la presencia de diferentes componentes del SM en niños, en relación con el RBP4 y su ratio con el retinol. Tanto el RBP4 como el cociente RBP4/retinol se correlacionaron con TG, obesidad (IMC) y adiposidad central (ICC), con independencia de la inflamación subclínica (proteína C, Il-6) y la edad. No obstante sólo el cociente RBP4/retinol se correlacionó con la IR, lo que sugería que el RBP4 podría ligar adiposidad y SM vía retinol dependiente y vía retinol independiente, al menos en niños.

En resumen, de los trabajos expuestos se extrae que el RBP4 puede estar ligado a la obesidad y al SM incluso con independencia de la IR. En cuanto a la relación con los parámetros de obesidad, parece que podría ser la adiposidad visceral la más directamente asociada al mismo.

A esto hemos de añadir además, las evidencias extraídas de diferentes estudios prospectivos que también han explorado la relación del RBP4 plasmático con estas variables.

Balagopal et al. estudiaron el comportamiento del RBP4 circulante en 21 niños realizando una intervención encaminada a modificar el estilo de vida en los 15 que eran obesos ⁷¹. En dicho trabajo, los niveles basales de RBP4 fueron más elevados en los obesos, correlacionándose positivamente con masa grasa, HOMA, insulina y parámetros inflamatorios como la proteína C e Il 6. Además se correlacionaron negativamente con la adiponectina. La intervención disminuyó los niveles circulantes de RBP4 en todos los obesos y el porcentaje de descenso de RBP4 se asoció al porcentaje de descenso de los marcadores inflamatorios (proteína C, Il-6) y a los niveles de insulina. En cambio no se correlacionó con los cambios en la masa grasa o en los niveles de adiponectina.

Los trabajos de Haider et al.^{72, 73} ambos longitudinales, también han sido de utilidad en la comprensión de la posible relación entre la sensibilidad a insulina y el RBP4.

En el primero de ellos investigaron la relación entre los niveles plasmáticos del RBP4 y la reducción ponderal en 33 obesos mórbidos que eran sometidos a cirugía de by-pass gástrico⁷².

El RBP4 basal fue mayor en los mórbidos que en los controles delgados. A los 6 meses de la cirugía se habían reducido IMC, RBP4, proteína C y TG. El RBP4 se asoció al IMC tanto antes como después de la cirugía y su variación tras la cirugía se asoció además con el HOMA y el colesterol total.

En el segundo⁷³ en pacientes no diabéticos ni obesos pero con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el tratamiento con rosiglitazona disminuyó los niveles plasmáticos de RBP4 y aumentó los de adiponectina. Además estos enfermos no sufrieron el deterioro en la sensibilidad a la insulina común a otros pacientes con VIH.

En conjunto los trabajos de Balagopal y Haider asocian las modificaciones en la sensibilidad a la insulina con las variaciones en los niveles plasmáticos de RBP4. Teniendo en cuenta la posibilidad de que la disminución en sus niveles colabore en contrarrestar el deterioro en la sensibilidad a la insulina de los pacientes con VIH, se podría plantear que el RBP4 estuviera implicado en el desarrollo de la IR de estos enfermos. De hecho se conoce el efecto de la terapia antirretroviral de alta eficacia aumentando los niveles plasmáticos de RBP4 (y disminuyendo los de adiponectina)⁷⁴.

Por su parte, Jia et al.⁷⁵ seleccionaron más de 1000 pacientes de distintos IMC (con DM2 o sin ella), y determinaron sus niveles circulantes de RBP4. Posteriormente en un subgrupo analizaron la relación entre adiposidad visceral, sensibilidad a la insulina y RBP4 tras tratamiento con rosiglitazona.

Los niveles de RBP4 fueron mayores en los diabéticos y se correlacionaron directamente con HOMA, glucosa, TG, grasa visceral e inversamente con la

adiponectina. En cambio fracasaron al tratar de hallar una correlación positiva entre el RBP4 y el IMC. En los tratados con rosiglitazona mejoró la sensibilidad a la insulina, disminuyeron el área grasa visceral y los niveles de RBP4, y aumentaron los de adiponectina.

Por último, cabe señalar los trabajos de Hammarstedt y de Lin. En el primero de ellos, se trató con pioglitazona a 10 diabéticos de reciente diagnóstico, objetivándose que mejoraban su sensibilidad a la insulina y aumentaban su adiponectinemia. Los niveles basales de RBP4 fueron predictores de una buena respuesta (mejora en la sensibilidad a la insulina) ⁷⁶. En el segundo, la adicción de pioglitazona a diabéticos tratados previamente con metformina mejoraba su sensibilidad a la insulina, disminuyendo el HOMA y el RBP4 y aumentando la adiponectinemia en comparación con aquellos a los que se añadía una sulfonilurea ⁷⁷.

En resumen, algunos de los trabajos mencionados exponen una relación entre diferentes parámetros del SM y el RBP4. Los estudios prospectivos orientan además hacia un vínculo entre el RBP4 y la IR, al menos en la DM2, a pesar de las referencias previas que apuntaban hacia lo contrario ^{45, 46, 47, 48, 49, 50, 51}; no obstante ya hemos analizado que es probable que la relación entre el RBP4 y el SM, no venga determinada exclusivamente por ésta vía ^{66, 70}.

Por último, varios de estos trabajos asocian por primera vez al RBP4 con la inflamación subclínica ^{59, 71} y con el infiltrado inflamatorio del tejido graso ⁵⁴. Teniendo en cuenta que previamente había sido descrito como un reactante de fase aguda negativo ^{34, 78} y que su asociación a la obesidad aislada es controvertida, la relación entre el RBP4 y el ambiente inflamatorio sistémico que acompaña a la obesidad debería analizarse en futuros estudios.

Tabla 6. Estudios iniciales a favor de la relación del RBP4 circulante con la obesidad y la insulinoresistencia.

Variable	Klötting	Balogopal	Haider	Lee
N	196	21	47	172
Obesidad (IMC)	+	+	+	+
Adiposidad (IC)	+	ND	ND	+
Índices de IR (HOMA)	+ ^ψ	+	+	+
Perfil lipídico	+	ND	+	+
Parámetros inflamatorios	No	+	No	+

ND: No disponible. No: Ausencia de correlación. +: Correlación positiva.
^ψ: IR determinada mediante índice de disponibilidad de glucosa.

5 Otras asociaciones del RBP4.

5.1. RBP4 y función renal.

Diferentes trabajos en los últimos 2 años han analizado el papel del RBP4 en la insuficiencia renal.

En el primero de ellos, Cabré et al. estudiaron la relación entre RBP4 y daño orgánico en diabéticos sin proteinuria o insuficiencia renal severa ⁷⁹. El RBP4 plasmático se correlacionó positivamente con la creatinina plasmática y negativamente con el filtrado glomerular. En cambio no hubo relación con la microalbuminuria. Por otra parte, hallaron que los individuos en el cuartil superior del RBP4 presentaban 2´5 veces mayor riesgo cardiovascular (en concreto cardíaco y de accidente vascular cerebral).

Los datos de Cabré en relación con la microalbuminuria no han sido confirmados por Raila et al. ⁸⁰ en cuyo trabajo estudiaron el impacto de la nefropatía diabética en los niveles plasmáticos de RBP4.

Así, tras comparar pacientes diabéticos con controles sanos, hallaron concentraciones plasmáticas de RBP4 superiores en los primeros, mayores aún si tenían microalbuminuria. De hecho, los diabéticos también presentaron niveles superiores de RBP4 urinario. De este modo, tras la regresión lineal, la presencia microalbuminuria aislada se asoció a niveles mayores de RBP4 pero no la DM2 aislada. Además detectaron por espectrometría la presencia de variantes truncadas de RBP4 de 19 kDa en los diabéticos que tenían microalbuminuria, pero no en los que no la tenían.

En cambio, en ninguno de éstos trabajos se correlacionó el RBP4 plasmático con HOMA, insulina, Il-6, adiponectina o IMC, aunque sí con el ICC y los TG en el estudio de Raila et al ⁸⁰.

Por otra parte, el trabajo de Ziegelmeier et al. ⁸¹ sobre pacientes en hemodiálisis (diabéticos y no diabéticos), halló el RBP4 cuatro veces más elevado en estos

pacientes comparados con los controles. En cambio los niveles plasmáticos de RBP4 no diferían en función de la presencia de DM2. La creatinina se correlacionó positivamente con el RBP4 y se mostró como predictor independiente de los niveles de RBP4 en ambos grupos.

Nuevamente ni los marcadores de metabolismo glucídico (HOMA, insulina, glucosa), lipídico (ácidos grasos libres, colesterol o TG) o de adiposidad (IMC, ICC) se relacionaron independientemente con RBP4.

En resumen, estos estudios sugieren un posible papel del RBP4 en la insuficiencia renal severa, moderada y en la nefropatía incipiente en la DM2 y quizás también en sujetos no diabéticos. Los niveles plasmáticos de RBP4 parecen estar estrechamente correlacionados con la función renal. El papel fisiológico del RBP4 en la insuficiencia renal es incierto. En cualquier caso la función renal debe ser considerada en los estudios que asocian RBP4 con enfermedades metabólicas.

5.2. RBP4 y función hepática.

Diferentes autores han vinculado al RBP4 con la enfermedad grasa hepática (EGH) desde el año 2007.

Los primeros en explorar dicha hipótesis fueron Stefan et al.⁸² Estos autores estudiaron en sujetos sanos la relación entre el RBP4, los parámetros de sensibilidad a la insulina y los depósitos de grasa (visceral, subcutánea y ectópica muscular o hepática) determinados por resonancia magnética.

El RBP4 se correlacionó positivamente con el HOMA y la insulina y negativamente con la sensibilidad a la misma y su aclaramiento hepático. En cambio, no se correlacionó con los ácidos grasos libres, lo que pone en duda la hipótesis de que el RBP4 este involucrado en fenómenos de lipólisis⁵⁷.

Igualmente objetivaron una correlación entre el RBP4 y la grasa hepática, pero no con el resto de depósitos de grasa. Además en algunos sujetos realizaron medidas encaminadas a modificar los hábitos de vida, objetivándose una

reducción del RBP4 que se correlacionaba con una disminución en los depósitos de grasa hepáticos, y un incremento en la sensibilidad a la insulina.

Pese a las limitaciones del estudio (escaso tamaño muestral y ausencia de expresión de RBP4 hepática), la consistencia del carácter longitudinal del mismo en relación a la sensibilidad a la insulina y al depósito de grasa hepático sugiere que el hígado graso podría estar vinculado al incremento de los niveles de RBP4. De hecho, el RBP4 regula el ácido retinoico, cuyo incremento se ha asociado con la EGH.

En su trabajo posterior de Wu et al.⁸³ compararon el RBP4 y la adiponectina en diabéticos con EGH, con diabéticos sin ésta (determinada por biomarcadores hepáticos, clínicos y ecográficos).

Los diabéticos con EGH presentaron mayores niveles de RBP4 y menores de adiponectina (además de mayor IMC, HOMA, TG, GPT, GGT). Tras la regresión múltiple, tanto RBP4 como TG se mostraron como factores independientemente asociados con la EGH.

En lo que respecta a la adiponectina, éste artículo corroboró trabajos previos que reportan niveles disminuidos en la EGH⁸⁴ y elevados en la cirrosis hepática⁸⁵. Ante los niveles plasmáticos mayores de RBP4 y menores de adiponectina en varones, teniendo en consideración la mayor incidencia de EGH en este sexo, se podría sugerir que las adipoquinas pudieran estar implicadas en la patogenia de dicha entidad.

En cambio, en la IR existente en la mayoría de los pacientes con cirrosis (fase final de la EGH) el RBP4 no parece jugar un papel relevante. Al menos eso se extrae del trabajo de Yagmur et al.⁸⁶. En él se estudiaron RBP4, adiponectina y diferentes parámetros de metabolismo glucídico y de función hepática en pacientes con enfermedad hepática crónica comparados con donantes sanos.

Tanto en controles sanos como en pacientes con enfermedad hepática crónica no cirróticos el RBP4 fue mayor en los obesos, y se relacionó con HOMA, e insulina. En cambio, en aquellos con enfermedad crónica cirróticos no se halló esta correlación, pese a determinarse una asociación con la actividad biológica

hepática. Consecuentemente los niveles de RBP4 fueron inferiores en los cirróticos y se correlacionaron negativamente tanto con el grado de cirrosis, como con las complicaciones de ésta (ascitis, varices esofágicas y esplenomegalia). En cambio no se asociaron al riesgo de hepatocarcinoma.

Por último, al examinar la expresión de ARNm de RBP4 en ratas con cirrosis inducida, objetivaron que ésta también era menor que la de las ratas sanas.

En resumen, parece que la función hepática puede tener un considerable impacto en los niveles séricos de RBP4. De hecho, los estudios previos muestran que podría existir una asociación entre RBP4 y EGH y sugieren que, quizás, el RBP4 pudiera ser útil como marcador de la esteatosis hepática. Las investigaciones futuras deberían esclarecer dicha posibilidad y, cuanto menos tener en cuenta la función hepática en la determinación de sus niveles. En cambio, existen dudas acerca de si el RBP4 pudiera ser un buen biomarcador de IR en estados de disfunción hepática severa.

Objetivos del estudio

En base a que:

- 1- Se ha demostrado la capacidad del tejido graso subcutáneo humano tanto para expresar el gen de RBP4 como para segregar RBP4 proteico.
- 2- El tejido graso subcutáneo se compone de adipocitos y de una fracción estromovascular en la que se hallan entre otros tipos celulares los macrófagos, conocida fuente de citoquinas y mediadores de la inflamación.
- 3- Los datos disponibles hasta la fecha relacionan positivamente al RBP4 circulante con las adipocitoquinas pro-inflamatorias y negativamente con la adiponectina. En cambio, las referencias acerca de la relación entre la expresión en tejido graso subcutáneo del gen de RBP4 y del de otras adipoquinas son escasas.
- 4- El RBP4 circulante se asocia posiblemente con la insulinoresistencia, la DM2, el perfil lipídico y diferentes componentes del síndrome metabólico, pero su vínculo con la obesidad aislada está más cuestionado.

Se definen los siguientes objetivos:

- 1- Analizar la relación de los niveles séricos y la expresión génica de RBP4 en tejido graso subcutáneo con respecto a diferentes variables clínicas y antropométricas en los distintos grados de obesidad.
- 2- Correlacionar los niveles séricos y la expresión génica de RBP4 en adipocitos de grasa subcutánea con los de otras adipocitoquinas, como la proteína C, la resistina y la adiponectina.

3- Analizar la expresión del gen del RBP4 en la fracción estromovascular y en los adipocitos del tejido graso subcutáneo.

4- Evaluar en cultivo celular de monocitos de sangre periférica diferenciados a macrófagos la expresión del gen de RBP4 y su regulación tras determinados estímulos proinflamatorios.

Metodología

6 Selección de pacientes y procedimientos.

En el estudio sobre niveles séricos de RBP4 se incluyeron 86 sujetos todos ellos mayores de 18 años. Inicialmente se analizaron 65 (32 varones y 33 mujeres) no diabéticos con grados de obesidad entre el normopeso ($IMC \leq 25$), el sobrepeso ($IMC > 25 \leq 30$) y la obesidad no mórbida ($IMC > 30 \leq 40 \text{ kg/m}^2$) determinados según la fórmula del IMC descrita previamente ⁸⁷. Teniendo en cuenta las posibles diferencias existentes en los niveles circulantes de RBP4 en función del sexo, y los escasos datos disponibles hasta la fecha en el terreno de la obesidad mórbida, decidimos ampliar en un segundo tiempo la población a estudio. De este modo, incluimos un análisis descriptivo de 21 mujeres con obesidad mórbida ($IMC > 40$), igualmente no diabéticas y mayores de edad.

El estudio sobre expresión de RBP4 en tejido graso subcutáneo se realizó en 61 de los sujetos pertenecientes a los grupos de normopeso, sobrepeso y obesidad no mórbida y en 18 obesas mórbidas. En 8 sujetos del grupo de obesidad no mórbida se separaron además las distintas fracciones del tejido graso subcutáneo. En 4 de ellos se analizó también la expresión de ARNm de RBP4 en monocitos de sangre periférica y tras su diferenciación in vitro a macrófagos.

Los sujetos fueron reclutados en el H.U.Joan XXIII, siendo enfermos que ingresaban para intervenciones quirúrgicas programadas (herniorrafias o eventraciones). Para completar alguno de los grupos se utilizaron muestras procedentes del Bio banco del HU Joan XXIII.

En todos los casos el peso se había mantenido estable en los últimos 3 meses. A excepción de las obesas mórbidas, a las que se mantuvo la medicación hipolipemiente, ninguno de los sujetos a estudio estaba tomando medicación o presentaba patología que pudiera interferir en su estado metabólico. Se excluyeron específicamente mediante test analíticos y visita médica la patología

renal o hepática. En la misma se solicitó un consentimiento informado, firmado en todos los casos.

Se determinó la edad (en años), el peso (en kg.), la altura (en metros) y los perímetros de cintura y de cadera (en cm.). Se calcularon el IMC (según la fórmula descrita previamente)⁸⁷ y el ICC (como razón entre el perímetro de cintura y el de cadera). Asimismo se determinó la tensión mediante esfigmomanómetro electrónico (Omrom digital blood pressure monitor HEM-907). Mediante la entrevista se clasificó el tabaquismo entre no fumador, ex fumador, fumador leve, moderado o severo (< 10 , $\geq 10 < 20$ ó ≥ 20 cigarros/día), el alcoholismo entre no bebedor, bebedor leve o bebedor severo (0 , $\geq 0 < 50$ o ≥ 50 gr/día) y el ejercicio físico entre no habitual o habitual (< 5 ó ≥ 5 horas/semanales). Asimismo se reflejaron la existencia o no de antecedentes personales o familiares de infarto agudo de miocardio (IAM), obesidad, DM, DLP o enfermedad cardiovascular. De igual modo, se clasificó a los sujetos en función de la presencia o no de SM, definido como tal si cumplían 3 ó más de los criterios de la ATP III: HDLc inferior a 1 mmol/l en varones o 1´3 mmol/l en mujeres, TG superiores a 1´7 mmol/l, perímetro de cintura ≥ 102 cm. en varones o 88 cm. en mujeres, y glucosa o TA mayores a 5´6 mmol/l o a 130/85 mm Hg respectivamente (o bien tratamiento antidiabético o antihipertensivo previo). Este análisis no se realizó en las obesas mórbidas dado que la medicación hipolipemiante podría interferir en el cumplimiento de algunos de los criterios de SM.

7 Metodología de laboratorio.

Determinaciones analíticas.

La mayor parte de estas determinaciones fueron realizadas en el laboratorio general del H.U.Joan XXIII. Las muestras de sangre de cada sujeto fueron extraídas de la vena antecubital tras una noche de descanso y un ayuno de aproximado de 8 horas. Todas ellas fueron almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización, excepto la glucosa que fue determinada inmediatamente después de la extracción sanguínea mediante el método de la glucosa oxidasa y utilizando un autoanalizador Hitachi.

El colesterol total fue medido mediante la relación de colesterol esterasa/colesterol oxidasa/peroxidasa. El HDLc se determinó tras precipitación con polietilenglicol a temperatura ambiente. Los TG fueron medidos mediante la reacción de glicerol fosfatasa oxidasa y peroxidasa. El LDLc se calculó mediante la fórmula de Friedewald ⁸⁸.

La insulina sérica fue determinada mediante radioinmunoensayo (Medgenix Diagnostics, Fleunes, Bélgica) el cual no presentaba reactividad cruzada con la proinsulina. La sensibilidad fue de 4'1 mU/litro y los coeficientes de variación intra e interensayo del 6 % y el 7 % respectivamente.

El modelo homeostático de insulinoresistencia (HOMA – IR) se calculó mediante la ecuación $(\text{insulina} \times \text{glucosa}) / 22,5$, donde la concentración de insulina se expresa en $\mu\text{U/ml}$ y la glucosa en concentración mM/l . Este índice se correlaciona con el índice de sensibilidad a la insulina, calculado a partir de la tolerancia a múltiples glicemias sanguíneas en modelos animales ⁸⁹.

La hemoglobina glicosilada (Hb A1c) se determinó por el método cromatográfico (Glico Hb Quick Alumn Procedure, Helena Laboratories, Beaumont, TX).

Para el cálculo de la creatinina y de la prot C séricas se utilizaron los kits correspondientes al autoanalizador ADVIA 1200 (Bayer, Siemens), mediante colorimetría y turbidimetría respectivamente.

Existieron, no obstante, algunas determinaciones para las que fue necesaria la colaboración del laboratorio de la Unidad de Recerca del H.U. Joan XXIII.

De este modo, los receptores solubles del TNF α (sTNFR1 y sTNFR2) fueron cuantificados mediante enzimoimmunoensayo de fase sólida (Bio Source Europa, Nivelles, Bélgica). El límite de detección fue de 50 pg/ml para el sTNFR1 y 0,1 ng/ml para el sTNFR2 y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron $< 7 \%$ y $< 9 \%$ respectivamente. Las determinaciones sTNFR1 y sTNFR2 no interferían con el TNF α ni presentaban reactividad cruzada entre sí.

La Il-6 fue determinada mediante enzimoimmunoensayo de fase sólida ultrasensible (Bio Source Europe, Nivelles, Bélgica). El límite de detección fue de 0,104 pg/ml y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 4,71 % y 6,7 % respectivamente. Este kit no presentaba reactividad cruzada con otras interleuquinas (Il-2, Il-4, Il- 10 o TNF α).

Los niveles plasmáticos de resistina fueron medidos mediante enzimoimmunoensayo absorbente (Bio Vendor Laboratory Medicine, Inc, Palackeho, República Checa). La sensibilidad fue de 0,2 ng/ml. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 5,8 % y 14,7 %, respectivamente.

La adiponectina plasmática fue cuantificada mediante radioimmunoensayo (Linco Research), con una sensibilidad de 1 ng/ml. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron del 8 y 12 % respectivamente.

Los niveles séricos de RBP4 se determinaron por nefelometría (Dade Behring Inc, Marburg, Germany). La sensibilidad del método es de 0,175 mg/l. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 3,1 y 2,2 % respectivamente. Dicho método ha sido contrastado con el WB previamente⁹⁰.

Determinaciones de expresión de ARNm de RBP4 y otras adipoquinas.

En este caso todos los experimentos tuvieron lugar en la Unidad de Recerca de nuestro centro. Las biopsias de tejido adiposo procedían de grasa subcutánea de la región abdominal electiva según el proceso quirúrgico desarrollado. Todas las muestras se congelaron en nitrógeno líquido para la extracción posterior del ARNm.

En las muestras seleccionadas de tejido adiposo de 8 sujetos obesos se procedió a la distinción entre adipocitos y células de la fracción estromovascular. Para ello estas muestras fueron transportadas inmediatamente al laboratorio en medio M199 (Givco, Invitrogen Corporation, Ca, Usa) suplementado con albúmina sérica bovina al 4 % y 5,5 mM de D-glucosa, y digeridas con 0,15 mg/g de colagenasa de tejido adiposo tipo I (Sigma, Inc. St Louis, USA) durante 1h a 37 ° C. Las células adiposas fueron separadas de la fracción no celular (matriz no digerida) mediante filtración a 200 μ . Posteriormente se separaron los adipocitos maduros de la fracción celular estromovascular mediante centrifugación durante 10 minutos a 1500 revoluciones. Tanto adipocitos como fracción celular estromovascular fueron congelados a -80 ° C para la posterior extracción de ARNm.

Por último, en la sangre periférica de 4 de éstos sujetos se aislaron monocitos humanos con el RosetteSep Human Monocyte Enrichment Cocktail Kit (StemCell Technologies, Inc) según las instrucciones del fabricante. Aproximadamente 3×10^6 células fueron incubadas en placas con 3 ml del medio RPMI y diferenciadas a macrófagos tras tratamiento con 10 ng/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) durante 5 días. Se utilizó el CD68 como marcador de la diferenciación de monocitos a macrófagos. Estos macrófagos se incubaron durante 48 horas con 1 μ g/ml del LPS de la endotoxina de E.Alli 026:26, con 50 ng/ml de TNF α , o con 50 ng/ml de Il-6. Las determinaciones en los cultivos sobrenadantes de RBP4 se realizaron

mediante ELISA (Adipogen, Seul, Corea), con una sensibilidad de 1 ng/ml, y unos coeficientes de variación intra e inter ensayo inferiores del 9'2 % y el 10'3 % respectivamente.

La extracción del ARNm tanto de los adipocitos de la biopsia de tejido adiposo subcutáneo como de las células de la fracción estromovascular y los cultivos celulares se realizó mediante el kit RNeasy Lipid Tissue Midi kit o el kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN Science, Maryland, USA). Acto seguido se sintetizó el ácido desoxirribonucleico (ADN) complementario de cada gen mediante el comercial reverse transcription kit (Promega corp, Madison, USA). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa a tiempo real para RBP4, proteína C reactiva, resistina, adiponectina y CD 68 se realizó mediante un ciclador LightCycler Faststart DNA master SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics, Basel, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para evitar detectar productos de PCR inespecíficos se confirmó cada ampliación mediante análisis en gel de agarosa, analizando sus respectivas curvas. Para preparar las curvas standard los productos de la PCR que codificaban RBP4, resistina, proteína C reactiva, adiponectina y CD 68 se clonaron en pCRII-TOPO (TOPO TA cloning kit; Invitrogen Corporation, California, USA). Para cada muestra la concentración se calculó a partir de la curva Standard mediante un software a tiempo real, usando el valor de punto de cruce y normalizándolo con la concentración de un gen "housekeeping", para lo que utilizamos el gen de la β actina (Ratio = ARNm gen/ARNm housekeeping gen).

8 *Estudio estadístico.*

Análisis descriptivo.

La descripción de los datos se ha efectuado mediante media \pm desviación estándar tanto para variables continuas como para frecuencias absolutas y relativas de variables categóricas.

Análisis univariable.

Para la comparación de grupos, se ha utilizado el análisis de la varianza de un factor para variables continuas, con corrección de Bonferroni para las comparaciones múltiples.

Las variables categóricas se han comparado mediante la prueba de la χ^2 de Pearson o prueba exacta de Fisher.

Para la comparación de dos variables cuantitativas se ha utilizado la correlación r de Spearman y, cuando se ha requerido, el análisis de regresión lineal.

Análisis multivariable.

En la comparación del RBP4 sérico con el colesterol y la creatinina y del ARNm de RBP4 con el ARNm de adiponectina en tejido adiposo subcutáneo, se ha utilizado el análisis de regresión lineal múltiple para ajustar el posible efecto de confusión de la edad y el IMC.

El nivel de significación estadística aceptado ha sido $p \leq 0,05$.

El análisis estadístico se realizó con el paquete SPSS/PC (versión 11.0 para Windows; SPSS, Inc, Chicago).

Resultados

9 Niveles séricos y expresión de ARNm de RBP4 en normopeso, sobrepeso y obesidad no mórbida.

Basalmente, los individuos obesos presentaron mayor peso, perímetro de cadera, perímetro de cintura, ICC e IMC, TAs y TAd que los delgados. Igualmente presentaron mayor HOMA, insulina, glucosa, colesterol total, TG y LDLc, como se puede apreciar en la tabla 7. Existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos respecto a la edad, lo cual debió ser considerado más adelante a la hora de analizar las correlaciones del RBP4 sérico con el resto de variables para evitar posibles sesgos.

En lo que respecta a las variables categóricas, no existieron diferencias basales entre grupos en su grado de tabaquismo ($p= 0\text{'}81$), consumo alcohólico ($p= 0\text{'}65$), hábito de ejercicio físico ($p= 0\text{'}16$) o antecedentes familiares de DM o dislipemia ($p= 0\text{'}28$ para ambas). Tampoco las hubo en relación a antecedentes personales de IAM ($p= 0\text{'}19$) o respecto al sexo ($p= 0\text{'}93$). En cuanto a la presencia de SM existieron diferencias basales significativas (prueba de tendencia lineal $p= 0\text{'}02$). Así, el grupo de los obesos contenía a más sujetos con SM que los sobrepesados, y estos más que los delgados.

Con objeto de aclarar si esto pudiera suponer un sesgo posteriormente, analizamos los diferentes criterios de SM por separado. Así, para los criterios de HDLc ($p= 0\text{'}83$), TG ($p= 0\text{'}93$) o glucosa ($p= 0\text{'}19$) no existieron diferencias significativas. En cambio sí las hubo con respecto a los criterios SM según perímetro de cintura ($p < 0\text{'}0001$) o TA ($p= 0\text{'}05$). Estos datos están en consonancia con los niveles basales más elevados de perímetro de cintura o TA hallados en los obesos con respecto a los otros dos grupos.

Tabla 7. Niveles basales de las diferentes variables en los distintos grupos.

	Delgados n 31 IMC ≤ 25	Sobrepeso n 15 IMC > 25 ≤ 30	Obesos n 19 IMC > 30 ≤ 40
IMC (kg/m²)	22'7	27'7	34'4
Peso (kg)	63'15 ± 8'35	71'90 ± 7'74 [¶]	88'31 ± 13'47 [°]
Talla (cm)	1'65 ± 0'06	1'63 ± 0'08	1'64 ± 0'09
Cintura (cm)	81'15 ± 9'25	93'90 ± 5'73 [¶]	110'79 ± 9'67 [°]
Cadera (cm)	94'20 ± 33'42	102'80 ± 7'72 [¶]	112'53 ± 0'03 [°]
Ind. cintura cadera	0'86 ± 0'09	0'90 ± 0'05 [¶]	0'98 ± 0'07 [∇]
Edad	44 ± 17	59 ± 14 [¶]	56 ± 13
TA sistólica (mm Hg)	123'56 ± 16'97	124'93 ± 18'48	137'82 ± 17'52 [∇]
TA diastólica (mm Hg)	72'15 ± 10'71	76'71 ± 12'23	80'65 ± 8'58
Colesterol total (mM/L)			
	4'69 ± 1'04	5'23 ± 0'23	5'53 ± 0'99 [∇]
Colesterol HDL (mM/L)			
	1'38 ± 0'47	1'36 ± 0'34	1'21 ± 0'37
Colesterol LDL (mM/L)			
	2'85 ± 0'75	3'48 ± 0'91	4'02 ± 1'02 [∇]
Triglicéridos (mM/L)			
	1'22 ± 0'79	1'02 ± 0'45	1'39 ± 0'51
Glucosa (mM/L)			
	5'07 ± 0'87	5'24 ± 0'75	5'63 ± 0'80 [∇]
Insulina (µUI/ml)			
	3'25 ± 2'43	3'26 ± 2'23	5'31 ± 3'25 [°]
HOMA			
	0'69 ± 0'45	0'74 ± 0'55	1'31 ± 0'94 [°]
Hb A1c (%)			
	4'6 ± 0'60	5'02 ± 0'56	4'6 ± 0'29
Creatinina (µgr/dl)			
	78'05 ± 19'37	78'13 ± 22'92	80'81 ± 21'99
<p>° Diferencia estadísticamente significativa (p < 0'05) de obesos con sobrepeso y delgados tras realizar el ajuste de Bonferroni. ∇ Diferencia estadísticamente significativa (p < 0'05) de obesos con delgados tras realizar el ajuste de Bonferroni. ¶ Diferencia estadísticamente significativa (p < 0'05) de sobrepesos con delgados tras realizar el ajuste de Bonferroni.</p>			

Como cabía esperar, en el análisis basal de las adipoquinas y citoquinas estudiadas hallamos niveles circulantes superiores de proteína C e inferiores de adiponectina en el grupo de obesos, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística. En lo referente al resto de adipoquinas estudiadas, como podemos apreciar en la tabla 8, no existieron diferencias significativas entre los diferentes grupos analizados en lo referente a sus niveles circulantes. Tampoco

las hubo para ninguna de ellas al analizar su expresión génica en grasa subcutánea.

No obstante, al comparar los niveles absolutos de expresión de las diferentes adipocinas en el tejido adiposo subcutáneo objetivamos que los niveles de expresión de RBP4 mostraban rangos similares a los de adiponectina ($1,05 \pm 0,35$ y $1,16 \pm 0,32$ respectivamente). Por el contrario, la expresión de resistina y proteína C ($0,00007 \pm 0,0$ y $0,00020 \pm 0,0$) fueron muy bajas comparadas con las primeras.

Tabla 8. Niveles circulantes y expresión de las diferentes adipocitoquinas en los distintos grupos.

	Delgados n 28 IMC \leq 25	Sobrepeso n 15 IMC $> 25 \leq 30$	Obesos n 18 IMC $> 30 \leq 40$
Resistina (ng/ml)	3'27 \pm 0'78	5'31 \pm 2'89	3'45 \pm 0'96
ARNm resistina	0'00004 \pm 0'00	0'00004 \pm 0'00	0'00014 \pm 0'00
Adiponectina (μg/ml)	14'63 \pm 5'87	12'15 \pm 6'32	10'28 \pm 6'43
ARNm adiponectina	1'52 \pm 1'70	0'77 \pm 0'65	1'19 \pm 0'60
Proteína C (mg/dl)	1'26 \pm 1'42	0'94 \pm 0'31	3'68 \pm 5'27
ARNm Proteína C	0'00008 \pm 0'00	0'00021 \pm 0'00	0'00033 \pm 0'00
RBP4 (mg/dl)	3'20 \pm 1'03	3'62 \pm 1'01	3'22 \pm 1'11
ARNm RBP4	1'42 \pm 1'06	0'96 \pm 0'65	0'77 \pm 0'59
Il-6 (pg/ml)	1'94 \pm 1'80	0'67 \pm 0'58	1'05 \pm 1'01
sTNFR-1 (ng/ml)	1'90 \pm 1'08	1'66 \pm 0'75	1'66 \pm 0'61
sTNFR-2 (ng/ml)	4'64 \pm 2'20	4'36 \pm 2'22	6'86 \pm 8'67
° Diferencia estadísticamente significativa $p < 0,05$.			

Correlaciones con niveles séricos y expresión de ARNm de RBP4.

Los resultados hallados tras analizar la relación de los niveles séricos o la expresión de RBP4 con respecto a las diferentes variables estudiadas se muestran a continuación.

En la tabla 9 observamos que no existió correlación estadísticamente significativa de los niveles séricos o la expresión de RBP4 con las diferentes variables antropométricas estudiadas (peso, talla, perímetro de cintura, perímetro de cadera, ICC, IMC). Tampoco la hubo con respecto a edad, TAs o TAd.

Tabla 9. Correlación de niveles séricos y expresión de RBP4 con determinaciones antropométricas y edad.

	Niveles séricos de RBP4		ARNm en tejido graso subcutáneo de RBP4	
	r	p	r	p
IMC	-0'29	0'81	-0'25	0'18
Edad	0'04	0'71	-0'14	0'47
Peso (kg)	0'06	0'59	-0'21	0'26
Talla (cm)	0'15	0'20	0'12	0'52
Cintura (cm)	0'20	0'10	-0'25	0'20
Cadera (cm)	0'09	0'48	-0'21	0'29
Ind. cintura cadera	0'20	0'12	-0'12	0'53
TA sistólica (mm Hg)	0'09	0'49	-0'08	0'69
TA diastólica (mm Hg)	0'14	0'27	0'02	0'91

^a Diferencia estadísticamente significativa (p<0'05)

De hecho, investigando más profundamente la relación entre RBP4 e ICC, clasificamos a los enfermos entre aquellos con un ICC > 1, indicativo de un predominio de la obesidad central o troncal, o aquellos sin éste. Tampoco en aquellos con ICC > de 1 (que suponían el 10 % del total de los sujetos a estudio) demostramos relación con los niveles séricos de RBP4.

En la tabla 10 mostramos la relación del RBP4 con el perfil lipídico. A pesar de hallar una clara correlación positiva entre los niveles séricos de RBP4 con el colesterol total, no existió correlación con LDLc, HDLc o triglicéridos. En lo referente a la expresión de RBP4, ésta no se correlacionó con ninguna de las variables de perfil lipídico.

Tabla 10. Correlación de niveles séricos y expresión de RBP4 con perfil lipídico.

	Niveles séricos de RBP4		ARNm en tejido graso subcutáneo de RBP4	
	r	p	r	P
Colesterol total (mM/L)	0´34	0´01[¤]	-0´04	0´85
Colesterol HDL(mM/L)	0´18	0´23	-0´10	0´64
Colesterol LDL (mM/L)	0´19	0´20	0´02	0´90
Triglicéridos (mM/L)	0´09	0´51	-0´25	0´26

[¤] Diferencia estadísticamente significativa (p<0´05).

En lo que respecta al vínculo entre RBP4 y los parámetros de metabolismo glucídico e IR, no hallamos correlación ni del RBP4 plasmático ni de su expresión con glucosa basal, insulina, HOMA o HbA1c. Esto se refleja en la tabla 11.

Tabla 11. Correlaciones de niveles séricos y expresión de RBP4 con parámetros de metabolismo glucídico, IR y creatinina.

	Niveles séricos de RBP4		ARNm en tejido graso subcutáneo de RBP4	
	r	p	r	P
Glucosa (mM/L)	0´09	0´47	-0´22	0´24
Insulina (µUI/ml)	0´11	0´41	-0´26	0´21
HOMA	0´06	0´68	-0´28	0´19
Hb A1c (%)	0´20	0´44	ND	ND
Creatinina (µgr/ml)	0´27	0´04[¤]	0´24	0´23

[¤] Diferencia estadísticamente significativa (p<0´05).

En la misma tabla se refleja una clara correlación positiva entre el RBP4 sérico y la creatinina. Esta correlación es de especial relevancia teniendo en cuenta que en el presente estudio se habían excluido específicamente los pacientes con niveles de creatinina basales alterados.

Por último, como se aprecia en la tabla 12, tampoco para las adipocitoquinas analizadas objetivamos correlación alguna con los niveles séricos de RBP4. En cambio la expresión de RBP4 sí se correlacionó fuertemente con la de adiponectina. Por otra parte no existió correlación entre la expresión en grasa subcutánea de RBP4 y sus niveles séricos.

Tabla 12. Correlaciones entre niveles séricos y expresión de ARNm de RBP4 y los de otras adipocitoquinas en tejido graso de normopeso, sobrepeso y obesidad no mórbida.

	Niveles séricos de RBP4		ARNm en tejido graso subcutáneo de RBP4	
	r	p	r	P
Resistina (ng/ml)	0'15	0'30	0'18	0'37
ARNm Resistina	0'23	0'17	-0'01	0'93
Adiponectina (µg/ml)	0'24	0'12	-0'16	0'55
ARNm Adiponectina	-0'84	0'66	0'65	0'00[□]
Proteína C (mg/dl)	-0'26	0'13	-0'24	0'26
ARNm Proteína C	-0'05	0'81	0'01	0'94
RBP4 (mg/dl)	-----	-----	0'09	0'64
ARNm RBP4	0'09	0'64	-----	-----
sTNFR-1 (ng/ml)	-0'48	0'73	-0'21	0'26
sTNFR-2 (ng/ml)	-0'53	0'72	-0'03	0'85

[□] Diferencia estadísticamente significativa (p<0'05).

Teniendo en cuenta que entre los diferentes grupos existían basalmente diferencias en función de la edad, realizamos análisis de regresión múltiple con objeto de aclarar si las correlaciones positivas del RBP4 sérico con creatinina o colesterol pudieran estar influidas por la edad. Al incluir además de la edad a la adiposidad como variable independiente se mantuvieron ambas asociaciones de RBP4 con creatinina y con colesterol. De este modo hallamos que los niveles séricos de RBP4 se asocian a los de creatinina y colesterol total con independencia de la edad y del hecho de que fueran delgados, sobrepesados u obesos.

Tabla 13. Regresión lineal múltiple para niveles séricos de RBP4 como variable dependiente.

Modelo Colesterol	Coefficiente β estandarizado	Significación	R²
Colesterol	0´407	0´005^α	0´15
Edad	0´073	0´593	
IMC	- 0´209	0´152	

Modelo Creatinina	Coefficiente β estandarizado	Significación	R²
Creatinina	0´282	0´043^α	0´08
Edad	- 0´034	0´814	
IMC	0´033	0´822	

^α Diferencia estadísticamente significativa (p<0´05).

Para la correlación entre expresión de RBP4 y de adiponectina realizamos el modelo de regresión tras los mismos ajustes. Los resultados se pueden apreciar en la tabla 14. Confirmamos así la fuerte asociación entre la expresión de ambas adipoquinas en tejido graso subcutáneo con independencia tanto de edad como de IMC.

Tabla 14. Modelo de regresión lineal múltiple para el ARNm de RBP4 como variable dependiente.

Modelo ARNm de adiponectina	Coefficiente β estandarizado	Significación	R²
ARNm de adiponectina	0´637	0´000^α	0´468
Edad	- 0´082	0´290	
IMC	- 0´172	0´608	

^α Diferencia estadísticamente significativa (p<0´05).

Para el resto de variables estudiadas, tras los mismos ajustes no existió asociación alguna.

En lo que respecta a las variables categóricas, no se halló correlación entre los niveles séricos de RBP4 y el hábito tabáquico ($p=0\text{'}38$), el consumo alcohólico ($p= 0\text{'}73$), el ejercicio físico ($p= 0\text{'}93$), el antecedente de IAM ($p= 0\text{'}78$). Tampoco los antecedentes familiares de DM ($p= 0\text{'}23$), DLP ($p= 0\text{'}85$), obesidad ($p= 0\text{'}40$) o enfermedad cardiovascular ($p= 0\text{'}22$) o la existencia de SM se correlacionaron con los niveles séricos de RBP4 ($p= 0\text{'}18$). En lo referente a la expresión en grasa subcutánea de RBP4, ésta no se correlacionó con ninguna las variables categóricas estudiadas.

Por otra parte, pese a hallar, como era esperable, niveles de RBP4 mayores en varones ($3\text{'}45 \pm 0\text{'}75$ vs $3\text{'}16 \pm 1\text{'}27$), no existieron diferencias significativas en función del sexo ($p= 0\text{'}1$).

10 Estudio de niveles séricos y expresión de ARNm de RBP4 en la obesidad mórbida.

Con objeto de explorar también el comportamiento del RBP4 sérico y su expresión en grasa subcutánea en la obesidad mórbida incluimos una segunda muestra poblacional a estudio. Teniendo en cuenta que se han descrito diferencias en los niveles de RBP4 sérico en relación con el sexo decidimos que el análisis incluyera sólo a hembras. De este modo, en la tabla 15 se exponen las características basales de las 21 mujeres con obesidad mórbida incluidas.

Tabla 15. Niveles de las diferentes variables en obesas mórbidas.

	Obesas Mórbidas IMC \geq 40 n 21
IMC	49'85 \pm 6'94
Peso (kg)	126'59 \pm 18'31
Talla (cm)	159 \pm 5'78
Cintura (cm)	127 \pm 14
Cadera (cm)	141 \pm 14
Ind. cintura cadera	0'8516 \pm 0'1944
Edad (años)	44 \pm 9
TA sistólica (mmHg)	133'20 \pm 15'00
TA diastólica (mmHg)	80'60 \pm 8'1
Colesterol total (mM/L)	4'97 \pm 0'78
Colesterol LDL(mM/L)	3'37 \pm 0'80
Colesterol HDL(mM/L)	1'25 \pm 0'36
Triglicéridos (mM/L)	1'31 \pm 0'32
Glucosa (mM/L)	5'45 \pm 1'15
Insulina (μUI/ml)	10'5 \pm 15'80
HOMA	2'66 \pm 3'94
Hb A1c (%)	5'20 \pm 0'40
Creatinina (μgr/ml)	77'06 \pm 15'1

Los niveles de colesterol total, TG, LDLc y HDL c eran similares a los que presentaban los pacientes delgados o con sobrepeso del grupo inicial sin obesidad mórbida. Lo mismo ocurrió con las cifras de TAs, TAd y creatinina. En cambio,

en lo referente glucosa, insulina, HOMA, Hb A1c, peso, perímetro de cintura, de cadera y obviamente IMC éstas pacientes presentaban valores mayores que en el grupo inicial.

Los niveles séricos y la expresión en grasa subcutánea de las diferentes adipocinas estudiadas en este segundo grupo se expresan en la tabla 16.

Tabla 16. Niveles séricos y expresión de las diferentes adipocitoquinas en la obesidad mórbida.

	Obesas Mórbidas IMC \geq 40 n 21
Resistina (ng/ml)	4'10 \pm 2'12
ARNm Resistina	0'0011 \pm 0'0027
Adiponectina (μg/ml)	15'68 \pm 7'41
ARNm Adiponectina	1'4591 \pm 0'9458
Proteína C (mg/dl)	16'6 \pm 12'6
ARNm Proteína C	0'0009 \pm 0'0001
RBP4 (mg/dl)	3'03 \pm 0'74
ARNm RBP4	1'2281 \pm 0'7808
Il-6 (pg/ml)	2'92 \pm 1'62
sTNFR-1 (ng/ml)	2'27 \pm 0'54
sTNFR-2 (ng/ml)	5'61 \pm 1'74

Correlaciones de niveles séricos y expresión de ARNm de RBP4 en la obesidad mórbida.

Del mismo modo que analizamos las correlaciones del RBP4 sérico y su expresión en tejido graso en el grupo inicial, nos dispusimos de nuevo a explorar dichas correlaciones en la obesidad mórbida.

Como se puede apreciar en la tabla 17, a diferencia de lo que ocurría en el grupo inicial, hallamos una clara correlación positiva entre el RBP4 sérico y la edad en la obesidad mórbida. En lo referente a las variables antropométricas, ni peso, ni IMC, perímetro de cintura, de cadera o ICC se correlacionaron con el RBP4 circulante. Para la expresión de RBP4 no se halló correlación alguna con edad o con las variables antropométricas.

Tabla 17. Correlaciones entre niveles séricos o expresión de ARNm de RBP4 en tejido graso de obesas mórbidas y variables antropométricas.

	Niveles séricos de ARNm en tejido graso subcutáneo de RBP4			
	r	p	r	P
IMC	0'05	0'82	-0'43	0'17
Edad	0'60	0'00°	-0'14	0'66
Peso (kg)	-0'09	0'68	-0'21	0'52
Talla (cm)	-0'27	0'24	0'46	0'14
Cintura (cm)	0'16	0'52	0'07	0'85
Cadera (cm)	0'11	0'65	-0'06	0'87
Ind. cintura cadera	-0'06	0'79	0'28	0'41
TA sistólica (mm Hg)	0'40	0'08	-0'32	0'29
TA diastólica (mm Hg)	0'16	0'63	0'33	0'28

° Diferencia estadísticamente significativa (p<0'05).

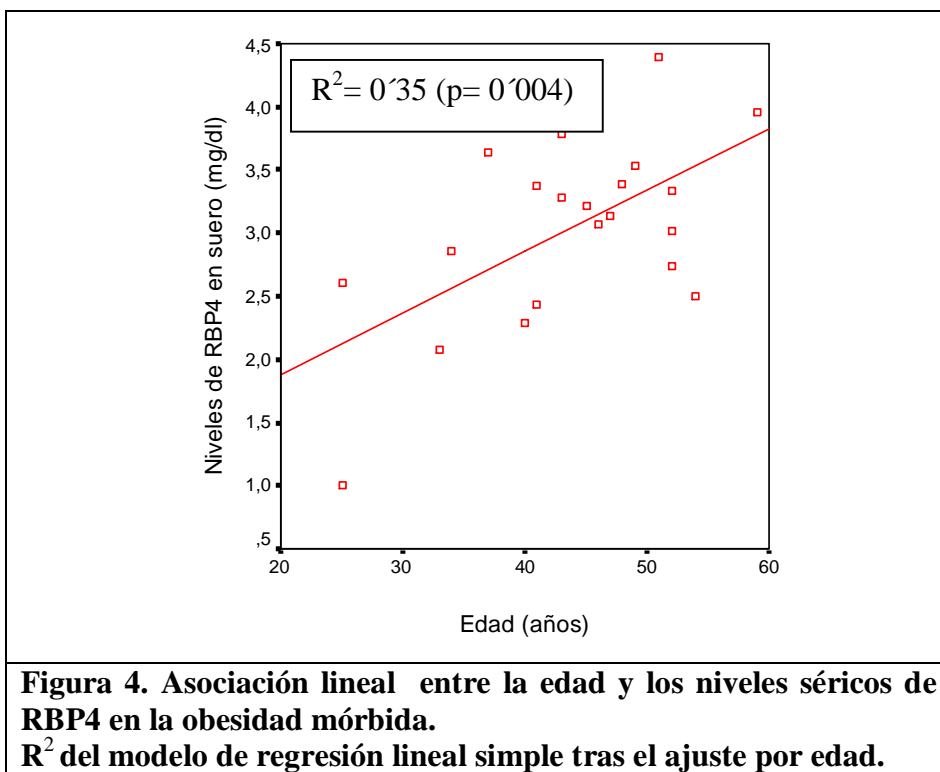
Con objeto de analizar con mayor profundidad la correlación positiva entre niveles séricos de RBP4 y edad, realizamos un análisis de regresión lineal simple. Sus resultados se observan en la tabla 18.

Tabla 18. Modelo de regresión lineal múltiple para niveles séricos de RBP4 como variable dependiente.

Modelo edad	Coefficiente β estandarizado	Significación	R ²
Edad	0'599	0'004°	0'359

° Diferencia estadísticamente significativa (p<0'05).

De este modo, como se puede observar en la figura 4 objetivamos la existencia de una correlación lineal entre la edad y los niveles séricos de RBP4 en la obesidad mórbida.



Por su parte, al analizar el perfil lipídico, no hallamos correlación de ninguno de sus componentes con el RBP4 sérico. Así se puede apreciar en la tabla 19 que la correlación positiva de RBP4 y colesterol total hallada en el grupo de estudio inicial no se objetiva en este grupo de obesas mórbidas tratadas con hipolipemiantes.

Tabla 19. Correlaciones de niveles séricos y expresión de RBP4 con variables de perfil lipídico en la obesidad mórbida.

	Niveles séricos de RBP4		ARNm en tejido graso subcutáneo de RBP4	
	r	p	r	p
Colesterol total (mM/L)	0.27	0.24	0.29	0.36
Colesterol HDL(mM/L)	0.22	0.36	0.01	0.96
Colesterol LDL (mM/L)	0.07	0.79	0.23	0.48
Triglicéridos (mM/L)	0.29	0.21	0.37	0.24

^a Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

En la tabla 20 reflejamos los datos referentes a parámetros de perfil glucídico, IR y creatinina. Como en el grupo inicial, no se ha hallado correlación significativa con el perfil glucídico o IR; en cuanto a la creatinina, la correlación fue $r= 0,45$, cercana a la significación estadística ($p= 0,08$).

Tabla 20. Correlaciones de niveles séricos y expresión de RBP4 con variables de perfil glucídico, IR y creatinina en la obesidad mórbida.

	Niveles séricos de RBP4		ARNm en tejido graso subcutáneo de RBP4	
	r	p	r	p
Glucosa (mM/L)	0´19	0´42	-0´05	0´89
Insulina (µUI/ml)	0´34	0´16	0´10	0´70
HOMA	0´3	0´21	0´04	0´92
Hb A1c (%)	-0´33	0´30	0´28	0´50
Creatinina (µgr/ml)	0´45	0´08	-0´44	0´17

^a Diferencia estadísticamente significativa ($p<0´05$).

Por último, en la tabla 21 se analiza la correlación de niveles y expresión de RBP4 con el resto de adipocinas. Nuevamente volvimos a hallar una fuerte correlación positiva entre la expresión de RBP4 y la de adiponectina, no reflejada en cambio entre sus niveles circulantes.

Como ocurría en el grupo inicial los niveles de RBP4 o la expresión de RBP4 en grasa subcutánea no guardaron correlación con ninguna de las restantes adipocinas. De nuevo, tampoco se correlacionaron entre sí.

Tabla 21. Correlaciones de niveles séricos y expresión de RBP4 con los niveles plasmáticos y la expresión del resto de adipocitoquinas estudiadas.

	Niveles séricos de RBP4		ARNm en tejido graso subcutáneo de RBP4	
	r	P	r	p
Resistina (ng/ml)	0´06	0´81	-0´1	0´76
ARNm Resistina	-0´06	0´87	0´49	0´18
Adiponectina (µg/ml)	0´07	0´78	-0´07	0´83
ARNm Adiponectina	-0´35	0´25	0´83	0´00^α
Proteína C (mg/dl)	-0´03	0´91	-0´21	0´62
ARNm Proteína C	-0´10	0´75	0´08	0´78
RBP4 (mg/dl)	-----	-----	-0´19	0´56
ARNm RBP4	-0´19	0´56	-----	-----
sTNFR-1 (ng/ml)	0´36	0´23	-0´21	0´61
sTNFR-2 (ng/ml)	0´08	0´78	0´08	0´86

^α Diferencia estadísticamente significativa (p<0´05).

Para analizar con mayor profundidad la correlación positiva existente entre la expresión de adiponectina y la de RBP4 en la obesidad mórbida realizamos nuevamente un análisis de regresión lineal ajustando por edad. Los resultados de dicho análisis se expresan en la tabla 22.

Tabla 22. Análisis de regresión lineal para la expresión de RBP4 en grasa subcutánea como variable dependiente.

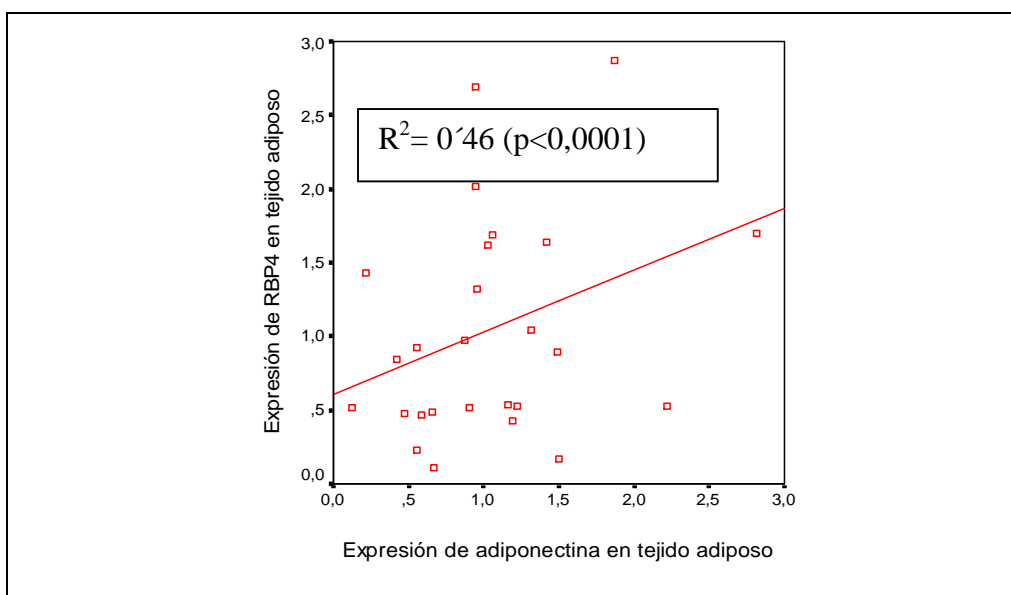
Modelo ARNm de adiponectina	Coefficiente β estandarizado	Significación	R ²
Edad	- 0´30	0´815	
ARNm de adiponectina	0´762	0´000^α	0´588

^α Diferencia estadísticamente significativa (p<0´05).

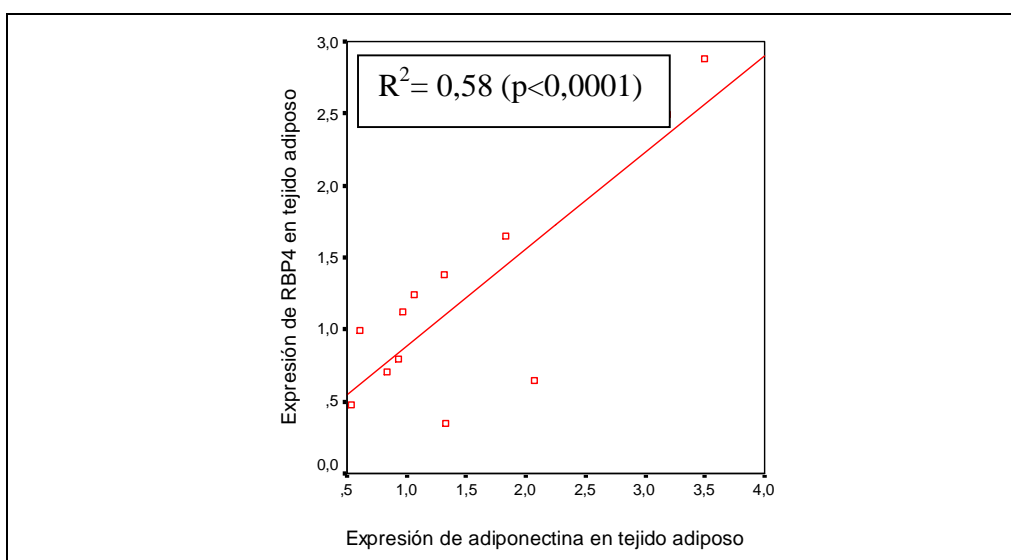
De este modo pudimos comprobar que la expresión de adiponectina explica el 58 % de la variación existente en los niveles de expresión de RBP4 entre las obesas

mórbidas. Objetivamos así la existencia de una relación lineal entre ambas variables.

En las figuras 5A y 5B se aprecia la relación lineal existente entre el ARNm de RBP4 y el ARNm de adiponectina en los dos grupos de estudio analizados con independencia de la edad y el IMC.



**Figura 5A: Asociación lineal entre expresión de RBP4 y de adiponectina normopeso, sobrepeso y obesos no mórbidos.
 R^2 del modelo de regresión lineal múltiple tras el ajuste por edad e IMC.**



**Figura 5B: Asociación lineal entre expresión de RBP4 y de adiponectina en la obesidad mórbida.
 R^2 del modelo de regresión lineal múltiple tras el ajuste por edad.**

Esta asociación entre la expresión de RBP4 y la de adiponectina podría variar en las diferentes fracciones de la grasa subcutánea o bien podía diferir en función de la célula encargada de su secreción. Para profundizar acerca de esta relación entre la expresión en grasa subcutánea de ambas adipoquinas realizamos la segunda parte del estudio. En este análisis utilizamos únicamente algunos sujetos seleccionados con obesidad no mórbida.

11 Resultados de expresión de ARNm de RBP4 y otras adipocitoquinas en las diferentes fracciones del tejido graso subcutáneo.

Esta segunda parte del estudio consistió inicialmente en la experimentación in vivo comparando la expresión de las diferentes adipoquinas en la fracción estromovascular y adipocitaria de las muestras de tejido graso subcutáneo de 8 sujetos seleccionados. Así, en la tabla 23 se muestran la expresión media de cada adipoquina en adipocito y en fracción estromovascular.

Tabla 23. Expresión media de cada adipoquina en la fracción estromovascular (FEV) y el adipocito maduro.

ARNm Adipoquina	Media FEV	Media adipocito	p
ARNm Adiponectina	0'003600	0'563200	0'057^ª
ARNm Proteína C	0'000026	0'000004	0'229
ARNm RBP4	0'000561	0'253800	0'008^ª
ARNm Resistina	0'003246	0'000026	0'10

^ª Diferencia estadísticamente significativa (p<0'05).

De este modo, confirmamos que la expresión de adiponectina y RBP4 es significativamente diferente entre ambas fracciones de grasa subcutánea.

Además pudimos comprobar que, del mismo modo que ocurrió en la expresión total en el tejido graso subcutáneo de los 61 pacientes iniciales, en estas muestras seleccionadas la expresión de RBP4 y de adiponectina también presentaron rangos similares, ostensiblemente superiores a los de resistina y proteína C.

Al expresar la relación existente entre ambas fracciones como cociente entre expresión en adipocito y expresión en fracción estromovascular podemos observar con mayor claridad en cual de dichas fracciones predomina la expresión de las diferentes adipoquinas. Tanto el RBP4 como la adiponectina se expresaron considerablemente más en los adipocitos maduros. Así, la razón entre expresión

en adipocito maduro y en fracción estromovascular para RBP4 fue de 452´4 y para la adiponectina de 156´4. En ambos casos dicha diferencia alcanzó la significación estadística.

Por el contrario, la razón de expresión fue de 0´008 para la resistina y de 0´153 para la proteína C reactiva. A diferencia de lo que ocurre con la adiponectina y el RBP4, la expresión de resistina y de proteína C reactiva es mayor en fracción estromovascular que en el adipocito maduro, aunque dicha diferencia no alcanza significación estadística. Estos resultados se aprecian en la tabla 24.

Tabla 24. Cociente entre expresión adipocitaria y expresión en fracción estromovascular de las distintas adipocitoquinas.

ARNm Adipocito/ARNm FEV de RBP4	452´4
ARNm Adipocito/ARNm FEV de Adiponectina	156´4
ARNm Adipocito/ARNm FEV de Resistina	0´008
ARNm Adipocito/ARNm FEV de Proteína C	0´153

12 Resultados de expresión de ARNm de RBP4 en monocitos de sangre periférica durante su diferenciación a macrófagos. Cultivos celulares tras la exposición a distintos estímulos proinflamatorios.

Análisis de la expresión de ARNm de RBP4 y adiponectina en monocitos de sangre periférica y tras su diferenciación a macrófagos.

Teniendo en cuenta las similitudes halladas entre la expresión de RBP4 y de adiponectina, incluso en las distintas fracciones del tejido adiposo por separado, analizamos dicha expresión en monocitos aislados de sangre periférica. Como era esperable, tras aislar los monocitos de 4 sujetos seleccionados no se objetivó expresión de adiponectina en ellos. Tampoco se detectó expresión de ARNm de RBP4.

Posteriormente, tras someter los monocitos a diferenciación a macrófagos durante 5 días, utilizando el CD68 como marcador de diferenciación volvimos a determinar la expresión de ambas adipoquinas.

La siguiente figura (Fig. 6) muestra un detalle anatomopatológico de la modificación en el tamaño y la morfología de los monocitos tras su diferenciación a macrófagos.

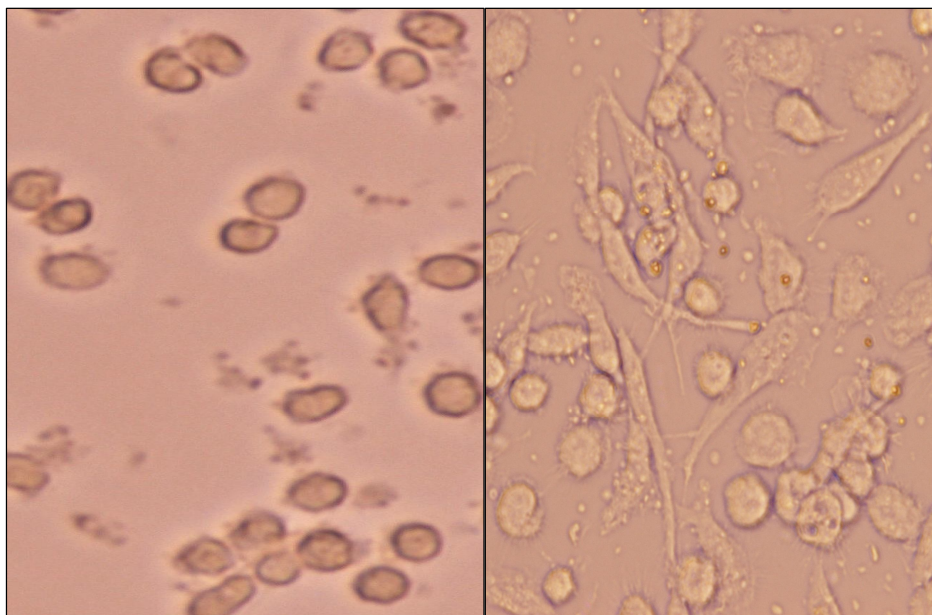


Fig 6. Modificación anatomopatológica de los monocitos tras su diferenciación a macrófagos.