

OBESITAT MÒRBIDA I ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÒLICA: ANÀLISI DEL METABOLISME DEL FERRO

Marina Bujaldón Velasco

TREBALL FINAL DE GRAU DE BIOTECNOLOGIA

Tutora acadèmica: Dra Carmen Portillo, departament de Bioquímica i Biotecnologia, carmen.portillo@urv.cat

En cooperació amb: Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV)

Supervisors: Dr Jorge Joven i Dra Anna Hernández

Gener 2020

ÍNDEX

DADES DEL CENTRE	4
RESUM	5
INTRODUCCIÓ	6
Obesitat	6
Índex de Massa Corporal (IMC)	6
Factors de risc de l'obesitat.....	7
Problema global i creixent.....	8
Tractament quirúrgic de l'obesitat: Cirurgia bariàtrica	9
Malaltia del fetge gras no alcohòlica (NAFLD).....	11
<i>Histologia</i>	12
Metabolisme del ferro	13
HIPÒTESI I OBJECTIUS	16
MATERIALS I MÈTODES	17
Disseny d'estudi	17
Procediment per l'obtenció de les mostres	17
Anàlisis bioquímiques	18
Anàlisis histològiques	18
Estadística	19
RESULTATS	20
Població d'estudi	20
Anàlisi histològica de presència de ferro al fetge.....	23
Canvis en el metabolisme del ferro: avaluació de paràmetres en plasma	24
Canvis en el metabolisme del ferro: variacions segons l'estat del fetge	27
DISCUSSIÓ	31
CONCLUSIÓ.....	35
BIBLIOGRAFIA.....	36
WEBGRAFIA.....	39
AUTOAVALUACIÓ.....	40

DADES DEL CENTRE

Aquest treball s'ha realitzat entre els mesos de setembre a desembre de 2019 a la Unitat de Recerca Biomèdica (URB) a l'antic Hospital de Reus i ha estat tutoritzat pel Dr Jorge Joven i la Dra Anna Hernández i la tutora acadèmica Dra Carmen Portillo.

La URB és un laboratori situat a l'Antic Hospital Universitari Sant Joan de Reus. Les institucions a les quals està adscrita la URB són la Universitat Rovira i Virgili, l'Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili i l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus.

RESUM

Introducció i objectius. La prevalença de l'obesitat està en constant augment arreu del món. Els problemes de salut associats a l'obesitat inclouen la diabetis tipus 2, malalties cardiovasculars, hipertensió, malalties respiratòries, problemes psicològics i problemes hepàtics. D'entre els últims, destaca la malaltia del fetge gras d'origen no alcohòlic (NAFLD). L'espectre de la NAFLD va des d'una simple esteatosi fins a l'esteatohepatitis no alcohòlica (NASH). L'objectiu d'aquest estudi ha estat observar els canvis que es produeixen en el metabolisme del ferro (ferro, ferritina i transferrina sèrics i acumulació hepàtica de ferro) en pacients amb obesitat mòrbida, tant amb NASH com sense NASH. També hem investigat què passa amb aquests pacients un any després de ser sotmesos a cirurgia bariàtrica.

Metodologia. Es van seleccionar pacients amb obesitat mòrbida sotmesos a cirurgia bariàtrica, pacients control amb normopès i pacients un any després de ser sotmesos a la cirurgia bariàtrica. Durant la cirurgia, s'obtenien mostres de sèrum, plasma i una biòpsia hepàtica. Amb la biòpsia hepàtica es va observar i quantificar el ferro en les mostres. Amb les mostres de plasma i sèrum, es van realitzar les anàlisis bioquímiques rutinàries i del metabolisme del ferro.

Resultats. Amb les anàlisis histològiques vam observar que els fetges de pacients sense NASH contenien més ferro que els fetges de pacients amb NASH. Pel que fa al metabolisme del ferro en sèrum, vam observar que el ferro i la ferritina estaven augmentats en els pacients obesos respecte el grup control amb normopès. A més, els focus d'inflamació lobular augmentaven a mesura que augmentava tant la concentració de ferro, com de ferritina i transferrina. El mateix succeïa en el cas de l'efecte *ballooning* i de l'estat de fibrosi, tant pel ferro com per la transferrina.

Conclusió. El ferro sembla ser un cofactor important en la patogènesi i la progressió de la NASH. S'ha demostrat que l'augment de ferritina i transferrina són freqüents durant la NASH. La fibrosi seria la característica de la NASH que podria estar més lligada a canvis en les concentracions de ferro, ferritina i transferrina.

Paraules clau. Obesitat mòrbida, NASH, cirurgia bariàtrica, fetge, ferro, ferritina, transferrina, esteatosi.

INTRODUCCIÓ

Obesitat

L'obesitat és una malaltia crònica i complexa que es defineix com un excés de greix corporal. La seva prevalença augmenta exponencialment i contínuament en adults, adolescents i nens, i és per aquest motiu que l'obesitat s'ha convertit en un dels problemes de salut pública més importants a tot el món (Bergman et al., 2011). L'obesitat es produeix quan l'excés d'acumulació de greix (regionalment, globalment o tots dos) resulta patològic (Purnell, 2000). Aquesta malaltia és un factor de risc per a moltes altres malalties: la diabetis tipus 2, malalties cardiovasculars, hipertensió i càncer. Per altra banda, també té efectes negatius ja sigui en la qualitat de vida o la productivitat del treball dels qui la pateixen o els costos sanitaris que comporta la pròpia malaltia (Bergman et al., 2011).

Quan l'organisme té un excés d'energia, aquest es converteix en triglicèrids, que s'emmagatzemen en dipòsits al teixit adipós. Aquests augmenten de mida, provocant el conseqüent augment de greix i de pes corporal. Segons la seva localització, el teixit adipós es classifica principalment en teixit adipós subcutani (situat sota la pell) i teixit adipós visceral (associat a òrgans interns). A més de la distribució del greix, la morfologia dels adipòcits (hipertrofia o hiperplàsia) també contribueix a les anomalies metabòliques associades a l'obesitat. En un estat crònic de desequilibri energètic positiu, la mida dels adipòcits pot arribar a un llindar crític i reclutar cèl·lules precursors per augmentar el nombre d'adipòcits (Longo et al., 2019).

Índex de Massa Corporal (IMC)

L'obesitat es sol classificar per l'IMC (Índex de Massa Corporal). Aquest índex es calcula dividint el pes corporal en quilograms entre l'alçada en metres al quadrat (kg/m^2) (Engin, 2017). L'IMC és, amb diferència, l'enfocament més aplicat per caracteritzar i classificar l'obesitat en éssers vius. Aquesta mesura va ser introduïda al segle XIX per Quetelet, que va identificar que calia corregir les diferències de mida corporal quan es comparava l'adipositat entre els pacients. L'IMC s'aplica rutinàriament no només en estudis epidemiològics, sinó també a la pràctica clínica (Bergman et al., 2011).

És important destacar que la relació entre l'IMC i la massa de greix corporal no és suficient per estimar amb precisió l'adipositat en un individu particularment ja que l'IMC no té en compte la composició corporal (com per exemple la massa muscular esquelètica) (Goossens, 2017).

De manera general, segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS), l'IMC presenta diferents categories (Blundell, Dulloo, Salvador, & Frühbeck, 2014):

- $<18,5 \text{ kg/m}^2$ (infra-pes)
- $18,5\text{--}24,9 \text{ kg/m}^2$ (pes normal)
- $25,0\text{--}29,9 \text{ kg/m}^2$ (sobrepès o pre-obès)
- $30,0\text{--}34,9 \text{ kg/m}^2$ (obès grau I)
- $35,0\text{--}39,9 \text{ kg/m}^2$ (obès grau II)
- $>40,0 \text{ kg/m}^2$ (obès grau III)

La prevalença mundial de sobrepès i obesitat és elevada i està en augment. L'OMS estima que més d'1,3 mil milions d'adults arreu del món tenen sobrepès, és a dir, un índex de massa corporal entre $25\text{--}30 \text{ kg/m}^2$ i 600 milions de persones són obeses ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (Di Angelantonio et al., 2016).

Factors de risc de l'obesitat

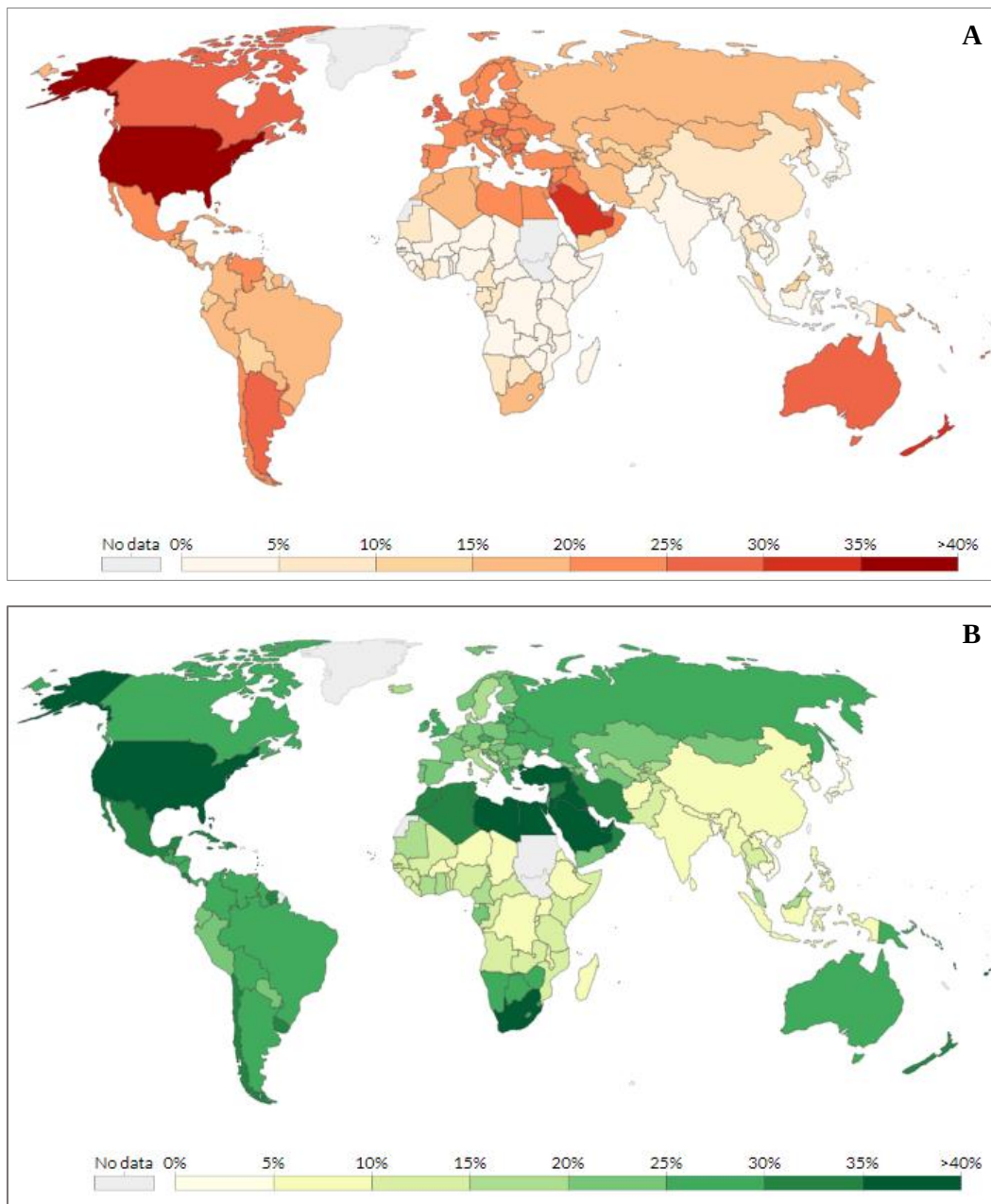
L'obesitat és causada per un desequilibri energètic entre les calories que s'ingereixen i les calories que es consumeixen. Existeixen molts factors que contribueixen a l'obesitat, incloent una dieta pobre o deficient en els nutrients necessaris que necessitem, manca d'exercici, certs medicaments, condicions mèdiques, factors socioeconòmics i genètica [1]:

- Dieta: Una dieta molt calòrica, sense fruites ni verdures, basada en menjar ràpid i en begudes calòriques generalment gasoses contribueix a l'augment de pes. S'ha observat que existeixen dos components dietètics que contribueixen majoritàriament a l'augment de pes i a l'obesitat: el sucre i el greix saturat. Pel que fa al sucre, s'ha estudiat que el seu consum excessiu és el factor més directe causant de l'obesitat a llarg termini. Per altra banda, el consum de greixos saturats s'ha relacionat amb un augment de les malalties cardiovasculars. A més, atès que els aliments alts en greixos saturats solen ser també elevats en calories, també tenen un paper important en el desenvolupament de l'obesitat [1].
- Factors mèdics: Si bé l'obesitat està relacionada generalment amb la dieta, hi ha alguns medicaments que poden contribuir a l'augment de pes que condueix a l'obesitat. Aquests medicaments inclouen alguns antidepressius, anticonvulsius, medicaments per a la diabetis, medicaments antipsicòtics i esteroides [1].
- Genètica: la genètica també pot jugar un paper important en l'eficàcia amb la què el cos converteix els aliments en energia, en com el cos regula la gana i en la forma en què el cos crema calories durant l'exercici [1].
- Estil de vida: en el cas dels adults, un estil de vida sedentari s'associa a un major risc de desenvolupar sobrepès i obesitat. A més, l'estrès crònic fa que l'organisme activi vies de senyalització que impliquen l'activació de factors relacionats amb l'estrès i hormones d'estrès, com el cortisol, que provoca que el cos respongui davant d'aquest estrès. A més,

no dormir prou o dormir massa també pot provocar canvis hormonal que provoquen un augment de la gana [1].

Problema global i creixent

En els últims anys, la prevalença global de l'obesitat ha crescut significativament. El predomini mundial d'obesitat s'ha duplicat aproximadament des del 1980 fins al punt que més d'un terç de la població mundial pateix de sobrepès i d'obesitat. Tot i que hi ha certa variabilitat entre països i regions, aquesta tendència és relativament uniforme a tot el món. (Figura 1).



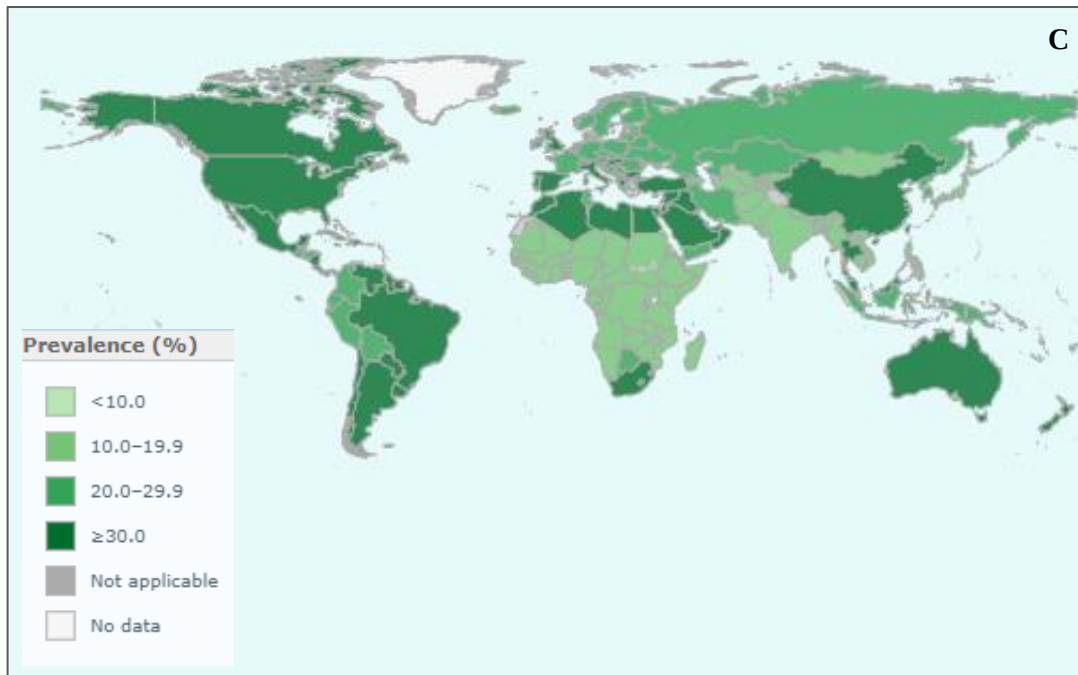


Figura 1. Prevalença global de l'obesitat en (A) homes (+18 anys), (B) dones (+18 anys) i (C) nens i adolescents (5-19 anys) (c) al 2016. Adaptació de l'OMS. * $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$ [2][3].

La prevalença en dones sempre ha estat més elevada que en homes (figura 2), i a més a més, la proporció d'individus obesos en països amb ingressos elevats també és superior que en països en progrés (Chooi, Ding, & Magkos, 2019).

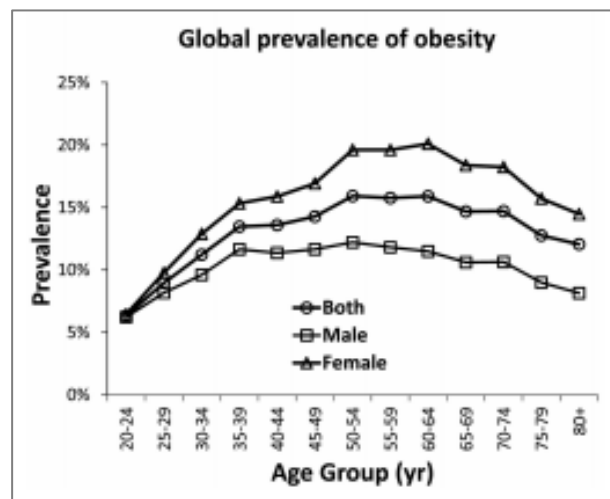


Figura 2. Prevalença d'obesitat segons l'edat (Chooi et al., 2019)

Tractament quirúrgic de l'obesitat: Cirurgia bariàtrica

Actualment, la cirurgia bariàtrica es considera una de les opcions més eficaces pel tractament de l'obesitat mòrbida. Comporta una important pèrdua de pes i millores en les comorbiditats relacionades amb l'obesitat en comparació amb les intervencions no quirúrgiques,

independentment del tipus de procediment quirúrgic utilitzat. La cirurgia bariàtrica provoca la pèrdua de pes mitjançant la restricció de la quantitat d'aliments que pot contenir l'estómac, provocant una malabsorció de nutrients o mitjançant una combinació tant de restricció gàstrica com de malabsorció. Els procediments bariàtrics també solen provocar canvis hormonals. Actualment, la majoria de les cirurgies per perdre pes es realitzen mitjançant tècniques mínimament invasives (laparoscòpia) (Angrisani et al., 2015) [4].

Els procediments de cirurgia bariàtrica més comuns són el bypass gàstric Roux-en-Y (RYGB, de l'anglès *Roux-en-Y gastric bypass*), la gastrectomia vertical (SG de l'anglès *Sleeve Gastrectomy*), seguits per la banda gàstrica ajustable (AGB, de l'anglès *Adjustable Gastric Band*) i el desviament biliopancreàtic amb interruptor duodenal (BPD-DS, de l'anglès *Biliopancreatic diversion-duodenal switch*) (figura 3). No obstant, els procediments de cirurgia bariàtrica més realitzats són SG i RYGB.

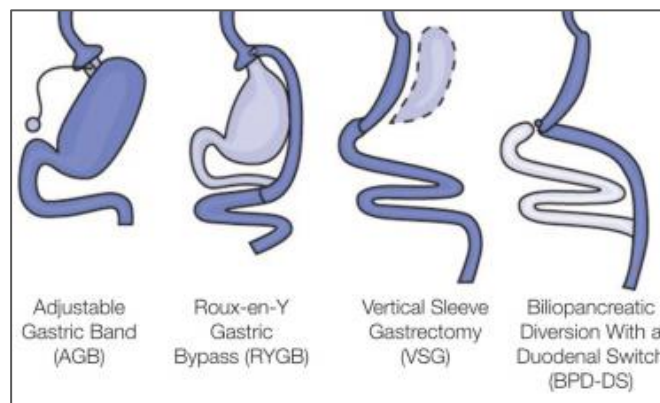


Figura 3. Intervencions de cirurgia bariàtrica i metabòlica (Marion L, 2012)

- *Sleeve Gastrectomy*: és una tècnica de cirurgia bariàtrica restrictiva. En els darrers anys s'ha considerat com un procediment bariàtric ideal ja que presenta diversos avantatges en comparació amb procediments bariàtrics més complexos, incloent evitar un *bypass* intestinal ni provocar anastomosi digestiva. Això vol dir que es pot accedir a tot el tracte digestiu sense modificar-ne l'anatomia (Stenard & Iannelli, 2015). La SG obté millors resultats que altres tècniques restrictives i és similar a RYGB en termes de pèrdua de pes i de millora del metabolisme dels carbohidrats a curt i mitjà termini (Benaiges et al., 2015).

Consisteix en una gastrectomia vertical subtotal amb preservació del pílor, incloent la resecció longitudinal del *fundus*, *corpus* i *antrum*, per crear un conducte tubular al llarg de la curvatura inferior. La resecció comprèn aproximadament el 80% de l'estómac (Benaiges et al., 2015).

- *Bypass gàstric Roux-en-Y (RYGB)*: Pertany al grup de procediments combinats perquè genera restricció i malabsorció. La restricció es genera tallant l'estómac proximal, reduint així el seu volum i creant una bossa d'aproximadament 10-25 ml, deixant la resta de l'estómac exclosa. D'altra banda, la malabsorció es genera dividint l'intestí prim en una extremitat alimentària (extremitat Roux) i una extremitat biliopancreàtica (Palermo, Acquafresca, Rogula, Duza, & Serra, 2015).

Malaltia del fetge gras no alcohòlica (NAFLD)

La malaltia del fetge gras no alcohòlica (NAFLD, de l'anglès *Non-alcoholic fatty liver disease*) és actualment la malaltia hepàtica crònica més comuna en països desenvolupats a causa de l'augment en el nombre de persones amb obesitat. Es caracteritza per la inflamació del fetge, que pot avançar cap a la fibrosi, cicatrització i el dany irreversible. La NAFLD es produeix en persones que no beuen alcohol en excés però la seva histologia hepàtica és molt semblant a la de pacients amb malaltia hepàtica d'origen alcohòlica. La NAFLD sovint s'associa a la diabetis mellitus tipus 2, a l'obesitat, dislipèmia i/o hipertensió arterial, totes elles afeccions que comprenen la síndrome metabòlica (Pappachan, Babu, Krishnan, & Ravindran, 2017) (Mary E Rinella, 2015).

L'espectre de la NAFLD va des d'una simple esteatosi, que normalment no és progressiva, fins a l'esteatohepatitis no alcohòlica (NASH), que pot avançar fins a la cirrosi i les seves complicacions (figura 4). Els pacients solen ser asimptomàtics, i la seva avaluació histològica és mitjançant biòpsia hepàtica estàndard tant per diagnosticar NAFLD com per diferenciar entre esteatosi simple i NASH (Mary E Rinella, 2015).

La NASH condueix a lesions hepàtiques per resistència a la insulina i a un excés d'àcids grassos lliures en els hepatòcits, provocant estrès oxidatiu i lipotoxicitat que promouen l'apoptosi o necroptosi. Els hepatòcits danyats desencadenen inflamació i fibrogènesi, però també poden conduir a l'aparició de cèl·lules progenitores fibrogèniques (Schuppan & Schattenberg, 2013).

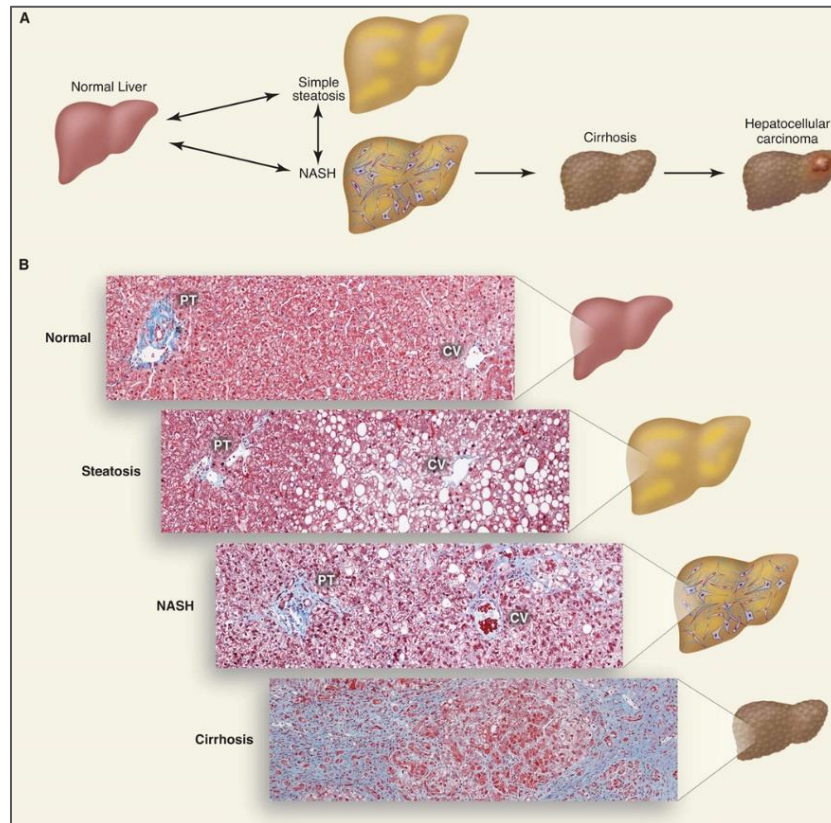


Figura 4. (A) Representació esquemàtica de la progressió de NAFLD. (B) Seccions histològiques que mostren el fetge normal, l'esteatosi, la NASH i la cirrosi. Es mostra la triada portal (PT) i la vena central (CV) (Cohen, Horton, & Hobbs, 2011).

Si bé originalment es deia que era una malaltia predominant en les dones, ara s'ha trobat que la NAFLD es produeix amb més freqüència en els homes, amb una prevalença del 31% en homes i un 16% en dones (Mary E Rinella, 2015).

El mecanisme pel qual la NAFLD condueix a la NASH se sol atribuir a dos passos. El primer consisteix en la deposició de greix als hepatòcits que condueix a la peroxidació dels lípids per mitocondris disfuncionals. Els radicals lliures dels àcids grassos oxidats estimulen la producció de citocines que dóna lloc a l'augment de l'estrès oxidatiu. El segon pas implica regulació parcial de cèl·lules estelades a causa d'un augment dels nivells del factor de necrosi tumoral-alfa (TNF- α). Es creu que aquest pas condueix a la progressió de la malaltia a fibrosi i cirrosi (Mary E Rinella, 2015).

Histologia

L'avaluació histològica mitjançant biòpsia hepàtica continua essent la norma d'or per a diferenciar esteatosi simple de NASH, ja que és l'única manera de diferenciar amb precisió les formes lleus de les formes moderades de la malaltia hepàtica. La valoració histològica té en compte diversos factors: efecte *ballooning*, extensió de la fibrosi, inflamació lobular, grau d'esteatosi,

microgranulomes i macròfags pigmentats. D'aquesta manera, existeix un sistema de puntuació histològic estàndard conegut com a *NAFLD Activity Score* (NAS).

De forma general, hi ha tres paràmetres que tenen més importància i són els que se solen utilitzar amb més freqüència per al càlcul del NAS. Per una banda, l'estat de la fibrosi, que pot arribar a tenir fins a 5 punts (de 0-4):

- Una puntuació de 0 significa que no hi ha fibrosi.
- Una puntuació d'1 està relacionada amb una fibrosi periportal o perisinusoidal.
- Una puntuació de 2 significa que s'observa tant fibrosi periportal com perisinusoidal.
- Una puntuació de 3 significa que ens trobem amb un tipus de fibrosi coneguda com a *bridging fibrosis*. Aquest terme fa referència a la presència de bandes de diferent gruix. Com més àmplies siguin les bandes, significa un major avançament de la malaltia.
- Una puntuació de 4 es tradueix en cirrosis en el teixit.

Per altra banda, s'estudia la inflamació lobular del teixit i té 4 puntuacions (0-3):

- Una puntuació de 0 significa que no hi ha focus d'inflamació.
- Es puntua amb 1 quan els focus d'inflamació són menors a 2.
- Quan els focus es troben entre 2-4 la puntuació és de 2.
- Quan els focus són superiors a 4 la puntuació és de 3.

Finalment es calcula l'efecte *ballooning* de les cèl·lules del teixit. Es tracta d'una variant extrema de degeneració hidròpica. Aquest efecte es classifica segons l'existència de cèl·lules amb efecte *ballooning*. En aquest cas, la puntuació va de 0-2, sent una puntuació de 0 la no existència de cèl·lules amb aquest efecte, mentre que una puntuació de 2 significa que hi ha moltes cèl·lules al teixit amb efecte *ballooning*.

La suma d'aquests components representa la puntuació NAS. Una puntuació igual o superior a 5 està relacionat amb un diagnòstic de NASH (Mary E Rinella, 2015).

Metabolisme del ferro

El ferro és un element essencial per a nombrosos processos fisiològics de l'organisme. A més, és un component dels citocroms i de la molècula hemo, que al seu torn forma part de l'hemoglobina i la mioglobina. També juga un paper fonamental en els processos d'oxidació-reducció en les cadenes respiratòries dels mitocondris, mecanisme clau en la respiració cel·lular. En general, participa en la integritat i manteniment cel·lular formant part de catalases, peroxidases i oxigenases (Baeza CI., 2016).

A l'organisme humà, el ferro també forma part de complexos no relacionats amb el grup hemo, com els enzims ferro-flàvics, la ferritina i la transferrina. Pràcticament dos terços del ferro de tot l'organisme es troba unit a l'hemoglobina dins dels glòbuls vermells circulants, 25% emmagatzemat i 15% unit a la mioglobina en el teixit muscular i als enzims ja comentats. El conjunt de la ferritina i l'hemosiderina es considera la reserva corporal d'aquest metall (Baeza CI., 2016).

Malgrat la seva gran importància, l'excés de ferro pot comportar hemocromatosi, una patologia caracteritzada per una acumulació de ferro a diversos òrgans degut a un augment en la seva absorció. L'acumulació de ferro pot produir dany cel·lular per estrès oxidatiu, mitjançant la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) a través de la reacció de Fenton, les quals actuen sobre components biològics com els lípids, proteïnes i ADN. La reacció de Fenton consisteix en l'addició de sals de ferro en presència de H_2O_2 , en medi àcid per la formació de radicals OH (Rubio-Clemente, Chica, & Peñuela, 2014). Es necessita principalment ferro per la producció d'espècies amb radicals hidroxil, ferril i perferril d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) menys perjudicials com ara H_2O_2 i superòxid mitjançant reaccions de Fenton (Moya et al., 2015).

El ferro pot emmagatzemar-se individualment a la ferritina (Ft) al citosol dels enteròcits o travessar la membrana basolateral i ser transportat a la resta de l'organisme. En aquesta membrana s'hi troba la ferroportina (FPN), proteïna implicada en el transport i reciclatge del ferro i sobre la qual actua l'hepcidina que és una hormona que regula el metabolisme del ferro. La FPN exporta ferro de l'interior a l'espai extracel·lular dels enteròcits, macròfags i hepatòcits. Una vegada extret per la FPN, el Fe^{2+} s'oxida a Fe^{3+} per a que la transferrina (Tf), la proteïna principal en el transport del ferro, faci circular aquest mineral per tot l'organisme en funció dels requeriments fisiològics (Baeza CI., 2016).

El ferro lliure provoca la peroxidació dels lípids convertint els hidroperòxids en radicals peroxils i alcoxils reactius. La transferrina afavoreix les reaccions d'oxidació que involucren grups aldehids de carbohidrats i proteïnes amb grups amino, que dóna lloc a la formació de productes glicats. Per aquesta raó és vital que el ferro es transporti de forma redox-inactiu. El paper principal de la transferrina és, per tant, transportar ferro de forma segura per tot el cos per proveir cèl·lules en creixement (Gomme & McCann, 2005).

La ferritina, a més de fixar i emmagatzemar el ferro d'una forma biològicament disponible per a processos cel·lulars vitals, protegeix les proteïnes, lípids i l'ADN de la toxicitat d'aquest element metàl·lic. La concentració plasmàtica de ferritina reflexa la quantitat de ferritina dins de les cèl·lules del cos i s'ha utilitzat durant dècades com un indicador diagnòstic de la concentració de ferro al fetge. Les concentracions poden ser elevades, independentment dels dipòsits del metall, en presència de certes síndromes clíniques, entre els quals s'inclouen la malaltia hepàtica, la

malaltia renal, la infecció pel virus de la immunodeficiència humana (VIH), la infecció o inflamació sistèmica no associada a VIH i els processos neoplàsics (Carrillo Esper et al., 2015) (Ramírez et al., 2004)

Els canvis que es produeixen en el metabolisme del ferro es poden estudiar a partir de l'observació de les concentracions de ferro, ferritina i transferrina, que són les principals molècules implicades en el metabolisme del ferro. Un excés de ferro lliure pot facilitar el desenvolupament de la inflamació hepàtica en la patogènesi de NASH (Moya et al., 2015).

HIPÒTESI I OBJECTIUS

L'obesitat i l'esteatohepatitis no alcohòlica (NASH) són dues malalties que estan molt relacionades i perjudiquen l'estat del fetge. La part més problemàtica d'aquestes malalties radica en les possibles conseqüències a llarg termini si no es realitza cap tractament. Se sap també que el fetge té un paper important en el metabolisme del ferro: emmagatzema ferro, regula el seu trànsit i és l'òrgan principal productor de proteïnes com la transferrina.

Creiem que l'obesitat i la NASH podrien modificar el metabolisme del ferro degut als canvis que experimenta el fetge durant aquestes patologies. D'altra banda, se sap que quan els pacients es sotmeten a cirurgia bariàtrica, les principals comorbiditats relacionades amb l'obesitat desapareixen. Creiem, per tant, que la cirurgia bariàtrica també comportaria una modificació en el metabolisme del ferro, potser similar a la d'individus amb normopès.

L'objectiu de l'estudi ha estat avaluar els canvis en el metabolisme del ferro associats a obesitat, al desenvolupament de NASH i també canvis deguts a la cirurgia bariàtrica.

- A nivell tissular: Estudiar la presència hepàtica de ferro en pacients amb obesitat, tant amb NASH com sense NASH a partir de talls histològics del fetge.
- A nivell sèric: Determinar les concentracions circulants de ferro, ferritina i transferrina (principals implicats en el metabolisme del ferro) per estudiar:
 - Canvis en el metabolisme del ferro relacionats amb l'obesitat (comparant pacients controls (normopès) amb pacients obesos sense NASH i amb NASH)
 - Canvis en el metabolisme del ferro relacionats amb la NASH (comparant pacients obesos amb NASH i sense NASH)
 - Avaluar si la cirurgia bariàtrica (CB) modifica les concentracions en el sèrum de les principals molècules implicades en el metabolisme del ferro.

MATERIALS I MÈTODES

Disseny d'estudi

El nostre estudi inclouïa pacients amb obesitat ($n = 100$) que es van sotmetre a cirurgia bariàtrica al l'Hospital Sant Joan de Reus. Els criteris d'inclusió a l'estudi van ser tenir un IMC igual o superior a 35 i ser majors d'edat (18 anys).

D'entre aquests 100 pacients, 50 tenien NASH (valor de NAS igual o superior a 5) i 50 pacients no tenien NASH (valor de NAS igual o inferior a 2). D'entre aquests pacients, 50 van acceptar fer una visita de seguiment al cap de 12 mesos de la intervenció quirúrgica (Figura 5).

Per tal de fer comparacions, vam utilitzar mostres de sang de pacients voluntaris sans ($n = 50$) obtinguts del Banc de Mostres Biològiques de l'Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (Biobanc-IISPV).

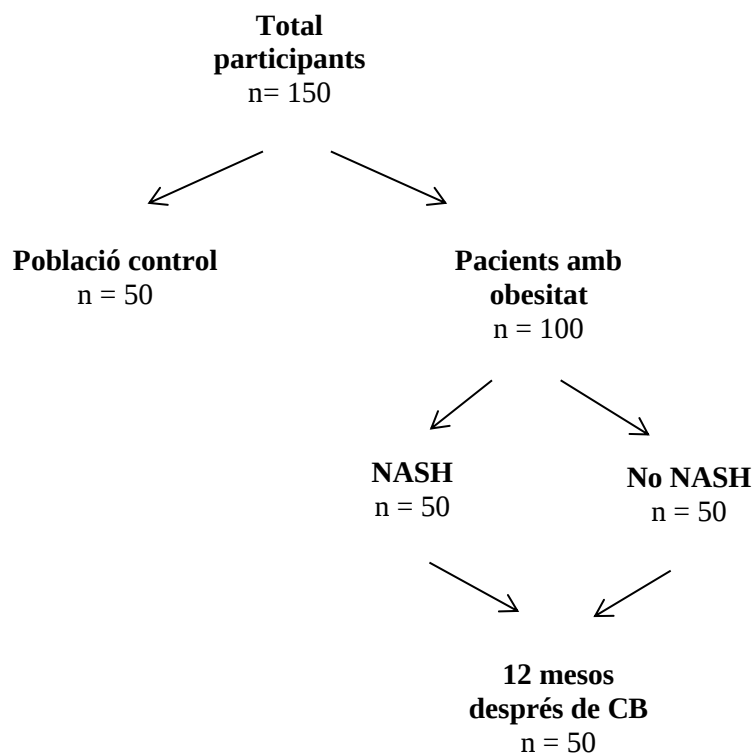


Figura 5. Representació esquemàtica de la distribució dels pacients en l'estudi

Procediment per l'obtenció de les mostres

Es van obtenir les mostres de sang i de fetge de pacients amb obesitat mòrbida en el moment de la intervenció de cirurgia bariàtrica. Dotze mesos després de la cirurgia, alguns d'aquests pacients

(n=50) van accedir a proporcionar mostres de sang i a fer-se una punció per obtenir una petita biòpsia de fetge per tal de controlar-ne l'estat.

Una vegada obtingudes les mostres de sang, es van centrifugar a 2500 rpm durant 15 minuts a 4°C per obtenir plasma i sèrum. Aquests es van guardar a -80°C per anàlisis futurs.

La mostra de fetge es va mantenir en formaldehid durant un temps raonable per tal que absorbissin el formaldehid tant com fos necessari (3-4 dies). A partir d'aquí, es van poder utilitzar els teixits per a fer anàlisis histològiques.

Anàlisis bioquímiques

Mitjançant l'ús d'un analitzador automàtic (COBAS 8000, Roche Farma), es van determinar els paràmetres bioquímics: glucosa, insulina, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicèrids, transaminases (ALT, AST, GGT), hemoglobina, plaquetes, leucòcits, albúmina, ferro, ferritina i transferrina. Les mostres de sèrum o plasma van ser sotmeses a quimioluminescents, immunoanàlisis o assaigs enzimàtics seguint procediments estàndards del Laboratori de Referència del Camp de Tarragona i Terres de l'Ebre.

Les concentracions de ferro, ferritina i transferrina es van determinar de forma rutinària mitjançant analitzadors automàtics dels laboratoris clínics de l'Hospital Verge de la Cinta de Tortosa.

Es va fer una avaluació del model homeostàtic de resistència a la insulina (HOMA-IR) per estimar la resistència a la insulina.

Anàlisis histològiques

Les mostres de fetge que es van mantenir en formaldehid van ser incloses en parafina i tallades a 2 µm utilitzant un micròtom. Seguidament, van ser deshidratades a partir de diferents solucions amb concentracions variables de xilol i etanol. Per hidratar les mostres s'introduïen primerament en una solució de xilol, després en una solució de xilol-etanol, en successives solucions de diferents concentracions d'etanol i, finalment, en aigua destil·lada. Es van realitzar 3 tipus de tincions per avaluar la NAS: Hematoxilina-Eosina, Sirius Red i tricròmic de Masson.

L'hematoxilina tenyeix les estructures àcides com el nucli de color blau o lila, mentre que la eosina tenyeix estructures bàsiques com el citoplasma de color rosa. La tinció de Sirius Red tenyeix el col·lagen i la tinció de tricròmic de Masson, que utilitza tres colorants (hematoxilina, fucsina i verd llum) tenyeix diferents components com cèl·lules musculars i també fibres de col·lagen.

Un cop tenyits els talls de fetge, la puntuació NAS es va determinar a partir de l'observació dels talls al microscopi i avaluant els components que conformen la NAS (esteatosi, inflamació lobular, fibrosi i efecte *ballooning*). D'aquesta manera, els pacients es van classificar en NASH o no NASH.

Per altra banda, es va determinar la presència d'acumulació hepàtica de ferro. Per tal de realitzar-ho, es van tenyir els talls de fetge amb Blau de Prússia partir del kit de Blau de Prússia d'Abcam (ab150674; Cambridge, UK). Aquesta tinció conté una barreja de solució de tint de ferro (1:1 de solució de ferrocianidina potàssica i solució d'àcid hidroclorohídric). El resultat dona una tinció de color blau. La contratinció es va realitzar amb una solució de *Fast Red* que tenyeix els nuclis de color vermell.

Una vegada realitzada la tinció, es va quantificar l'àrea tenyida de blau amb l'eina *ImageJ*. Aquest programa té la capacitat de discriminar les diferents tonalitats de colors i en el nostre cas, es van detectar les àrees de color blau i es va realitzar una quantificació d'àrea tenyida.

Estadística

Els valors erronis (outliers) van detectar-se mitjançant el mètode del rang interquartil. Aquests valors van ser reemplaçats per la mediana del grup. Per tal de comparar variables no paramètriques entre els diferents grups es va utilitzar el test de l'U de Mann-Whitney. El test de Wilcoxon es va utilitzar per comparacions emparellades de variables quantitatives no paramètriques. Per comparar variables categòriques es van utilitzar taules de contingència i el khi-quadrat. Per estudiar la relació entre dues variables quantitatives, es va realitzar una correlació de Spearman. Es va considerar que hi havia diferències significatives entre grups quan el p valor <0,05. Les variables quantitatives s'expressen com a medianes (rang interquartil) i les variables qualitatives com a % del total de participants. Les anàlisis estadístiques es van realitzar amb el programa SPSS 25 (IBM Corp., Chicago, IL, USA) i GraphPad Prism 8.3 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTATS

Població d'estudi

A la taula 1 es troben descrites les característiques clíniques i bioquímiques dels diferents grups d'estudi.

Per una banda, tant al grup control com als dos grups de pacients amb obesitat (no NASH i NASH) hi havia un percentatge major de dones que d'homes. Només als dotze mesos després de la cirurgia bariàtrica el percentatge d'homes era major respecte el de dones. Pel que fa a les edats, vam observar que en els 4 grups eren semblants.

Respecte l'IMC, òbviament observàvem diferències entre els pacients amb obesitat i el grup control, sent l'IMC dels primers significativament superior. No obstant, entre els pacients obesos amb i sense NASH no s'observaven diferències. Pel que fa als pacients un any després de ser sotmesos a cirurgia bariàtrica, vam observar que l'IMC disminuïa considerablement respecte els pacients amb obesitat.

També hi havia diferències quant a les comorbiditats. Es podia observar que la diabetis mellitus tipus 2, la hipertensió i la dislipèmia augmentaven significativament en els pacients amb obesitat respecte el grup control, i a més eren una mica superiors en els pacients amb NASH comparat amb els pacients sense NASH. D'altra banda, s'observava una disminució d'aquestes malalties en els pacients al cap de l'any de la cirurgia bariàtrica.

Tant el colesterol total, el colesterol HDL com el colesterol LDL estaven disminuïts en pacients amb obesitat (tant NASH com no NASH) respecte el grup control. D'entre els pacients amb obesitat, el colesterol encara disminuïa més en el grup amb NASH respecte el grup sense NASH. Per altra banda, la glucosa, els triglicèrids, la insulina i el HOMA IR augmentaven en els pacients obesos comparat amb el grup control. Tots aquests valors disminuïen en els pacients al cap de l'any de la cirurgia bariàtrica.

Pel que fa a l'hemograma, no es van veure canvis realment importants. Destacava la concentració de plaquetes i de leucòcits, que era superior en els pacients obesos comparat al grup control. Al cap de l'any de la cirurgia bariàtrica, el valor d'aquestes variables també era menor comparat amb el valor dels pacients amb i sense NASH.

Pel que fa a les transaminases, el contingut d'ALT, AST i GGT augmentava tant en el grup amb NASH com al grup sense NASH respecte el grup control. Entre els dos grups de pacients obesos, la concentració de transaminases és superior als pacients amb NASH. Aquests valors es veien altra vegada disminuïts en els pacients al cap de l'any de realitzar-se la cirurgia bariàtrica.

Finalment, pel que fa a la medicació, es veia un clar augment de pacients amb obesitat que es prenen medicació per alguna comorbiditat associada en comparació amb el grup control. A més, després de la cirurgia bariàtrica, el percentatge de pacients que prenia algun fàrmac tornava a valors similars als del grup control, ja que les comorbiditats també revertien. D'entre els pacients obesos, els pacients amb NASH prenen, de forma general, més medicació que els pacients sense NASH.

Taula 1. Característiques clíniques i bioquímiques dels quatre grups d'estudi.

	Grup control (n = 50)	No-NASH (n = 50)	NASH (n = 50)	12 mesos després de CB (n = 50)	p-valor
Característiques clíniques					
Sexe (Dona, %)	64.7	81.6	64	33	a, c
Edat (anys)	41 (35-47)	50 (42-61)	50 (42-56)	48 (41-61)	a, b, d
IMC (kg/m ²)	25 (23-30)	45 (40-50)	45 (41-51)	34 (31-37)	a, b, d
PAS (mmHg)	120 (110-130)	127 (113-145)	129 (122-143)	134 (116-147)	a, b, d
PAD (mmHg)	80 (70-88)	71 (64-80)	80 (71-87)	76 (67-88)	a, c
DMT2 (%)	9.8	36.7	50	15	a, b, e, f
Hipertensió (%)	11.8	55.1	64	20	a, b, e, f
Dislipèmia (%)	2	42.9	48	6	a, b, e, f
Esteatosi (%)	-	5 (2-7.5)	50 (40-70)	-	c
NAS	-	1 (1-2)	5 (5-6)	-	c
Variables bioquímiques generals					
Colesterol total (mmol/L)	5.0 (4.5-5.6)	3.7 (3.3-4.6)	3.8 (3.4-4.6)	4.8 (4.4-5.7)	a, b, e, f
Colesterol HDL (mmol/L)	1.46 (1.24-1.86)	1.06 (0.93-1.54)	0.96 (0.85-1.17)	1.56 (1.34-1.84)	a, b, c, e, f
Colesterol LDL (mmol/L)	2.93 (2.46-3.5)	2.52 (2.05-3.11)	2.25 (1.73-2.87)	2.95 (2.51-3.34)	a, b, e, f
Triglicèrids (mmol/L)	0.90 (0.60-1.40)	1.31 (1.04-1.65)	1.44 (1.26-1.88)	0.99 (0.81-1.18)	a, b, c, e, f
Glucosa (mmol/L)	4.65 (4.40-5.13)	6.61 (5.16-8.69)	6.52 (5.43-8.77)	4.69 (4.37-5.30)	a, b, e, f
Insulina (pmol/L)	46.7 (29.4-61.3)	49.7 (29.5-112.1)	84.7 (59.2-168.1)	42.7 (27.5-71.4)	b, c, f
HOMA IR	1.39 (1.03-1.90)	2.73 (1.11-5.01)	3.71 (2.29-6.91)	1.38 (0.92-2.04)	a, b, c, e, f
Hemograma					
Hemoglobina (g/dL)	14.4 (13.4-15.1)	13.1 (12.4-14.2)	14.2 (13.5-15.2)	13.4 (12.2-14.7)	a, c, d, f
Plaquetes (x10 ⁹ /L)	217 (194-263)	235 (194-299)	245 (207-292)	234 (184-291)	b
Leucòcits (x10 ⁹ /L)	6.7 (5.5-8.2)	7.5 (6.0-9.1)	8.2 (7.3-9.8)	6.8 (5.6-7.6)	b, c, e, f
Transaminases					
ALT (μKat/L)	0.31 (0.25-0.46)	0.51 (0.34-0.76)	0.82 (0.57-1.29)	0.24 (0.19-0.29)	a, b, c, d, e, f
AST (μKat/L)	0.34 (0.30-0.40)	0.46 (0.37-0.62)	0.72 (0.47-0.99)	0.29 (0.23-0.32)	a, b, c, d, e, f
GGT (μKat/L)	0.20 (0.13-0.33)	0.31 (0.23-0.63)	0.54 (0.38-0.67)	0.26 (0.16-0.38)	a, b, c, e, f
Medicació					
Metformina (%)	0	24.5	34	4	a, b, e, f
Sulfonilurees (%)	2	8.2	6	2	
Insulina (%)	2	4.1	8	2	
ACE-ARBS(%)	0	40.8	44	10	a, b, d, e, f
Diürètic (%)	3.9	4.1	14	4	
Estatines (%)	2	20.4	38	6	a, b, c, e, f

IMC: índex de massa corporal, PAS: pressió arterial sistòlica, PAD: pressió arterial diastòlica, DMT2: Diabetis mellitus tipus 2, HDL: lipoproteïnes d'alta densitat, LDL: lipoproteïnes de baixa densitat, HOMA IR: avaluació del model homeostàtic per la resistència a insulina, ALT: alanina aminotransferasa, AST: aspartat aminotransferasa, GGT: gamma-glutamil transferasa, ACE-ARBS: enzim convertidor d'angiotensina i bloquejadors de receptors d'angiotensina. Les variables no paramètriques es mostren amb

la mediana i IQR (25%-75%). Les variables qualitatives es mostren com el percentatge (%) dels participants. Els grups es van comparar utilitzant el test de Mann-Whitney i Wilcoxon per les variables no paramètriques i el test chi-quadrat per les variables qualitatives. Un p-valor <0.05 vol dir que les diferències són significatives i per tant es mostren a la taula com a diferències entre: (a) Controls sans i pacients sense NASH, (b) Controls sans i pacients amb NASH, (c) pacients amb NASH i sense NASH, (d) Controls sans i pacients al cap de l'any de la CB, (e) pacients sense NASH i pacients al cap de l'any de la CB i (f) pacients amb NASH i pacients al cap de l'any de la CB.

Anàlisi histològica de presència de ferro al fetge

Gràcies a la tinció de Blau de Prússia i al programa *ImageJ* es van poder determinar i quantificar les àrees tenyides de color blau, que indicaven presència de ferro al teixit hepàtic. Es van realitzar fotografies a partir dels talls de fetge de pacients amb obesitat amb i sense NASH per observar la presència de ferro.

Tal i com s'observa en la figura 6A, en el teixit de pacients amb NASH no existia presència de ferro, ja que no observàvem Blau de Prússia. No obstant, en les mostres de teixit de pacients sense NASH (figura 6B) s'observava presència de Blau de Prússia, i per tant, existència de ferro.

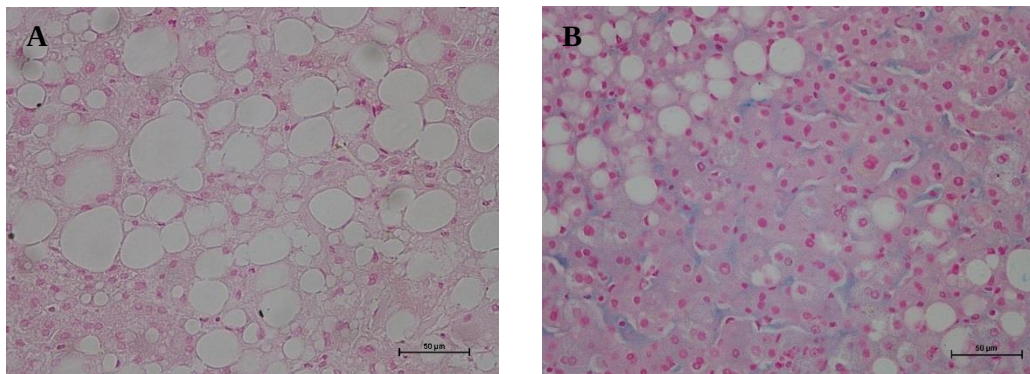


Figura 6. Imatges de teixit hepàtic amb tinció Blau de Prússia de (A) pacients amb NASH i (B) pacients sense NASH. Magnificació: 20X

A partir de les quantificacions d'àrea obtingudes, es va realitzar un gràfic on es mostra el percentatge d'àrea d'aquelles zones de teixit hepàtic tenyides tant de pacients sense NASH com de pacients amb NASH.

Com es pot observar en figura 7, els pacients amb NASH presentaven molta menys àrea tenyida que en els pacients sense NASH.

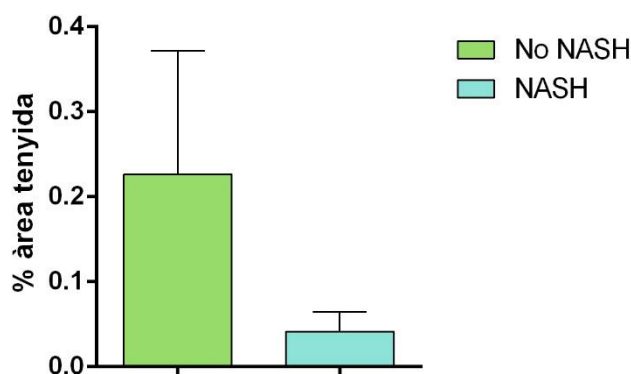


Figura 7. Percentatge d'àrea tenyida de Blau de Prússia en el teixit hepàtic de pacients amb obesitat amb i sense NASH

Canvis en el metabolisme del ferro: avaluació de paràmetres en plasma

Per tal d'observar si hi havia canvis en el metabolisme del ferro, es van comparar tres paràmetres (ferro, ferritina i transferrina) en el sèrum dels diversos grups:

- Entre els pacients control i els pacients amb obesitat, tant sense NASH com amb NASH: canvis relacionats amb l'obesitat
- Entre els pacients amb NASH i sense NASH: canvis relacionats amb la NASH
- Entre pacients amb obesitat amb i sense NASH i aquests pacients un any després de la cirurgia bariàtrica.
- Entre pacients un any després de la cirurgia bariàtrica i grup control.

Tal i com s'observa a la figura 8, la concentració de ferro era major en els pacients amb obesitat, tant amb NASH com sense NASH comparats amb el grup control. En ambdós casos, les diferències eren significatives. Entre els pacients amb obesitat, el ferro era superior en el sèrum dels pacients amb NASH.

Si s'observaven els pacients post-cirurgia bariàtrica, es veia una major concentració de ferro present respecte al controls sans i respecte al grup de pacients obesos (amb i sense NASH). Les diferències eren estadísticament significatives en tots els casos menys entre els pacients post-cirurgia i el grup amb NASH.

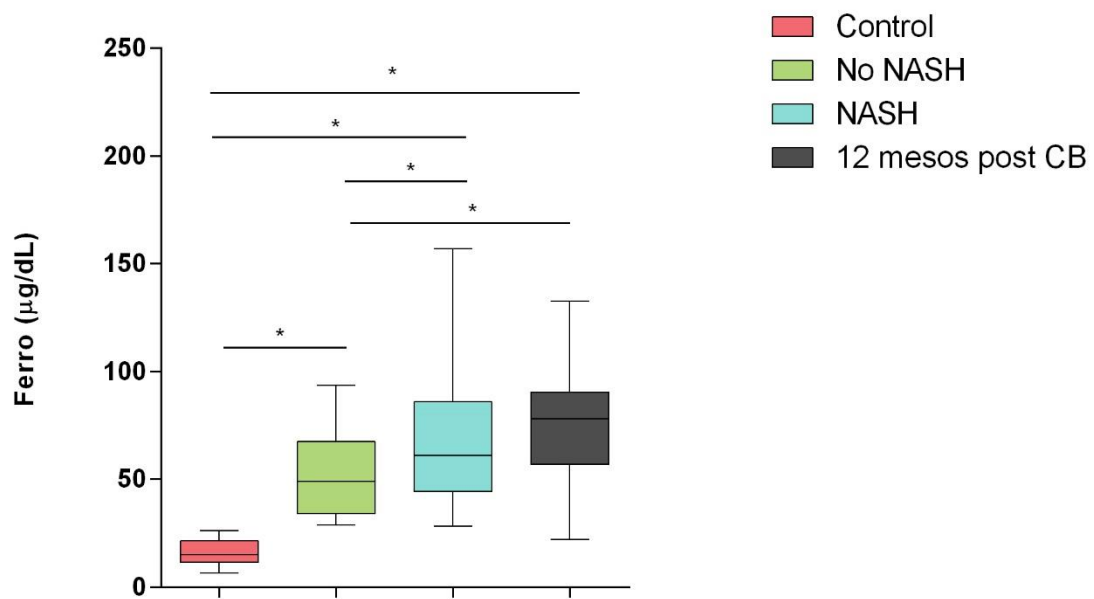


Figura 8. Representació gràfica de la concentració de ferro en els diferents grups d'estudi. Els * fan referència a un p-valor <0.05.

Pel que fa a la ferritina (figura 9), observàvem també un augment de la seva concentració en els pacients amb obesitat (tant amb NASH com sense NASH) comparats amb el grup control. D'entre els dos grups de pacients, la concentració de ferritina era altra vegada més elevada en els pacients amb NASH. No obstant, en aquest cas no s'observaven diferències significatives, que sí que s'observaven entre el grup control i els dos grups amb obesitat.

Per altra banda, pel que fa als pacients que van fer una segona visita al cap de l'any de la cirurgia bariàtrica, s'observava una disminució de la concentració de ferritina respecte als pacients obesos, i semblava molt similar a la concentració observada en el grup control. No obstant, les diferències només eren significatives entre el grup de pacients amb NASH i el grup de pacients post-cirurgia bariàtrica.

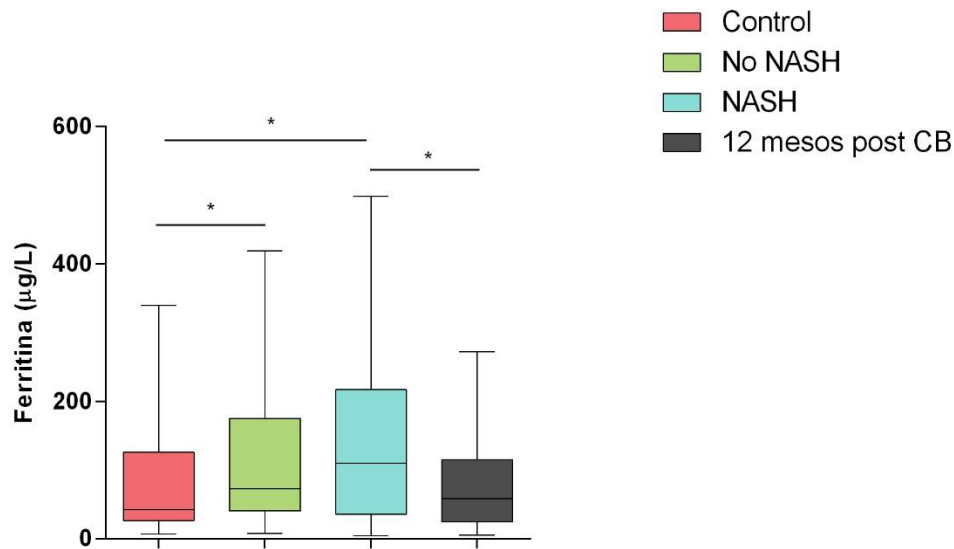


Figura 9. Representació gràfica de la concentració de ferritina en els diferents grups d'estudi. Els * fan referència a un p-valor <0.05.

Quant a la concentració de transferrina, els pacients amb obesitat presentaven dos comportaments oposats: els pacients sense NASH presentaven menys transferrina que el grup control. En canvi, si es comparava el grup control respecte el grup de pacients amb NASH, la concentració de transferrina era lleugerament superior en els pacients amb NASH.

Finalment, si consideràvem el grup de pacients post-cirurgia bariàtrica, la concentració de ferritina disminuïa, sent similar a la del grup de pacients sense NASH, i sent significativament diferent a la del grup control.

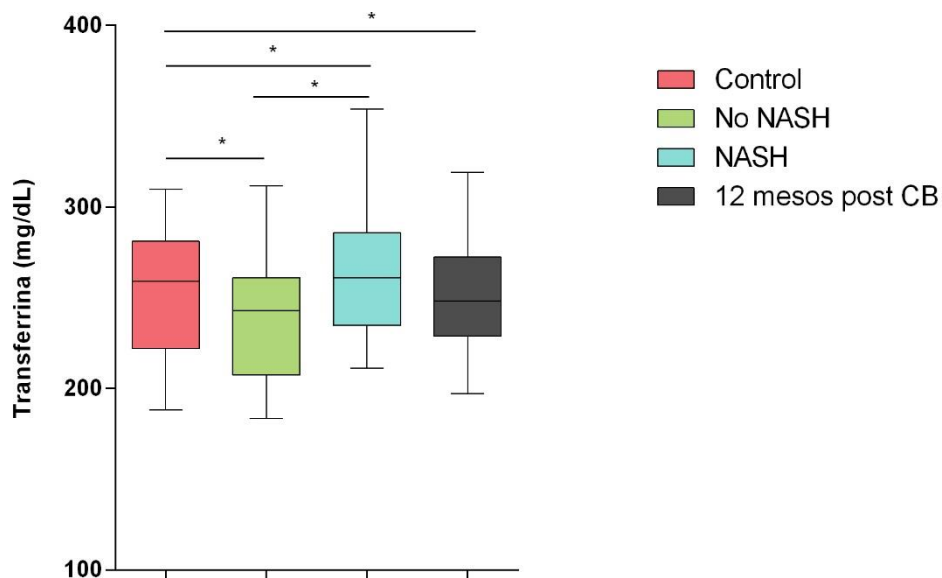


Figura 10. Representació gràfica de la concentració de transferrina en els diferents grups d'estudi. Els * fan referència a un p-valor <0.05.

Canvis en el metabolisme del ferro: variacions segons l'estat del fetge

L'avaluació del NAS es va realitzar a partir de la valoració de certs paràmetres amb escala numèrica. Vam voler veure si alguns d'aquests paràmetres podien associar-se més o menys a canvis en el metabolisme del ferro (ferro, ferritina i transferrina). Els paràmetres que vam tenir en compte van ser: inflamació lobular del teixit, efecte *ballooning* en les cèl·lules, l'estat de fibrosi, l'esteatosi i finalment la pròpia puntuació de NAS. Per una banda, es van estudiar aquells paràmetres que fossin qualitatius (inflamació lobular, efecte *ballooning*, estat de fibrosi i puntuació de NAS). Pel que fa a l'esteatosi, es tracta d'un paràmetre quantitatiu i per tant, es va realitzar una correlació entre aquest paràmetre i el ferro, transferrina i ferritina.

Tal i com mostra la figura 11A, en els graus més baixos d'inflamació lobular (grau 0 o 1; focus iguals o menors a 2) observàvem que les concentracions de ferro eren més baixes que en grau 2. Curiosament, en l'estat més elevat d'inflamació, grau 3, la concentració de ferro tornava a ser inferior, fins i tot una mica més baixa que en els graus 0 o 1.

Per altra banda, pel que fa a la figura 11B, el contingut de ferritina era superior en el grau 1 i 2 d'inflamació lobular respecte a grau 0. No obstant, al grau 3 el contingut de ferritina era inferior, similar al de grau 0, mostrant altra vegada un comportament similar al del cas del ferro.

Finalment, quant a la concentració de transferrina (figura 11C), s'observava que a major grau d'inflamació lobular, el contingut de transferrina anava augmentant. En el cas del ferro i la ferritina, no s'observaven diferències significatives, però en el cas de la transferrina, hi havia diferències significatives entre graus 0 i 2.

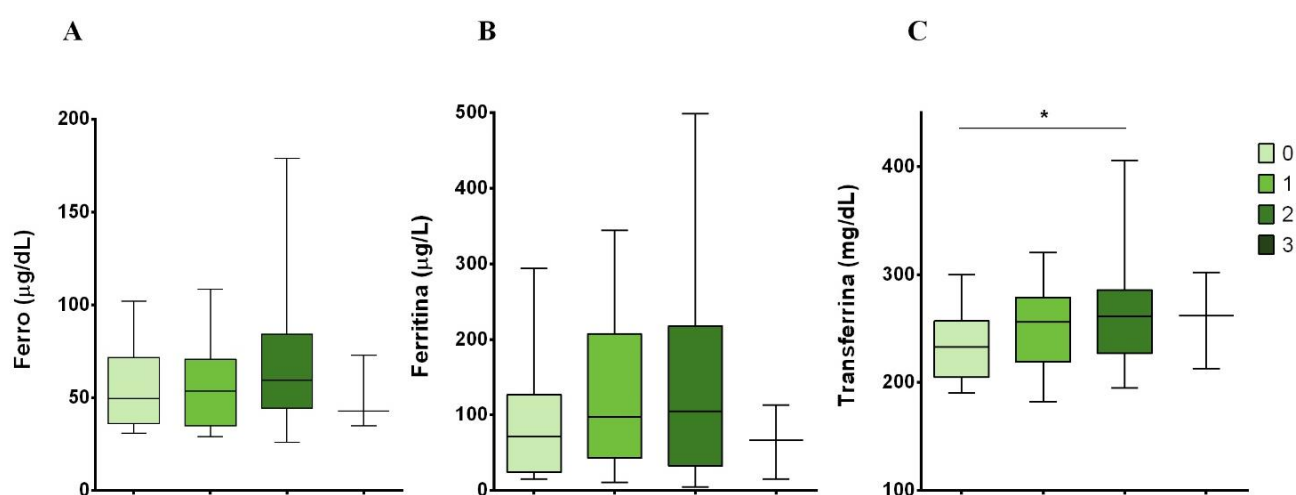


Figura 11. Representació de A) Ferro, B) Ferritina i C) Transferrina segons els graus d'inflamació lobular. Els * fan referència a un p-valor <0.05

Respecte l'efecte *ballooning* en les cèl·lules, es va observar que a mesura que augmentava el nombre de cèl·lules amb efecte *ballooning*, augmentava la concentració de ferro (figura 12A), amb diferències significatives entre els graus 0 i 2.

Respecte la ferritina (figura 12B), s'observava un efecte diferent que en el cas anterior, ja que en grau 2 no seguia augmentant la concentració, sinó que tornava a disminuir.

En el cas de la transferrina (figura 12C), sí que succeïa un efecte semblant al del ferro: s'observava un augment de la concentració de transferrina en augmentar el nombre de cèl·lules amb efecte *ballooning*. Existien diferències significatives entre graus 0 i 2 i entre 1 i 2.

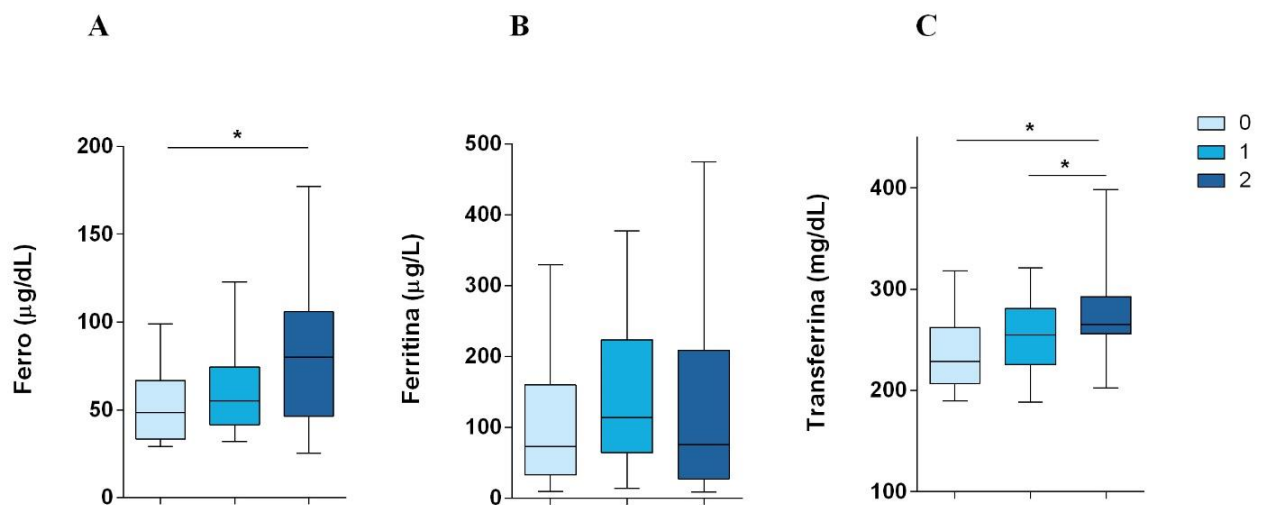


Figura 12. Representació de A) Ferro, B) Ferritina i C) Transferrina segons els graus de l'efecte ballooning. Els * fan referència a un p-valor <0.05.

Per altra banda, també es va estudiar l'estat dels marcadors respecte el grau de fibrosi (figura 13). Es va observar que a mesura que augmentava la puntuació de fibrosi, augmentava el contingut de ferro (figura 13A). Només en l'estat 2 de fibrosi no s'observava aquest augment de forma tant clara, sinó que semblava que la concentració romangués estable. Les diferències eren significatives entre la majoria de les puntuacions de fibrosi respecte el ferro.

Quant a la ferritina, no s'apreciaven canvis destacats en la seva concentració entre els diversos graus de fibrosi (figura 13B).

Si ens centràvem en la concentració de transferrina, aquesta augmentava en estat de fibrosi de 0, 1, 3 i 4, però, curiosament, s'observava una disminució en estat de 2 (figura 13C). Tot i així, les diferències només eren significatives entre grau 0 i 3.

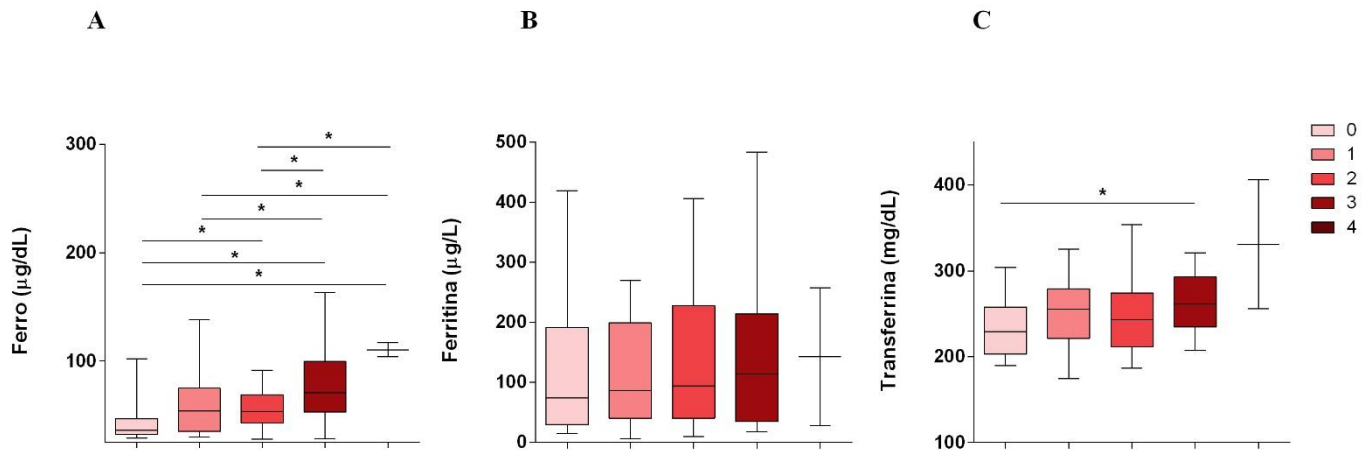


Figura 13. Representació de A) Ferro, B) Ferritina i C) Transferrina segons l'estat de fibrosi. Els * fan referència a un p-valor <0.05.

Vam realitzar una correlació entre el grau d'esteatosi i el ferro, la ferritina i la transferrina. No obstant, vam observar que només la transferrina es correlacionava de forma significativa amb l'esteatosi (figura 14). Concretament, la concentració de transferrina es correlacionava significativament i de forma positiva en pacients sense NASH (p-valor = 0,038), mentre que en pacients amb NASH hi havia una correlació negativa però no significativa.

Per tant, observàvem que en graus baixos d'esteatosi, que normalment coincidien amb els pacients que no tenien NASH, a mesura que augmentava l'esteatosi, augmentava la transferrina. No obstant, en els pacients amb NASH es va veure que la correlació era al revés que en el cas anterior, ja que a mesura que augmentava l'esteatosi, la concentració de transferrina anava disminuint.

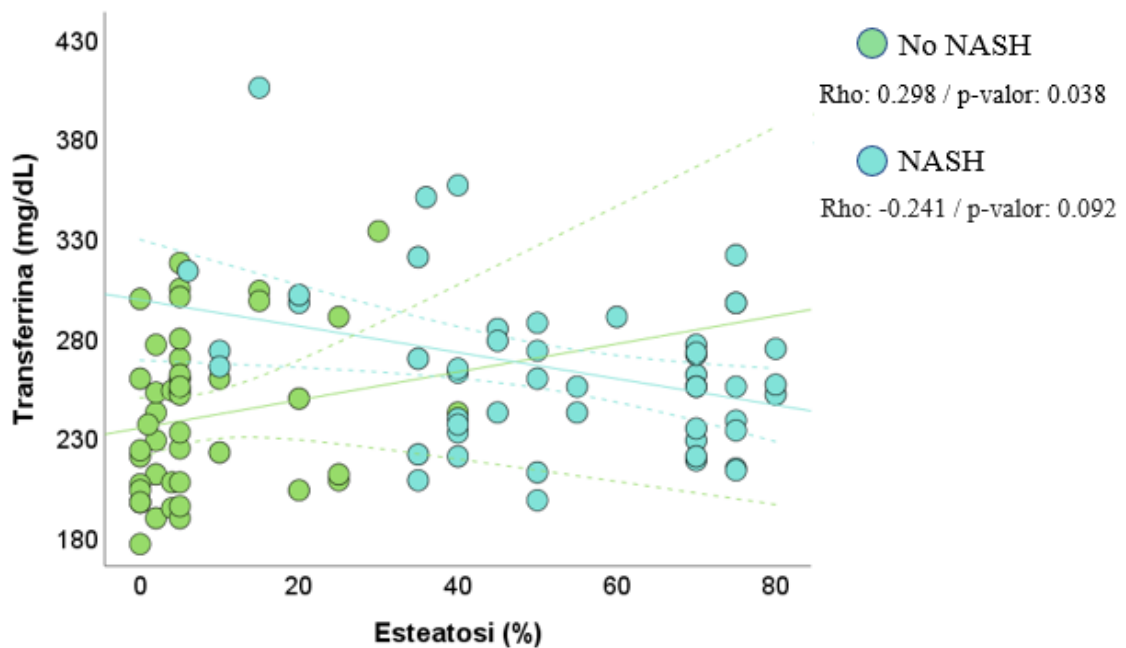


Figura 14. Correlació entre esteatosi hepàtica i transferrina en pacients amb NASH i sense NASH.

Finalment, es va estudiar si els diferents graus del sistema de puntuació *NAFLD Activity Score* (NAS) es relacionaven amb canvis en les concentracions de ferro, ferritina i transferrina (figura 15). Pel que fa a la figura 15A, es va observar que el contingut de ferro disminuïa a mesura que augmentava la puntuació NAS, fins a arribar al grau 2. A partir d'aquí, la concentració de ferro no mostrava un patró associat al grau de NAS, ja que les concentracions augmenten i disminueixen al llarg dels diferents graus de NAS.

Observàvem el mateix comportament en el gràfic de la ferritina (figura 15B). No hi havia cap relació entre augment o disminució del ferro i els diferents graus de NAS.

En el cas de la transferrina (figura 15C), sí que observàvem que la concentració de la proteïna anava en augment en grau baixos de NAS (0, 1, 2) mentre que en graus més elevats, la transferrina tornava a disminuir (graus 5, 6, 7).

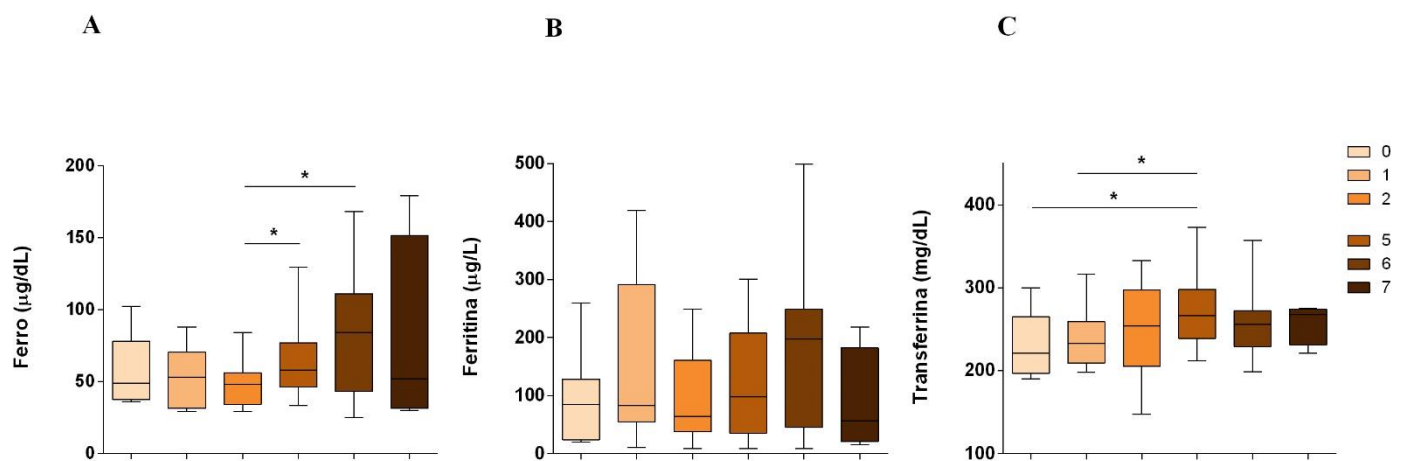


Figura 15. Representació de A) Ferro, B) Ferritina i C) Transferrina segons el grau de NAS. Els graus 3-4 són graus que considerem intermitjos i no s'han utilitzat per aquest estudi. Els * fan referència a un p-valor <0.05.

DISCUSSIÓ

L'obesitat, juntament amb els trastorns metabòlics associats, és considerada un dels actuals majors problemes de salut i la seva prevalença està en constant augment. Això és degut, principalment, a un estil de vida sedentari i als canvis en la nostra alimentació, que ha vist substituïts els aliments frescos per aquells que són ultra-processats i que contenen grans quantitats de sucres, greixos i sal.

Les principals característiques clíniques i bioquímiques dels grups d'estudi que eren significativament diferents entre els grups estaven generalment associades a les pròpies condicions patològiques. Per aquest motiu, els pacients amb obesitat tenien incrementades totes aquelles variables tradicionalment associades a aquesta: IMC, incidència d'hipertensió, diabetis i dislipèmia...

Òbviament tant els pacients obesos amb NASH com els pacients sense NASH presentaven un IMC superior al grup control. Segons la literatura, l'obesitat es defineix per un índex de massa corporal igual o superior a 30 kg/m^2 (Milić, Lulić, & Štimac, 2014). En aquest cas, s'estudiaven pacients amb obesitat mòrbida, el qual implica un IMC igual o superior a 40 kg/m^2 . A més, vam observar una disminució de l'IMC en els pacients un any després de la cirurgia bariàtrica, efecte demostrat de la intervenció de cirurgia bariàtrica, ja sigui per SG o RYGB (Sierzantowicz et al., 2017).

L'obesitat també s'ha associat a la diabetis mellitus tipus 2. Un estudi realitzat a Anglaterra va concloure que el 90% de persones que patien T2DM tenien sobrepès o eren obesos [5].

Per altra banda, la dislipèmia comporta un seguit de canvis quantitatius i qualitius de lípids i lipoproteïnes (Kopin & Lowenstein, 2017). La dislipèmia associada a l'obesitat causa l'augment de triglicèrids, àcids grassos i colesterol LDL, així com també una disminució del colesterol HDL, fet que s'observa en la població amb obesitat comparada al grup control. (Klop, Elte, & Cabezas, 2013) (González Sandoval et al., 2014). No obstant, en el nostre cas, la concentració d'LDL es veia disminuïda. Una possible explicació a aquest fet es podria justificar amb els tractaments farmacològics, com les estatines, que disminueixen la concentració de LDL.

L'epidèmia mundial d'obesitat ha provocat un augment de la incidència de la malaltia del fetge gras no alcohòlica i les complicacions que comporta. L'esteatohepatitis no alcohòlica (NASH) és una forma més agressiva d'aquesta malaltia i pot causar cirrosi i insuficiència hepàtica. En aquest sentit, els paràmetres relacionats amb l'estat hepàtic (transaminases) eren significativament superiors en els pacients amb obesitat i NASH.

L'obesitat té un paper important en la modificació de l'homeòstasi de ferro. L'augment del contingut de ferritina, ferro i transferrina són freqüents en la NASH. Com que l'excés de ferro augmenta l'estrès oxidatiu sembla probable que això pugui tenir un paper en la patogènesi de la NASH (L. Tussing-Humphreys et al., 2012).

Les anàlisis histològiques de teixit hepàtic mostraven que el fetge de pacients sense NASH tenia més presència de ferro que el fetge de pacients amb NASH. Les proteïnes implicades en la unió del ferro, com la transferrina i la ferritina es troben en excés, de manera que el ferro lliure és molt baix, però és suficient per catalitzar reaccions de Fenton. No obstant, un excés de ferro lliure pot facilitar el desenvolupament de la inflamació hepàtica característica en la patogènesi de la NASH (Moya et al., 2015). Mentre l'excés de ferro condueix a l'estrès oxidatiu, també hi ha una activació de defenses antioxidants, que poden ser un factor important per limitar l'acumulació de danys oxidatius. Aquesta defensa antioxidant pot veure's compromesa per la coexistència de lesions hepàtiques o factors nutricionals/genètics, i en particular d'esteatosi (Dongiovanni, Fracanzani, Fargion, & Valenti, 2011).

Hi ha diversos estudis sobre l'excés de ferro en pacients amb NAFLD/NASH i s'han obtingut resultats contradictoris. Per una banda, es va observar un excés de ferro en el fetge de pacients amb NASH respecte el fetges de pacients controls (Bonkovsky et al., 1999) però en altres estudis no es va trobar excés de ferro en la majoria de pacients amb NAFLD (Moya et al., 2015). Alguns investigadors també van utilitzar la tècnica de Blau de Prússia per observar el ferro present en el teixit hepàtic procedent de biòpsies de pacients amb NASH. Els resultats van demostrar que no s'observava presència de ferro en el teixit hepàtic d'aquests pacients, obtenint doncs resultats similars als del nostre estudi.

Quant al ferro en circulació, vam observar que la seva concentració circulant era superior en pacients amb obesitat mòrbida respecte al grup control i encara augmentava més al cap d'un any de la cirurgia bariàtrica. Això és un resultat inesperat, ja que tradicionalment, després de la cirurgia bariàtrica, la majoria de pacients presenten dèficits de ferro i fins i tot, en alguns casos, desenvolupen anèmia (Velazquez, Apovian, & Istfan, 2017) (Jáuregui-Lobera, 2013).

Entre els pacients obesos, els pacients amb NASH tenien concentracions superiors que els pacients sense NASH. Si avaluàvem la concentració respecte el grau de NAS, no observàvem cap tendència que indiqués que a major NAS, major concentració de ferro, tot i que en graus baixos de NAS (0, 1 i 2) el contingut de ferro disminuïa, mentre que a graus elevats de NAS (5, 6 i 7) el ferro augmentava. Sí que vam observar que, a major grau de fibrosi i a major grau de *ballooning* major concentració de ferro. Hi ha estudis que han demostrat que l'acumulació de ferro augmenta al augmentar l'estat de fibrosi. També s'ha vist que l'efecte *ballooning* es va relacionar amb un

augment en el contingut de ferro de pacients amb NAFLD (Mehta et al., 2019) (Nelson et al., 2011).

Aquests resultats contradictoris del contingut de ferro en el fetge i en el sèrum pot portar controvèrsia. Per una banda, el fetge de pacients amb NASH té menys ferro que el fetge de pacients sense NASH però en el cas del sèrum, succeeix el contrari. Això podria indicar que els pacients amb NASH mobilitzen el ferro del fetge, i seria per això que el podem trobar en el sèrum. Aquest fenomen és causat per la molècula transportadora ferroportina (FNP), que allibera el ferro dels hepatòcits al torrent sanguini (Graham et al., 2007).

La ferritina és un paràmetre fonamental per valorar els dipòsits corporals totals de ferro i la reducció dels seus nivells sèrics és diagnòstica com a dèficit de ferro. La ferritina, a més, es comporta com un reactant de fase aguda i marcador d'inflamació, de tal manera que, en estats inflamatoris com ara l'obesitat, pot augmentar independentment de l'estatus de ferro (Amaya García et al., 2012).

Es va observar un augment de la concentració de ferritina en pacients obesos respecte el grup control, i era més elevada en el cas dels pacients amb NASH. Curiosament, després de la cirurgia bariàtrica, la concentració de ferritina tornava a nivells similars al grup control. En aquest últim cas, la literatura està plena de resultats contradictoris, similars i contraris als obtinguts (Vartanoğlu et al., 2017) (L. M. Tussing-Humphreys et al., 2010).

Verma *et al.* van observar un augment de contingut de ferritina en un grup de pacients amb NASH (Verma, Jensen, Hart, & Mohanty, 2013). No obstant, van concloure que aquest augment estava independentment relacionat amb la patologia. Quan van valorar la concentració de ferritina segons el grau de NAS, no van observar cap patró determinat: la concentració ni augmentava ni disminuïa depenent del grau. L'estat de fibrosi va ser la única variable que semblava relacionar-se positivament amb la ferritina: a més fibrosi, més ferritina circulant. Contràriament, altres estudis han conclòs que la concentració de ferritina no estaria associada a un augment de fibrosi ni a un augment en el valor de NAS (Britton et al., 2016).

Si ens centrem amb la concentració de transferrina, vam veure que en pacients amb obesitat i sense NASH la concentració disminuïa respecte el grup de pacients sans i també respecte el grup de pacients obesos amb NASH. Entre aquests dos grups, la concentració de transferrina era similar i poc més alta que en els pacients post-cirurgia bariàtrica, que no presentava diferències entre aquests. A la literatura ja s'ha observat que entre pacients pre-cirurgia i post-cirurgia no hi ha variacions significatives en la concentració de transferrina (L. M. Tussing-Humphreys et al., 2010). Aquests resultats són contraris als de l'estudi de Moya *et al.*, que van demostrar que existia una disminució de contingut de transferrina en pacients amb NASH (Moya et al., 2015). L'estrès oxidatiu pot induir, en pacients amb NASH, l'expressió de transferrina i la seva regulació està

sota el control de la disminució de la concentració de ferro. Això pot indicar una activitat reduïda de la medul·la òssia, i és comú en la inflamació crònica (Moya et al., 2015).

La literatura no té conclusions clares respecte el paper del ferro i transportadors en la NASH. Com hem pogut observar, els resultats són molt contradictoris entre sí, de manera que caldrien més estudis, amb poblacions més grans i de diversos llocs per tal de poder treure conclusions clares i definitives. Com a perspectives futures, proposariem ampliar l'anàlisi i determinar altres molècules importants en la regulació i transport del ferro: DMT1 (de l'anglès *Divalent Metal Transporter 1*), ferroportina i hepcidina, tant a nivell de circulació com de mRNA, per intentar entendre les diverses variacions observades. D'altra banda, estudis animals amb models *knock-out* de les diverses proteïnes i amb NASH ens ajudarien també a elucidar mecanismes que podrien associar el ferro i el desenvolupament de l'esteatohepatitis.

CONCLUSIÓ

Tenint en compte els resultats obtinguts es poden arribar a diverses conclusions.

El ferro, i els processos d'estrès oxidatiu que se'n derivarien, podrien ser un factor important en la patogènesi i la progressió de la NASH. S'ha vist que el ferro present en el teixit hepàtic de pacients amb NASH és inferior al que es troba en el fetge de pacients sense NASH. No obstant, en el sèrum de pacients amb NASH, el contingut de ferro és superior que aquells sense NASH. La ferroportina seria la responsable d'aquest canvi, degut a que allibera el ferro dels hepatòcits a la circulació, i aquest ferro alliberat podria augmentar els processos d'estrès oxidatiu associats a la NASH.

També s'ha demostrat que l'augment del contingut de ferritina i transferrina són freqüents en la NASH i que la fibrosi seria la característica de la NASH que podria estar més lligada a les concentracions de ferro, ferritina i transferrina.

Per últim, hem observat que al cap d'un any de la cirurgia bariàtrica, els pacients no sempre recuperen els nivells de marcadors propis d'una població control.

BIBLIOGRAFIA

- Amaya García, J., Vilchez López, F. J., Campos Martín, C., Sánchez Vera, P., Pereira Cunill, J. L., Luis, J., & Cunill, P. (2012). Micronutrientes en cirugía bariátrica. *Nutr Hosp*, 27(2), 349–361. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.2.5670>
- Angrisani, L., Santonicola, A., Iovino, P., Formisano, G., Buchwald, H., & Scopinaro, N. (2015). Bariatric Surgery Worldwide 2013. *Obesity Surgery*, 25(10), 1822–1832. <https://doi.org/10.1007/s11695-015-1657-z>
- Benaiges, D., Más-Lorenzo, A., Goday, A., Ramon, J. M., Chillaran, J. J., Pedro-Botet, J., & Flores-Le Roux, J. A. (2015, November 7). Laparoscopic sleeve gastrectomy: More than a restrictive bariatric surgery procedure? *World Journal of Gastroenterology*, Vol. 21, pp. 11804–11814. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i41.11804>
- Bergman, R. N., Stefanovski, D., Buchanan, T. A., Sumner, A. E., Reynolds, J. C., Sebring, N. G., ... Watanabe, R. M. (2011). A better index of body adiposity. *Obesity*, 19(5), 1083–1089. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.38>
- Blundell, J. E., Dulloo, A. G., Salvador, J., & Frühbeck, G. (2014). Beyond BMI - Phenotyping the obesities. *Obesity Facts*, 7(5), 322–328. <https://doi.org/10.1159/000368783>
- Bonkovsky, H. L., Jawaid, Q., Tortorelli, K., LeClair, P., Cobb, J., Lambrecht, R. W., & Banner, B. F. (1999). Non-alcoholic steatohepatitis and iron: Increased prevalence of mutations of the HFE gene in non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology*, 31(3), 421–429. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(99\)80032-4](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(99)80032-4)
- Britton, L. J., Subramaniam, N., Hg, D., Laurence, C., Britton, J., & Crawford, D. H. (2016). *Iron and non-alcoholic fatty liver disease*. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i36.8112>
- Carrillo Esper, R., Peña Pérez, C., Denise Zepeda Mendoza, A., Martín Meza Márquez, J., Neri Maldonado, R., Margarita Meza Ayala, C., ... Alberto Carrillo Córdova, C. (2015). *Ferritina y síndrome hiperferritinémico. Su impacto en el enfermo grave; conceptos actuales*. Retrieved from www.medigraphic.org.mx
- Chooi, Y. C., Ding, C., & Magkos, F. (2019). The epidemiology of obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 92, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.09.005>
- Cohen, J. C., Horton, J. D., & Hobbs, H. H. (2011, June 24). Human fatty liver disease: Old questions and new insights. *Science*, Vol. 332, pp. 1519–1523. <https://doi.org/10.1126/science.1204265>
- De, F., Biológicas, C., Baeza, C. I., Directores, R., Pardo, E. A., María, A., & Parra, L. (2016). Universidad Complutense de Madrid. *Estudio de asociación entre marcadores genéticos y alteraciones del metabolismo del hierro en población española*
- Di Angelantonio, E., Bhupathiraju, S. N., Wormser, D., Gao, P., Kaptoge, S., de Gonzalez, A. B., ... Hu, F. B. (2016). Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *The Lancet*, 388(10046), 776–786. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30175-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30175-1)
- Dongiovanni, P., Fracanzani, A. L., Fargion, S., & Valenti, L. (2011, October). Iron in fatty liver and in the metabolic syndrome: A promising therapeutic target. *Journal of Hepatology*, Vol. 55, pp. 920–932. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.05.008>
- Engin, A. (2017). The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 960, pp. 1–17). https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_1

- Gomme, P. T., & McCann, K. B. (2005, February 15). Transferrin: Structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discovery Today*, Vol. 10, pp. 267–273. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03333-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03333-1)
- González Sandoval, C. E., Díaz Burke, Y., Mendizabal-Ruiz, A. P., Medina Díaz, E., & Alejandro Morales, J. (2014). Prevalencia de obesidad y perfil lipídico alterado en jóvenes universitarios. *Nutricion Hospitalaria*, 29(2), 315–321. <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.2.7054>
- Goossens, G. H. (2017). The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obesity Facts*, 10(3), 207–215. <https://doi.org/10.1159/000471488>
- Graham, R. M., Chua, A. C. G., Herbison, C. E., Olynyk, J. K., & Trinder, D. (2007, September 21). Liver iron transport. *World Journal of Gastroenterology*, Vol. 13, pp. 4725–4736. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i35.4725>
- Jáuregui-Lobera, I. (2013, May 15). Iron deficiency and bariatric surgery. *Nutrients*, Vol. 5, pp. 1595–1608. <https://doi.org/10.3390/nu5051595>
- Klop, B., Elte, J. W. F., & Cabezas, M. C. (2013, April 12). Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients*, Vol. 5, pp. 1218–1240. <https://doi.org/10.3390/nu5041218>
- Kopin, L., & Lowenstein, C. J. (2017). Dyslipidemia. *Annals of Internal Medicine*, 167(11), ITC81. <https://doi.org/10.7326/AITC201712050>
- Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G. A., ... Miele, C. (2019). Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9). <https://doi.org/10.3390/ijms20092358>
- Marion L. (2012). Comparison of Bariatric Surgical Procedures for Diabetes Remission: Efficacy and Mechanisms \$watermark-text \$watermark-text \$watermark-text. *Diabetes Spectr*, 25(4), 200–210. <https://doi.org/10.2337/diaspect.25.4.200>
- Mary E Rinella. (2015). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 313(22), 1221–1231. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0548-5_10
- Mehta, K. J., Farnaud, S. J., & Sharp, P. A. (2019). Iron and liver fibrosis: Mechanistic and clinical aspects. *World J Gastroenterol*, 25(5), 521–538. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i5.521>
- Milić, S., Lulić, D., & Štimac, D. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: Biochemical, metabolic and clinical presentations. *World Journal of Gastroenterology*, 20(28), 9330–9337. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i28.9330>
- Moya, D., Baker, S. S., Liu, W., Garrick, M., Kozielski, R., Baker, R. D., & Zhu, L. (2015). Novel pathway for iron deficiency in pediatric non-alcoholic steatohepatitis. *Clinical Nutrition*, 34(3), 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2014.06.011>
- Nelson, J. E., Wilson, L., Brunt, E. M., Yeh, M. M., Kleiner, D. E., Unalp-Arida, A., & Kowdley, K. V. (2011). Relationship between the pattern of hepatic iron deposition and histological severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 53(2), 448–457. <https://doi.org/10.1002/hep.24038>
- Palermo, M., Acquafresca, P. A., Rogula, T., Duza, G. E., & Serra, E. (2015, April 1). Late surgical complications after gastric by-pass: a literature review. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva : ABCD = Brazilian Archives of Digestive Surgery*, Vol. 28, pp. 139–

143. <https://doi.org/10.1590/S0102-67202015000200014>
- Pappachan, J. M., Babu, S., Krishnan, B., & Ravindran, N. C. (2017). Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Clinical Update. *J Clin Transl Hepatol*, 5(4), 384–393. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2017.00013>
- Purnell, J. Q. (2000). Definitions, Classification, and Epidemiology of Obesity. In *Endotext*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905390>
- Ramírez, C., Rubio, C., Fernández de la Puebla, R. Á., Aguilera, C., Espejo, I., & Fuentes, F. (2004). Significado clínico de los valores elevados de ferritina sérica. *Medicina Clínica*, 122(14), 532–534. [https://doi.org/10.1016/s0025-7753\(04\)74296-7](https://doi.org/10.1016/s0025-7753(04)74296-7)
- Rubio-Clemente, A., Chica, E. L., & Peñuela, G. A. (2014). *Application of Fenton process for treating petrochemical wastewater* (Vol. 16).
- Schuppan, D., & Schattenberg, J. M. (2013). Non-alcoholic steatohepatitis: Pathogenesis and novel therapeutic approaches. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 28, 68–76. <https://doi.org/10.1111/jgh.12212>
- Sierzantowicz, R., Lewko, J., Hady, H. R., Kirpsza, B., Trochimowicz, L., & Dadan, J. (2017). Effect of BMI on quality of life and depression levels after bariatric surgery. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 26(3), 491–496. <https://doi.org/10.17219/acem/62246>
- Stenard, F., & Iannelli, A. (2015, September 28). Laparoscopic sleeve gastrectomy and gastroesophageal reflux. *World Journal of Gastroenterology*, Vol. 21, pp. 10348–10357. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i36.10348>
- Tussing-Humphreys, L. M., Nemeth, E., Fantuzzi, G., Freels, S., Holterman, A. X. L., Galvani, C., ... Braunschweig, C. (2010). Decreased serum hepcidin and improved functional iron status 6 months after restrictive bariatric surgery. *Obesity*, 18(10), 2010–2016. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.490>
- Tussing-Humphreys, L., Pustacioglu, C., Nemeth, E., & Braunschweig, C. (2012). Rethinking Iron Regulation and Assessment in Iron Deficiency, Anemia of Chronic Disease, and Obesity: Introducing Hepcidin. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 112(3), 391–400. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2011.08.038>
- Vartanoğlu, T., Tokoçin, M., Tokoçin, O., Kutaniş, R., Çelebi, F., & Çelik, A. (2017). Comparison of Iron, Iron Binding Capacity and Ferritin Levels After Laparoscopic Bariatric Surgery. *The World Clinics Journal of Medical Sciences*, 1(1), 42–46. <https://doi.org/10.5336/worldclin.2016-52516>
- Velazquez, A., Apovian, C. M., & Istfan, N. W. (2017). *The Complexities of Iron Deficiency in Patients After Bariatric Surgery*. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2017.01.040>
- Verma, S., Jensen, D., Hart, J., & Mohanty, S. R. (2013). Predictive value of ALT levels for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Liver International*, 33(9), 1398–1405. <https://doi.org/10.1111/liv.12226>

WEBGRAFIA

- [1] Obesity Causes and Risk Factors | Everyday Health. (n.d.). Retrieved October 17, 2019, from <https://www.everydayhealth.com/obesity/guide/causes-and-risk-factors/>
- [2] Obesity - Our World in Data. (n.d.). Retrieved October 16, 2019, from <https://ourworldindata.org/obesity>
- [3] WHO | Overweight and obesity. (2018). *WHO*.
- [4] Bariatric Surgery Procedures | ASMBS. (n.d.). Retrieved October 16, 2019, from <https://asmbs.org/patients/bariatric-surgery-procedures>
- [5] Health England, P. (2014). *Adult obesity and type 2 diabetes*. Retrieved December 19, 2019, from https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/338934/Adult_obesity_and_type_2_diabetes_.pdf

AUTOAVALUACIÓ

L'estada de pràctiques a la URB m'ha servit en molts aspectes. Per començar, he realitzat tècniques a nivell de laboratori que m'han ajudat a entendre com es manipulen les mostres, el material emprat i, en definitiva, a comprendre com es treballa en una unitat d'investigació científica. Un altre aspecte important és haver-me pogut apropar més al món laboral sobre la carrera que he cursat.

Per altra banda, el fet d'haver treballat en un grup d'investigació, m'ha ajudat a comprendre com es treballa en equip. He trobat important i necessari el fet de treballar en equip, ja que és imprescindible que hi hagi un bon ambient de treball. En aquest aspecte, m'he sentit afortunada. A més, els companys amb qui he pogut treballar, m'han ajudat en tot moment aportant-me idees i coneixements necessaris per l'estudi realitzat.

Considero que és important fer un seguiment del treball realitzat al laboratori. El fet d'elaborar un treball sobre un estudi en concret, m'ha servit per entendre com plantejar i realitzar un estudi. Trobo que és imprescindible mostrar interès en tot moment sobre la investigació que s'està realitzant. En el meu cas, he realitzat un estudi sobre l'obesitat. En aquest aspecte, considero que he après amb més profunditat sobre un àmbit on només tenia uns coneixements bàsics.