



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI



IISPV
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI

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

Adrià Vilalta Videgain

TREBALL DE FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA

Tutor acadèmic: Dra. Anna Hernández Aguilera, Grau de Biotecnologia, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, anna.hernandez@urv.cat

En cooperació amb: Unitat de Recerca Biomèdica (URB), Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV)

Supervisor/s: Dr. Jorge Joven Maried, Departament de Medicina i Cirurgia (URV) i Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) jorge.joven@urv.cat i Dra. Anna Hernández Aguilera, Departament de Bioquímica i Biotecnologia (URV) i IISPV, anna.hernandez@iispv.cat

Jo, *Adrià Vilalta Videgain*, amb DNI 399951692W, sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.



ADRIÀ VILALTA VIDEGAIN

Reus, 8 de JUNY de 2020

ÍNDEX

1. DADES DEL CENTRE	3
2. RESUM	4
3. INTRODUCCIÓ	5
3.1. OBESITAT	5
3.1.1. Tractaments de l'obesitat	6
3.1.2. Obesitat i fetge: Malaltia del fetge gras no alcohòlic (NAFLD) i esteatohepatitis no alcohòlica (NASH)	7
3.2. TMAO	8
3.2.1. Metabolisme del TMAO	8
3.2.2. El paper del TMAO a l'organisme	9
3.2.3. TMAO i altres malalties cròniques	10
4. HIPÒTESIS I OBJECTIUS	11
5. MATERIALS I MÈTODES	12
5.1. DISSENY DE L'ESTUDI	12
5.2. PROCESSAMENT DE LES MOSTRES	12
5.3. CARACTERÍSTIQUES BIOQUÍMIQUES	13
5.4. ANÀLISIS HISTOLÒGIQUES	13
5.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA	14
5.5.1. Preparació de les mostres	14
5.5.2. Anàlisis metabolòmiques	14
5.6. ANÀLISIS ESTADÍSTIQUES	15
6. RESULTATS	16
6.1. Estudi de la població	16
6.2. Anàlisi de les concentracions de TMAO, TMA, colina i betaïna en pacients amb obesitat mòrbida	20
6.3. Anàlisi de les concentracions de TMAO, TMA, colina i betaïna en pacients amb i sense NASH	22

6.4. Variacions de les concentracions de TMAO, TMA, colina i betaïna en funció de les característiques histològiques del fetge	23
7. DISCUSSIÓ	26
8. CONCLUSIONS	30
9. BIBLIOGRAFIA	31
10. AUTOAVALUACIÓ	36

1. DADES DEL CENTRE

Aquest projecte s'ha realitzat a la Unitat de Recerca Biomèdica (URB) que forma part de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus i està adscrita a la Universitat Rovira i Virgili i a l'Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili. La URB està localitzada a l'Antic Hospital Sant Joan de Reus i actualment està dirigida pel Dr Jorge Joven amb la col·laboració del Dr Jordi Camps. El treball ha estat tutoritzat pel Dr. Jorge Joven i la Dra. Anna Hernández, qui també ha exercit com a tutora acadèmica.

2. RESUM

INTRODUCCIÓ: L'obesitat és una de les malalties amb un major increment de prevalença en l'actualitat. Una de les comorbilitats associades més importants és l'esteatohepatitis no alcohòlica (NASH). L'òxid de trimetilamina (TMAO) és un metabòlit derivat de la trimetilamina (TMA), que es sintetitza en l'intestí per la microbiota a partir de colina i betaïna.

HIPOTESIS I OBJECTIUS: L'obesitat i la NASH podrien modificar les concentracions de TMAO, TMA, colina i betaïna. Els principals objectius del treball són determinar canvis en les concentracions d'aquests metabòlits deguts a l'obesitat i a la cirurgia bariàtrica, canvis associats al grau de NASH i canvis associats a les condicions histològiques del fetge (esteatosi, fibrosi, *ballooning* hepatocel·lular i inflamació).

MATERIALS I MÈTODES: Les mostres es van obtenir de pacients amb obesitat mòrbida abans i 1 any després de la cirurgia bariàtrica. Les mostres van ser sotmeses a cromatografia líquida per tal d'analitzar les concentracions de TMAO, TMA, colina i betaïna

RESULTATS: L'obesitat causa una disminució de la concentració de TMA, colina i betaïna en pacients amb obesitat mòrbida però no hi ha diferències en la concentració de TMAO. Quan es pacients es classifiquen segons el grau de NASH, no hi ha variacions en cap dels metabòlits. Des del punt de vista histològic, només hi ha variacions en el grau màxim d'esteatosi (augment de colina i TMA) i en estat avançats de fibrosi (increment de colina).

CONCLUSIONS: L'obesitat modifica les concentracions dels metabòlits, probablement a partir de canvis en la microbiota intestinal. L'estat de NASH no provoca canvis en les concentracions de metabòlits però estats avançats d'esteatosi i fibrosi poden modular el metabolisme del TMAO.

PARAULES CLAU: TMAO, TMA, colina, betaïna, NASH, Obesitat

3. INTRODUCCIÓ

3.1. OBESITAT

L'obesitat és una malaltia multifactorial complexa que inclou factors de comportament, genètics, metabòlics i ambientals (1). No obstant, la principal causa de l'obesitat és una desregulació entre la ingesta i la despesa energètica, essent major l'entrada que la sortida. Aquesta situació causa l'acumulació de triacilglicèrids (TAGs) a les cèl·lules adiposes, donant lloc a la hiperplàsia de les cèl·lules (2). L'obesitat és una de les malalties amb major increment de la seva prevalença en els darrers anys segons ha informat l'Organització Mundial de la Salut (OMS). Actualment afecta al voltant de 650 milions de persones i ha fet incrementar els problemes de salut en nens, adolescents i adults. Tot i que afecta principalment als països desenvolupats, també està en augment en països en desenvolupament (figura 1) (3).

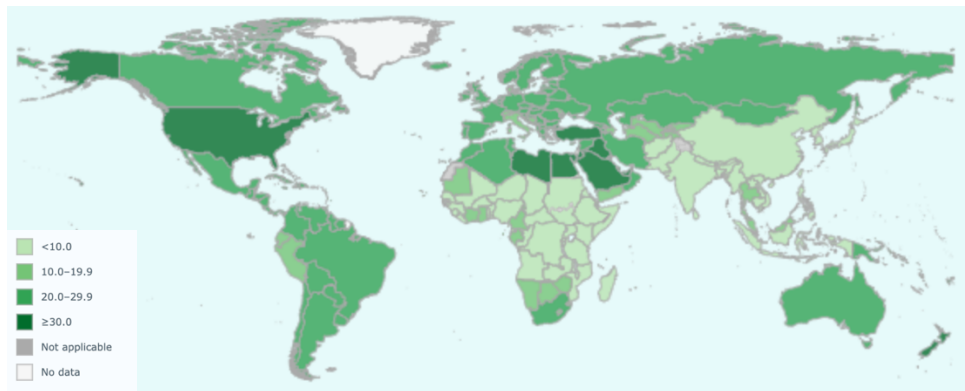


Figura 1. Mapa de prevalença de l'obesitat a nivell mundial (3).

L'obesitat representa un factor de risc en el desenvolupament d'altres malalties com la diabetis Mellitus tipus 2 (DMT2), l'arteriosclerosi, la malaltia del fetge gras no-alcohòlica (NAFLD, de l'anglès *Non-alcoholic fatty liver disease*), asma i fins i tot càncer (4). Aquestes comorbiditats normalment estan relacionades amb una excessiva acumulació de TAG, normalment a la regió abdominal. Aquest augment de TAG produeix alteracions metabòliques, malalties cardiovasculars i resistència a la insulina (IR) (5). Totes aquestes alteracions comporten una disminució de l'esperança de vida amb el conseqüent increment dels costos pel sistema sanitari (6).

L'índex de massa corporal (IMC) és el principal mètode utilitzat per a la classificació de l'obesitat. Es calcula dividint el pes corporal (kg) entre l'alçada (m) al quadrat. Tot i que l'IMC no és el mètode més exacte, està internacionalment acceptat com a mètode estàndard de classificació de

l'obesitat (4). La població es divideix en diferents categories segons el valor de l'IMC: infrapès (<18.5), pes normal (18.5<BMI< 24.9), sobrepès (25<BMI<29.9) i obesitat (30>BMI). Dins de la classificació d'obesitat, es considera obesitat mòrbida quan l'IMC és superior a 40 (7).

3.1.1. Tractaments de l'obesitat

El principal tractament de l'obesitat és la restricció calòrica junt a un increment de l'activitat física per tal de disminuir la ingesta i augmentar la despesa energètica (8). En els casos més severes, es pot recórrer a tractaments farmacològics o bé quirúrgics, com la cirurgia bariàtrica (9). Altres estratègies es basen en la utilització de compostos naturals que han demostrat que tenen propietats en la disminució dels efectes de l'obesitat. Aquest productes naturals poden presentar una gran diversitat d'efectes com interferir amb l'absorció de nutrients, disminuir l'adipogènesi, incrementar el consum d'energia per termogènesi, supressió de la gana, modificar la composició de la microbiota intestinal i incrementar l'excreció de greix per via fecal (10). S'utilitzen, per exemple, extractes naturals provinents de plantes com l'extracte de proantocianidines de la llavor del raïm (GSPE, *grape-seed proanthocyanidin extract*) que presenta una millora dels efectes de l'obesitat (11–13).

S'ha demostrat que la cirurgia bariàtrica és un dels tractaments més eficaços contra l'obesitat, reduint el pes dels pacients i millorant les comorbiditats associades, com ara la hipertensió, la DMT2, la NAFLD, els problemes cardiopulmonars entre d'altres (14). D'entre els diferents tipus de cirurgia bariàtrica, n'hi ha dos tipus que són els més utilitzats actualment (figura 2). En el bypass gàstric Roux-en-Y es deixa una cavitat estomacal petita que s'uneix directament al jejú, sense eliminar l'estómac ni el duodè. Pel que fa a la gastrectomia vertical (en anglès, *vertical sleeve gastrectomy*), aquesta tècnica es basa en la reducció de l'estómac deixant-lo en forma principalment tubular. Aquest procediment aconsegueix reduir la concentració de l'hormona ghrelina i disminuir la sensació de gana en el pacient. És el tipus de cirurgia més utilitzat actualment (15).

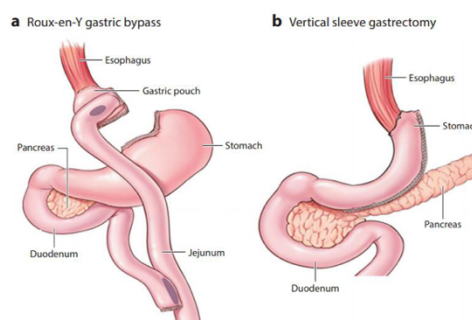


Figura 2. Representació esquemàtica del procediment de cirurgia bariàtrica. Extret de Evers et al. (15)

3.1.2. Obesitat i fetge: Malaltia del fetge gras no alcohòlic (NAFLD) i esteatohepatitis no alcohòlica (NASH)

S'ha demostrat que els pacients amb obesitat i amb presència de síndrome metabòlica presenten un risc major de patir malalties secundàries com la malaltia de fetge gras no alcohòlic (NAFLD) (16). La NAFLD pot estar acompanyada d'inflamació i fibrosi, i llavors evoluciona cap a un estat d'esteatohepatitis no alcohòlica (NASH). Si l'estat de NASH és molt perllongat en el temps, pot donar lloc a cirrosi i processos cancerosos.

En els darrers anys la prevalença de la NAFLD al món ha augmentat igual que la d'obesitat. La prevalença de NAFLD en els països més desenvolupats és superior comparada amb països en desenvolupament, encara que aquests han patit un increment dels casos diagnosticats (figura 3).

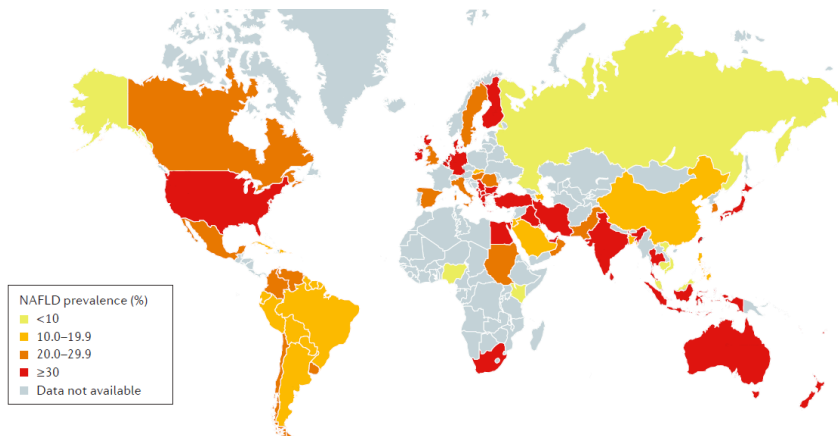


Figura 3. Prevalença global de NAFLD. Adaptació de Younssi et al (17)

La NAFLD es pot diagnosticar per una desregulació de la concentració dels enzims hepàtics (aspartat transaminasa - AST, alanina aminotransferasa - ALT, gamma glutamil transpeptidasa - GGT) al plasma sanguini, tot i que el millor mètode per a la seva diagnosi és la biòpsia hepàtica. Aquesta tècnica és la que s'utilitza per valorar el fetge dels pacients i poder-los classificar segons el seu estat (18).

L'increment de la concentració de TAGs al plasma provoca l'acumulació de greixos al fetge. Aquest increment de TAGs prové principalment d'un increment de la lipòlisi i de la resistència a la insulina. L'obesitat inhibeix la β -oxidació dels àcids grassos i l'activitat mitocondrial i dóna lloc a aquesta acumulació de greix al fetge (19). En estadis inicials, l'acumulació de greix al fetge es pot considerar una condició "benigna", però en estadis com la NASH, representa un factor de risc per patir altres malalties.

L'evolució d'esteatosi simple cap a NASH es produeix per l'excessiva quantitat de TAGs lliures que són absorbits pels hepatòcits i acaben formant gotes lipídiques (*lipid droplets*). Això acaba portant a les cèl·lules a estats de "*ballooning*", on queden inflades, i desemboca a un estat d'inflamació crònica en el teixit, desregulació de l'apoptosi i fibrosi. Si això segueix evolucionant, pot provocar el desenvolupament de cirrosi i, en última instància, càncer hepatocel·lular (20) (figura 4).

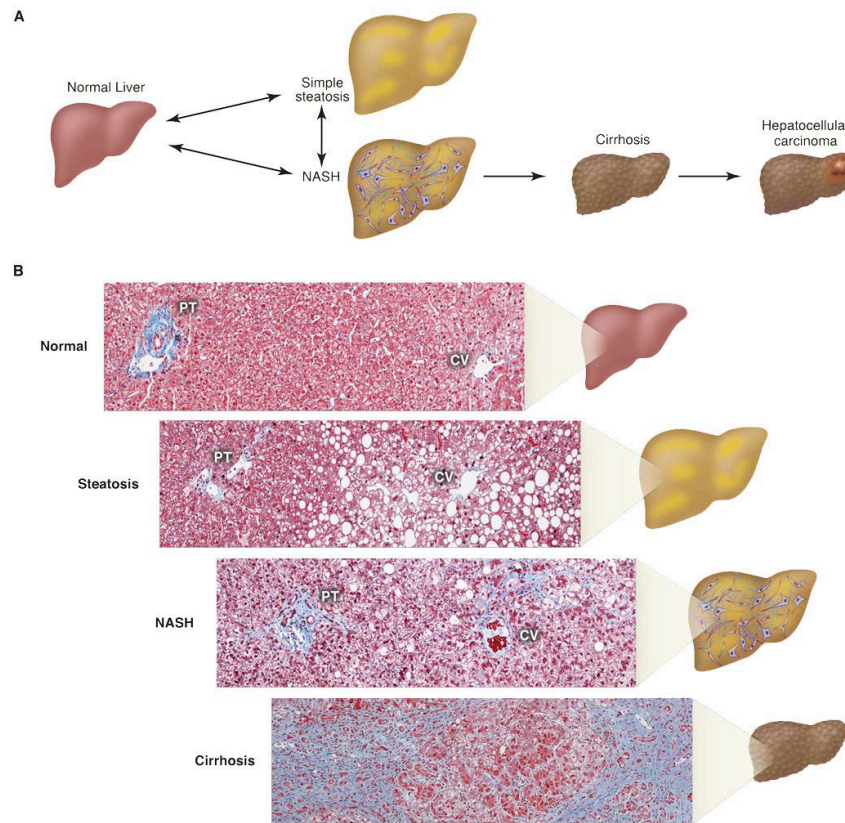


Figura 4. (A) Progressió esquemàtica de NAFLD i (B) Mostres histològiques dels diferents estats de progressió de NAFLD. PT: triada portal; CV: vena central. Extret de Cohen et al (2011) (21).

3.2. TMAO

El TMAO (N-òxid de trimetilamina) és un metabòlit que ha tingut molta rellevància en els darrers anys com a marcador biològic de malalties cardiovasculars com l'arteriosclerosi, malalties renals i també en estadis primaris de la síndrome metabòlica (22–24).

3.2.1. Metabolisme del TMAO

El TMAO pot ser generat per diferents vies metabòliques. La principal producció de TMAO és per síntesi hepàtica a partir de la trimetilamina (TMA) i per acció de la monooxigenasa dependent de flavines 3 (FMO3) (22). La TMA és una metabòlit que es genera a l'intestí per la microbiota a partir

d'una gran varietat de substrats. Els principals precursors que poden generar TMA són la colina i la L-carnitina. A l'intestí, la L-carnitina i la colina poden ser transformades directament a TMA per enzims específics o bé ser transformades a betaïna i posteriorment a TMA. La TMA és absorbida pels enteròcits i és transportada fins al fetge, on s'utilitza com a precursor per la FMO3 per sintetitzar TMAO. El TMAO és secretat pel fetge al plasma i pot ser absorbit pels diferents teixits o bé ser excretat a l'orina (22,25) (figura 5).

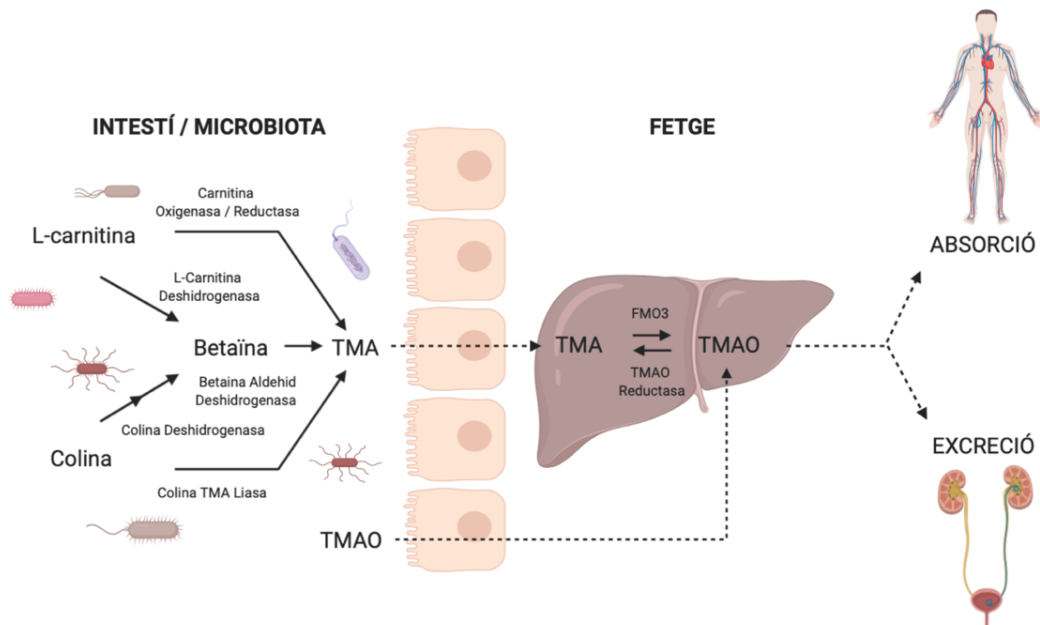


Figura 5. Representació esquemàtica del metabolisme del TMAO. TMAO: òxid de trimetilamina, TMA: trimetilamina
FMO3: monooxigenasa dependent de flavines 3.

3.2.2. El paper del TMAO a l'organisme

El TMAO és una molècula amb una gran varietat de funcions entre les que s'inclouen el manteniment del volum cel·lular en situacions d'estrès hídric, pal·liar els efectes de la urea sobre estructures macromoleculares o promoure el correcte plegament de proteïnes en el reticle endoplasmàtic (reduint l'estrès de reticle i reduint la resposta contra proteïnes mal plegades) (25).

Com s'ha mencionat anteriorment, el TMAO és una molècula que s'ha relacionat directament amb les malalties cardiovasculars. Hi ha diversos mecanismes pels quals el TMAO pot incrementar el risc de patir malalties com l'arteriosclerosi (23). A nivell hepàtic, el TMAO pot causar la inhibició dels enzims responsables de la síntesi d'àcids biliars (CYP7A1 i CYP27A1) provocant una disminució del *pool* d'àcids biliars del fetge (26).

S'ha vist que el TMAO també pot incrementar la quantitat de receptors de tipus *Scavenger* en macròfags (CD36 i SRA), augmentant la quantitat de cèl·lules escumoses. Això podria provocar una modificació del flux de colesterol modificant-ne els nivells, tant del colesterol HDL com colesterol LDL en plasma (26). De forma indirecta, l'enzim responsable de la conversió de TMA a TMAO, FMO3, pot regular elements com els receptors PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptor*) i LXR (*liver receptor X*) reduint així la inflamació hepàtica i incrementant la gluconeogènesi i la lipogènesi (26). S'ha vist que FMO3 pot tenir un paper inhibitori en la ruta d'excreció de colesterol transintestinal no biliar o TICE (*nonbiliary transintestinal cholesterol export pathway*). Aquesta combinació de mecanismes podria portar a un increment del colesterol retingut en les cèl·lules escumoses i incrementar el risc de patir arteriosclerosi (26) (figura 6).

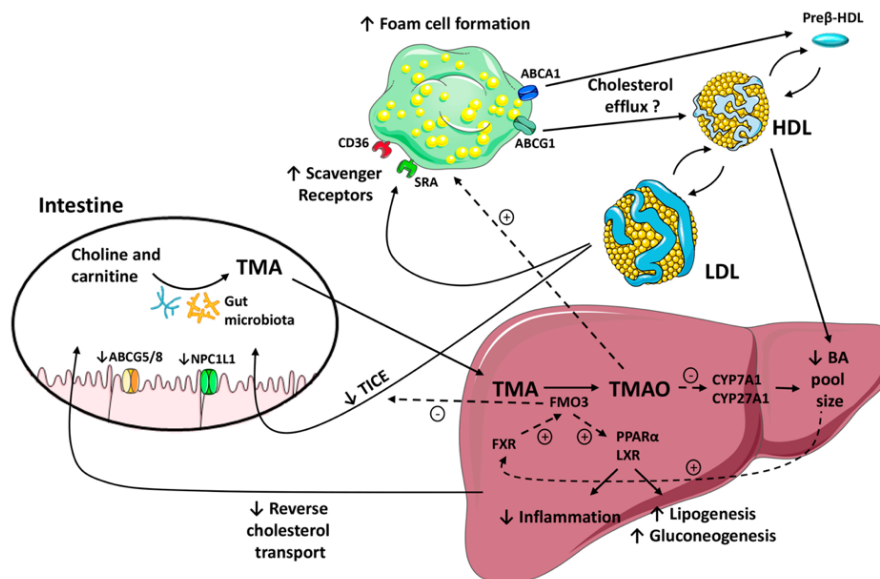


Figura 6. Representació esquemàtica dels efectes del TMAO sobre el metabolisme del colesterol. TMAO: òxid de trimetilamina, TMA: trimetilamina; FMO3: monooxigenasa dependent de flavines 3; BA: àcids biliars; HDL: lipoproteïnes d'alta densitat; LDL: lipoproteïnes de baixa densitat. Extret de Canyelles et al. (26)

3.2.3. TMAO i altres malalties cròniques

S'ha vist que hi ha una correlació positiva entre la concentració de TMAO i l'IMC dels pacients, la resistència a insulina, la massa de greix visceral i la quantitat de greix en el fetge. A més, s'han trobat correlacions positives entre els nivells en plasma de TMAO, colina i betaina i la presència i severitat de la NAFLD i la síndrome metabòlica. Aquests fets donen al TMAO bones perspectives per ser usat com a biomarcador per a aquest tipus de patologies (24).

4. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

L'obesitat i l'esteatohepatitis no alcohòlica (NASH) són dues malalties que es troben estretament relacionades. Provoquen canvis en la microbiota intestinal i també poden modificar la funcionalitat del fetge. Si no es realitza el diagnòstic i tractament adient, aquestes patologies poden causar greus problemes al pacient.

La nostra hipòtesi principal és que els canvis generats per la NASH en el fetge i per l'obesitat a la microbiota intestinal modifiquen els nivells de TMAO i dels seus derivats, ja que el seu metabolisme es desenvolupa entre aquests dos òrgans. Creiem també que la cirurgia bariàtrica, que reverteix les comorbiditats associades a l'obesitat, podria restablir el metabolisme del TMAO i fer que aquests metabòlits tornin a nivells similars als de persones amb normopès i sense NASH.

Per tant els objectius principals d'estudi consisteixen en:

- Avaluar si l'obesitat mòrbida genera canvis a nivell plasmàtic de les concentracions de TMAO, TMA, betaïna i colina respecte pacients control amb normopès. Avaluar també si la cirurgia bariàtrica restaura les modificacions provocades per l'obesitat.
- Determinar si, en pacients amb obesitat, la presència de NASH té implicacions en les concentracions de TMAO, TMA, betaïna i colina. Comprovar si algun d'aquests metabòlits és viable com a possible marcador plasmàtic de NASH.
- Comprovar si hi ha una possible correlació entre les concentracions de metabòlits i el valor de *NAFLD Activity Score* (NAS). Avaluar també una possible relació amb la resta de paràmetres histològics del fetge.

5. MATERIALS I MÈTODES

5.1. DISSENY DE L'ESTUDI

En aquest estudi es van incloure pacients amb obesitat mòrbida que eren sotmesos a cirurgia bariàtrica (n=50), pacients control amb normopès (n=30) i pacients un any després de ser operats (n=50). El total de participants va ser de 130 (figura 7). Els criteris d'inclusió per als pacients amb obesitat van ser tenir un BMI igual o superior a 35 i ser majors d'edat.

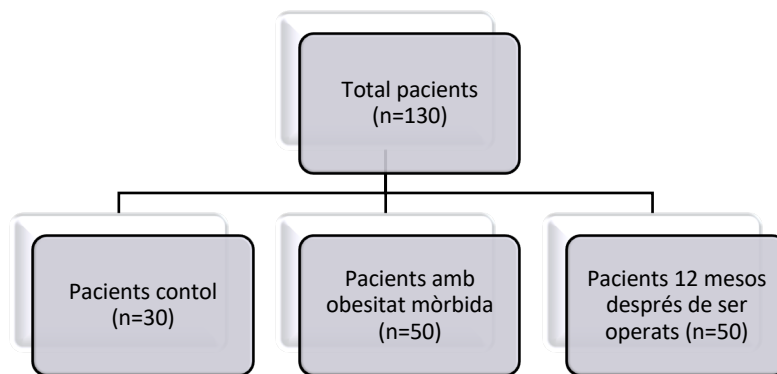


Figura 7. Representació esquemàtica de la distribució dels pacients de l'estudi.

5.2. PROCESSAMENT DE LES MOSTRES

Les mostres de sang i fetge dels pacients amb obesitat es van recollir en el moment de la cirurgia bariàtrica i un any després (en el cas dels pacients que acceptaven donar mostra de seguiment). Les mostres de sang es van centrifugar a 2500rpm durant 15 minuts a 4°C per tal d'obtenir el plasma i sèrum. Les mostres es van aliquotar i es van emmagatzemar a -80°C per al seu ús posterior.

Les mostres de fetge es van mantenir en tubs amb formaldehid durant un temps prudencial per tal de fixar el teixit. Després es van dipositar en *cassettes* que van passar a través d'un processador on es va deshidratar la mostra mitjançant diferents solucions d'etanol, xilol/etanol, xilol, i per últim es van incloure en parafina. Els blocs de parafina es van tallar utilitzant el micròtom fent talls de 3µm de gruix per a l'anàlisi histològica.

5.3. CARACTERÍSTIQUES BIOQUÍMIQUES

Els paràmetres bioquímics com la glucosa, insulina, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicèrids i transaminases (ALT, AST i GGT) es van analitzar mitjançant un analitzador automàtic COBAS8000 (Roche Farma). Les mostres de plasma van ser sotmeses a anàlisis quimioluminscents, immunoanàlisis o assajos enzimàtics seguint els protocols estàndards del Laboratori de Referència del Camp de Tarragona i Terres de l'Ebre. A més es va realitzar una avaluació del model homeostàtic de resistència a la insulina (HOMA- IR) per estimar la resistència a la insulina.

5.4. ANÀLISIS HISTOLÒGIQUES

Els talls de fetge es van desparafinar i hidratar mitjançant una bateria de xilols i alcohols i posteriorment es van sotmetre a diferents tincions que permetien l'avaluació del seu estat histològic utilitzant el grau de NAS. Aquest permet la classificació dels pacients en No NASH (NAS 0, 1, 2), NASH dubtós (NAS 3, 4) i NASH (NAS 5, 6, 7, 8). Les tincions que es van realitzar per estimar aquest NAS són:

- Sirius Red: permet la tinció del col·lagen present en talls histològics ja que el colorant Sirius Red s'uneix a les fibres de col·lagen de tipus I i III permetent l'estudi de fibrosi i la seva quantificació.
- Tricròmic de Masson: aquests colorants permeten la tinció diferenciada dels nuclis, els citoplasma i el col·lagen present en talls histològics. S'utilitza per observar la disposició del col·lagen i altres tipus cel·lulars en els talls histològics.
- Hematoxilina – Eosina: els colorants de l'hematoxilina i l'eosina s'uneixen a les diferents estructures cel·lulars permetent la seva observació en els teixits.

Un cop tenyits, aquests talls es van deshidratar utilitzant una cadena de xilols i alcohols de forma inversa a l'esmentat anteriorment i es van muntar utilitzant el medi DPX, permetent la preservació del tall histològic en el temps. Els talls es van observar al microscopi i amb les diferents tincions es van puntuar els diferents paràmetres de la NAS. Els paràmetres que s'observen i es valoren són: esteatosi, inflamació lobular i efecte *ballooning*. A més, també s'observa si hi ha fibrosi en el teixit. La puntuació d'aquests paràmetres es realitza segons Kleiner *et al.* (27) Els pacients amb obesitat mòrbida es van dividir segons el seu valor de NAS. Hi havia 86 pacients sense NASH (36

pacients amb NAS=0 i 50 pacients amb NAS=1/2), 100 pacients amb NASH dubtós (50 pacients amb NAS=3 i 50 pacients amb NAS=4) i 50 pacients amb NASH (NAS ≥5) (figura 8).

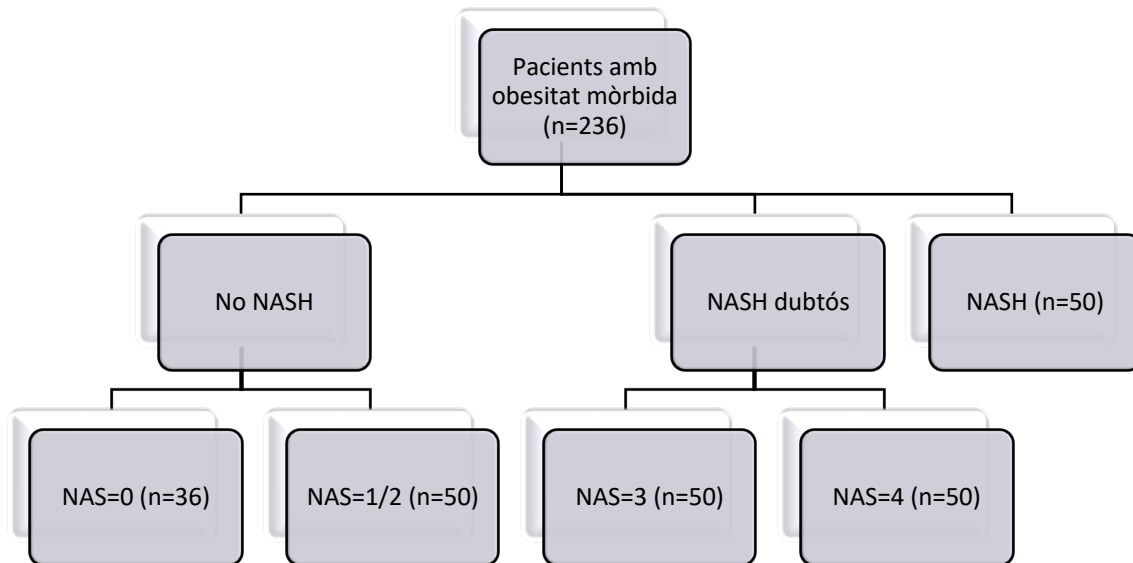


Figura 8 Representació esquemàtica de la classificació dels pacients amb obesitat.

5.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

5.5.1. Preparació de les mostres

Es va realitzar l'extracció de metabòlits a partir de 100µL de plasma. Les mostres de plasma es van barrejar amb 900µL de metanol:aigua en proporció 8:2, es van vortejar i mantenir a -20°C durant 2h per tal de precipitar proteïnes. Posteriorment, les mostres van ser centrifugades a 14 000 rpm durant 10 minuts a 4°C i es va recollir el sobrenedant. Posteriorment, les mostres de plasma van ser barrejades amb els estàndards interns, tert-butil bromoacetat en acetonitril (ACN) i hidròxid d'amoni. Després les mostres es van vortejar durant un minut i van ser derivatitzades durant 30 minuts a temperatura ambient. Després s'hi va afegir àcid fòrmic en ACN i les mostres es van vortejar i centrifugar durant 5 minuts a 15000 rpm a 4°C. El sobrenedant es va transferir a un vial de vidre per a la seva posterior anàlisi.

5.5.2. Anàlisis metabolòmiques

Les mostres es van injectar en un UHPLC 1290 *Infinity II Series* acoblat a un espectròmetre de masses de triple quadrupol que usa una font d'ionització en electroesprai (UHPLC-ESI-QqQ-MS).

L'UHPLC estava equipat amb una columna ACQUITY UPLC BAH HILIC. Les fases mòbils consistien en A: ACN:H₂O (10:90) i B: ACN:H₂O (90:10), ambdues en una solució de format d'amoni i d'àcid fòrmic. La separació cromatogràfica va ser realitzada amb un flux de 0.5mL/min i un gradient de concentració ascendent de B.

La detecció dels metabòlits es va realitzar mitjançant *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) treballant en un mode positiu. La quantificació de cada metabòlit va ser realitzada corregint les àrees dels pics amb els seu estàndard intern corresponent i la corba de calibratge. La quantificació es va realitzar utilitzant el software *MassHunter Workstation Quantitative Analysis* B.10.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

5.6. ANÀLISIS ESTADÍSTIQUES

Les anàlisis estadístiques es van realitzar amb el programa SPSS 26 (IBM Corp., Chicago, USA) i GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, USA). Els valors erronis (*outliers*) es van detectar mitjançant el mètode de Iglewicz and Hoaglin's i es van reemplaçar per la mediana del grup. Per tal de comparar les diferents variables no-paramètriques es va aplicar el test de l'U de Mann-Whitney. Les dades també es van analitzar mitjançant el servidor MetaboAnalyst (www.metaboanalyst.ca) i es van obtenir *heatmaps*, *Partial Least Squares – Discriminant Analysis* (PLS-DA) i VIP (*Variable Importance in the Projection*) Scores. El heatmap és un gràfic visual per observar possibles patrons entre els diferents grups i compostos. Els PLS-DA és un anàlisi estadístic que intenta separar i maximitzar distàncies entre els grups combinant diverses variables i el VIP Scores indica les variables que són més discriminants per separar els grups (28,29). Es va considerar com a diferències significatives aquelles comparacions en les que el p-valor era inferior a 0,05.

6. RESULTATS

6.1. Estudi de la població

Les característiques clíniques i bioquímiques dels participants es troben recollides a la Taula 1. Degut a la seva condició d'obesitat, el valor de l'IMC era diferent en els tres grups, essent el grup control el que tenia un menor valor i el grup de pre-cirurgia (pacients amb obesitat mòrbida) el que presentava el valor més elevat. Un any després de la cirurgia bariàtrica, s'observava una disminució del valor de l'IMC però sense arribar al nivell dels pacients sans. Respecte les comorbiditats associades a l'obesitat (DMT2, hipertensió i dislipèmia), el grup de pacients obesos (pre-cirurgia) presentava un percentatge significativament més alt de pacients amb patologies, que la resta.

Si ens fixem en les variables bioquímiques, s'observava un augment de la glucosa i insulina en el grup de pacients obesos (pre-cirurgia) comparat als grups control i pacients post-cirurgia. En relació, l'índex de resistència a la insulina (HOMA IR) també era més elevat en els pacients amb obesitat que en el grup control i en el grup de pacients post-cirurgia.

Les variables bioquímiques associades al metabolisme lipídic presentaven comportaments oposats entre elles: el colesterol total i el colesterol LDL estaven augmentats en els pacients amb obesitat (pre-cirurgia) mentre que els triglicèrids (TAGs) i el colesterol HDL estaven més disminuïts en aquests pacients. Les transaminases (ALT, AST i GGT) en plasma presentaven una major activitat en el grup pre-cirurgia respecte el grup control i el grup post-cirurgia. L'aspartat transaminasa (AST) també presentava diferències entre el grup control i el grup post-cirurgia, essent el valor d'activitat d'aquesta inferior en els pacients post-cirurgia.

Taula 1. Característiques clíniques i variables bioquímiques dels pacients segregats per grup d'estudi.

	Control (n=30)	Pre-cirurgia (n=50)	Post-cirurgia (n=50)	p-valor
Característiques Clíniques				
IMC (kg/m ²)	25,6 (23,12 – 31,26)	45,94 (41,63 – 49,51)	34,49 (31,1 – 38,36)	a**, b**, c**
DMT2 (n, %)	1 (3,33)	23 (46,0)	5 (10,0)	a**, c**
Hipertensió (n, %)	2 (6,67)	22 (44,0)	8 (22,2)	c*
Dislipèmia (n, %)	2 (6,67)	34 (68,0)	3 (8,1)	a*, c*
Característiques bioquímiques generals				
Glucosa (mmol/L)	4,60 (4,20 – 4,98)	7,10 (6,16 – 8,91)	4,72 (4,33 – 5,30)	a**, c**
Insulina (pmol/L)	54,64 (29,48 – 85,28)	81,95 (38,20 – 151,40)	43,41 (29,86 – 68,76)	a, c*
HOMA IR	1,65 (0,89 – 2,74)	3,70 (1,88 – 8,53)	1,37 (0,92 – 2,05)	a**, c**
Colesterol total (mmol/L)	1,10 (0,70 – 1,325)	4,33 (3,75 – 5,19)	1,00 (0,85 – 1,13)	a, c*
Colesterol HDL (mmol/L)	4,95 (4,10 – 5,82)	1,01 (0,78 – 1,27)	4,85 (4,49 – 6,02)	a**, b*, c**
Colesterol LDL (mmol/L)	1,56 (1,14 – 1,68)	2,53 (2,00 – 2,95)	1,66 (1,44 – 2,22)	a
TAG (mmol/L)	2,98 (2,21 – 3,77)	1,63 (1,25 – 2,59)	2,75 (1,96 – 3,32)	a**, c**
Transaminases				
ALT (uKat/L)	0,24 (0,21 – 0,43)	0,53 (0,34 – 0,99)	0,24 (0,19 – 0,29)	a**, c**
AST(uKat/L)	0,32 (0,29 – 0,38)	0,56 (0,36 – 0,93)	0,29 (0,22 – 0,33)	a**, b, c**
GGT (uKat/L)	0,25 (0,16 – 0,34)	0,41 (0,26 – 0,59)	0,26 (0,18 – 0,38)	a*, c**

IMC: índex de massa corporal, DMT2: diabetis mellitus tipus 2, HOMA-IR: índex de resistència a la insulina, HDL: lipoproteïnes d'alta densitat, LDL: lipoproteïnes de baixa densitat, TAG: triacilglicèrids, ALT alanina transaminasa, AST: aspartat transaminasa, GGT: gamma-glutamil transferasa. Les lletres a, b i c indiquen un p valor < 0,05 (a entre control i pre-cirurgia, b entre control i post-cirurgia i c entre pre-cirurgia i post-cirurgia), * indica p valor < 0,01 i ** p valor < 0,001.

El grup de pacients amb obesitat mòrbida (pre-cirurgia) es va dividir segons la presència de NASH al fetge: No-NASH (pacients sense NASH, $NAS \leq 2$), NASH dubtós ($NAS = 3$ o 4) i pacients amb NASH ($NAS \geq 5$) (taula 2). Es va observar que el grup de pacients sense NASH tenia un major percentatge de dones que els grups de pacients amb NASH dubtós o pacients amb NASH. Els pacients sense NASH presentaven una edat inferior quan es comparaven amb el grup amb NASH dubtós i el grup amb NASH. Solament la DMT2 era major en el pacients amb NASH dubtós quan es comparava amb el grup sense NASH.

Si ens centrem en les variables bioquímiques, es podia observar una augment de les concentracions de glucosa, insulina i l'HOMA-IR en el grup de pacients amb NASH. Els altres paràmetres bioquímics no presentaven diferències significatives a excepció d'un augment en la quantitat de TAGs en el grup de pacients amb NASH. Les variables bioquímiques associades al metabolisme lipídic no presentaven diferències entre grups.

L'activitat de les transaminases en plasma presentaven un augment progressiu en els tres grups: a major gravetat de NASH, major concentració de transaminases. Pel que fa a la medicació administrada, no es van observar diferències entre els grups a excepció de la metformina, que s'administrava en més pacients del grup de NASH dubtós que del grup sense NASH.

Taula 2. Característiques clíniques i variables bioquímiques dels pacients segregats en funció de la presència de NASH.

	No – NASH (n=86)	NASH dubtós (n=100)	NASH (n=50)	p-valor
Característiques Clíniques				
Sexe dones (n, %)	69 (82,1)	68 (68)	34 (68)	b
Edat (anys)	47 (40 – 58)	52 (44,5 – 59,5)	51 (48 – 56,2)	a, b
IMC (Kg/m ²)	44,50 (39,3 – 47,73)	44,87 (41,10 – 48,59)	44,86 (40,11 – 49,95)	
DMT2 (n, %)	19 (36,5)	27 (42,2)	21 (58,3)	a
Hipertensió (n, %)	24 (46,2)	39 (61,9)	23 (65,7)	
Dislipèmia (n, %)	18 (34,6)	25 (39,1)	16 (44,4)	
Característiques bioquímiques generals				
Glucosa (mmol/L)	6,16 (5,33 – 7,72)	7,00 (5,77 – 8,83)	7,11 (5,84 – 9,48)	a, b
Insulina (pmol/L)	48,27 (27,42 – 90-98)	79,17 (41,7 – 157,0)	85,42 (60,77 – 229,53)	a**, b*
HOMA IR	2,01 (1,25 – 3,54)	3,69 (2,21 – 7,21)	3,70 (2,78 – 14,25)	a**, b**
Colesterol total (mmol/L)	4,11 (3,56 – 4,81)	4,10 (3,51 – 4,57)	3,79 (3,34 – 4,49)	
Colesterol HDL (mmol/L)	0,97 (0,85 – 1,38)	0,91 (0,79 – 1,20)	0,96 (0,78 – 1,11)	
Colesterol LDL (mmol/L)	2,46 (1,87 – 2,95)	2,37 (1,71 – 2,86)	2,11 (1,65 – 2,80)	
TAG (mmol/L)	1,27 (0,98 – 1,68)	1,59 (1,18 – 2,18)	1,58 (1,26 – 2,11)	a*, b*
Transaminases				
ALT (uKat/L)	0,48 (0,36 – 0,64)	0,54 (0,37 – 0,94)	0,87 (0,46 – 1,29)	a**, c
AST(uKat/L)	0,46 (0,36 – 0,64)	0,58 (0,37 – 0,83)	0,72 (0,39 – 0,93)	a*, b
GGT (uKat/L)	0,29 (0,21 – 0,58)	0,36 (0,23 – 0,50)	0,52 (0,35 – 0,73)	a*, c*
Medicació				
Metformin (n, %)	11 (21,2)	20 (31,3)	17 (47,2)	a*, b
Sulfonilurees (n, %)	2 (3,8)	3 (4,7)	2 (5,6)	
Insulina (n, %)	4 (7,7)	7 (10,9)	6 (16,7)	
ACE ARBS (n, %)	9 (32,1)	1 (16,7)	-	
Diürètic (n, %)	3 (23,1)	8 (12,5)	5 (13,9)	
Estatines (n, %)	12 (23,1)	16 (25)	12 (33,3)	

IMC: índex de massa corporal, DMT2: diabetis mellitus tipus 2, HOMA-IR: índex de resistència a la insulina, HDL: lipoproteïnes d'alta densitat, LDL: lipoproteïnes de baixa densitat, TAG: triacilglicèrids, ALT alanina transaminasa, AST: aspartat transaminasa, GGT: gamma-glutamil transferasa. Les lletres a, b i c indiquen un p valor < 0,05 (a entre no-NASH i NASH, b entre no-NASH i NASH dubtós i c entre NASH dubtós i NASH), * indica p valor < 0,01 i ** p valor < 0,001.

6.2. Anàlisi de les concentracions de TMAO, TMA, colina i betaïna en pacients amb obesitat mòrbida

Es van determinar les concentracions de TMAO, TMA, betaïna i colina en controls, en pacients amb obesitat (pre-cirurgia) i un any després de la cirurgia bariàtrica (figura 9). El grup de pacients pre-cirurgia presentava una disminució de la concentració de TMAO plasmàtica respecte el grup post-cirurgia i també respecte el grup control ($p < 0,01$ en ambdós casos) (figura 9A). Pel que fa al TMA, vam observar que el grup control presentava una concentració significativament superior tant al grup de pacients amb obesitat (pre-cirurgia) com al grup de pacients post-cirurgia ($p < 0,001$ en ambdós casos) (figura 9B). Alhora el grup post-cirurgia també tenia una major concentració de TMA que el grup pre-cirurgia ($p < 0,001$). En els pacients amb obesitat, la colina es trobava augmentada respecte el grup post-cirurgia ($p < 0,05$) però tenia una concentració inferior a la del grup control ($p < 0,001$). El grup post-cirurgia, també tenia una concentració de colina inferior al grup control ($p < 0,001$) (figura 9C). La betaïna es trobava augmentada en el grup post-cirurgia i el grup control quan es comparaven amb el grup pre-cirurgia ($p < 0,001$ i $p < 0,01$ respectivament) (figura 9D).

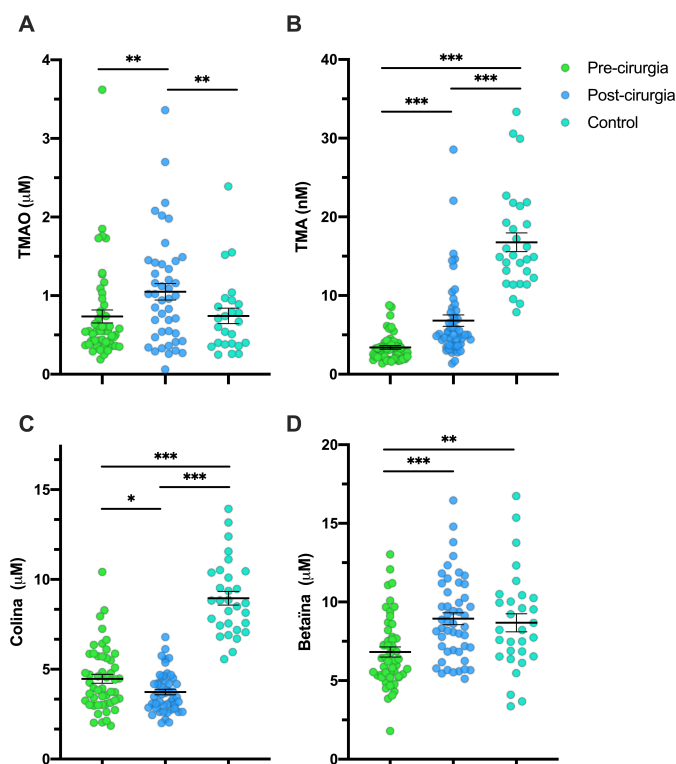


Figura 9. Representació gràfica de la concentració de TMAO, TMA, colina i betaïna dels pacients amb obesitat (pre-cirurgia), post-cirurgia i controls. *: p valor < 0,05; **: p valor < 0,01; *** p valor < 0,001

Vam realitzar un anàlisi multivariant per veure el potencial d'aquests metabòlits a l'hora de distingir entre ambdós grups (figura 10). Amb el *Heatmap*, vam observar que la Colina i la TMA es trobaven augmentats en el grup control i que la Colina era inferior en el grup post-cirurgia. D'altra banda, el grup de pacients amb obesitat (pre-cirurgia) semblava tenir una menor quantitat de TMA en plasma (figura 10A). Amb l'anàlisi del PLS-DA, vam observar que el grup control diferia bastant dels grups pre i post-cirurgia, mentre que aquests dos tenien una gran àrea de solapament (figura 10B). Amb el *VIP Scores* vam analitzar quin compost era el que tenia més importància en la separació de grups i vam observar que era la TMA (figura 10C), que tal i com es veia en el *heatmap*, diferia bastant (figura 10A).

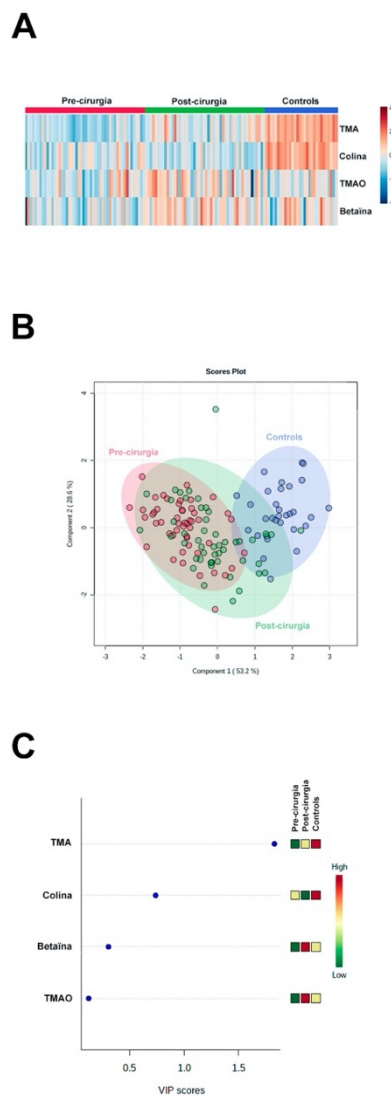


Figura 10. *Heatmap* (A), *PLS-DA* (B) i *VIP Scores* (C) dels diversos metabòlits en els grups control, pre-cirurgia i post-cirurgia.

6.3. Anàlisi de les concentracions de TMAO, TMA, colina i betaïna en pacients amb i sense NASH

Es van determinar les concentracions de TMAO, TMA, betaïna i colina en pacients amb obesitat mòrbida dividits segons la presència de NASH al fetge (no-NASH, NASH dubtós i NASH) (figura 11). Tot i que cap dels compostos analitzats presentava diferències significatives entre els 3 grups d'estudi, la colina tendia a augmentar a mesura que empitjorava l'estat de la NASH.

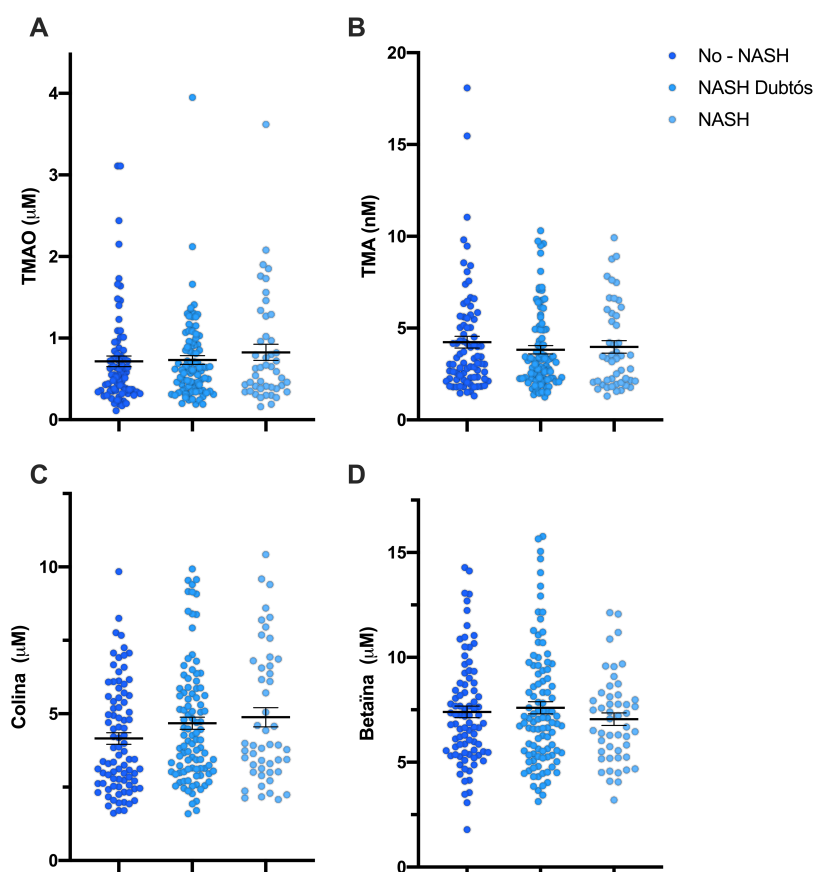


Figura 11. Representació gràfica de la concentració de TMAO, TMA, colina i betaïna segons la presència de NASH (no-NASH, NASH dubtós i NASH).

En aquest cas, també vam realitzar un anàlisi multivariant entre els graus més oposats de malaltia (pacients amb i sense NASH) (figura 12). Ni el Heatmap (figura 12A) ni el PLS-DA (figura 12B) mostraven patrons específics entre grups ni separació, hi havia un solapament pràcticament total entre pacients amb i sense NASH. Tot i així, la colina va resultar el metabòlit amb més capacitat per separar els grups (figura 12C).

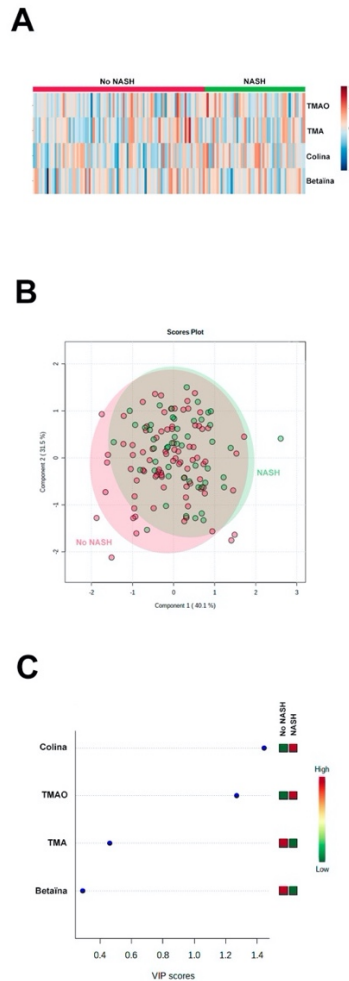


Figura 12. Heatmap (A), PLS-DA (B) i VIP Scores (C) dels diversos metabòlits en els grups amb i sense NASH.

6.4. Variacions de les concentracions de TMAO, TMA, colina i betaina en funció de les característiques histològiques del fetge

La concentració dels diversos metabòlits es va analitzar en funció dels diferents paràmetres histològics que conformen la NAS (gra d'esteatosi, inflamació i *ballooning*) i també la fibrosi (figura 13).

Pel que fa a l'esteatosi, tant la TMA com la colina estaven augmentats ($p < 0,001$) en els pacients que presentaven un percentatge d'esteatosi major al 66%, és a dir, en els grau més avançats. En canvi, els altres compostos no presentaven cap relació amb el grau d'esteatosi ja que no augmentaven ni disminuïen a major acumulació hepàtica de lípids.

Quan es separaven els pacients segons el grau de fibrosi del fetge, únicament la colina presentava un increment en un dels graus de fibrosi més elevat, F3, quan es comparava amb graus inferiors com F1 i F2 ($p < 0,05$ en ambdós casos). De forma contrària, els altres metabòlits no presentaven increments o descensos en estats on el fetge tenia un percentatge de fibrosi més alt.

Si es separaven els pacients segons el nombre de focus inflamatoris, es podien observar increments en la TMA i la colina en diferents condicions. La TMA es trobava incrementat en els pacients que tenien un focus respecte els que no en tenien cap ($p < 0,05$). La colina semblava que seguia una tendència: incrementava com major era el nombre de focus inflamatoris, tot i que l'increment era únicament significatiu entre els pacients sense cap focus i els que en tenien entre 2 i 4 ($p < 0,05$). Els altres metabòlits no presentaven diferències significatives ja que ni augmentaven ni disminuïen amb l'increment de focus inflamatoris.

Pel que fa al *ballooning* cel·lular, en cap dels compostos analitzats es podien observar diferències significatives. Tot i això, en la colina sí es podia observar una tendència a incrementar a mesura que augmentava l'estat de *ballooning*, però les comparacions no van ser estadísticament significatives.

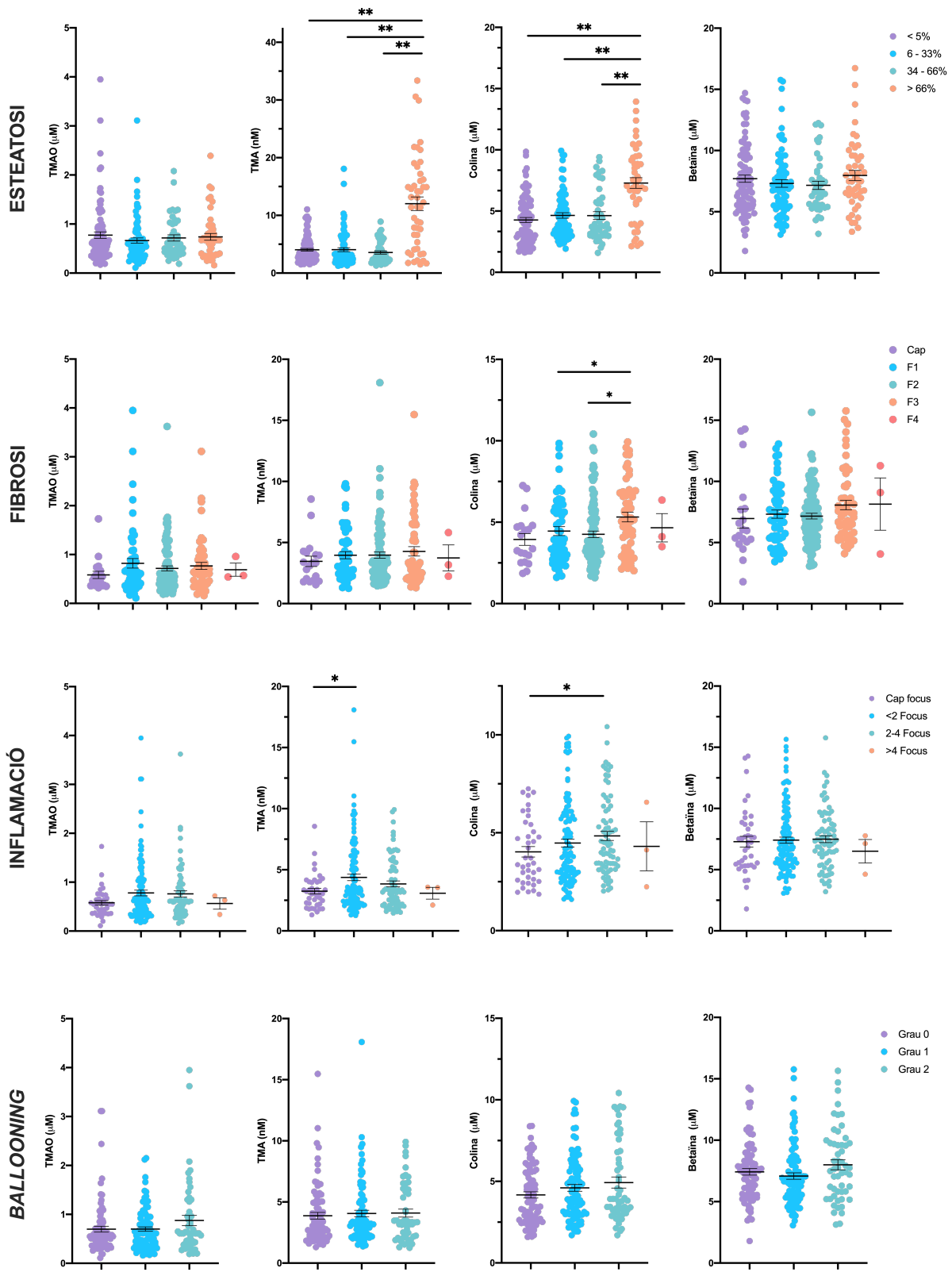


Figura 13. Representació gràfica de la concentració de TMAO, TMA, colina i betaina segons les característiques principals de progressió de la NASH i l'estat del fetge (esteatosi, fibrosi, inflamació i ballooning).

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$

7. DISCUSSIÓ

L'obesitat, i en concret l'obesitat mòrbida, és una malaltia que ha augmentat en els últims anys representant un greu problema de salut pública. L'increment de l'obesitat no és un fet casual, sinó que és degut a un increment del sedentarisme per part de l'esser humà, acompanyat de l'increment del consum de sucre, majoritàriament associat a la ingesta de productes ultra-processats. L'aparició de comorbiditats associades a l'obesitat representa cada cop un dels majors costos de la sanitat pública del món actual (6). La major implicació de l'obesitat mòrbida és un augment de l'IMC, que comporta a un augment de l'adipositat general. En conseqüència, es produeixen certes alteracions metabòliques a nivell sistèmic que acaben provocant les comorbiditats associades a l'obesitat (30).

Una de les comorbiditats més comuns que pateixen els pacients amb obesitat és l'aparició de la resistència a la insulina que pot portar al desenvolupament de malalties com la DMT2. Mitjançant l'HOMA-IR, vam observar que els pacients amb obesitat (pre-cirurgia) presentaven resistència a la insulina i aquesta es revertia 1 any després de la cirurgia bariàtrica, arribant a valors similars als del grup control. La resistència a la insulina comporta un augment de la glucosa plasmàtica acompanyat de l'increment d'insulina plasmàtica. El principal tractament és l'administració de metformina. La metformina és l'antidiabètic oral per excel·lència, i ha demostrat tenir efectes en el pes corporal en models animals d'obesitat i NAFLD quan es combina amb restricció calòrica (32). Aquesta relació estreta entre obesitat, resistència a la insulina i canvis en la glicèmia ja ha estat demostrada en altres experiments amb anterioritat (33–35)

La cirurgia bariàtrica, també coneguda com a cirurgia metabòlica, presenta grans efectes beneficiosos per als pacients amb obesitat ja que permet revertir en gran mesura els efectes causats per aquesta malaltia i restaurar la normalitat metabòlica dels pacients (15). Això es pot observar en el grup de pacients post-cirurgia, i a més aquests efectes han estat descrits també amb anterioritat en altres estudis (15,31). A nivell bioquímic, es pot apreciar aquest comportament concret que se sol repetir en totes les variables: Els paràmetres bioquímics empitjoren en els pacients amb obesitat i solen millorar després de la cirurgia bariàtrica, assimilant-se als del grup control. En els paràmetres del metabolisme lipídic, s'observa un increment del colesterol total lligat a un descens del Colesterol HDL i a un augment del Colesterol LDL. L'increment de colesterol es troba lligat a l'augment dels àcids grassos lliures en el plasma que en arribar al fetge es metabolitzen en TAGs. Això causa que la síntesi de les lipoproteïnes de molt baixa densitat es

vegi augmentada portant a un increment del colesterol LDL i disminuint el colesterol HDL (36,37). Les transaminases o aminotransferases són enzims del metabolisme intermedi del fetge que donen informació de lesió hepatocel·lular (38). L'acumulació de lípids, àcids grassos, cristalls de colesterol pot portar a una alteració de l'homeòstasi de les cèl·lules causant dany cel·lular. Això porta a l'activació dels sistemes de protecció del fetge, que en últim terme acaben amb la secreció de citocines pro-inflamatòries. Aquestes poden activen cascades d'enzims pro-apoptòtics i agreujar el desenvolupament de malalties com NASH (39). L'increment d'enzims apoptòtics comporta la lisi de cèl·lules hepàtiques i en conseqüència es dona un increment de d'activitat d'aquests enzims (ALT, AST i GGT) en el plasma, indicant per tant, lesió hepàtica, característica en els pacients amb NASH.

Quan analitzem les concentracions de TMAO, TMA, colina i betaïna podem observar clars efectes de l'obesitat sobre aquestes concentracions. Aquests efectes observats són molt similars als obtinguts per Aragonès *et al.*, que també van observar una disminució de TMA i betaïna en pacients obesos respecte pacients sans. Contràriament, van observar un increment de la colina (40), mentre que en els nostres pacients aquesta es troba reduïda. Altres autors també han observat una reducció de les quantitats de colina en pacients amb NAFDL quan es comparen amb pacients sans (41).

El metabolisme del TMAO comença pel processament de la betaïna i la colina a l'intestí per la microbiota bacteriana. Es sabut que les dietes altes en greixos causen una modificació de la microbiota (42,43) i això podria provocar una modificació de la taxa de síntesi de TMA per part de la microbiota i una disminució de l'absorció d'aquesta a causa de les alteracions provocades per l'obesitat. Els efectes d'una menor absorció de certs micronutrients ha estat descrita amb anterioritat (44). Aquest fets combinats podrien causar una disminució de la concentració de TMA, colina i betaïna en sang en els pacients pre-cirurgia si es comparen amb els pacients sans. Aquesta disminució de la TMA en sang és contradictòria amb la concentració del TMAO que es manté similar entre pacients amb obesitat (pre-cirurgia i sans).

El manteniment de la concentració del TMAO podria ser degut a un increment de l'expressió, la quantitat o bé l'activitat de la FMO3 que catalitza la conversió de TMA a TMAO. L'increment de l'activitat de la FMO3 junt a l'increment de l'IMC ja ha estat descrita en altres estudis (45). L'augment de l'activitat de la FMO3 a més portaria a un disminució de la TMA plasmàtica i possiblement una major metabolització de colina, reduint els nivells encara més. Els nivells de

betaïna, que també és un precursor de la TMA i TMAO també es troben disminuïts en el grup pre-cirurgia i podrien donar suport a la hipòtesi plantejada anteriorment.

En els pacients post-cirurgia es pot apreciar que no hi ha una recuperació de la normalitat en les concentracions dels metabòlits, com sí es podia observar amb altres paràmetres bioquímics i histològics. Únicament la betaïna presenta valors similars en sang al grup control mentre que la TMA i la colina es mantenen disminuïdes amb concentracions similars a les del grup de pacients amb obesitat. El TMAO, per contra presenta una concentració major 1 any després de la intervenció de cirurgia bariàtrica. Una possible explicació es que la disrupció de la microbiota i l'afectació en l'intestí per l'obesitat en els pacients es podria mantenir en el temps tot i la realització de cirurgia bariàtrica. Les dades referents a la composició de la microbiota intestinal després de la cirurgia són limitades pel moment, pel que no es pot saber amb certesa si la taxa de síntesi de TMA es podria veure afectada (46). En referència a l'augment del TMAO, es podria explicar degut a que la FMO3 podria mantenir uns nivells d'activitat semblants als que tenia quan el pacient era obès. Aquest fet, juntament amb la recuperació del metabolisme hepàtic post-cirurgia bariàtrica, portaria a un increment en la síntesi de TMAO a partir de TMA.

Els pacients amb obesitat solen ser complexos perquè, a banda de l'obesitat i la resistència a la insulina, també n'hi ha molts amb afectacions hepàtiques, sobretot amb NASH. Quan es profunditza sobre els pacients amb obesitat mòrbida i es classifiquen segons l'estat del fetge, es pot veure que no hi ha grans diferències significatives en les característiques clíniques ni en les variables bioquímiques. El que vam observar és que la majoria de variables augmentaven (o disminuïen, segons el cas) de forma gradual d'acord a un empitjorament de la NASH. Els que més destaquen són un increment en la glucosa, la insulina i l'HOMA-IR en pacients amb NASH. A més, la concentració de les transaminases hepàtiques (AST, ALT, GGT) també era superior en aquests pacients, ja que la progressió de la malaltia empitjora la funcionalitat del fetge, fet que es reflecteix en canvis metabòlics i fibrosi (47,48)

Pel que fa al TMAO, la TMA, la betaïna i la colina, en aquest cas no hi havia diferències significatives entre pacients amb diferent grau d'afectació de NASH. En altres estudis però, s'havia vist que els nivells de betaïna es troben reduïts en pacients amb NASH quan es comparen amb pacients que pateixen NAFLD (49). Els nostres resultats poden resultar sorprenents, ja que a la literatura s'ha relacionat el TMAO amb la disminució del *pool*/d'àcids biliars causant, entre d'altres efectes, un major increment i progressió de la NAFLD (41,50). Es per això que s'esperava un

increment més marcat d'aquest metabòlit en pacients amb NASH. Degut a que no hi havia diferències significatives no va valorar a cap dels metabòlits com a marcador plasmàtic de NASH. A banda de l'estat de NASH, ens vam preguntar si alguna de les característiques histològiques del fetge durant la NASH (esteatosi, *ballooning* hepatocel·lular, inflamació lobular i fibrosi) podrien associar-se a canvis en les concentracions de TMAO i derivats. Vam observar que cap dels metabòlits estudiats presentava tendències clares i significatives a augmentar o disminuir a mesura que empitjorava l'estat del fetge. Només la colina i la TMA estaven incrementades en els pacients amb major grau d'esteatosi, mentre que els nivells de TMAO es mantenen similars. Aquest resultat resulta interessant, ja que segons la literatura, el TMAO es relaciona amb la progressió de la NASH i per tant s'esperaria observa un augment del TMAO en pacients amb un major grau d'esteatosi i una disminució progressiva de la TMA, la colina i la betaïna. Aquestes dades permeten deduir que la FMO3 no és dependent del grau d'esteatosi (l'afecta negativament quan els nivells són molt elevats) sinó que és controlada principalment per l'IMC i/o l'augment d'adipositat del pacient. En el cas de la fibrosi, vam observar que en graus elevats d'aquesta (estadi F3) la colina estava incrementada. Contràriament, se sap que dietes deficientes en colina poden provocar esteatosi hepàtica i fibrosi (52). Aquest resultat però, es pot relacionar amb la disminució de la colina en els pacients pre-cirurgia respecte els pacients control i la tendència dels pacients a patir un major grau de fibrosi en el fetge a causa de l'obesitat (53).

El nostre estudi presenta algunes limitacions. Per exemple, el baix nombre de pacients que es van analitzar per cada grup (n=50) i la limitació d'estudiar únicament els metabòlits i no pas els enzims responsables de la seva metabolització. En aquest estudi també ens trobem limitats a una única perspectiva (plasma) ja que les concentracions dels metabòlits no es va analitzar ni al fetge ni a l'intestí, que junt al plasma, són els espais on es desenvolupa el metabolisme del TMAO.

Com a perspectives futures, és molt recomanable augmentar el nombre de participants, que permetrien una visió més acurada dels resultats. També es podria realitzar un estudi d'expressió gènica de FMO3 en cèl·lules hepàtiques i una quantificació de l'activitat de l'enzim FMO3. A més, seria interessant repetir la determinació dels metabòlits al fetge i intestí. També es podria analitzar si hi ha diferències en el *pool* d'àcids biliars, ja que és un de les principals dianes del TMAO i aquest es podria trobar modificat, tot i no trobar diferències en les concentracions del TMAO.

8. CONCLUSIONS

- L'obesitat produeix canvis en les concentracions dels metabòlits relacionats amb el TMAO (TMA, betaïna i colina), probablement a través de canvis en la microbiota intestinal. La cirurgia bariàtrica modifica aquests canvis encara que no retorna les concentracions a nivells similars als de la població control en tots els metabòlits (únicament la betaïna recupera valors similars als pacients controls). L'enzim FMO3 podria tenir un paper important en aquestes variacions i seria un candidat per a futurs estudis.
- La presència i el grau de NASH no provoca canvis significatius en les concentracions de TMAO, TMA, betaïna i colina. Degut a l'absència de diferències significatives, cap dels metabòlits és podria considerar un bon marcador plasmàtic de NASH.
- Quant a les característiques histològiques del fetge, hem vist que l'esteatosi en el seu màxim grau d'afectació provoca un increment de la concentració de TMA i colina en plasma. D'altra banda, estats de fibrosi avançats causen un increment en la concentració de colina.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Williams EP, Mesidor M, Winters K, Dubbert PM, Wyatt SB. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. Vol. 4, Current obesity reports. 2015. p. 363–70.
2. Piaggi P, Vinales KL, Basolo A, Santini F, Krakoff J. Energy expenditure in the etiology of human obesity: spendthrift and thrifty metabolic phenotypes and energy-sensing mechanisms. Vol. 41, Journal of Endocrinological Investigation. Springer International Publishing; 2018. p. 83–9.
3. WHO | Overweight and obesity. WHO. 2018;
4. Abdelaal M, le Roux CW, Docherty NG. Morbidity and mortality associated with obesity. Vol. 5, Annals of Translational Medicine. AME Publishing Company; 2017.
5. Grundy SM. Metabolic Syndrome Pandemic. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 Apr;28(4):629–36.
6. Leung MYM, Pollack LM, Colditz GA, Chang SH. Life years lost and lifetime health care expenditures associated with diabetes in the U.S., National health interview survey, 1997-2000. Vol. 38, Diabetes Care. American Diabetes Association Inc.; 2015. p. 460–8.
7. Drolet R, Richard C, Sniderman AD, Mailloux J, Fortier M, Huot C, et al. Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. Int J Obes. 2008 Feb;32(2):283–91.
8. Rise MB, Pellerud A, Rygg L, Steinsbekk A. Making and Maintaining Lifestyle Changes after Participating in Group Based Type 2 Diabetes Self-Management Educations: A Qualitative Study. PLoS One. 2013 May 9;8(5):e64009.
9. Srivastava G, Apovian C. Future Pharmacotherapy for Obesity: New Anti-obesity Drugs on the Horizon. Vol. 7, Current obesity reports. 2018. p. 147–61.
10. Fu C, Jiang Y, Guo J, Su Z. Natural Products with Anti-obesity Effects and Different Mechanisms of Action. Vol. 64, Journal of Agricultural and Food Chemistry. American Chemical Society; 2016. p. 9571–85.
11. Serrano J, Casanova-Martí À, Gil-Cardoso K, Blay MT, Terra X, Pinent M, et al. Acutely administered grape-seed proanthocyanidin extract acts as a satiating agent. Food Funct.

- 2016 Jan 1;7(1):483–90.
12. Ginés I, Gil-Cardoso K, Terra X, Blay Mt, Pérez-Vendrell AM, Pinent M, et al. Grape Seed Proanthocyanidins Target the Enteroendocrine System in Cafeteria-Diet-Fed Rats. *Mol Nutr Food Res*. 2019;63(11):1–7.
 13. Casanova-Martí À, Serrano J, Portune KJ, Sanz Y, Blay MT, Terra X, et al. Grape seed proanthocyanidins influence gut microbiota and enteroendocrine secretions in female rats. *Food Funct*. 2018 Mar 1;9(3):1672–82.
 14. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrback K, et al. Bariatric surgery: A systematic review and meta-analysis. Vol. 292, *Journal of the American Medical Association*. 2004. p. 1724–37.
 15. Evers SS, Sandoval DA, Seeley RJ. The Physiology and Molecular Underpinnings of the Effects of Bariatric Surgery on Obesity and Diabetes. *Annu Rev Physiol*. 2017 Feb 10;79(1):313–34.
 16. Almeda-Valdes P, Aguilar-Olivos N, Uribe M, Mendez-Sanchez N. Common Features of the Metabolic Syndrome and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Rev Recent Clin Trials*. 2015 Jan 30;9(3):148–58.
 17. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. Vol. 15, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 11–20.
 18. Clark JM, Diehl AM. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Underrecognized Cause of Cryptogenic Cirrhosis. *J Am Med Assoc*. 2003 Jun 11;289(22):3000–4.
 19. Méndez-Sánchez N, Arrese M, Zamora-Valdés D, Uribe M. Current concepts in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. Vol. 27, *Liver International*. 2007. p. 423–33.
 20. Pierantonelli I, Svegliati-Baroni G. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Basic Pathogenetic Mechanisms in the Progression from NAFLD to NASH. *Transplantation*. 2019 Jan 1;103(1):E1–13.
 21. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: Old questions and new insights. Vol. 332, *Science*. 2011. p. 1519–23.

22. Janeiro MH, Ramírez MJ, Milagro FI, Martínez JA, Solas M. Implication of trimethylamine n-oxide (TMAO) in disease: Potential biomarker or new therapeutic target. Vol. 10, *Nutrients*. MDPI AG; 2018.
23. Zeisel SH, Warrier M. Trimethylamine *N*-Oxide, the Microbiome, and Heart and Kidney Disease. *Annu Rev Nutr*. 2017 Aug 21;37(1):157–81.
24. Barrea L, Annunziata G, Muscogiuri G, Di Somma C, Laudisio D, Maisto M, et al. Trimethylamine-N-oxide (TMAO) as novel potential biomarker of early predictors of metabolic syndrome. *Nutrients*. 2018 Dec 13;10(12).
25. Cho CE, Caudill MA. Review: Trimethylamine-N-Oxide: Friend, Foe, or Simply Caught in the Cross-Fire? *Trends Endocrinol Metab*. 2016;
26. Canyelles M, Tondo M, Cedó L, Farràs M, Escolà-Gil JC, Blanco-Vaca F. Trimethylamine N-oxide: A link among diet, gut microbiota, gene regulation of liver and intestine cholesterol homeostasis and HDL function. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2018.
27. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Jun;41(6):1313–21.
28. Chong J, Xia J. *MetaboAnalystR*: an R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data.
29. Pang Z, Chong J, Li S, Xia J. *MetaboAnalystR 3.0*: Toward an Optimized Workflow for Global Metabolomics. *Metabolites*. 2020 May 7;10(5):186.
30. Seravalle G, Grassi G. Obesity and hypertension. *Pharmacol Res*. 2017;122:1–7.
31. Cabré N, Luciano-Mateo F, Fernández-Arroyo S, Baiges-Gayà G, Hernández-Aguilera A, Fibla M, et al. Laparoscopic sleeve gastrectomy reverses non-alcoholic fatty liver disease modulating oxidative stress and inflammation. *Metabolism*. 2019 Oct 1;99:81–9.
32. Riera-Borrull M, García-Heredia A, Fernández-Arroyo S, Hernández-Aguilera A, Cabré N, Cuyàs E, et al. Metformin potentiates the benefits of dietary restraint: A metabolomic study. *Int J Mol Sci*. 2017 Nov 1;18(11).
33. Polsky S, Ellis SL. Obesity, insulin resistance, and type 1 diabetes mellitus. Vol. 22, *Current*

- Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity. Lippincott Williams and Wilkins; 2015. p. 277–82.
34. Chen W, Balland E, Cowley MA. Hypothalamic Insulin Resistance in Obesity: Effects on Glucose Homeostasis. Vol. 104, Neuroendocrinology. S. Karger AG; 2017. p. 364–81.
 35. Gustafson B, Hedjazifar S, Gogg S, Hammarstedt A, Smith U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. Vol. 26, Trends in Endocrinology and Metabolism. Elsevier Inc.; 2015. p. 193–200.
 36. Vekic J, Zeljkovic A, Stefanovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V. Obesity and dyslipidemia. Vol. 92, Metabolism: Clinical and Experimental. W.B. Saunders; 2019. p. 71–81.
 37. Klop B, Elte JWF, Cabezas MC. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. Vol. 5, Nutrients. MDPI AG; 2013. p. 1218–40.
 38. García Martín M, Zurita Molina A. Transaminasas: Valoración y significación clínica. Hosp Univ Virgen Macarena. 1998;267–75.
 39. Del Campo JA, Gallego P, Grande L. Role of inflammatory response in liver diseases: Therapeutic strategies. Vol. 10, World Journal of Hepatology. Baishideng Publishing Group Co; 2018. p. 1–7.
 40. Aragonès G, Colom-Pellicer M, Aguilar C, Guiu-Jurado E, Martínez S, Sabench F, et al. Circulating microbiota-derived metabolites: a “liquid biopsy? Int J Obes. 2020 Apr 1;44(4):875–85.
 41. Chen YM, Liu Y, Zhou RF, Chen XL, Wang C, Tan XY, et al. Associations of gut-flora-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide, betaine and choline with non-alcoholic fatty liver disease in adults. Sci Rep. 2016 Jan 8;6(1):1–9.
 42. Gérard P. Gut microbiota and obesity. Vol. 73, Cellular and Molecular Life Sciences. Birkhauser Verlag AG; 2016. p. 147–62.
 43. Isolauri E. Microbiota and Obesity. In: Nestle Nutrition Institute Workshop Series. S. Karger AG; 2017. p. 95–105.
 44. Via M. The Malnutrition of Obesity: Micronutrient Deficiencies That Promote Diabetes. Int Sch Res Netw ISRN Endocrinol. 2012;2012.

45. Schugar RC, Shih DM, Warriar M, Helsley RN, Burrows A, Ferguson D, et al. The TMAO-Producing Enzyme Flavin-Containing Monooxygenase 3 Regulates Obesity and the Being of White Adipose Tissue. *Cell Rep.* 2017 Jun 20;19(12):2451–61.
46. Aron-Wisnewsky J, Doré J, Clement K. The importance of the gut microbiota after bariatric surgery. Vol. 9, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group; 2012. p. 590–8.
47. Arsik I, Frediani J, Frezza D, Chen W, Ayer T, Keskinocak P, et al. Alanine Aminotransferase as a Monitoring Biomarker in Children with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Secondary Analysis Using TONIC Trial Data. *Children.* 2018 May 25;5(6):64.
48. Povsic M, Wong OY, Perry R, Bottomley J. A Structured Literature Review of the Epidemiology and Disease Burden of Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Adv Ther.* 2019 Jul 7;36(7):1574–94.
49. Sookoian S, Puri P, Castaño GO, Scian R, Mirshahi F, Sanyal AJ, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with a state of betaine-insufficiency. *Liver Int.* 2017 Apr 1;37(4):611–9.
50. Tan X, Liu Y, Long J, Chen S, Liao G, Wu S, et al. Trimethylamine N-Oxide Aggravates Liver Steatosis through Modulation of Bile Acid Metabolism and Inhibition of Farnesoid X Receptor Signaling in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Mol Nutr Food Res.* 2019 Sep 1;63(17).
51. Zhao ZH, Xin FZ, Zhou D, Xue YQ, Liu XL, Yang RX, et al. Trimethylamine N-oxide attenuates high-fat high-cholesterol diet-induced steatohepatitis by reducing hepatic cholesterol overload in rats. *World J Gastroenterol.* 2019 May 28;25(20):2450–62.
52. Sherriff JL, O'Sullivan TA, Properzi C, Oddo J-L, Adams LA. Choline, Its Potential Role in Nonalcoholic Fatty Liver Disease, and the Case for Human and Bacterial Genes. *Adv Nutr.* 2016 Jan 1;7(1):5–13.
53. Chiang DJ, Pritchard MT, Nagy LE. Obesity, diabetes mellitus, and liver fibrosis. Vol. 300, *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol; 2011.

10. AUTOAVALUACIÓ

A títol personal, crec que gràcies aquest treball he pogut aprendre en molts aspectes diferents de la ciència. He pogut profunditzar sobre les tècniques de laboratori necessàries per tal de poder obtenir els resultats per poder comprovar les meves hipòtesis, però també m'ha permès familiaritzar-me amb aspectes de la ciència més rutinaris, com les cerques bibliogràfiques. Tot això ha reforçat tots aquells coneixements teòrics que he anat aprenent durant el grau.

Personalment l'estada de pràctiques, en les que s'emmarca aquest treball, m'han permès desenvolupar-me com a científic en aspectes més tècnics però també en aspectes més personals i professionals. He pogut observar una progressió des de l'inici de les pràctiques fins a la finalització d'aquest treball on es destaquen els coneixements associats a la redacció d'un projecte com aquest. A més aquest projecte m'ha donat la oportunitat d'aprofundir en malalties que afecten a una gran part de la població mundial i formar-me en altres àrees del coneixement de la salut humana.

Gràcies a l'equip de recerca de la Unitat de Recerca Biomèdica he pogut aprendre quin és el funcionament intern d'un equip i m'ha permès acostar-me al món laboral. També en destaco les competències adquirides com el treball en equip, l'organització del treball i la disciplina que s'ha de tenir en un ambient de treball professional.