



**UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI**



IISPV
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI

LA GASTRECTOMIA VERTICAL RESTABLEIX EL PROTEOMA PLASMÀTIC DELS PACIENTS AMB OBESITAT

Estudi del perfil proteòmic de plasma i dels teixits adiposos

Núria Mimbrero Pelegrí

TREBALL FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA

Tutor acadèmic: Dr. Santiago García Vallvé, biotecnologia, departament de
Bioquímica i Biotecnologia

En cooperació amb: Institut de Investigació Sanitària Pere Virgili, Unitat de
Recerca Biomèdica

Supervisors: Helena Castañé Vilafranca, helena.castane@iispv.cat i Prof. Jorge
Joven Maried, jorge.joven@urv.cat

Data de convocatòria: juny 2022

Jo, Núria Mimbrero Pelegrí , amb DNI 39943377J, 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/vidacampus/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.

Tarragona, 1 de juny de 2022

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'nat' with a vertical line extending downwards from the end.

ÍNDEX

| | |
|---|----|
| ABREVIACIONS | 6 |
| DADES DEL CENTRE | 8 |
| RESUM | 8 |
| INTRODUCCIÓ..... | 9 |
| 1. OBESITAT | 9 |
| 1.1. Causes | 10 |
| 1.2. Prevalença: un problema en augment..... | 11 |
| 2. TRACTAMENT DE L'OBESITAT: CIRURGIA BARIÀTRICA | 12 |
| 3. MALALTIES CONCOMITANTS: COMORBIDITATS DE L'OBESITAT | 14 |
| 3.1. Resistència a la insulina (RI) i diabetis mellitus tipus 2 (T2DM) | 14 |
| 3.2. Malalties cardiovascular (CVD) i hipertensió arterial (HTA)..... | 15 |
| 3.3. Dislipèmia (DLP) | 16 |
| 3.4. Malaltia del fetge gras no alcohòlic (NAFLD) i esteatohepatitis no alcohòlica (NASH) | 16 |
| 3.5. Càncer | 17 |
| 3.6. Trastorns de son - apnea de la son (OSA) | 17 |
| 3.7. Trastorns de depressió i ansietat..... | 17 |
| 3.8. Infertilitat i síndrome de l'ovari poliquístic (SOP)..... | 18 |
| 4. PROTEÒMICA..... | 18 |
| 4.1. Tècniques proteòmiques..... | 19 |
| 4.2. Proteòmica translacional | 23 |
| HIPÒTESI DEL TREBALL I OBJECTIUS | 24 |
| METODOLOGIA..... | 25 |
| 1. DISSENY DE L'ESTUDI..... | 25 |
| 2. OBTENCIÓ DE LES MOSTRES..... | 26 |
| 3. CARACTERÍSTIQUES BIOQUÍMIQUES..... | 26 |
| 4. ANÀLISI HISTOLÒGICA | 27 |
| 5. PROTEÒMICA..... | 27 |
| 6. ESTADÍSTICA..... | 29 |
| RESULTATS | 30 |
| 1. CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques I BIOQUÍMIQUES DE LA POBLACIÓ..... | 30 |
| 2. SIGNATURA PROTEÒMICA DELS TEIXITS ADIPOSOS EN L'OBESITAT | 32 |

| | |
|--|----|
| 3. EFECTE DE L'OBESITAT EN LA PROTEÒMICA PLASMÀTIC..... | 35 |
| 4. EFECTE DE LA CIRURGIA BARIÀTRICA EN PROTEOMA PLASMÀTIC | 37 |
| 4.1. Comparativa entre pacients amb obesitat pre i post cirurgia bariàtrica..... | 37 |
| 4.2. Comparativa entre pacients control i postcirurgia bariàtrica..... | 38 |
| 5. GLOBALMENT | 40 |
| DISCUSSIÓ | 41 |
| CONCLUSIONS | 46 |
| BIBLIOGRAFIA | 47 |
| AUTOAVALUACIÓ | 54 |
| AGRAÏMENTS | 54 |
| ANNEXOS | 55 |
| Annex 1. Anàlisis proteòmics per mostres tissulars i plasmàtiques | 55 |
| Taula S1. Proteïnes identificades i destacades en les comparatives entre els teixits adiposos visceral i subcutani durant l'obesitat (ordenades alfabèticament)..... | 61 |
| Taula S2. Proteïnes identificades i destacades en les comparatives de plasma dels grups d'estudi (ordenades alfabèticament)..... | 62 |
| Annex 2. Fitxa de seguiment del tutor del TFG..... | 63 |

ABREVIACIONS

| | |
|---------|---|
| ALT | Alanina aminotransferasa |
| AST | Aspartat aminotransferasa |
| BPD | <i>Bilopancreatic diversion</i> |
| CB | Cirurgia bariàtrica |
| CPAP | Pressió positiva continua en la via aèria |
| CVD | Malalties cardiovascular |
| DLP | Dislipèmia |
| FC | <i>Fold change</i> |
| FDR | <i>False discovery rate</i> |
| FFA | Àcids grassos lliures |
| GB | <i>Gastric banding</i> |
| GGT | Gamma glutamil transpeptidasa |
| HDL | Lipoproteïnes d'alta densitat |
| HOMA-IR | Model homeostàtic de resistència a la insulina |
| HTA | Hipertensió arterial |
| IMC | Índex de massa corporal |
| LDL | Lipoproteïnes de baixa densitat |
| MS | Espectrometria de masses |
| MS/MS | Espectrometria de masses en tàndem |
| NAFLD | Malaltia del fetge gras no alcohòlic |
| NASH | Esteatohepatitis no alcohòlica |
| OMS | Organització mundial de la salut |
| OSA | Apnea de la son |
| PCA | <i>Principal component analysis</i> |
| PLS-DA | <i>Partial least square – discriminant analysis</i> |
| RI | Resistència a la insulina |
| RYGB | <i>Roux-en-Y gastric bypass</i> |
| SG | <i>Sleeve gastrectomy</i> o gastrectomia vertical |
| SM | Síndrome metabòlica |
| SOP | Síndrome de l'ovari poliquístic |
| T2DM | Diabetis tipus 2 |
| TAS | Teixit adipós subcutani |

| | |
|------|--|
| TAV | Teixit adipós visceral |
| TG | Triglicèrids |
| VIP | Importància de les variables en la projecció |
| VLDL | Lipoproteïnes de molt baixa densitat |

DADES DEL CENTRE

El treball està vinculat a les pràctiques externes realitzades a la Unitat de Recerca Biomèdica (URB) del Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV). És un grup d'investigació creat l'any 1990 i situat a l'antic Hospital Universitari Sant Joan de Reus. La unitat està dirigida pel Prof. Jorge Joven i el Dr. Jordi Camps.

L'àrea de recerca de la URB és nutrició i metabolisme. De manera que, els projectes actuals s'enfoquen en l'estudi de la relació entre el metabolisme, l'oxidació i la inflamació amb malalties no transmissibles, especialment l'obesitat mòrbida, malalties hepàtiques, cardiovasculars i càncer. En definitiva, s'usen tècniques de biologia molecular i determinacions multiòmiques per estudiar el paper dels marcadors en la inflamació i l'oxidació, i la naturalesa i l'origen dels trastorns metabòlics.

RESUM

Context: L'obesitat és una malaltia que constitueix un problema de salut mundial per la seva creixent prevalença i les malalties associades, perquè disminueixen l'esperança de vida dels pacients. L'únic tractament eficaç per a l'obesitat severa és la cirurgia bariàtrica, que mostra millores clíniques com la remissió de comorbiditats. El desenvolupament d'obesitat i l'efecte de la cirurgia bariàtrica són processos complexos que, per ser estudiats, requereixen tècniques d'alt rendiment com l'ús de ciències òmiques. La proteòmica permeten examinar els mecanismes implicats en aquests successos biològics.

Objectius: Estudiar el perfil proteic dels teixits adiposos per determinar si varien segons la seva localització en l'obesitat i avaluar si hi ha modificacions en el proteoma plasmàtic causades per l'obesitat i la cirurgia bariàtrica.

Metodologia: Es van obtenir mostres de plasma de pacients sotmesos a cirurgia bariàtrica (n=40), de pacients dotze mesos postintervenció (n=20) i de voluntaris sans no obesos (n=20). Addicionalment, es van recollir biòpsies de teixit adipós visceral i subcutani de pacients amb obesitat (n=18). Les mostres es van emprar per determinar els paràmetres bioquímics, per fer estudis histològics i anàlisis proteòmics.

Resultats: Les característiques clíniques i bioquímiques eren diferents entre els grups d'estudi. El proteoma dels teixits adiposos en l'obesitat depenia de la seva localització. L'obesitat alterava el proteoma plasmàtic en els pacients precirurgia respecte dels voluntaris sans. La cirurgia bariàtrica modificava al perfil proteòmic plasmàtic dels

pacients postcirurgia, alterant i el restablint la concentració de proteïnes com la C reactiva i l'apolipoproteïna A-IV, involucrades en la resposta inflamatòria i la regulació de la ingesta de menjar.

Conclusió: Els pacients amb obesitat presentaven alteracions en el proteoma de plasma i perfils proteòmics diferents en funció del tipus de teixit. Addicionalment, la cirurgia bariàtrica restablí part del proteoma en plasma, especialment el d'aquelles proteïnes involucrades en processos inflamatoris i reguladors de la ingesta.

INTRODUCCIÓ

1. OBESITAT

L'Organització Mundial de la Salut (OMS) defineix el sobrepès i l'obesitat com l'acumulació anormal o excessiva de greix, regional, global o totes dues, que pot posar en risc la salut (WHO 2021).

L'índex de massa corporal (IMC), que es calcula dividint el pes entre el quadrat de l'alçada, i la ràtio de cintura-maluc s'usen per delimitar diferents estadis d'aquesta condició mèdica (WHO 2021). En adults, un IMC entre 18,5 i 24,9 correspon a un estat de pes saludable, mentre que si aquest valor se situa entre 25 i 29,9 es considera sobrepès, i entre 30 o més, obesitat. Addicionalment, l'obesitat es subdivideix en tres classes segons el grau de massa corporal, sent la categoria de grau III la més severa, també anomenada obesitat mòrbida ($IMC \geq 40$) (Williams *et al.* 2015) (figura 1). Paral·lelament, un perímetre de cintura de més de 102 cm en homes i 88 cm en dones es consideren signes d'obesitat (Luppino *et al.* 2010). Per a l'avaluació en nens s'ha de tenir en compte l'edat, hi ha una distinció entre menors de 5 i entre 5 i 19 anys, i s'estableixen gràfics i taules específiques que descriuen patrons de creixement de cada col·lectiu, emprats com a guia de referència per especificar l'obesitat i el sobrepès (WHO 2021).

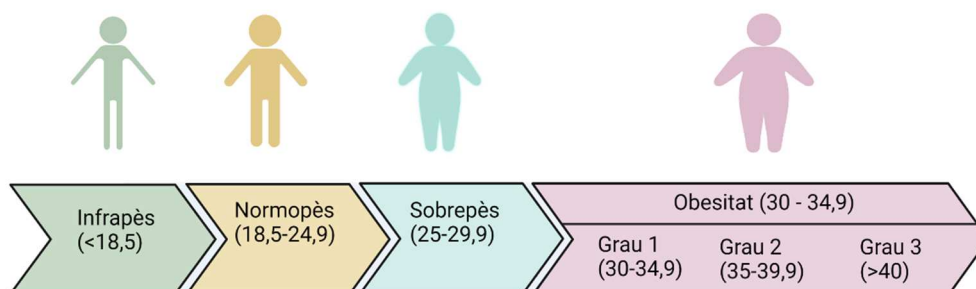


Figura 1. Índex de massa corporal

L'obesitat indueix a la remodelació del teixit adipós, que s'expandeix per acomodar l'excessiva entrada de calories, fet que canvia notablement l'estructura i composició cel·lular dels adipòcits. L'increment del teixit adipós és, per tant, la principal característica de l'obesitat. Tanmateix, no només és important la quantitat de teixit, sinó que la seva distribució també té un paper essencial en la salut del pacient. És per això que aquest teixit es pot classificar en funció de la seva localització, en teixit adipós subcutani o parietal (TAS) i teixit adipós visceral (TAV). El TAS es localitza sota la pell i constitueix el primer lloc d'acumulació de greix. Quan en aquesta zona ja no hi ha disponibilitat de suportar més inputs d'energia, el greix es distribueix en localitzacions ectòpiques com entre òrgans, en aquests casos s'anomena TAV (Longo *et al.* 2019). L'increment de TAV es relaciona amb un major risc de mortalitat. Per tant, en aquests casos és quan té especial rellevància el perímetre de cintura-maluc, donant així una idea de la salut del pacient i de la possibilitat d'una mort prematura (Cameron *et al.* 2013).

1.1. Causes

En el desenvolupament de l'obesitat hi intervenen diversos factors. Per una banda, s'ha demostrat que algunes alteracions genètiques, basades en mutacions de pèrdua de funció de gens, s'han vist associades amb el desenvolupament de l'obesitat severa. L'obesitat severa pot ser resultat de defectes en la via de les leptines-melanocortines ja que la leptina és una hormona derivada dels adipòcits que té la funció de regular la gana segons les necessitats energètiques de l'organisme, una deficiència en aquesta via pot conduir a l'augment de la ingesta i conseqüentment, a un augment de massa greixosa. Alguns gens implicats en aquesta via, la desregulació dels quals poden donar lloc a obesitat són la leptina, el receptor de la leptina, la pro-opiomelanocortina, la prohormona convertasa 1 i el receptor de la melanocortina 4 (Niazi *et. al.* 2019). Tot i això, les alteracions genètiques de l'obesitat són trastorns rars (menor a l'1% de freqüència al·lèlica) que afecten un baix nombre de les persones amb obesitat severa, és per això que les causes principals que donen es centren en altres factors que poden influenciar el balanç positiu d'energia. El guany de pes resulta de la combinació de l'increment de l'energia consumida, baixa activitat física i despesa energètica reduïda (figura 2) (Blüher 2019).

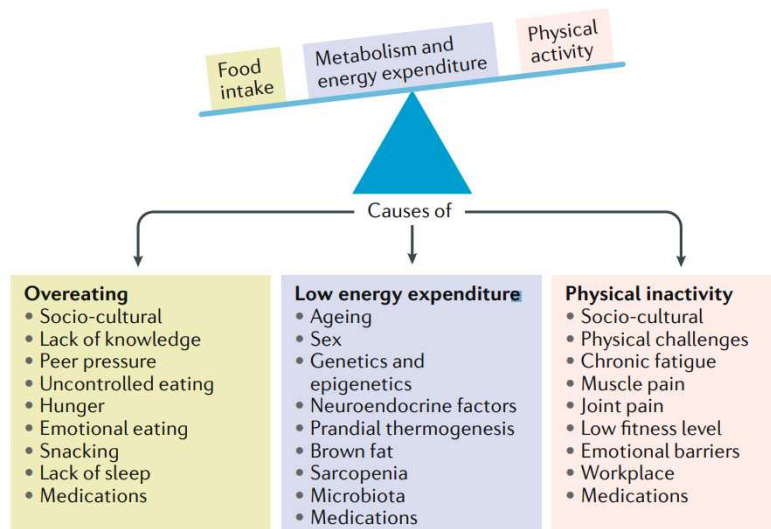


Figura 2. Factors que contribueixen al balanç positiu d'energia i, en conseqüència, a l'obesitat.

Font: Blüher et al. Nat Rev Endocrinol (2019)

1.2. Prevalença: un problema en augment

La prevalença arreu del món de l'obesitat ha incrementat significativament durant els últims anys, sent actualment considerada una epidèmia per l'OMS. Gairebé un terç de la població mundial té sobrepès o obesitat (Chooi *et al.* 2019). Globalment, l'any 2015 es va estimar que hi havia un total d'1,9 mil milions d'adults amb sobrepès i 609 milions d'adults amb obesitat, representant el 39% de la població mundial (figura 3). Les tendències en nens i adolescents són particularment rellevants per a la predicció del nivell d'obesitat que podria afectar a la població futura. En nens de menys de 5 anys, uns 38,2 milions tenien obesitat o sobrepès al 2019, mentre que en nens d'entre 5 i 19 anys, uns 340 milions al 2016. La ràtio de creixement és alarmant, entre nens de 5 i 19 anys, ha augmentat des d'un 4% al 1975 fins a un 18% al 2016 (WHO 2021).

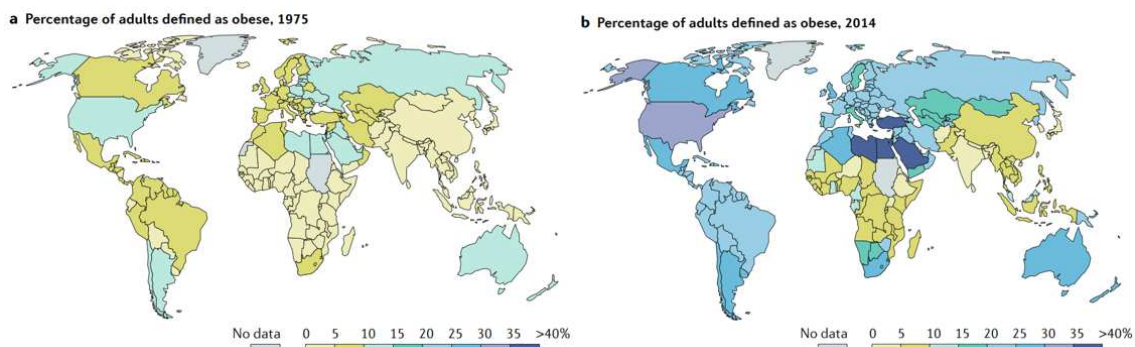


Figura 3. Increment de la prevalença d'obesitat sobre el temps. Percentatge d'adults amb obesitat per país al 1975 (a) i al 2014 (b).

Font: Blüher et al. Nat Rev Endocrinol (2019)

L'any 2015, el nombre de persones amb sobrepès era menor en dones que en homes entre els adults joves (entre 20 i 44 anys), però aquesta tendència es reverteix a partir dels 45-49 anys, coincidint amb l'etapa menopàusica de les dones. Alternativament, la prevalença d'obesitat és generalment més alta en dones que en homes, en totes les edats, sent entre 50 i 65 anys quan la diferència entre sexes és màxima (figura 4) (Chooi *et al.* 2019).

Les ràtios d'ambdues condicions (sobrepès i obesitat) s'incrementen a partir dels 20 anys, assolint el seu pic màxim entre les edats de 50 i 65 anys i declinant després (figura 4) (Chooi *et al.* 2019).

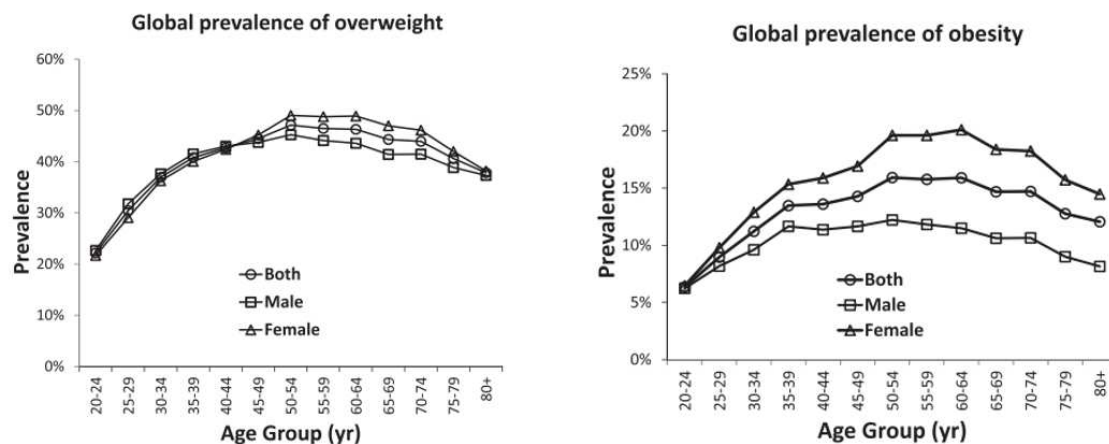


Figura 4. Prevalença global de sobrepès i obesitat en adults majors a 20 anys per grup d'edat i sexe.

Font: Chooi et al. Metabolism (2019).

2. TRACTAMENT DE L'OBESITAT: CIRURGIA BARIÀTRICA

La cirurgia bariàtrica (CB) és el tractament més eficaç contra l'obesitat severa. Es defineix com una intervenció quirúrgica que té per objectiu reduir l'IMC mitjançant la restricció en la ingesta d'elevades quantitats de menjar o causant una restricció en l'absorció de nutrients, o totes dues. Hi ha diferents tipus de cirurgia bariàtrica, es realitzen depenent del pacient i les seves característiques clíniques (figura 5) (le Roux & Heneghan 2018).

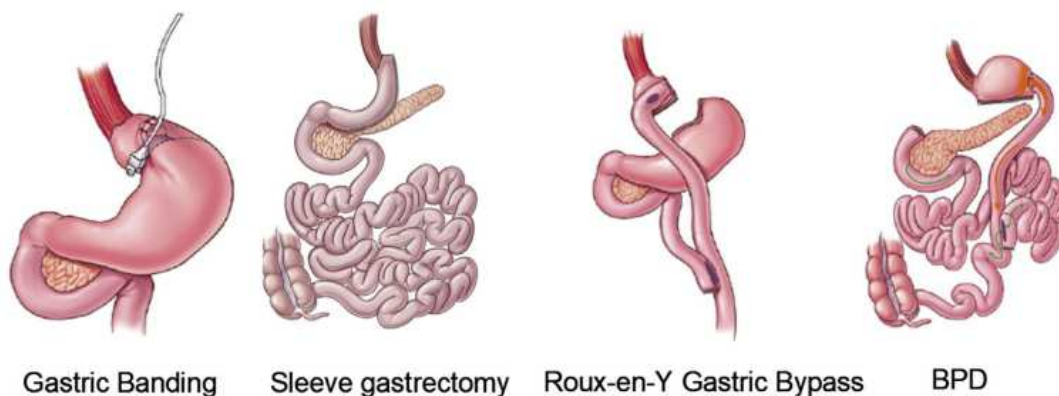


Figura 5. Procediments bariàtrics: *Gastric Banding* (GB), *Sleeve Gastrectomy* (SG), *Roux-en-Y Gastric Bypass* (RYGB) i *Bilopancreatic Diversion* (BPD)

Font: Roux et al. Med Clin North Am. (2018)

Les dues cirurgies bariàtriques més comunament realitzades són la *Sleeve gastrectomy* i la *Roux-en-Y gàstric bypass* (figura 6) (Evers *et al.* 2017).

El *Roux-en-Y bypass* (RYGB) és el tractament bariàtric *gold-standard*, i és un procediment de restricció i mala absorció. L'estómac proximal es separa de l'estómac distal per formar una petita bossa gàstrica restrictiva. La bossa gàstrica es connecta al jejú mitjà, el qual s'ha desviat de les secrecions pancreàtiques de la vesícula biliar. Aquest procediment té certs avantatges com la restricció en l'absorció dels aliments, canvis hormonals favorables i l'estimulació de la reducció de pes. Tot i això, és una cirurgia bastant complexa que podria comportar deficiències en algunes vitamines i minerals al llarg del temps (Padwal *et al.* 2011). Redueix la mida de l'estómac i redirigeix el flux de nutrients (Evers *et al.* 2017).

Sleeve gastrectomy (SG) consisteix en la resecció de la curvatura major i fonda de l'estómac, deixant l'estómac remetent i en forma de tub allargat. L'eliminació d'aquesta part disminueix els nivells de grelina, la principal hormona reductora de la fam. Aquest procediment bariàtric, relativament nou, és un dels més utilitzats actualment, ja que implica canvis favorables en el metabolisme, donant la capacitat de revertir patologies severes que afecten el fetge (Padwal *et al.* 2011). Es considera un procediment restrictiu perquè elimina aproximadament el 80% de l'estómac, però no afecta significativament en l'absorció de nutrients (Evers *et al.* 2017).

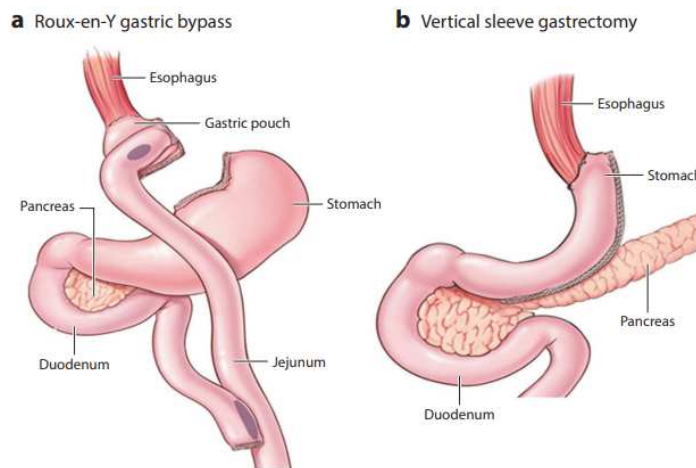


Figura 6. Representació de les dues cirurgies bariàtriques més comunes. a) *Roux-en-Y gastric bypass*. b) *Vertical sleeve gastrectomy*.

Font: Evers et al. *Annu Rev Physiol*. (2016)

3. MALALTIES CONCOMITANTS: COMORBIDITATS DE L'OBESITAT

La incidència i la prevalença de l'obesitat constitueix un perill per a la salut, a causa de les comorbiditats associades (Agha & Agha 2017). La síndrome metabòlica (SM) és un terme que defineix un estat en el qual coincideixen un conjunt de característiques clíniques que augmenten la probabilitat de patir diverses malalties. L'obesitat augmenta la probabilitat d'aparició de SM i, en conseqüència, les seves patologies derivades, algunes de les quals són diabetis tipus 2, hipertensió i dislipèmia (Samson & Garber 2014). Entre les malalties concomitants associades al sobrepès i a l'obesitat, es distingeixen aquelles dependents d'alteracions metabòliques associades a aquesta condició, com són entre d'altres la diabetis mellitus tipus 2, la dislipèmia, el fetge gras, la hipertensió arterial i les malalties cardiovasculars. Altres comorbiditats depenen de canvis físico-mecànics de l'excés de pes, com la hipoventilació, l'apnea de la son i osteoartrosi. En últim lloc, les condicions psicològiques com l'ansietat i la depressió són molt recurrents entre la població amb obesitat per la poca adaptació social i comprensió cap aquesta patologia (Agha & Agha 2017).

3.1. **Resistència a la insulina (RI) i diabetis mellitus tipus 2 (T2DM)**

L'increment de la prevalença de la T2DM s'ha vist relacionada amb l'augment de la incidència de l'obesitat. L'excés de massa corporal s'associa amb un increment del risc de desenvolupament de resistència a la insulina, un factor que augmenta la possibilitat de patir alteració de la tolerància a la glucosa i de T2DM (Maggio & Pi-Sunyer 2003). La RI és la incapacitat de respondre correctament a la secreció d'insulina per part de les

cèl·lules β de les illes pancreàtiques (cèl·lules encarregades d'alliberar insulina), conduint a una major producció d'aquesta hormona, provocant hiperinsulinèmia (Kahn *et al.* 2006). El teixit adipós modula el metabolisme mitjançant l'alliberament d'àcids grassos no esterificats, glicerol, hormones (incloses adiponectina i leptina) i citocines pro inflamàtores. En individus obesos, la producció de molts d'aquests compostos es troba alterada. A més de factors derivats dels adipòcits, s'augmenta l'alliberament del factor de necrosis tumoral α , d'interleuquina-6, de proteïna quimioattractora de monòcits i de productes addicionals de macròfags i altres cèl·lules que habiten en el teixit adipós, implicades en el procés de resistència a la insulina (Kahn *et al.* 2006). De manera que, involucra un conjunt de molècules que predisposen a un estat inflamatori i a complicacions metabòliques (Golay & Ybarra 2005).

Finalment, addicionalment a la RI, si aquesta s'acompanya de la disfunció de les cèl·lules β , resulta en una pèrdua del control dels nivells de glucosa en sang que pot donar lloc a T2DM (Kahn *et al.* 2006).

3.2. Malalties cardiovascular (CVD) i hipertensió arterial (HTA)

L'obesitat comporta múltiples efectes directes sobre el sistema cardiovascular, canvis hemodinàmics i alteracions en l'estructura i funció cardíaca i endotelial. L'excés de massa corporal, particularment l'obesitat severa, requereix un augment del volum sanguini total, del volum sistòlic i de la despesa cardíaca. Augmenta la demanda cardiovascular, causant dilatació i hipertròfia del ventricle esquerre i en alguns casos comporta la disfunció sistòlica i diastòlica (Lavie *et al.* 2009). Totes les variacions són conseqüència de l'adaptació cardiovascular a l'excés de massa corporal i a l'augment de les demandes metabòliques. Afecta l'estructura del miocardi i al rendiment del bombeig a causa de la substitució del miocardi per teixit adipós (miocardiopatia per obesitat) (Ren *et al.* 2021). Una gran quantitat de morts en la població mundial es poden atribuir als elevats índexs de massa corporal i a l'estil de vida sedentari, trets de risc significatius per a les malalties cardiovasculars (Ren *et al.* 2021).

La hipertensió és el terme que s'usa per descriure la pressió arterial major a 130/90 mmHG (tensió arterial sistòlica/diastòlica) en mesures no puntuals. Hi ha estudis epidemiològics que demostren una clara associació entre l'augment de la pressió arterial i l'increment de pes i s'ha observat que les persones amb obesitat tenen major probabilitat de patir hipertensió (Seravalle & Grassi 2017). El desenvolupament d'hipertensió en l'obesitat implica diferents mecanismes que sorgeixen de l'augment de greix corporal.

Factors com la RI, l'augment de l'activitat del sistema nerviós simpàtic, la pujada dels nivells d'hormones natriuètiques angiotensina II i l'aldosterona i d'adipocines (especialment leptina), l'increment en la reabsorció del sodi, l'alteració del sistema renal i canvis hemodinàmics, poden contribuir potencialment a l'aparició d'hipertensió (Hall *et al.* 2019; Mikhail *et al.* 1999). A més, l'obesitat prolongada sovint condueix al desenvolupament d'hipertensió resistent al tractament. Per tant, el pacient sovint requereix múltiples fàrmacs antihipertensius i un tractament concurrent de la dislipèmia, la resistència a la insulina, la diabetis i la inflamació (Hall *et al.* 2019).

3.3. Dislipèmia (DLP)

La dislipèmia descriu l'alteració de nivells de lípids i lipoproteïnes de la sang. La forma derivada de l'obesitat i de la RI s'anomena dislipèmia metabòlica (Lavie *et al.* 2009). Es caracteritza principalment per un augment en les concentracions de triglicèrids (TG) i àcids grassos lliures (FFA), acompanyat d'una disminució de colesterol de lipoproteïnes d'alta densitat (colesterol HDL) i nivells normals o augmentats de lipoproteïnes de baixa densitat (colesterol LDL). L'increment dels FFA en el fetge porta a l'acumulació de TG i a la síntesi de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) (Lavie *et al.* 2009; Vekic *et al.* 2019). La malaltia és un vincle significativament important entre l'obesitat i el desenvolupament de T2DM, CVD i certs tipus de càncer (Lavie *et al.* 2009).

3.4. Malaltia del fetge gras no alcohòlic (NAFLD) i esteatohepatitis no alcohòlica (NASH)

NAFLD és la malaltia hepàtica més prevalent al món. És multisistèmica, afecta tant a fetge com a òrgans extrahepàtics i a vies reguladores. Es caracteritza per una acumulació ectòpica de TG en el fetge i pot provocar en alguns casos inflamació i fibrosi de teixit hepàtic (Byrne & Targher 2015). El desenvolupament de NAFLD acostuma a anar acompanyat d'elevats nivells d'IMC. Durant l'obesitat, a causa del balanç energètic positiu, en el teixit adipós es produeix hiperplàsia i hipertròfia que resulta en disfuncions en el teixit. S'augmenta el nivell de FFA circulants i de les adipocines, provocant l'emmagatzematge de FFA en altres teixits com el múscul o el fetge (acumulació de greix ectòpic) (Adams *et al.* 2005). La patologia és progressiva, s'explica amb la hipòtesi del *hit* múltiple. S'inicia amb l'acumulació de greix al fetge, estadi designat amb el nom d'esteatohepatitis hepàtica (1r *hit*). Quan el fetge presenta una quantitat de greix superior o igual al 5%, es passa a considerar patogènic (2n *hit*). Finalment, en presència de dany cel·lular hepàtic i inflamació, es designa com a NASH (3r *hit*) (Buzzetti *et al.* 2016).

L'obesitat, el SM i la T2DM són condicions de salut fonamentals que instiguen el desenvolupament de NAFLD (Adams *et al.* 2005).

3.5. Càncer

L'obesitat augmenta el risc de desenvolupar diversos tipus diferents de càncer i s'associa amb un pitjor resultat clínic. S'han proposat diferents mecanismes que el promouen, específics de cada teixit. No obstant, la inflamació crònica associada a l'obesitat és el tema central, un esdeveniment que promou la progressió d'aquesta malaltia (Kolb *et al.* 2016). En persones amb alt IMC, a escala local, la inflamació i l'augment del nombre d'adipòcits produeixen l'alteració del teixit adipós. La pertorbació del teixit porta a la mort dels adipòcits i a inflamació crònica de baix grau. En alguns casos, la inflamació del teixit adipós dirigeix a la infiltració de cèl·lules immunitàries per remodelar l'ambient. Dins de l'ambient alterat poden succeir canvis pato fisiològics que poden conduir a l'aparició de càncer (Iyengar *et al.* 2016). A més, a escala sistèmica la SM, la DLP i la RI poden empitjorar el dany del teixit causant el creixement del tumor (Iyengar *et al.* 2016).

3.6. Trastorns de son - apnea de la son (OSA)

L'apnea obstructiva del son és una condició infra-diagnosticada caracteritzada per episodis recurrents d'obstrucció de les vies respiratòries superiors, que condueixen a la fragmentació i hipòxia intermitent durant el període de son. L'obesitat predisposa a l'OSA, i la seva prevalença està augmentant arreu del món a causa de l'epidèmia de l'obesitat (Drager *et al.* 2013). Estudis recents han demostrat que els marcadors del risc cardiovascular (incloent-hi l'activació simpàtica, la inflamació sistèmica i la disfunció endotelial) s'incrementen significativament en pacients obesos amb OSA en comparació a aquells sense OSA, evidenciant que l'OSA és un factor de risc emergent per a les conseqüències cardiometabòliques de l'obesitat. Hi ha proves consistents de models animals i estudis clínics que suggereixen que l'OSA augmenta la disfunció metabòlica, inflamatòria, autònoma, vascular i cardíaca de l'obesitat i exacerba la síndrome metabòlica (Drager *et al.* 2013).

3.7. Trastorns de depressió i ansietat

La incidència de la depressió i l'ansietat s'amplifica per l'obesitat. L'estat neuroimmune i els circuits neurals de control de l'estat d'ànim i emocional es troben influenciats per la disfunció metabòlica i vascular, inflamació, resistència a la insulina i leptina i la hipertensió (Fulton *et al.* 2022). Les conseqüències psiquiàtriques de l'obesitat provenen d'una dieta nutricional pobra, de la inflamació conduïda cap al cervell, dels circuits

d'intersecció neural que controlen l'estat d'ànim i el pes corporal i dels moduladors endocrins de l'estat d'ànim, entre d'altres. La dieta nutricional pobra basada en greixos té diferents efectes de comportament per culpa de l'estimulació de diverses classes de lípids que comporten la simptomatologia depressiva, a més, l'excés de sucre agreuja aquest estat. L'augment dels nivells circulants de citocines proinflamatòries, quimosines i molècules d'adhesió cel·lular com les prostaglandines resultat de l'expansió dels adipòcits i la disbiosis intestinal, indueix un estat de depressió i ansietat. Alteracions en els circuits d'intersecció neural que controlen l'estat d'ànim i el pes corporal també poden influenciar en l'aparició d'aquests trastorns. Finalment, hi ha diverses hormones endocrines que poden augmentar la incidència d'ansietat i depressió com el cortisol, insulina i leptina (Fulton *et al.* 2022).

3.8. Infertilitat i síndrome de l'ovari poliquístic (SOP)

L'obesitat és responsable d'un augment de risc d'infertilitat. L'impacte en la salut reproductiva es relaciona amb l'aparició de la síndrome de l'ovari poliquístic, una de les principals causes d'infertilitat en moltes dones amb IMC elevats. El SOP és una afectació endocrina resultada de trastorns hormonals, apareix per les anomalies produïdes en l'estat de SM com la RI, DLP i HTA, patologies derivades de l'obesitat (Cena *et al.* 2020).

4. PROTEÒMICA

Els successos biològics complexos generalment impliquen la interacció de gens, transcrits, proteïnes, metabòlits i lípids. El desenvolupament de les ciències òmiques (genòmica, proteòmica, transcriptòmica, i metabolòmica) pot revelar nous dominis en la complexitat dels sistemes biològics. En particular, la comprensió de malalties a partir d'aquestes estratègies obre la porta a identificar factors genètics, epigenètics i ambientals involucrats. La integració de totes les òmiques és una estratègia significativa per poder estudiar tots els factors moleculars de les cèl·lules, teixits o organismes complets en un moment determinat (Monti *et al.* 2019).

La proteòmica consisteix en l'estudi del proteoma d'un sistema. Les estratègies proteòmiques d'alt rendiment s'usen per quantificar proteïnes i localitzar i identificar modificacions postraduccionals i estudiar interaccions proteïna-proteïna, específicament relacionades amb condicions fisiològiques o patològiques particulars (Aslam *et al.* 2017). El proteoma de les cèl·lules és relativament complex i exhibeix un ampli rang dinàmic, és a dir, depèn de l'estat fisiològic com la pressió, pH, temperatura, de la dosi i de la

durada del tractament. Varia entre tipus cel·lulars, entre estadis del desenvolupament i entre cèl·lula sana i patològica (Monti *et al.* 2019). Aquesta ciència òmica té un paper fonamental en l'estudi dels sistemes biològics. En la figura 7, es mostra l'increment de l'ús de la proteòmica basada en els estudis publicats que empen tècniques òmiques.

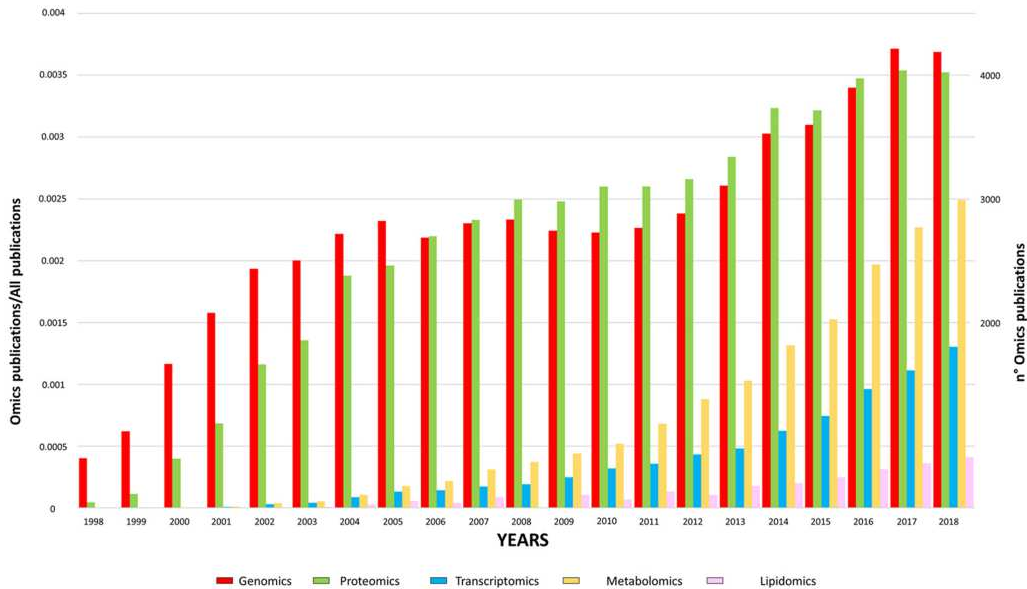


Figura 7. Representació gràfica dels estudis científics publicats cada any que usen tècniques òmiques.

Font: Monti et al. J Proteomics (2019)

4.1. Tècniques proteòmiques

Les anàlisis proteòmiques proveeixen la representació completa de la informació estructural i funcional de la cèl·lula en resposta a diferents situacions. Amb el suport de les tecnologies d'alta eficiència, es recull un enorme volum de dades proteòmiques. A més, s'estableixen bases de dades bioinformàtiques per poder manejar la informació i emmagatzemar-la (figura 8) (Aslam *et al.* 2017).

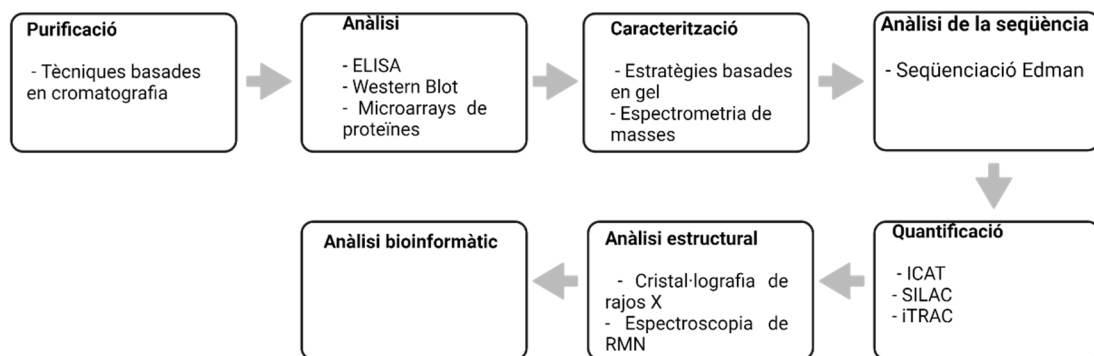


Figura 8. Visió general de les tècniques proteòmiques.

Adaptació de la font: Aslam et al. J Chromatogr Sci (2017)

4.1.1. Purificació

Les tècniques cromatogràfiques s'usen per separar i purificar proteïnes d'un complex biològic, existeixen diferents metodologies per fer-ho, basats en la càrrega de les proteïnes (cromatografia d'intercanvi iònic), en la mida molecular (cromatografia d'exclusió de mida) i en l'afinitat de la interacció amb diferents components (cromatografia d'afinitat) (Aslam *et al.* 2017; Neverova & Van Eyk 2005).

4.1.2. Anàlisi

Per a l'anàlisi es poden usar tècniques com l'ELISA (figura 10), el *Western Blot* (figura 11) i els *microarrays* de proteïnes (figura 9) (Aslam *et al.* 2017). L'ELISA permet detectar i quantificar proteïnes mitjançant la unió d'anticossos conjugats amb enzims que generen productes detectables per espectrofotometria (Aslam *et al.* 2017; De La Rica & Stevens 2012). Per altra banda, el *Western Blot* permet la identificació i semiquantificació de proteïnes mitjançant marcatge de proteïnes amb anticossos primaris i/o secundaris (AllScience 2019; Aslam *et al.* 2017). Finalment, els *microarrays* de proteïnes és una tecnologia d'alta eficiència usada per analitzar les interaccions i activitats de diverses proteïnes alhora, consta d'una superfície de suport al qual s'addiciona un *array* de captura de proteïnes (figura 9) (Aslam *et al.* 2017; Kaushansky *et al.* 2010).

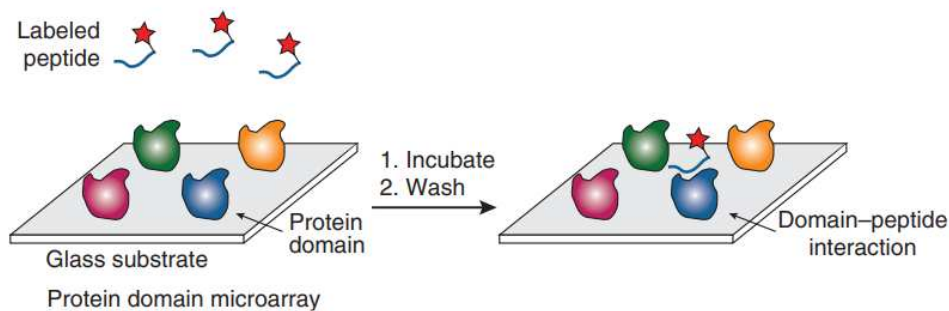


Figura 9. Microarrays de proteïnes

Font: Kaushansky A et al. Nat Protoc (2010)

4.1.3. Caracterització

Per a la caracterització, s'usen estratègies basades en gel i espectrometria de masses. Per separar proteïnes complexes en mostres s'usen gels d'electroforesis (figura 10) (Aslam *et al.* 2017; Viswanathan *et al.* 2006). Per altra banda, l'espectrometria de masses és una tècnica que permet determinar la distribució de les molècules d'una substància en funció de la seva massa (figura 11) (Aslam *et al.* 2017; Gingras *et al.* 2007).

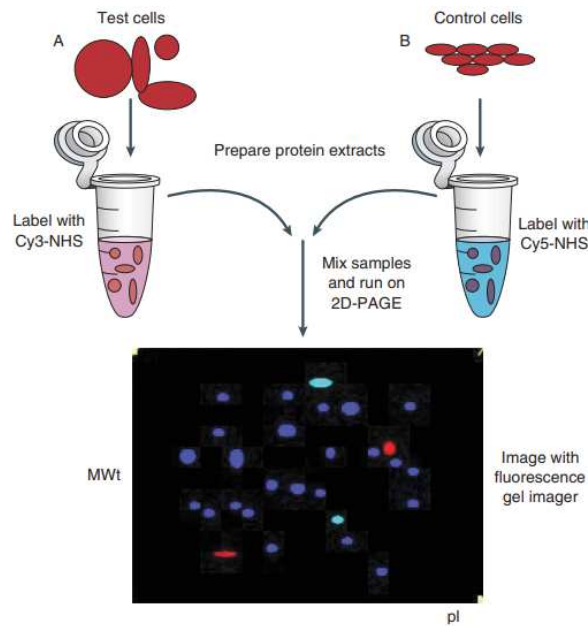


Figura 10. Anàlisi 2-D-DIGE (*two-dimensional differential gel electrophoresis*)

Font: Viswanathan S et al. Nat Protoc (2006)

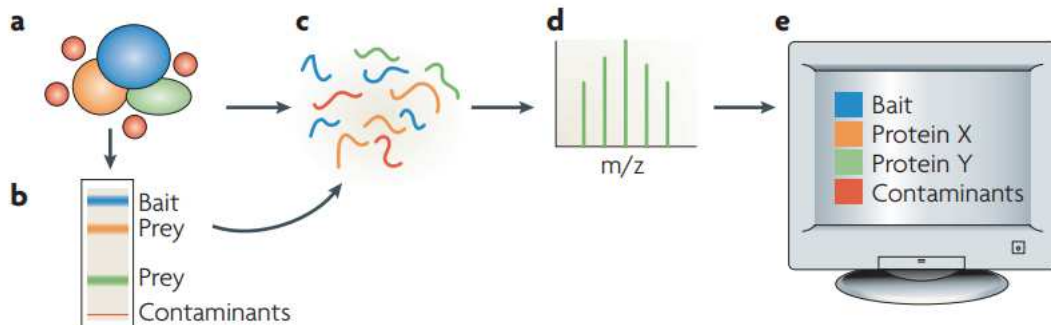


Figura 11. Espectrometria de masses. A. Purificació de la proteïna d'interès mitjançant lisi cel·lular; B. Pas opcional de separació de components amb SDS-PAGE; C. Proteòlisi; D. Espectrometria de masses; E. Interpretació dels resultats.

Font: Gingras AC et al. Nat Rev Mol Cell Biol (2007)

4.1.4. Anàlisi de la seqüència

La seqüenciació Edman és un mètode de determinació de la seqüència d'aminoàcids en una proteïna particular. El residu amino terminal s'etiqueta i es va separant del pèptid sense afectar les unions dels altres aminoàcids (figura 12) (Alfaro *et al.* 2021; Aslam *et al.* 2017).

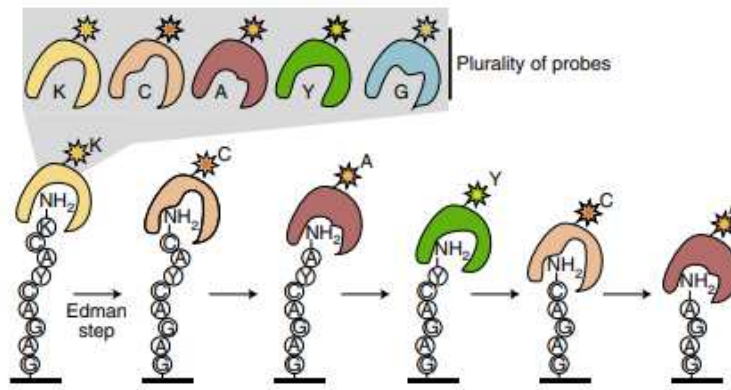


Figura 12. Seqüenciació Edman

Font: Alfaro JA et al. Nat Methods (2021)

4.1.5. Quantificació

ICAT, SILAC i ITRAQ són tècniques de quantificació de proteïnes basades en el marcatge d'isòtops estables. ICAT i ITRAQ realitzen la quantificació mitjançant el marcatge químic mentre que en SILAC es fa un marcatge metabòlic dels isòtops (Aslam *et al.* 2017; Harsha *et al.* 2008; Shiio & Aebersold 2006; Unwin 2010) (figura 16).

4.1.6. Anàlisi estructural

La cristal·lografia de rajos X i l'espectrometria de RMN són dues tècniques d'alta eficiència que proveeixen l'estructura de les proteïnes de forma tridimensional que és útil per entendre la seva funció biològica (Aslam *et al.* 2017; Gawas *et al.* 2019; Zia *et al.* 2019).

4.1.7. Anàlisi bioinformàtic

L'enorme volum de dades obtingudes a partir de les tecnologies d'alta eficiència usades en la proteòmica són analitzades a partir d'eines computacionals i analítiques. Les bases de dades bioinformàtiques s'estableixen per tractar i emmagatzemar les dades aconseguides. S'han desenvolupat diverses eines bioinformàtiques per predir l'estructura tridimensional de les proteïnes, per a l'anàlisi dels dominis i motius proteics, de les interaccions entre proteïnes i de les dades aconseguides amb MS (Aslam *et al.* 2017).

En conclusió, les múltiples tècniques proteòmiques en conjunt proveeixen la representació completa de la informació estructural i funcional de la cèl·lula així com dels mecanismes de resposta cel·lulars contra estrès i fàrmacs.

4.2. Proteòmica translacional

Una de les característiques principals del proteoma és que varia depenent de les condicions biològiques, el que proveeix estats de dinamisme cel·lulars, fent que no tot el genoma present en la cèl·lula s'expressi donant lloc a proteïnes funcionals. De manera que, l'estudi de les proteïnes específiques produïdes en diferents moments té efecte potencial important en el camp clínic (Aslam *et al.* 2017). L'estudi del proteoma cel·lular pot aportar informació sobre les vies de senyalització cel·lular i, per tant, generar noves dianes farmacològiques (He & Chiu 2003). D'altra banda, l'anàlisi de diversos fluids proximals humans com plasma, sèrum i orina, permet caracteritzar el comportament cel·lular mitjançant l'avaluació del perfil proteic i aportar possibles marcadors biològics sobre l'evolució de les malalties (Candiano *et al.* 2018; Hristova & Chan 2019; Peng *et al.* 2018).

Una aplicació translacional de la proteòmica en el càncer és la identificació de marcadors biològics per detectar els diferents subtipus moleculars de càncer de mama. Els diferents tipus de càncer de mama es defineixen per una combinació de característiques morfològiques, genòmiques i proteòmiques que fins a l'actualitat s'han de determinar mitjançant una biòpsia. La identificació de cada subtipus proporciona informació sobre pronòstic i tractament del càncer. Malauradament, a partir de la classificació actual, hi ha moltes pacients a les qui el tractament els resulta ineficient per resistència als medicaments, recurrència del càncer o fracàs de la teràpia. Per exemple el tractament del càncer es complica en presència d'heterogeneïtat clonal intratumoral, en aquests casos, es manté activa més d'una població de clons tumorals per assegurar la supervivència del tumor fins i tot en si un con mor en el tractament (figura 13). En conseqüència, un major coneixement de l'entorn proteic del tumor augmenta la possibilitat de l'ús d'un tractament eficient. En aquest camp, la proteòmica està facilitant el refinament del tipus de càncer de mama, la identificació de la possibilitat de recurrència i la probabilitat de resistència als medicaments, conduint a uns tractaments potencialment més efectius en aquesta malaltia (Mueller *et al.* 2018).

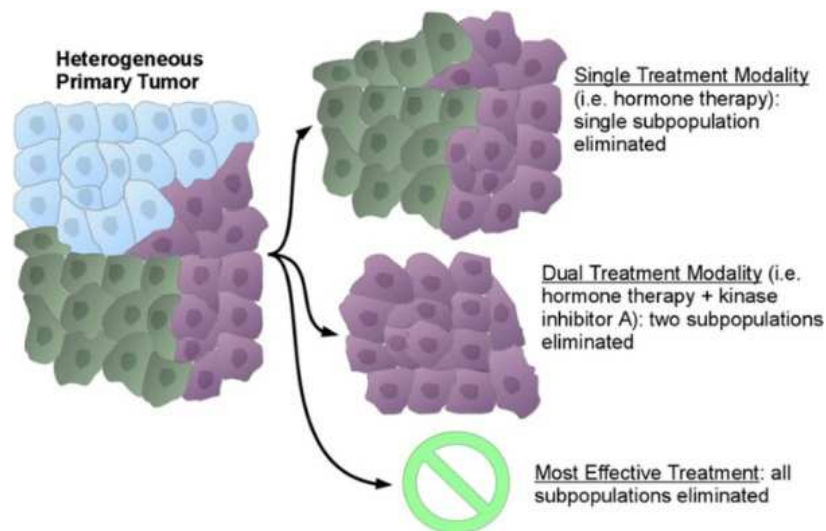


Figura 13. Heterogeneïtat intratumoral en càncer de mama. Els tumors de mama poden contenir subclons cel·lulars amb una varietat d'alteracions genòmiques i proteòmiques. La cooperació clonal i l'aparició de subclons durant el tractament influencien el fenotip biològic del tumor i la resistència al tractament. El tractament combinat per eliminar de forma simultània i seqüencial totes les poblacions clonals podria proporcionar una major eficàcia.

Font: Mueller C et al Expert Rev Proteomics (2018)

HIPÒTESI DEL TREBALL I OBJECTIUS

L'obesitat és una malaltia que afecta a nivell mundial per la seva alta prevalença i la seva creixent incidència. L'obesitat, per l'acumulació excessiva de greix i la possible acumulació ectòpica en altres òrgans, pot donar lloc a l'aparició de comorbiditats que empitjoren la qualitat de vida i fins i tot augmenten el risc de mort prematura del pacient, com la diabetis, malalties cardiovasculars, dislipèmia, esteatohepatitis no alcohòlica, càncer, trastorns de la son, ansietat i depressió i infertilitat.

Es creu que l'obesitat podria reprogramar metabòlicament tot l'organisme, i que aquests canvis podrien veure's reflectits en (1) el perfil proteòmic dels teixits adiposos segons la seva localització i el seu possible efecte en les característiques clíniques dels pacients, i (2) les proteïnes circulants en el plasma, per la qual cosa seria molt interessant poder esbrinar quins són aquests canvis i quin paper tenen en l'acumulació de greix i en la subseqüent aparició de comorbiditats. A més, quan els pacients amb obesitat mòrbida són intervinguts amb cirurgia bariàtrica, la majoria de comorbiditats associades desapareixen. Ens preguntem si la cirurgia bariàtrica també modifica les concentracions proteiques en plasma, restablint el proteoma, assimilant-lo als individus sans.

L'objectiu del nostre estudi és determinar si el perfil proteic dels teixits adiposos varia segons la seva localització i avaluar canvis en el proteoma plasmàtic relacionats amb l'obesitat i la cirurgia bariàtrica.

Tasques planificades:

- Determinar i quantificar el perfil proteòmic en mostres de teixit adipós subcutani i visceral de pacients amb obesitat severa.
- Comparar els diferents perfils proteics entre els teixits per trobar:
 - Canvis relacionats amb l'àrea dels adipòcits del teixit
 - Si existeix un perfil proteòmic específic dependent de la localització del teixit adipós.
- Determinar i quantificar el perfil proteòmic en mostres de plasma de controls sans i de pacients obesos abans i dotze mesos després de la cirurgia bariàtrica.
- Comparar els diferents perfils proteics plasmàtics per trobar:
 - Canvis relacionats amb l'obesitat: controls sans comparats amb pacients amb obesitat.
 - Canvis associats a la cirurgia bariàtrica: pacients obesos abans de la cirurgia comparats amb els mateixos pacients després de dotze mesos de la cirurgia.
 - Si en els pacients es restaura el perfil proteic: comparació de pacients obesos després de dotze mesos de la cirurgia amb controls sans.

METODOLOGIA

1. DISSENY DE L'ESTUDI

El nostre estudi inclou pacients amb obesitat severa (n=40) que es van sotmetre a gastrectomia vertical (SG) a 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 de 18 anys (majors d'edat), i es van excloure aquells pacients amb malalties infeccioses cròniques (com hepatitis vírica o Síndrome de la Immunodeficiència Adquirida) o amb consum actual o anterior d'alcohol (≥ 30 g en homes i ≥ 20 g en dones diaris). L'estudi és retrospectiu, es fan comparatives postoperatòries, és per això que es va fer un seguiment de 20 dels pacients amb obesitat 12 mesos després de la cirurgia bariàtrica (figura 14).

Per fer comparacions, vam utilitzar mostres de sang d'individus voluntaris sans (n=20) reclutats en la nostra àrea, que ens va facilitar el Banc de Mostres Biològiques de l'Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (Biobanc-IISPV).

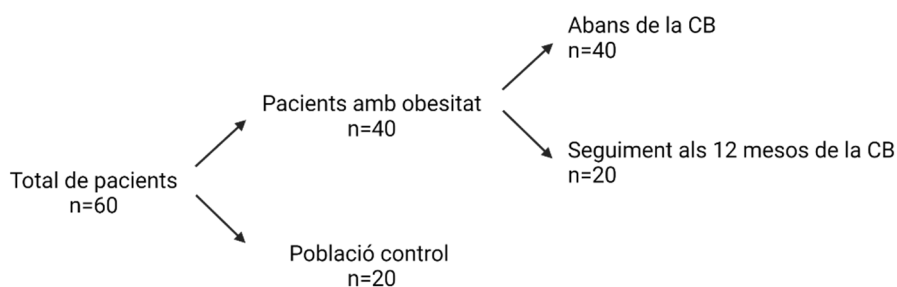


Figura 14. Representació esquemàtica del disseny d'estudi i de la distribució dels pacients

2. OBTENCIÓ DE LES MOSTRES

Es van obtenir 40 mostres de sang i 18 de teixit adipós subcutani i visceral de pacients amb obesitat mòrbida el dia de la intervenció. Dotze mesos després de la cirurgia, 20 dels pacients van accedir a acudir a hospital a proporcionar mostres de sang.

Les mostres de sang es van obtenir just abans de la cirurgia, es van recollir en tubs Vacutainer per a sèrum (amb gelosa) i per a plasma (amb EDTA) i es van centrifugar a 2500 rpm durant 15 minuts a 4°C per obtenir aquests espècimens. Les mostres es van aliquotar i emmagatzemar immediatament a -80 °C per futurs anàlisis.

El procediment quirúrgic es va dur a terme per laparoscòpia i sota anestèsia general, i en finalitzar el procés de resecció de l'estómac, es va procedir a l'obtenció de biòpsies de teixit: TAV de l'*omentum majus*, i TAS del teixit adipós situat just per sota del teixit connectiu de la pell de l'abdomen.

Una porció de la biòpsia es va emmagatzemar a -80 °C en diverses alíquotes per a futurs anàlisis, i l'altra porció es va fixar en formaldehid durant 24 hores, per a després incloure-la en parafina i elaborar anàlisis histològiques.

3. CARACTERÍSTIQUES BIOQUÍMIQUES

Mitjançant l'ús d'un analitzador automàtic (COBAS 8000, Roche Farma), es van determinar els paràmetres bioquímics: glucosa, insulina, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicèrids, transaminases (ALT, AST, GGT), hemoglobina, plaquetes, leucòcits i albúmina. Les mostres de sèrum o plasma van ser sotmeses a assajos quimioluminescents, immunoassajos o enzimàtics seguint procediments estàndards del

Laboratori de Referència del Camp de Tarragona i Terres de l'Ebre. Es va estimar la RI amb el model homeostàtic de resistència a la insulina (HOMA-IR) (Matthews *et al.* 1985).

4. ANÀLISI HISTOLÒGICA

Les mostres parafinades van ser tallades a 2 µm mitjançant el micròtom. Després, van ser subjectes a un procés de rehidratació a partir de diferents solucions amb concentracions variables d'etanol i xilol. Inicialment, es van introduir en solucions de xilol, seguidament en xilol-etanol en solucions decreixents en xilol i creixents en etanol i finalment en aigua destil·lada. Després de la deshidratació, es va realitzar la tinció Sirius Red. La tècnica de la tinció Sirius Red es basa en la tinció del col·lagen present en els talls histològics. El Sirius Red s'uneix específicament a les fibres de col·lagen donant una coloració vermella identificable i quantificable.

Mitjançant l'anàlisi histològic de les mostres de teixit adipós amb l'ús d'un microscopi connectat a una càmera Nikon Eclipse i de les mostres tenyides amb Sirius Red es van realitzar micrografies i es va determinar l'àrea dels adipòcits de les mostres mitjançant ImageJ (Schneider *et al.* 2012) i l'eina MRI Adipocyte Tool (Osman *et al.* 2013).

5. PROTEÒMICA

L'anàlisi proteòmic es va analitzar al centre Eurecat, Centre Òmic de Ciències. A continuació es troben descrites breument les diferents etapes que es van dur a terme. L'objectiu era validar el perfil proteic de mostres de plasma i teixit adipós subcutani i visceral usant nano cromatografia líquida acoblada a un espectròmetre de masses Orbitrap. En total, es van analitzar 18 mostres de TAV, 18 mostres de TAS) i 80 mostres de plasma (20 controls, 20 postcirurgia i 40 precirurgia).

L'anàlisi proteòmic de les mostres tant de teixit com de plasma es va basar en l'extracció i quantificació proteica; la digestió proteica i el marcatge peptídic; la separació cromatogràfica, l'anàlisi per espectrometria de masses i finalment la identificació i la quantificació proteica.

El procediment de l'anàlisi proteòmic es troba explicat detalladament en l'apartat d'annexos (annexos 1).

5.1. Anàlisi proteòmic per mostres tissulars

Inicialment, les mostres es van sotmetre a una lisi i homogeneïtzació en presència de tampó RIPA (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estats Units) en cicles de

congelació-descongelació amb nitrogen líquid. Seguidament, es van realitzar rondes de centrifugació i tractament mecànic amb sonicador. A continuació, es van precipitar les proteïnes del sobrenedant amb una solució de TCA/acetona i les proteïnes precipitades es van re suspendre en una solució d'urea/bicarbonat d'amoni. Finalment, es van quantificar amb el mètode Bradford. Seguidament, i prèviament a la digestió, les proteïnes es van dissoldre en una solució de ditiotretitol per a ser reduïdes i posteriorment en iodoacetamina per a ser alquilades.

Per a la digestió, les mostres es van incubar amb tripsina de grau de seqüenciació tota la nit. A continuació, es va parar la digestió mitjançant àcid fòrmic i es van dessalinitzar els pèptids en una columna Oasis HLB SPE (Waters, Massachusetts, USA) per a ser posteriorment marcats amb TMT 10-plex (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). A més, es va etiquetar un grup (pool) i es va incloure a cada lot de TMT. Finalment, es van dessalinitzar els lots en columnes Oasis HLB SPE (Waters, Massachusetts, USA).

A continuació, les mostres marcades es van fraccionar amb el mètode Off-gel (Tecnologia Agilent). Les fraccions es van separar per una columna de fase reversa de C18 (nanoLC EASY-II de Thermo Fisher). Seguidament, es va fer l'anàlisi d'espectrometria de masses (espectròmetre de masses LTQ-Orbitrap Velos Pro de Thermo Fisher).

Posteriorment, es va procedir a fer la identificació i quantificació proteica. Per a la identificació, la informació es va obtenir a partir del *software Proteome Discoverer versió.1.4.0.288* (Thermo Fisher). Totes les mostres del MS i MS/MS es van analitzar usant Mascot (Thermo Fisher versió 2.5). La quantificació proteica es va fer comparant les ràtios de cada marcatge TMT sobre el TMT-126 i els resultats de la quantificació es van normalitzar basant-se a la mediana de les proteïnes per poder avaluar l'increment o disminució de l'expressió de les proteïnes.

5.2. Anàlisi proteòmic per mostres de plasma

Per altra banda, en l'anàlisi proteòmic per mostres de plasma es va seguir el mateix procediment que per mostres de teixit amb dues petites variacions. La primera és que abans de l'anàlisi proteòmic es va fer una depleció de les 7 proteïnes plasmàtiques més abundants (albúmina, IgG, antitripsina, IgA, transferrina, haptoglobina i fibrinogen) per incrementar el nombre de proteïnes identificades/quantificades. La segona és que el marcatge peptídic es va fer amb TMT 11 plex.

6. ESTADÍSTICA

Per a les avaluacions estadístiques, els grups es van comparar utilitzant Rstudio amb la versió V4.0.5 del llenguatge i amb el paquet “Tableone” (Panos & Mavridis 2020). Les diferències entre grups es van considerar significatives si el valor $p < 0,05$. Mann-Whitney U es va utilitzar per comparar variables no paramètriques, la prova Wilcoxon per comparacions coincidents i taules de contingència i prova de chi quadrat per a variables categòriques. Les variables quantitatives es van expressar com a variables mitjanes (rang interquartil) i qualitatives com a n (%) del total de participants.

Es va utilitzar el Metaboanalyst 5.0 per generar diferents *scores* i *loading plots*. Les dades es van normalitzar mitjançant transformació logarítmica i els *missing values* es van estimar i imputar amb les medianes de la variable en concret. Les anàlisis univariants es feien servir com a mètode exploratori de les dades fent estudis d'una sola variable, consistien en generar diferents gràfiques basades en ràtios de concentració i p-valors. Es feien servir anàlisis de *Fold Change (FC)*, *t-test*, *Volcano plot* i *False Discovery Rate (FDR)* pels quals vam establir un llindar de $FC > 1,5$ i p-valor i $FDR < 0,05$. Per altra banda, s'empraven els següents anàlisis multivariants *Principal Component Analysis (PCA)* i el *Partial Least Square – Discriminant Analysis (PLS-DA)*. Addicionalment, s'usaven anàlisis d'agrupació, concretament *heatmaps* clusteritzats jeràrquicament. Finalment, es van fer anàlisis de xarxes de correlació (*Correlation Network*) utilitzant el paquet “qgraph” de R (Epskamp *et al.* 2012).

El PCA és un mètode no supervisat que s'utilitza per trobar les direccions que millor expliquin les variacions del conjunt de dades. Les dades es resumeixen en menys variables anomenades *scores* que són la mitjana ponderada de les variables originals. Els perfils de ponderació s'anomenen *loadings*. Contràriament, els PLS-DA són un mètode supervisat que utilitza tècniques de regressió multivariant per extreure informació que pugui predir la pertinença de cada variable mitjançant la combinació lineal de variables originals. A més, a partir del PLS-DA es generen VIP score (importància de variables en la projecció) per visualitzar les variables amb major capacitat de separació. Per tant, el PCA i el PLS-DA es van usar per reduir la dimensionalitat de les dades. Els *heatmaps* s'utilitzaven per determinar la concentració relativa de cada component de cada pacient i es va aplicar per visualitzar les concentracions relatives globals i les correlacions entre les variables. Per últim, l'anàlisi de xarxes de correlació grafica les relacions entre les variables contínues seleccionades, situant més a prop aquelles amb més correlació.

RESULTATS

En aquest estudi, es va dur a terme una anàlisi proteòmica per identificar i quantificar les concentracions de proteïnes en plasma en voluntaris sans no obesos i en pacients amb obesitat mòrbida (abans i després de la CB) per determinar variacions proteòmiques associades a l'obesitat i la CB. A més, es va fer una anàlisi proteòmica de mostres de TAV i TAS dels mateixos pacients amb obesitat severa per determinar la presència de canvis relacionats amb la mida dels adipòcits i atribuir un perfil proteòmic diferent en funció de la localització del teixit adipós.

1. CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques I BIOQUÍMIQUES DE LA POBLACIÓ

Fent una comparació de les característiques clíniques dels tres grups (controls sans, pacients obesos i pacients postcirurgia bariàtrica), la majoria dels resultats van ser els esperats. S'obtenien resultats similars en el sexe i l'edat, la majoria eren dones i la mitjana d'edat era entre els 40 i 50 anys. Les diferències més significatives van ser l'IMC i el perímetre de cintura, els pacients obesos tenien valors mitjans més alts en les dues variables, seguit dels pacients obesos intervinguts de CB feia dotze mesos i finalment els controls sans. Addicionalment, es va veure un increment lleuger en la pressió arterial sistòlica en els pacients obesos i post CB en comparació amb els no obesos.

L'aparició de malalties com TD2M, DLP, hipotiroïdisme, NASH, trastorns de la son, depressió i ansietat, era considerablement major en pacients obesos. A més, es va observar una disminució significativa d'aquestes malalties en els pacients que s'havien sotmès a CB. En conseqüència de la presència d'aquestes comorbiditats, els pacients amb obesitat eren els qui prenen més medicació per a tractar-les. La tècnica quirúrgica majoritària que seria emprada en tots els pacients obesos era l'*Sleeve Gastrectomy*, sent l'única utilitzada en els pacients ja operats. Les variables bioquímiques també van ser diferents en els tres grups, destacant la glucosa, la insulina i l'HOMA IR que eren significativament majors en els pacients obesos, així com, els nivells de transaminases també es trobaven augmentats en el grup de pacients obesos, aquests valors disminuïen al cap de dotze mesos del tractament quirúrgic, arribant a nivells similars al dels pacients control.

L'àrea dels adipòcits en els pacients amb obesitat del TAS va ser significativament major que el del TAV (pvalor=0,008).

Els resultats complets de l'anàlisi clínic i bioquímic dels pacients es mostra en la taula 1.

Taula 1. Característiques clíniques i bioquímiques dels pacients. Les variables categòriques de la taula es mostren en la forma n(%), sent n de casos que es compleixen amb la variable i % el percentatge de la població que representa respecte del total.

| | Pacients obesos (n=40) | 12 mesos després de CB (n=20) | Controls sans (n=20) | p-valor |
|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------------|-------------------------|---------|
| CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques | | | | |
| Sexe (dona) | 32 (82,1) | 14 (73,7) | 11 (57,9) | <0,001 |
| Edat (anys) | 49,6 ± 10,3 | 52,5 ± 10,2 | 40,3 ± 12,4 | 0,002 |
| IMC (kg/m ²) | 45,3 ± 6,0 | 33,4 ± 3,0 | 24,8 ± 3,3 | <0,001 |
| Perímetre de cintura (cm) | 133,5 ± 13,7 | 111,0 ± 11,7 | 83,8 ± 13,9 | <0,001 |
| Tensió arterial sistòlica (mmHg) | 127,9 ± 31,1 | 135,1 ± 24,7 | 118,7 ± 19,4 | 0,191 |
| Tensió arterial diastòlica (mmHg) | 75,4 ± 17,6 | 80,9 ± 10,2 | 77,6 ± 14,1 | 0,51 |
| Hipertensió arterial | 15 (37,5) | 5 (25,0) | 1 (5,3) | 0,032 |
| Diabetis mellitus tipus 2 | 14 (35,0) | 5 (15,0) | 1 (5,3) | 0,025 |
| Dislipèmia | 10 (25,0) | 3 (15,0) | - | 0,052 |
| Apnea obstructiva de la son | 14 (35,0) | 1 (5,0) | - | 0,001 |
| Depressió | 8 (20,0) | 1 (5,0) | - | 0,045 |
| Ansietat | 10 (25,0) | 4 (20,0) | - | 0,06 |
| Hipotiroidisme | 2 (5,0) | 2 (10,0) | - | 0,363 |
| Esteatohepatitis no alcohòlica | 20 (51,3) | - | - | - |
| TRACTAMENTS | | | | |
| Vasodilatadors | - | 1 (5,0) | - | 0,224 |
| Sulfonilurees | 1 (2,5) | - | - | 0,61 |
| Hormones tiroides | 3 (7,5) | 1 (5,0) | - | 0,471 |
| Diürètics | 5 (12,5) | 1 (5,0) | - | 0,21 |
| Biguanides | 8 (20) | 2 (10,0) | - | 0,089 |
| Beta bloquejadors | 1 (2,5) | 1 (5,0) | - | 0,61 |
| Inhibidors d'ACE | 6 (15,0) | 3 (15,0) | - | 0,2 |
| CPAP | 9 (22,5) | 1 (5,0) | - | 0,026 |
| TÈCNICA QUIRÚRGICA | | | | |
| BPD | 1 (2,6) | - | - | - |
| RYGB | 11 (28,2) | - | - | - |
| SG | 27 (69,2) | 20 (100) | - | - |
| VARIABLES BIOQUÍMIQUES | | | | |
| Glucosa (mM) | 7,1 ± 2,1 | 5,1 ± 1,0 | 4,9 ± 0,4 | <0,001 |
| Insulina (mM) | 111,1 ± 82,7 | 62,8 ± 28,9 | 45,3 ± 15,8 | 0,001 |
| HOMA IR | 5,2 ± 4,7 | - | 1,4 ± 0,5 | 0,001 |
| Triglicèrids (mM) | 1,6 ± 0,7 | 0,9 ± 0,3 | 1,0 ± 0,4 | <0,001 |
| Colesterol total (mM) | 4,0 ± 1,0 | 5,8 ± 1,2 | 5,0 ± 1,0 | <0,001 |
| Colesterol HDL (mM) | 1,3 ± 0,6 | 1,8 ± 0,3 | 1,6 ± 0,4 | 0,001 |
| Colesterol LDL (mM) | 2,7 ± 0,8 | 3,6 ± 1,0 | 3,1 ± 0,9 | 0,004 |
| Colesterol VLDL (mM) | 0,7 ± 0,4 | 0,5 ± 0,2 | 0,4 ± 0,2 | 0,003 |
| TRANSAMINASES | | | | |
| ALT (µKat/L) | 0,8 ± 0,4 | 0,3 ± 0,1 | 0,4 ± 0,2 | <0,001 |
| AST (µKat/L) | 0,8 ± 0,4 | 0,3 ± 0,1 | 0,4 ± 0,1 | <0,001 |
| GGT (µKat/L) | 0,4 ± 0,3 | 0,3 ± 0,2 | 0,2 ± 0,2 | 0,023 |
| ÀREA DELS ADIPÒCITS | | | | |
| TAV (µm ²) | 4043,2 (2962,1-4729,3) | - | - | - |
| TAS (µm ²) | 4556,2 (3894,9-5863,8) | - | - | - |

IMC: Índex de massa corporal; TAS: teixit adipós subcutani; TAV: teixit adipós visceral; CPAP: pressió positiva continua en la via aèria; CB: cirurgia bariàtrica; BPD: *Bilopancreatic Diversion*; RYGB: *Roux-en-Y bypass*; SG: *Sleeve Gastrectomy*; HOMA IR: model homeostàtic per avaluar la resistència a la insulina; HDL: lipoproteïnes d'alta densitat; LDL: lipoproteïnes de baixa densitat; VLDL: lipoproteïnes de molt baixa densitat.; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartat aminotransferasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa.

2. SIGNATURA PROTEÒMICA DELS TEIXITS ADIPOSOS EN L'OBESITAT

Divuit dels pacients amb obesitat van accedir a donar mostres de TAS i TAV. A partir d'elles, es va avaluar la signatura proteòmica i la possible existència de diferències significatives en la concentració proteica entre els dos subtipus de teixit adipós. Es van detectar i quantificar 507 pèptids en tots dos teixits.

Es van dur a terme anàlisis univariants i multivariants per determinar la possible presència de diferències significatives en la concentració proteica dels dos subtipus de teixit. Les anàlisis univariants *Fold Change*, *t-test* i *Volcano Plot* indicaven alteracions en la concentració d'algunes proteïnes entre els dos teixits. Així mateix, el *Volcano Plot* evidencia les proteïnes que tenen diferències significatives entre el TAS i el TAV, les proteïnes que presenten una concentració significativament major en el TAV són el factor de barrera de l'autointegració (O75531), l'adenosina quinasa (P55263), la proteïna de xoc tèrmic beta-6 (A0A1X7SC65) i la caveolina-1 (Q03135), mentre que la leucotriè A-4 hidrolasa (P09960), la histona H2A tipus 1-A (Q96QV6), la subunitat alfa-3 de la proteïna G d'unió a nucleòtids de guanina (P08754) i la lactoferrina (E7EQB2) es trobaven disminuïdes (Figura 15A).

A continuació, es van elaborar els anàlisis multivariants PCA i PLS-DA per poder analitzar més variables simultàniament. L'anàlisi no supervisat PCA (figura 15B) mostra que la màxima variabilitat en el proteoma no permet diferenciar els dos teixits adiposos analitzats. Contràriament, sí que es poden separar els dos teixits amb una anàlisi supervisada PLS-DA (figura 15C). A partir del gràfic PLS-DA VIP *score* es van definir les variables més importants de l'estudi PLS-DA i que permeten una gran separació, aquestes són la proteïna RAD23 de reparació de l'escissió UV (Q5W0S5), la proteïna S100-A13 (Q99584) la lactoferrina (E7EQB2), la proteïna 1 de quatre dominis LIM i mig (Q5JXI8) i la proteïna 1 d'unió a fosfatidiletanolamina (P30086), destacant per la seva

capacitat de separació la proteïna Q5W0S5, que es troba incrementada en el teixit adipós subcutani (figura 15D).

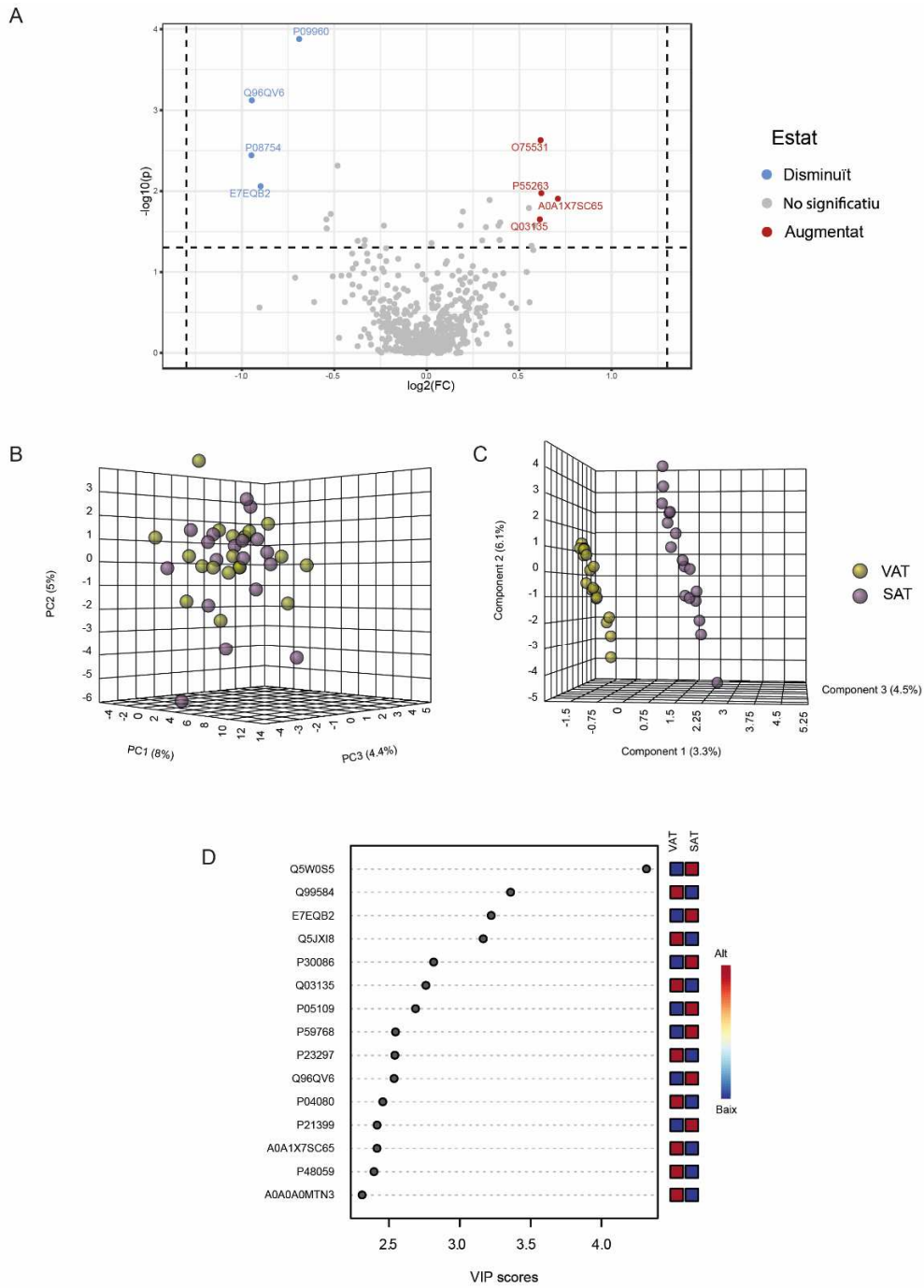


Figura 15. Comparativa de la signatura proteòmica dels teixits adiposos en l'obesitat. A. Volcano Plot; B. PCA 3D; C. PLS-DA 3D; D. Projectió de variables d'importància (VIP).

PCA: Anàlisi de components principals; PLS-DA: Anàlisi discriminant de mínims quadrats parcials; Q5W0S5: proteïna RAD23 homòleg B de reparació per escissió, Q99584: proteïna S100-A13; E7EQB2: lactotransferrina, Q5JXI8: proteïna 1 de dominis LIM quadre i mig i P30086: proteïna 1 d'unió a fosfatidiletanolamina.

Un cop estudiada la relació entre el perfil proteòmic dels dos teixits adiposos, es va voler avaluar la relació entre la proteòmica del TAV i TAS amb les característiques clíniques (antropometria i característiques bioquímiques) i histològiques de cada pacient. Es va fer una anàlisi de xarxa de correlació, un mètode aplicat a l'estudi de correlacions entre diverses variables.

Els resultats de la xarxa de correlació del TAS mostren correlacions entre pèptids i totes les característiques clíniques menys l'edat i el perímetre de cintura. A més, totes les variables que tenen correlació es troben agrupades en un sol clúster (figura 16A). Contràriament, en la xarxa de correlació que inclou al teixit adipós visceral, poques característiques clíniques semblen estar correlacionades amb pèptids, només el colesterol HDL i l'HOMA-IR; l'HDL està correlacionat amb la proteïna d'unió a àcids grassos 5 (Q01469) i la immunoglobulina constant pesada gamma 4 (P01861), i l'HOMAIR amb la membrana amino oxidasa primària (Q16853) i la proteïna associada a caveolae 3 (Q969G5) (figura 16B). Addicionalment, en aquest segon mapa, a diferència del primer, s'observen quatre clústers que agrupen diferents variables entre elles.

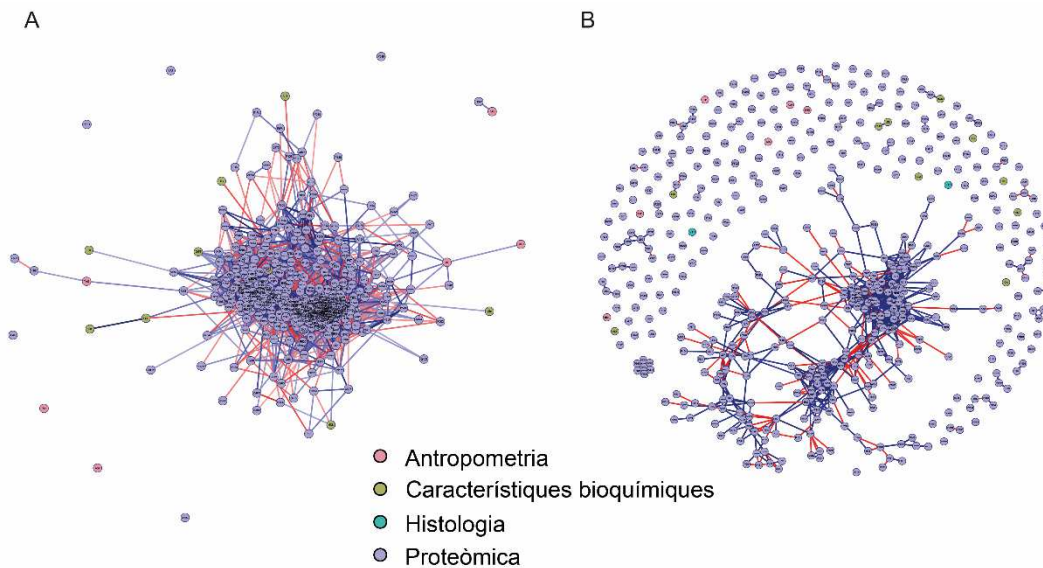


Figura 16. Xarxes de correlació. L'anàlisi de xarxes de correlació mostra diferències entre els pèptids i les característiques clíniques i histològiques dependent del teixit. Xarxa de correlació del teixit adipós (A) subcutani i (B) visceral. Com més a prop estan localitzades les variables, i com més gruixuda és la línia que les uneix, la correlació és més significativa. Les línies blaves representen correlacions positives, i les línies vermelles correlacions negatives

En resum, s'han pogut identificar les proteïnes que presenten majors diferències entre els teixits adiposos visceral i subcutani. Els processos biològics en els que es troben involucrades d'aquestes proteïnes es troben llistats en la taula S1 de l'annex.

3. EFECTE DE L'OBESITAT EN LA PROTEÒMICA PLASMÀTIC

D'entre els 40 pacients amb obesitat, tots van donar mostres de plasma abans de la cirurgia bariàtrica i 20 d'aquests en van donar també dotze mesos després de la intervenció. Paral·lelament, es van recollir mostres de 20 voluntaris sans no obesos per a poder fer estudis comparatius. En l'anàlisi proteòmic es van detectar i quantificar 230 pèptids.

Es va comparar la concentració en plasma de proteïnes dels 40 pacients amb obesitat i amb els 20 pacients voluntaris sans no obesos. Es va veure que l'obesitat modifica el perfil proteòmic en plasma.

Inicialment, es va fer una anàlisi univariant. Les anàlisis *Fold Change*, *t-test* i *Volcano Plot* mostraven que hi havia variació de proteïnes en els dos grups. El *Volcano Plot* mostra que alguns pèptids com la proteïna C reactiva (P02741), la subunitat beta de l'hemoglobina (P68871), l'haptoglobina (P00738), la proteïna bàsica plaquetària (P02775) i la subunitat alfa de l'hemoglobina (P69905) es trobaven significativament augmentats i l'apolipoproteïna C-I (K7ERI9) i l'apolipoproteïna A-IV (P06727) significativament disminuïdes en els pacients amb obesitat (figura 17A). Seguidament, es va fer anàlisi multivariant amb PCA i PLS-DA. En l'anàlisi PCA es mostra que el perfil proteòmic global, en un anàlisi supervisat, no van presentar grans diferències entre els pacients obesos i els control (figura 17B). En canvi, l'anàlisi PLS-DA indica que les concentracions de proteïnes globals, en una anàlisi supervisada, van presentar diferències suficients per a poder separar els dos grups (figura 17C). En el PLS-DA *VIP score* (figura 17D), es determina que les proteïnes que més destacaven per la seva capacitat de separació eren la proteïna C reactiva (P02741), la glicoproteïna alfa 1-B (P04217), la proteïna del complement C5 (P01031), la subunitat beta de l'hemoglobina (P68871) i l'haptoglobina (P00738), el que significa que se'ls va donar més importància a l'hora de generar el PLS-DA perquè es pogués distingir la separació entre els grups, tots aquests es trobaven augmentats en els pacients obesos respecte els control.

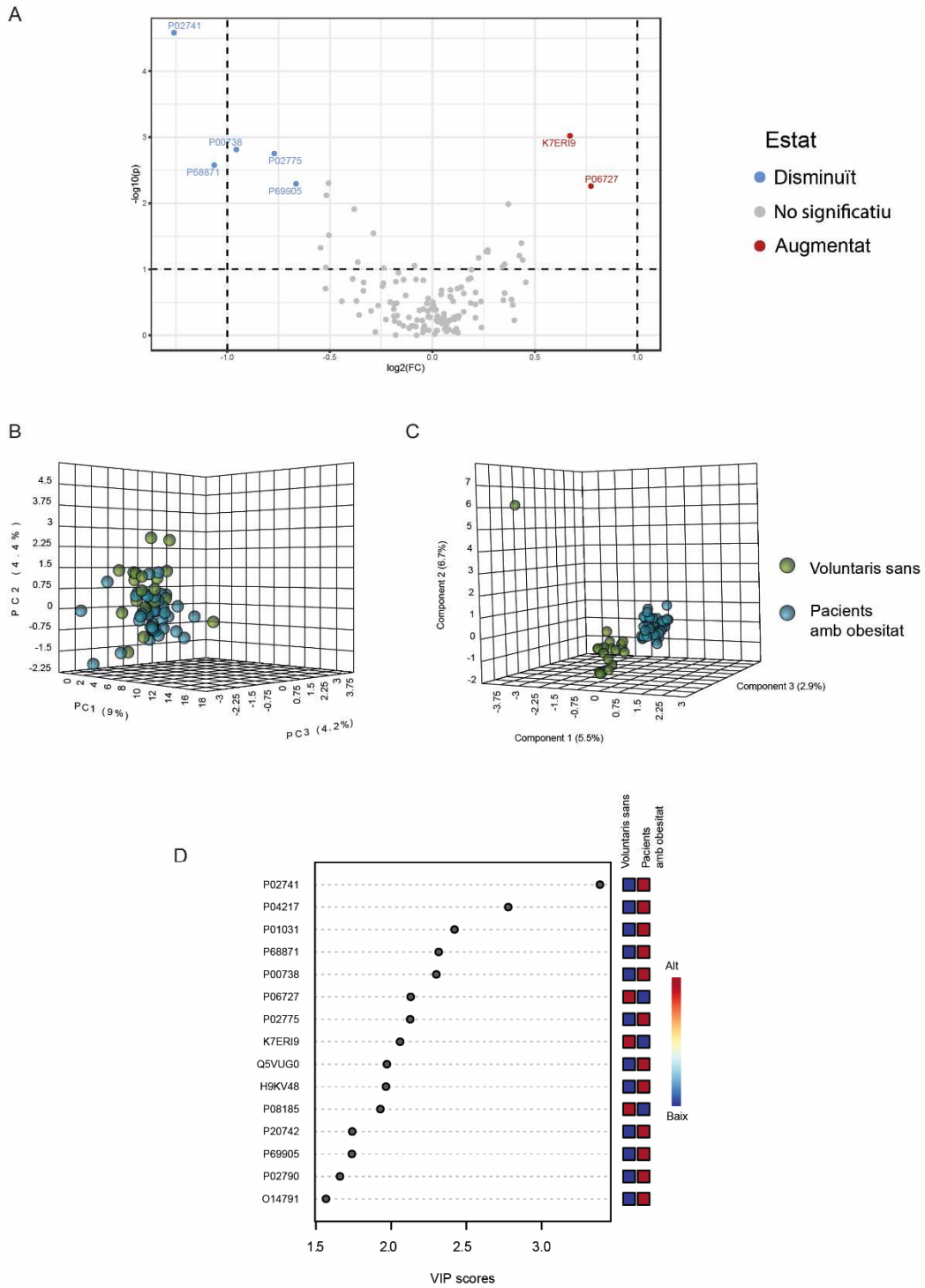


Figura 17. Efecte de l'obesitat en el perfil proteòmic plasmàtic. A. Fold Change; B. T-test; C. Volcano Plot; D. PCA 3D; E. PLS-DA 3D; F. Importància de les variables en la projecció (VIP).

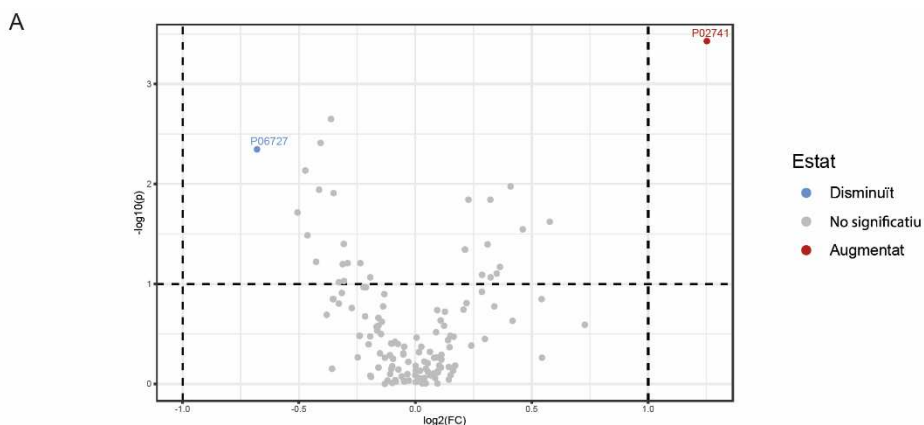
PCA: Anàlisi de components principals; PLS-DA: Anàlisi discriminant de mínims quadrats parcials; P02741: proteïna C reactiva; P04217: glicoproteïna alfa 1B; P01031: proteïna del complement C5; P68871: subunitat beta d'hemoglobina; P00738: haptoglobina.

4. EFECTE DE LA CIRURGIA BARIÀTRICA EN PROTEOMA PLASMÀTIC

4.1. Comparativa entre pacients amb obesitat pre i post cirurgia bariàtrica

Per a determinar l'efecte de la cirurgia bariàtrica en proteòmica de plasma, es van fer comparacions de la concentració plasmàtica de proteïnes dels 20 pacients dels qui es tenia mostra abans de cirurgia bariàtrica i dotze mesos després, així com comparacions entre els 20 pacients dotze mesos després de la cirurgia bariàtrica i les 20 persones voluntàries no obeses sanes. S'observa una modificació en el perfil proteic en plasma a causa de la cirurgia bariàtrica.

Es van fer anàlisis univariants de *Fold Change*, *t-test* aparellats i *Volcano Plot* entre pacients obesos pre i postoperació que van revelar variacions en la concentració d'algunes proteïnes, l'apolipoproteïna A-IV (P06727) es trobava disminuïda i la proteïna C reactiva (P02741) augmentada en pacients amb obesitat precirurgia (figura 18A). Els anàlisis multivariants com PCA i PLS-DA mostraven diferències significatives en les concentracions de proteïnes globals en les anàlisis supervisades, però en les no supervisades, les diferències no eren tan clares (figura 18B i C). A partir dels PLS-DA VIP score (figura 18D) es van determinar els pèptids que més destacaven per la seva capacitat de separació, la proteïna C reactiva (P02741), el component P del sèrum amiloide (P02743), la proteasa 1 (P15636) i el factor I del complement (G3XAM2), utilitzats en el PLS-DA perquè es pogués distingir la separació entre els grups. Aquests quatre pèptids es troben augmentats en pacients amb obesitat respecte als mateixos pacients després de la cirurgia.



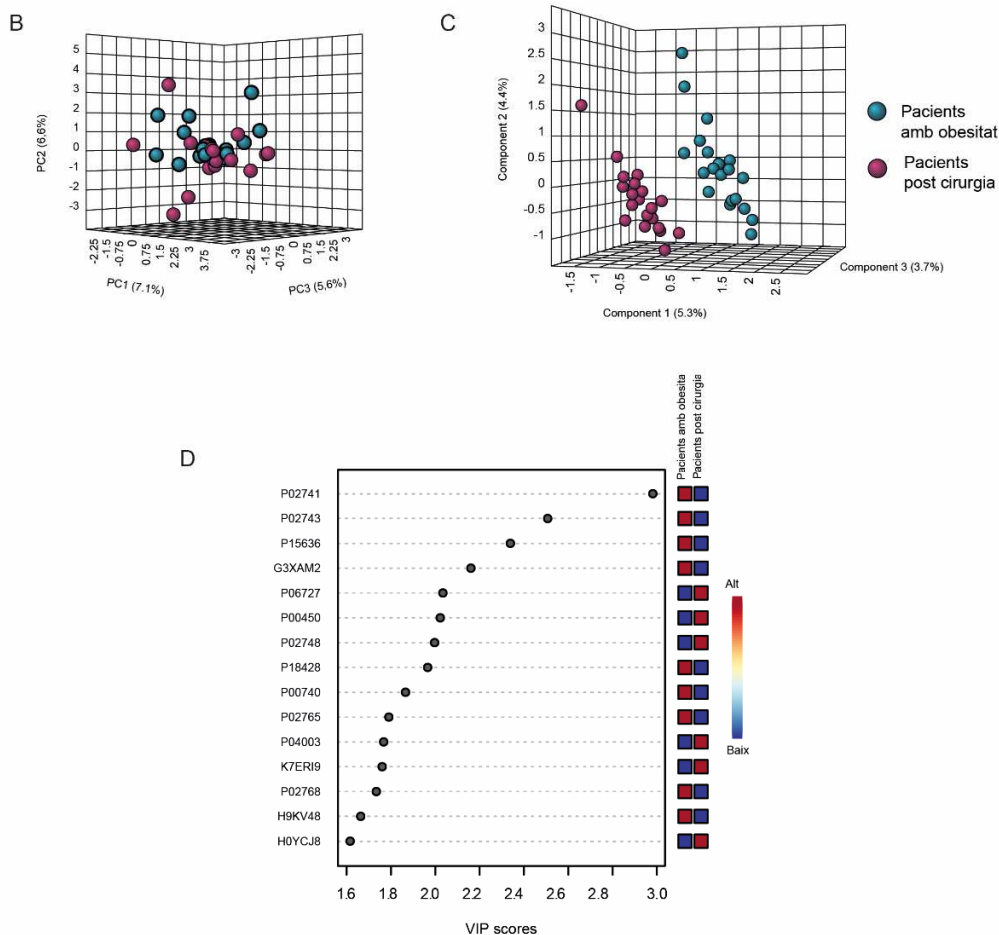


Figura 18. Efecte de la cirurgia bariàtrica en el perfil proteòmic de plasma, comparativa entre pacients obesos pre i post cirurgia. A. Volcano Plot; B. PCA 3D; C. PLS-DA 3D; D. Importància de les variables en la projecció (VIP)

PCA: Anàlisi de components principals; PLS-DA: Anàlisi discriminant de mínims quadrats parcials; P02741: proteïna C reactiva; P15636: proteasa 1; P06727: apolipoproteïna A-IV; G3XAM2: factor del complement 1; glicoproteïna alfa 2HS

4.2. Comparativa entre pacients control i postcirurgia bariàtrica

Per altra banda, també es van fer el mateix tipus d'anàlisis univariants i multivariants entre els 20 pacients postcirurgia i els 20 controls no obesos sans. L'anàlisi univariant *Volcano Plot*, en aquest cas, només va trobar diferències significatives en concentració proteica en la proteïna zeta/delta 14-3-3 (B0AZS6) i la proteïna plaquetària bàsica (P02775), en els dos casos la concentració d'aquestes proteïnes es trobava disminuïda en els pacients control (figura 19A). En l'anàlisi multivariant no supervisat PCA (figura 19B) els grups d'estudi s'observaven superposats, en canvi, en l'anàlisi supervisats PLS-DA (figura 19C) es van observar completament separats gràcies a l'ús de pèptids amb major capacitat de distinció. Segons es mostra el PLS-DA *VIP score* (figura 19D) els

pèptids més importants són la glicoproteïna alfa 1-B (P04217), augmentada en els pacients post cirurgia, el component P del sèrum amiloide (P02743) i la ficolina 3 (O75636), disminuïdes en els pacients postcirurgia, i la proteïna zeta/delta 14-3-3 (B0AZS6), augmentada en els pacients postcirurgia.

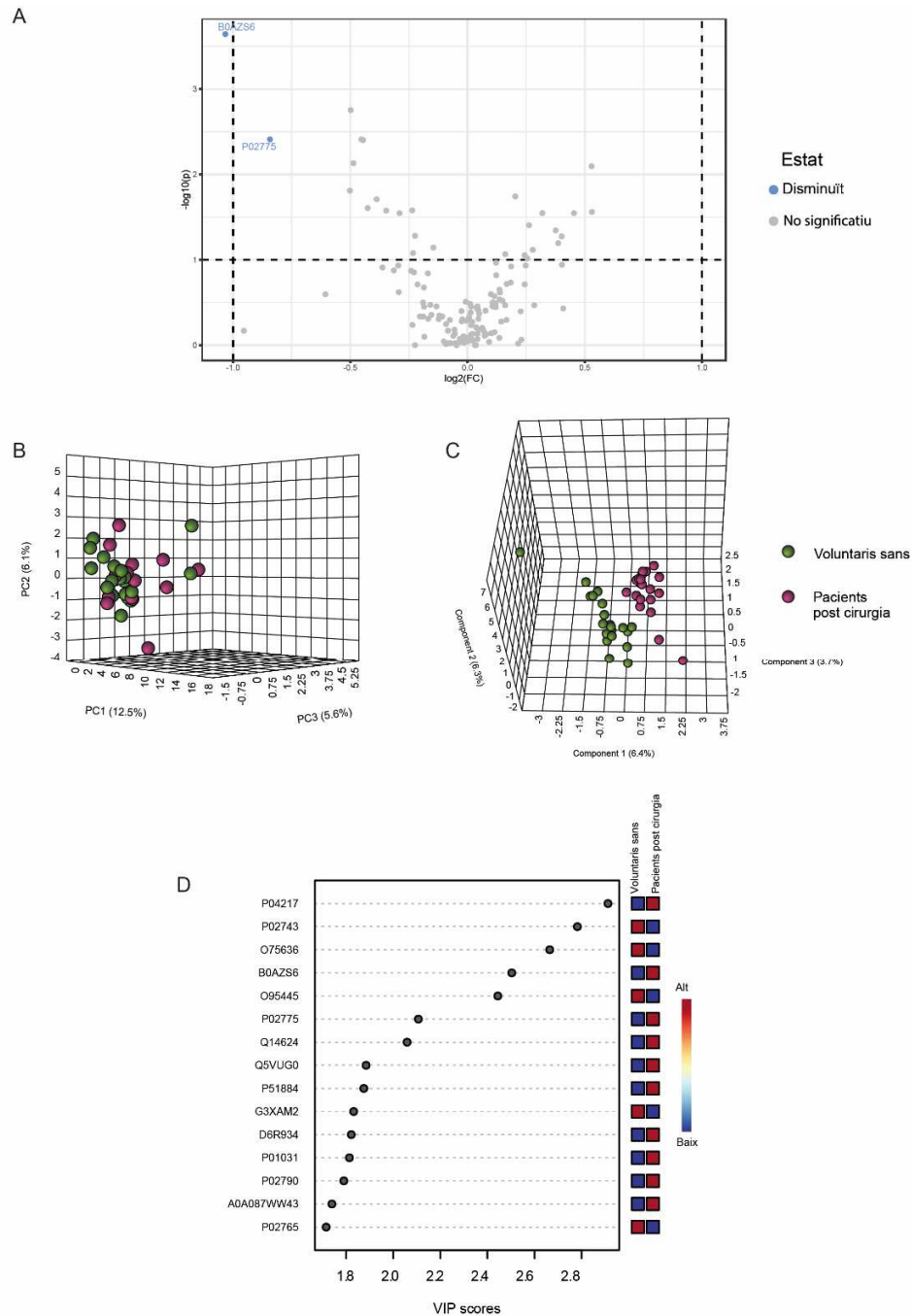


Figura 19. Efecte de la cirurgia bariàtrica en el perfil proteòmic plasmàtic, comparativa entre pacients obesos postcirurgia i pacients control. A. Volcano Plot; B. PCA 3D; C. PLS-DA 3D; D. Importància de les variables en la projecció (VIP).

PCA: Anàlisi de components principals; PLS-DA: Anàlisi discriminant de mínims quadrats parcials; P04217: glicoproteïna alfa 1; P02743: component P del sèrum amiloide; O75636M: ficolina 3; B0AZS6: zeta/delta proteïna 14-3-3 i O95445: apolipoproteïna M.

5. GLOBALMENT

En l'estudi comparatiu de la proteòmica en plasma dels 3 grups de pacients (control sans no obesos, obesos pre i postcirurgia) es va detectar la presència de proteïnes amb diferències significatives entre els tres grups. En l'anàlisi univariant *Kruskal-Wallis*, es van detectar 6 proteïnes significativament diferents (figura 20A). Aquestes proteïnes són l'hemopexina (P02790), l'apolipoproteïna C-I (K7ERI9), la calistatina (P29622), l'apolipoproteïna M (O95445), la proteïna C reactiva (P02741) i la proteïna zeta/delta 14-3-3 (B0AZS6). Addicionalment, l'anàlisi clusteritzat *heatmap* de la figura 23B, que mostra el top 25 d'espècies llistades amb el *t-test* i representades per mitjanes de grup, indica que el grup de pacients postcirurgia segueixen tendències en el perfil proteic més similar als pacients amb obesitat, i més diferents respecte als pacients control. Tot i això, el *heatmap* també mostra que sembla que en els pacients postcirurgia es restauri part del proteoma, assemblant-se a les concentracions que tenen els control (figura 20B). Les proteïnes que més destaquen perquè els seus nivells són més similars entre els controls i els pacients postcirurgia són la proteïna C reactiva (P02741), l'apoproteïna A-IV (P06727), el subcomponent C1q de la subunitat C del complement (P02747) i l'apolipoproteïna F (Q13790). En canvi, altres proteïnes com la glicoproteïna alfa 1B (P04217) i la proteïna plaquetària bàsica (P02775) es troben en nivells molt similars en el grup de pacients amb obesitat i el grup després de la cirurgia. Finalment, entre el grup de pacients amb obesitat i el grup control, és on es troben més diferències en la concentració de proteïnes.

En resum, s'han pogut identificar les proteïnes que presenten majors diferències entre els grups a través d'anàlisis estadístiques. Els processos biològics en els quals es troben involucrades aquestes proteïnes es troben llistats en la taula S2 de l'annex. Hi ha proteïnes que destaquen en diversos gràfics comparatius de diferents grups, aquests són la proteïna C reactiva (P02741), la proteïna plaquetària bàsica (P02775), l'apolipoproteïna C-I (K7ERI9), l'apolipoproteïna A-IV (P06727), la glicoproteïna alfa 1-B (P04217) i el component P del sèrum amiloide (P02743). L'aparició d'aquestes proteïnes com a destacades en les diferents comparacions es mostra en la taula 2.

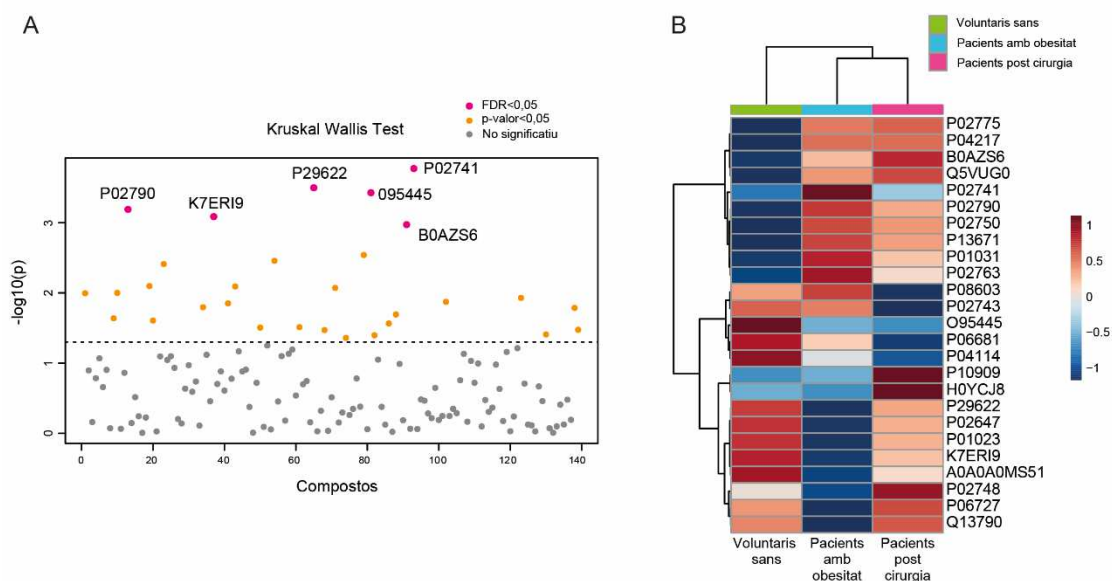


Figura 20. Estudi comparatiu de la proteòmica en plasma de pacients control, obesos pre cirurgia i obesos postcirurgia. A. Anova; B. Heatmap

Taula 2. Proteïnes destacades en les comparatives de grups. Es senyalen amb una X els grups en els que ha aparegut com a destacada cada proteïna.

| | Voluntaris sans vs pacients amb obesitat | Pacients amb obesitat vs post cb | Voluntaris sans vs post cirurgia | Voluntaris sans vs pacients amb obesitat vs post cb |
|---------------|--|----------------------------------|----------------------------------|---|
| P02741 | X | X | | X |
| P02775 | X | | X | X |
| K7ERI9 | X | | | X |
| P06727 | X | X | | X |
| P04217 | X | | X | X |
| P02743 | | X | X | |

P02741: proteïna C reactiva; P02775: proteïna plaquetària bàsica, K7ERI9: apolipoproteïna C-I, P06727: apolipoproteïna A-IV, P04217: glicoproteïna alfa 1-B, P02743: component P del sèrum amiloide

DISCUSSIÓ

L'obesitat i el sobrepès són considerades un problema de salut molt greu per les seves complicacions fisiològiques i la seva creixent prevalença, gairebé 2 mil milions d'adults pateixen sobrepès i 650 milions obesitat (WHO 2021). L'obesitat comporta l'augment de la incidència de malalties com diabetis mellitus tipus 2, dislipèmia, malalties cardiovasculars, càncer, desordres en la son i psicològiques com ansietat i depressió. Totes aquestes condicions augmenten el risc de mort prematura (Agha & Agha 2017). La cirurgia bariàtrica és considerada el tractament més efectiu en casos d'obesitat extrema,

mostrant resultats clínics positius en el control de les comorbiditats (Arterburn *et al.* 2020).

Existeix una gran heterogeneïtat en el fenotip entre els individus que pateixen obesitat, fet que està estretament relacionat amb la presència de diferents molècules com les proteïnes (Mayoral LP *et al.* 2020). Per aquest motiu, s'ha avaluat el perfil proteòmic plasmàtic i en els TAS i TAS en un estudi multi comparatiu entre controls sans, pacients amb obesitat i pacients 12 mesos després de la cirurgia bariàtrica.

Hi ha certes característiques clíniques i bioquímiques dels tres grups d'estudi que són significativament diferents. Les característiques clíniques de l'IMC, el perímetre de cintura i la pressió arterial; variables bioquímiques com la glucosa, la insulina i l'HOMA IR; i les transaminases tenien valors mitjans més baixos en els voluntaris sans. En conseqüència, la incidència de comorbiditats (hipertensió arterial, diabetis mellitus tipus 2, dislipèmia, apnea obstructiva de la son, depressió, ansietat i NASH) era major en els pacients que tenien alterades aquestes variables, concretament en els pacients amb obesitat (WHO 2021; Agha & Agha 2017).

Després de la cirurgia bariàtrica es va observar una disminució significativa en la presència de comorbiditats. Algunes variables com la glucosa, la insulina, l'HOMA IR, els triglicèrids i les transaminases també es van reduir significativament, arribant a nivells similars als dels voluntaris sans, i van augmentar els nivells de colesterol, fets que poden estar lligats a la subseqüent remissió de patologies. Per exemple, la disminució dels nivells de glucosa, d'insulina i d'HOMA-IR expliquen la reducció de la incidència de T2DM (Insenser *et al.* 2021), així com, l'augment del colesterol HDL i la disminució dels nivells de TG expliquen la reducció de DLP en els pacients 12 mesos després de la cirurgia (Genua *et al.* 2020). A més, la remissió completa de la malaltia NASH observada en els resultats i ja descrita en estudis anteriors (Tan *et al.* 2018), es pot veure reflectida en la disminució dels nivells de transaminases, indicant una millora en el dany hepàtic, encara que aquestes molècules no s'utilitzin com a diagnòstic directe de NASH (Woreta & Alqahtani 2014).

El teixit adipós blanc (subcutani i visceral) pateix canvis en condicions d'obesitat. Tot i ser tots dos teixits adiposos blancs tenen diferències significatives, tal com mostren els resultats d'aquest estudi mitjançant anàlisis i comparacions en el perfil proteòmic dels teixits i en la diferència entre la mida dels adipòcits (és major en el teixit adipós visceral).

Estudis anteriors (Ibrahim 2010) ja evidencien l'existència de distincions anatòmiques, cel·lulars, moleculars i fisiològiques entre ells. Els canvis que pateixen el TAV i TAS en condicions d'obesitat inclouen hiperplàsia (augment de producció de cèl·lules), hipertròfia (augment de la massa muscular), infiltració de cèl·lules immunitàries i secreció de vasoconstrictors (Benjamin Chun-Kit Tong 2017). Aquestes alteracions són causades per variacions en la concentració de diverses molècules. En aquest estudi, s'han evidenciat algunes d'elles.

En el TAV, s'ha vist un augment en la concentració de proteïnes que participen en la hipertròfia, en concret, la proteïna 1 de quatre dominis LIM i mig. L'increment de la concentració d'aquesta proteïna, que promou l'expansió del teixit, té relació amb que el TAV és el següent lloc d'acumulació de greix després del TAS (Longo *et al.* 2019), i per això, en els casos en els quals el TAS no té més capacitat, s'incrementaria la producció d'aquesta proteïna en el TAV perquè pugui emmagatzemar més greix. Els resultats també mostren un augment en la concentració de proteïnes que participen en la infiltració de cèl·lules immunitàries en el TAV, com la proteïna S100-A13 o el factor de barrera de l'auto integració, fet que es correspon amb el que havien explicat altres autors (Ibrahim 2010). Addicionalment, en el TAV augmenta la producció de proteïnes relacionades amb la reparació i mecanismes epigenètics com la histona H2A tipus 1-A o la proteïna RAD23 de reparació de l'escissió UV. S'ha descrit en estudis anteriors, que la disrupció en el balanç dels mecanismes epigenètics contribueix l'obesitat i a comorbiditat com la T2DM (Ling & Rönn 2019).

L'alteració en la concentració d'algunes proteïnes provocada per l'obesitat promou l'aparició de comorbiditats. Per exemple la proteïna caveolina 1, significativament augmentada en TAV, està involucrada en la senyalització del receptor de la insulina, per la qual cosa té un paper important en l'aparició de T2DM (Haddad *et al.* 2020). Un altre exemple seria l'increment de molècules implicades en la producció d'ATP com l'adenosina quinasa (també es troba incrementada en TAV) que contribueixen a l'alteració del metabolisme energètic i en conseqüència a l'aparició o agreujament de malalties cardiovasculars (Lopaschuk *et al.* 2021).

En l'estudi de xarxes de correlació indica un cop més que el TAS i TAV tenen un perfil proteòmic diferent: en el TAS es mostra relació entre tots els pèptids i la majoria de característiques clíniques excepte l'edat i el perímetre de cintura. En canvi, en el TAV només dues característiques clíniques es troben relacionades amb pèptids (HDL i HOMA

IR), l'HDL està correlacionat amb la proteïna d'unió a àcids grassos 5 (Q01469) i la immunoglobulina constant pesada gamma 4 (P01861) i l'HOMA IR amb la membrana amino oxidasa primària (Q16853) i la proteïna associada a caveolae 3 (Q969G5).

Totes aquestes relacions mostrades en la xarxa de correlacions del TAV es poden recolzar amb descripcions d'estudis anteriors. Les proteïnes d'unió a àcids grassos faciliten el transport dels lípids als diferents orgànuls cel·lulars, concretament la proteïna d'unió a àcids grassos 5 està relacionada amb el desenvolupament de desordres metabòlics com la resistència a la insulina (Furuhashi *et al.* 2020). Les correlacions observades entre l'HDL i la immunoglobulina constant pesada gamma 4 podria esdevenir causada per les alteracions metabòliques que pateix aquest teixit, i la major infiltració de cèl·lules immunitàries (Aguilar-Ballester *et al.* 2020; Benjamin Chun-Kit Tong 2017). De la mateixa manera, també s'ha vist una relació entre l'HOMA IR i la membrana amino oxidasa primària (Q16853), una proteïna que intervé en el sistema immunitari, estudis anteriors ja descriuen relacions entre el sistema immunitari i la utilització d'energia com la glucosa (Lee & Dixit 2020).

Les comparatives del proteoma en plasma dels tres grups d'estudi mostren diferències significatives. L'efecte de l'obesitat és notori, en aquesta condició es presenta un alt grau d'inflamació i, en conseqüència, una alteració de les cèl·lules que intervenen en els processos inflamatoris (Karczewski *et al.* 2018), i una desregulació en el sistema immunitari alterant els nivells de molècules de resposta immunitària innata i adaptativa (Fang *et al.* 2020). En l'estudi comparatiu de l'efecte de l'obesitat s'ha observat una alteració significativa de certes proteïnes que coincideixen amb declaracions els estudis ja fets anteriorment per altres autors. S'observa un augment en la proteïna C reactiva en el grup de pacients amb obesitat respecte al control com a resposta a l'estat inflamatori (Kawai *et al.* 2021). A més, s'alteren algunes molècules que participen en la resposta del sistema immunitari com la proteïna del complement C5, la proteïna bàsica plaquetària, l'haptoglobina i la glicoproteïna alfa 1-B (Kawai *et al.* 2021). Addicionalment, els resultats també van indicar un increment tant en la subunitat alfa com en la beta de l'hemoglobina en pacients amb obesitat, corroborant el fet que els nivells d'hemoglobina es troben alterats en l'estat d'obesitat (Elmugabil *et al.* 2017). Finalment, els pacients amb obesitat mostraven nivells significativament menors d'apolipoproteïnes (C-I i A-IV), el que suggereix la presència d'una desregulació en el procés metabòlic del colesterol i del

transport de lípids i fins i tot, la disminució de l'apolipoproteïna A-IV indica una desregulació en el control de la ingesta del menjar (Qin & Tso 2012).

El perfil proteòmic en els pacients en resposta a la cirurgia bariàtrica també varia. Per una banda, els pacients amb obesitat abans de la cirurgia presenten nivells més elevats de proteïnes de resposta inflammatòria (proteïna C reactiva), nivells més baixos de proteïnes encarregades de donar sensació de sacietat (apolipoproteïna AIV) (Kawai *et al.* 2021; Qin & Tso 2012) i nivells més alts de proteïnes relacionades amb la resposta immunitària (factor del complement 1 i component P del sèrum amiloide) (Fang *et al.* 2020). Aquestes diferències significatives en la concentració de certes proteïnes evidencien els canvis que experimenten els pacients després de la cirurgia com la baixada de pes i la disminució de comorbiditats. Per altra banda, la comparativa entre el proteoma del grup control i els pacients postcirurgia sembla indicar un possible restabliment del proteoma, doncs en el *Volcano Plot* només es troben diferències significatives en dues proteïnes i en el anàlisi PLS-DA, el VIP score màxim que té una proteïna és menor a 3 mentre que en la comparativa entre els grups pre i postcirurgia aquest valor és superior. Tot i això, les diferències en les concentracions de certes proteïnes entre els pacients postcirurgia i els control mostren que el perfil proteòmic dels pacients postcirurgia pateix grans millores però no es restableix completament i segueixen estant en un estat d'inflamació i resposta immunitària alterat (Biobaku *et al.* 2020). Algunes de les proteïnes augmentades en el grup postcirurgia estan relacionades amb molècules del sistema immunitari (proteïna plaquetària bàsica i glicoproteïna alfa 1-B) o proteïnes reguladores de la transducció de senyals de vies apoptòtiques en els mitocondris crítiques per a la supervivència cel·lular (proteïna zeta/delta 14-3-3), el que indica la presència de dany cel·lular i disfunció mitocondrial causada per l'obesitat (de Mello *et al.* 2018).

Finalment, en la comparativa del proteoma plasmàtic global, s'evidencia que el perfil proteòmic del grup de pacients després de la cirurgia s'assembla més al control que els d'abans de la cirurgia amb els control. En alguns casos fins i tot la concentració d'algunes proteïnes acaba sent més similar entre els pacients després de la cirurgia i els controls sans que entre els pacients abans i després de la cirurgia, com en el cas de la proteïna C reactiva i l'apolipoproteïna A-IV, descrites anteriorment. Aquests resultats suporten la idea del restabliment parcial del proteoma gràcies a la cirurgia, fet que explicarien els efectes beneficiosos del tractament en la reducció de les comorbiditats (Guangzhong & Song 2021).

CONCLUSIONS

Després d'elaborar les diferents anàlisis d'aquest estudi, s'ha arribat a diverses conclusions:

1. Els pacients que pateixen obesitat tenen un alt risc de patir malalties derivades d'aquesta condició. A més, la cirurgia bariàtrica és útil no només per a reduir de pes, sinó que també resulta ser un tractament eficaç per a l'eliminació d'aquestes comorbiditats i per a la millora d'altres condicions clíniques i bioquímiques com la disminució dels nivells de transaminases, insulina, glucosa i HOMA IR.
2. L'àrea dels adipòcits presenta diferències entre els dos tipus de teixit adipós (visceral i subcutani) en l'obesitat, és major en el TAS, la qual cosa dona més pes a la hipòtesi que són distints.
3. El perfil proteòmic dels pacients amb obesitat varia en funció del tipus de teixit adipós (visceral o subcutani), el que indica que tot i ser dos teixits adiposos blancs, les molècules que participen en cadascun d'ells són específiques. VAT en comparació amb SAT conté un major nombre de pèptids immunitaris i inflamatoris.
4. La relació del proteoma dels teixits adiposos visceral i subcutani amb les característiques clíniques i bioquímiques dels pacients és molt diferent. En el SAT la majoria dels pèptids es relacionen amb totes les característiques clíniques i bioquímiques excepte l'edat i el perímetre de cintura, mentre que en el VAT només alguns pèptids es poden relacionar amb l'HDL i l'HOMA IR.
5. L'obesitat es caracteritza per presència d'hiperplàsia, hipertròfia i infiltració de cèl·lules immunitàries en el teixit adipós visceral i subcutani, pel que hi ha una alteració de proteïnes que intervenen en aquests processos. Augmenta la concentració de proteïnes de resposta inflamatòria crònica (proteïna C reactiva) i de resposta del sistema immunitari (complement C5, bàsica plaquetària, haptoglobina i glicoproteïna alfa 1-B, especialment).
6. La cirurgia bariàtrica modifica les concentracions de proteïnes en plasma, restablint parcialment el proteoma. S'observa una disminució en la concentració de molècules responsables de la sensació de sacietat (apoproteïna A-IV), de la inflamació (proteïna C reactiva) i de resposta immunitària (subcomponent C1q de la subunitat C del complement). Aquestes proteïnes podrien intervenir especialment en les característiques clíniques del pacient.

7. La proteïna C reactiva i l'apolipoproteïna IV semblen estar molt relacionades amb l'obesitat i amb les comorbiditats. La proteïna C reactiva augmenta i la apolipoproteïna IV disminueix en l'obesitat, mentre que al cap d'un any de la cirurgia els nivells d'aquests pèptids arriben a ser molt similars als dels control.

Tot i això, aquest estudi presenta limitacions que es podrien tenir en compte per a estudis posteriors. La mostra de pacients de l'estudi és baixa, augmentar el nombre seria molt interessant per poder extreure conclusions amb major precisió. A més, dels 40 pacients que es van sotmetre a la cirurgia només es van prendre dades al cap de dotze mesos de 20 pacients, el que va disminuir el nombre de dades de pacients amb qui fer comparatives abans i després de la cirurgia. Addicionalment, un dels pacients control tenia hipertensió i un altre diabetis mellitus tipus 2, pel no estaven completament sans. Per finalitzar, s'ha de tenir en compte que els pacients estaven sent tractats amb medicació, pel que a l'hora de fer les comparacions entre els diferents grups aquest era un punt on ja es diferia de partida i podria haver afectat d'alguna manera a les dades obtingudes.

BIBLIOGRAFIA

- AllScience. (2019) Accessed May 2022, from <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/introduccion-a-western-blot>.
- Adams, L. A., Angulo, P., & Lindor, K. D. (2005). Nonalcoholic fatty liver disease. *Cmaj*, **172**(7), 899–905.
- Agha, M., & Agha, R. (2017). The rising prevalence of obesity. *International Journal of Surgery Oncology*, **2**(7), e19.
- Aguilar-Ballester, M., Herrero-Cervera, A., Vinué, Á., Martínez-Hervás, S., & González-Navarro, H. (2020). Impact of cholesterol metabolism in immune cell function and atherosclerosis. *Nutrients*, **12**(7), 1–19.
- Alfaro, J. A., Bohländer, P., Dai, M., ... Joo, C. (2021). The emerging landscape of single-molecule protein sequencing technologies. *Nature Methods*, **18**(6), 604–617.
- Arterburn, D. E., Telem, D. A., Kushner, R. F., & Courcoulas, A. P. (2020). Benefits and Risks of Bariatric Surgery in Adults: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, **324**(9), 879–887.
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2017). Proteomics:

- Technologies and their applications. *Journal of Chromatographic Science*, **55**(2), 182–196.
- Benjamin Chun-Kit Tong. (2017). Obesity, Adipose Tissue and Vascular Dysfunction. *Physiology & Behavior*, **176**(5), 139–148.
- Biobaku, F., Ghanim, H., Monte, S. V., Caruana, J. A., & Dandona, P. (2020). Bariatric surgery: Remission of inflammation, cardiometabolic benefits, and common adverse effects. *Journal of the Endocrine Society*, **4**(9), bvaa049.
- Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, **15**(5), 288–298.
- Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: Clinical and Experimental*, **65**(8), 1038–1048.
- Byrne, C. D., & Targher, G. (2015). NAFLD: A multisystem disease. *Journal of Hepatology*, **62**(S1), S47-64.
- Cameron, A. J., Magliano, D. J., & Söderberg, S. (2013). A systematic review of the impact of including both waist and hip circumference in risk models for cardiovascular diseases, diabetes and mortality. *Obesity Reviews*, **14**(1), 86–94.
- Candiano, G., Musante, L., Petretto, A., ... Ghiggeri, G. (2018). *Proteomics of plasma and urine in primary nephrotic syndrome in children. Contributions to Nephrology*, Vol. 160.
- Cena, H., Chiovato, L., & Nappi, R. E. (2020). Obesity, Polycystic Ovary Syndrome, and Infertility: A New Avenue for GLP-1 Receptor Agonists. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, pp. 2695–2709.
- Chooi, Y. C., Ding, C., & Magkos, F. (2019). The epidemiology of obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental*, **92**, 6–10.
- De La Rica, R., & Stevens, M. M. (2012). Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. *Nature Nanotechnology*, **7**(12), 821–824.
- de Mello, A. H., Costa, A. B., Engel, J. D. G., & Rezin, G. T. (2018). Mitochondrial

- dysfunction in obesity. *Life Sciences*, **192**, 26–32.
- Drager, L. F., Togeriro, S. M., Polotsky, V. Y., & Lorenzi-Filho, G. (2013). Obstructive Sleep Apnea: A Cardiometabolic Risk in Obesity and the Metabolic Syndrome. *J Am Coll Cardiol*, **62**(7), 569–576.
- Elmugabil, A., Rayis, D. A., Abdelmageed, R. E., Adam, I., & Gasim, G. I. (2017). High level of hemoglobin, white blood cells and obesity among Sudanese women in early pregnancy: A cross-sectional study. *Future Science OA*, **3**(2).
- Epskamp, S., Cramer, A. O. J., Waldorp, L. J., Schmittmann, V. D., & Borsboom, D. (2012). Qgraph: Network visualizations of relationships in psychometric data. *Journal of Statistical Software*, **48**(4).
- Evers, S. S., Sandoval, D. A., & Seeley, R. J. (2017). The Physiology and Molecular Underpinnings of the Effects of Bariatric Surgery on Obesity and Diabetes. *Annual Review of Physiology*, **79**, 313–334.
- Fang, X., Henao-Mejia, J., & Henrickson, S. E. (2020). Obesity and immune status in children. *Current Opinion in Pediatrics*, **32**(6), 805–815.
- Fulton, S., Décarie-Spain, L., Fioramonti, X., Guiard, B., & Nakajima, S. (2022). The menace of obesity to depression and anxiety prevalence. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **33**(1), 18–35.
- Furuhashi, M., Sakuma, I., Morimoto, T., ... Ueda, S. (2020). Independent and Distinct Associations of FABP4 and FABP5 With Metabolic Parameters in Type 2 Diabetes Mellitus. *Frontiers in Endocrinology*, **11**, 575557.
- Gawas, U. B., Mandrekar, V. K., & Majik, M. S. (2019). Structural analysis of proteins using X-ray diffraction technique. *Advances in Biological Science Research: A Practical Approach*, 69–84.
- Genua, I., Ramos, A., Caimari, F., ... Miñambres, I. (2020). Effects of Bariatric Surgery on HDL Cholesterol. *Obesity Surgery*, **30**(5), 1793–1798.
- Gingras, A. C., Gstaiger, M., Raught, B., & Aebersold, R. (2007). Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**(8), 645–654.

- Golay, A., & Ybarra, J. (2005). Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, **19**(4), 649–663.
- Guangzhong, X., & Song, M. (2021). Recent advances in the mechanism underlying the beneficial effects of bariatric and metabolic surgery. *Surg Obes Relat Dis*, **17**(1), 139–148.
- Haddad, D., Al Madhoun, A., Nizam, R., & Al-Mulla, F. (2020). Role of Caveolin-1 in Diabetes and Its Complications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 9761539.
- Hall, J., do Carmo, J., da Silva, A., Wang, Z., & Hall, M. (2019). Obesity, kidney dysfunction and hypertension: mechanistic links. *Nat Rev Nephrol*, **15**(6), 367–385.
- Harsha, H. C., Molina, H., & Pandey, A. (2008). Quantitative proteomics using stable isotope labeling with amino acids in cell culture. *Nature Protocols*, **3**(3), 505–516.
- He, Q. Y., & Chiu, J. F. (2003). Proteomics in biomarker discovery and drug development. *Journal of Cellular Biochemistry*, **89**(5), 868–886.
- Hristova, V. A., & Chan, D. W. (2019). Cancer biomarker discovery and translation: proteomics and beyond. *Expert Review of Proteomics*, **16**(2), 93–103.
- Ibrahim, M. M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: Structural and functional differences. *Obesity Reviews*, **11**(1), 11–18.
- Insenser, M., Vilarrasa, N., Vendrell, J., & Escobar-Morreale, H. F. (2021). Remission of diabetes following bariatric surgery: Plasma proteomic profiles. *Journal of Clinical Medicine*, **10**(17).
- Iyengar, N. M., Gucalp, A., Dannenberg, A. J., & Hudis, C. A. (2016). Obesity and cancer mechanisms: Tumor microenvironment and inflammation. *Journal of Clinical Oncology*, **34**(35), 4270–4276.
- Kahn, S. E., Hull, R. L., & Utzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, **444**(7121), 840–6.
- Karczewski, J., Śledzińska, E., Batur, A., ... Dobrowolska, A. (2018). Obesity and inflammation. *European Cytokine Network*, **29**(3), 83–94.
- Kaushansky, A., Allen, J. ., Gordus, A., ... MacBeath, G. (2010). Quantifying protein–

- protein interactions in high throughput using protein domain microarrays. *Nat Protoc.*, **5**(4), 773–790.
- Kawai, T., Autieri, M. V., & Scalia, R. (2021). Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, **320**(3), C375–C391.
- Kolb, R., Sutterwala, F. S., & Zhand, W. (2016). Obesity and cancer: inflammation bridges the two. *Curr Opin Pharmacol.*, **29**, 77–89.
- Lavie, C. J., Milani, R. V., & Ventura, H. O. (2009). Obesity and Cardiovascular Disease. Risk Factor, Paradox, and Impact of Weight Loss. *Journal of the American College of Cardiology*, **53**(21), 1925–1932.
- le Roux, C. W., & Heneghan, H. M. (2018). Bariatric Surgery for Obesity. *Medical Clinics of North America*, **102**(1), 165–182.
- Lee, A. H., & Dixit, V. D. (2020). Dietary Regulation of Immunity. *Ann Oncol*, **53**(3), 510–523.
- Ling, C., & Rönn, T. (2019). Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Metabolism*, **29**(5), 1028–1044.
- Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., ... Miele, C. (2019). Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**(9).
- Lopaschuk, G. D., Karwi, Q. G., Tian, R., Wende, A. R., & Abel, E. D. (2021). Cardiac Energy Metabolism in Heart Failure. *Circulation Research*, **128**(10), 1487–1513.
- Luppino, F. S., De Wit, L. M., Bouvy, P. F., ... Zitman, F. G. (2010). Overweight, obesity, and depression: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Archives of General Psychiatry*, **67**(3), 220–229.
- Maggio, C. A., & Pi-Sunyer, F. X. (2003). Obesity and type 2 diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, **32**(4), 805–822.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, **28**(7),

412–419.

Mayoral LP, Andrade GM, Mayoral EP, Huerta TH, Canseco SP, & Rodal Canales FJ et al. (2020). Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. *The Indian Journal of Medical Research*, **151**(1), 11–21.

Mikhail, N., Golub, M. S., & Tuck, M. L. (1999). Obesity and hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases*, **42**(1), 39–58.

Monti, C., Zilocchi, M., Colugnat, I., & Alberio, T. (2019). Proteomics turns functional. *Journal of Proteomics*, **198**, 36–44.

Mueller, C., Haymond, A., Davis, J. B., Williams, A., & Espina, V. (2018). Protein biomarkers for subtyping breast cancer and implications for future research. *Expert Review of Proteomics*, **15**(2), 131–152.

Neverova, I., & Van Eyk, J. E. (2005). Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **815**(1–2), 51–63.

Niazi, R. K., Gjesing, A. P., Hollensted, M., ... Hansen, T. (2019). Screening of 31 genes involved in monogenic forms of obesity in 23 Pakistani probands with early-onset childhood obesity: a case report. *BMC Medical Genetics*, **20**(1), 152.

Obesity and overweight. (n.d.). Retrieved May 27, 2022, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

Osman, O. S., Selway, J. L., Kępczyńska, M. A., ... Langlands, K. (2013). A novel automated image analysis method for accurate adipocyte quantification. *Adipocyte*, **2**(3), 160–164.

Padwal, R., Klarenbach, S., Wiebe, N., ... Tonelli, M. (2011). Bariatric surgery: A systematic review of the clinical and economic evidence. *Journal of General Internal Medicine*, **26**(10), 1183–1194.

Panos, A., & Mavridis, D. (2020). TableOne: An online web application and R package for summarising and visualising data. *Evidence-Based Mental Health*, **23**(3), 127–130.

Peng, L., Cantor, D. I., Huang, C., Wang, K., Baker, M. S., & Nice, E. C. (2018). Tissue

- and plasma proteomics for early stage cancer detection. *Molecular Omics*, **14**(6), 405–423.
- Qin, X., & Tso, P. (2012). The Role of Apolipoprotein AIV on the Control of Food Intake. *Current Drug Targets*, **6**(2), 145–151.
- Ren, J., Wu, N. N., Wang, S., Sowers, J. R., & Zhang, Y. (2021). Obesity Cardiomyopathy. Evidence, Mechanisms, and Therapeutic Implications.pdf, **101**(4), 1745–1807.
- Samson, S. L., & Garber, A. J. (2014). Metabolic syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, **43**(1), 1–23.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, **9**(7), 671–675.
- Seravalle, G., & Grassi, G. (2017). Obesity and hypertension. *Pharmacological Research*, **122**, 1–7.
- Shiio, Y., & Aebersold, R. (2006). Quantitative proteome analysis using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nature Protocols*, **1**(1), 139–145.
- Tan, C. H., Al-Kalifah, N., Ser, K. H., Lee, Y. C., Chen, J. C., & Lee, W. J. (2018). Long-term effect of bariatric surgery on resolution of nonalcoholic steatohepatitis (NASH): An external validation and application of a clinical NASH score. *Surgery for Obesity and Related Diseases*, **14**(10), 1600–1606.
- Unwin, R. D. (2010). Quantification of proteins by iTRAQ. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **658**, 205–215.
- Vekic, J., Zeljkovic, A., Stefanovic, A., Jelic-Ivanovic, Z., & Spasojevic-Kalimanovska, V. (2019). Obesity and dyslipidemia. *Metabolism: Clinical and Experimental*, **92**, 71–81.
- Viswanathan, S., Ünlü, M., & Minden, J. S. (2006). Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Nature Protocols*, **1**(3), 1351–1358.
- WHO. (2021). Obesity and Overweight. Accessed 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
- Williams, E. P., Mesidor, M., Winters, K., Dubbert, P. M., & Wyatt, S. B. (2015).

Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. *Current Obesity Reports*, **4**(3), 363–370.

Woreta, T. A., & Alqahtani, S. A. (2014). Evaluation of abnormal liver tests. *Medical Clinics of North America*, **98**(1), 1–16.

Zia, K., Siddiqui, T., Ali, S., Farooq, I., Zafar, M. S., & Khurshid, Z. (2019). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Medical and Dental Applications: A Comprehensive Review. *European Journal of Dentistry*, **13**(1), 124–128.

AUTOAVALUACIÓ

L'objectiu de la meua estada a la Unitat de Recerca Biomèdica era completar la meua formació professional mitjançant l'aplicació dels continguts teòrics i pràctics que he adquirit durant la carrera. Aquestes expectatives s'han complert i fins i tot, l'aprenentatge adquirit va més enllà d'això. En l'àmbit científic, he tingut l'oportunitat d'assimilar amb més profunditat i realitzar tècniques de l'àmbit biotecnològic, fet que m'ha permès entendre millor la seva aplicabilitat en recerca. També he estat capaç d'analitzar, gestionar i interpretar la informació de les dades obtingudes amb tècniques estadístiques, i amb la cerca i anàlisi d'articles ja publicats i bases de dades biològiques (proteòmiques principalment). A més, he estat capaç d'aprendre a treballar de forma autònoma a l'hora de gestionar el projecte, així com de comunicar informació, idees, problemes i solucions als meus companys del laboratori. Addicionalment, he pogut potenciar altres aptituds importants com la responsabilitat, la iniciativa, la seguretat i el treball en equip, aspectes que considero imprescindibles per al meu futur. Tot això sumat a un gran sentiment d'autorealització per tot el desenvolupament personal i professional que he experimentat.

AGRAÏMENTS

M'agradaria agrair a totes aquelles persones que m'han acompanyat al llarg de la meua etapa com a estudiant universitària. En primer lloc, a tots els professors que he tingut durant la carrera per haver impulsat el meu coneixement i interès cap a l'àmbit científic i per ajudar-me a créixer com a professional, en particular al meu tutor del Treball de Final de Grau, el Dr. Santiago García Vallvé per haver-me fet millorar i donat suport, estic molt agraïda per totes les recomanacions i consells que m'has donat.

Segonament, a tot l'equip de la Unitat de Recerca Biomèdica per haver-me fet sentir molt còmoda. En especial al Prof. Jorge Joven per donar-me l'oportunitat de realitzar les meves

pràctiques curriculars amb el seu grup i a la meua tutora de pràctiques i supervisora del treball. Gràcies Helena per confiar en mi, per ajudar-me en tot sempre que t'ho he demanat i per la teua paciència en explicar-me les coses tantes vegades com fos necessari, m'has fet créixer com a científica i has fet que tingui més ganes d'aprendre i d'avançar en aquest món. També agraeixo molt a la Irene per haver viscut aquesta experiència amb mi, pel teu suport i per haver fet que aquesta etapa fos molt més fàcil i divertida.

A més a més, m'agradaria agrair a la meua família, especialment als meus pares i al meu germà, per haver-me acompanyat i recolzat durant tota la meua vida, per motivar-me a continuar en els moments bons i en els més difícils i per haver contribuït a ser com soc.

Finalment, a tots els amics que he fet durant la carrera per fer d'aquesta època una de les millors que he viscut i a les meves amigues de tota la vida per fer-me costat sempre.

ANNEXOS

Annex 1. Anàlisis proteòmic per mostres tissulars i plasmàtiques

6.1. Anàlisi per mostres tissulars

1.1. Extracció i quantificació proteica

Es van pesar les mostres de teixit (25-30 mg) i es va fer una lisis cel·lular segons el protocol del tampó RIPA (*Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estats Units*): primer, es va addicionar 1mL del tampó RIPA i es va homogeneïtzar completament amb un BlueBender amb 3 cicles de congelació-descongelació amb nitrogen líquid i després es va agitar 1 hora a 4°C i centrifugar. Després de la centrifugació, es va usar el sonicador amb un pols de 30s al 50% d'amplitud. A continuació, les mostres van ser centrifugades a 14000 rpm durant 15 minuts i es van recollir els sobrenadants per a fer la precipitació de proteïnes mitjançant l'addició d'una solució amb un 10% de TCA/acetona (àcid tricloroacètic/acetona). Els pelets de les proteïnes es van resuspendre en una solució 6M d'urea i 50mM de bicarbonat d'amoni (ABC) i es van quantificar amb el mètode Bradford (figura 15).

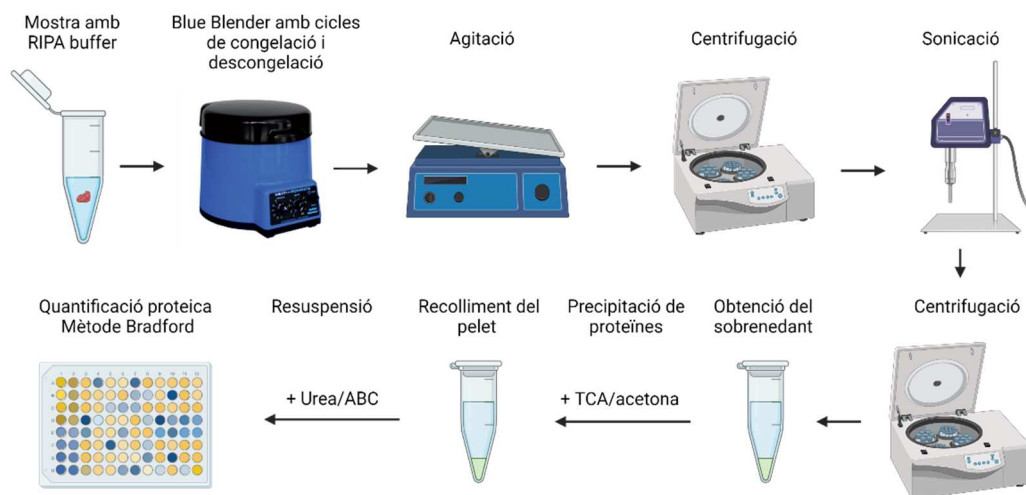


Figura suplementària 1. Esquema del procés d'extracció i quantificació proteica

1.2. Digestió proteica i marcatge peptídic 10-plex TMT

Es van reduir 30 µg de proteïna amb una solució 4 mM de 1,4 Ditiotretitol (DTT) durant 1 h a 37°C i es va fer una alquilació amb 8 mM de iodoacetamina (IAA) durant 30 minuts a 25°C en un ambient sense llum. Posteriorment, les mostres es van digerir durant tota la nit (pH 8,0 i 37°) amb la proteasa tripsina de grau de seqüenciació (Promega, Wisconsin, USA) i amb Lys-C (Wako, Richmond, USA), a una relació enzim:proteïna de 1:50. Passat el temps, la digestió es va parar per acidificació mitjançant una solució d'àcid fòrmic al 1% v/v. A continuació, els pèptids es van dessalinitzar en una columna Oasis HLB SPE (Waters, Massachusetts, USA) just abans de fer marcatge amb TMT 10-plex (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) seguint les instruccions del fabricant (figura 16).

Per normalitzar totes les mostres del estudi d'entre els diferents lots de TMT multiplexats utilitzats, es va etiquetar un grup (pool) que contenia totes les mostres amb l'etiqueta TMT-126 i es va incloure en cada lot de TMT. Finalment, els diferents lots de TMT 10-plex es van dessalinitzar en columnes Oasis HLB SPE abans de l'anàlisi de nano-LC-MC (figura 16).

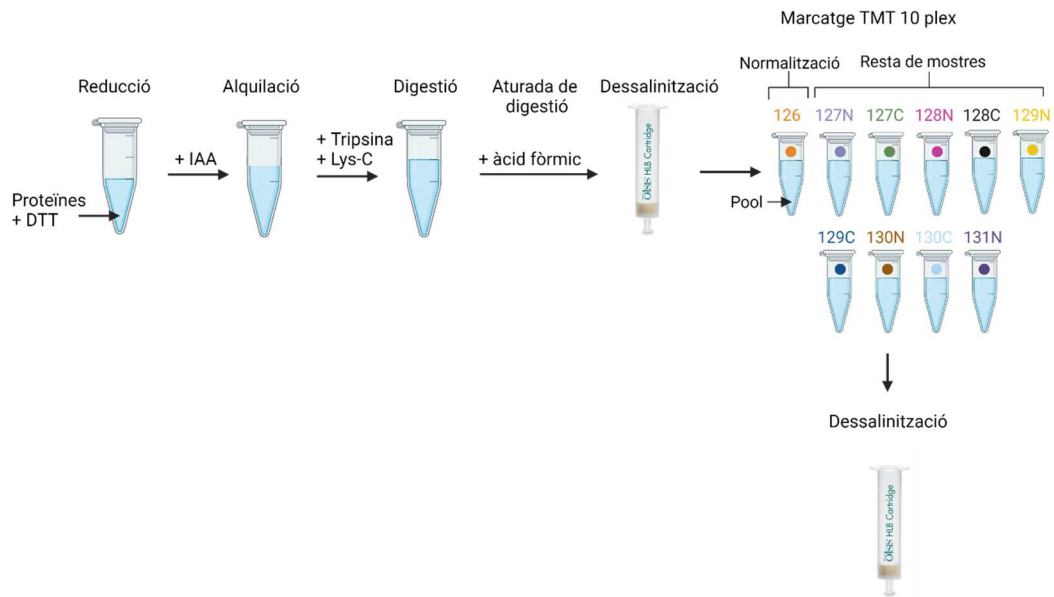


Figura suplementària 2. Esquema del procés de digestió proteica i marcatge peptídic 10-plex TMT

1.3. Anàlisi *Offgel-nanoLC (Orbitrap)/Espectrometria de masses (MS)*

Les mostres marcades i multiplexades van ser fraccionades amb el mètode Off-gel (Tecnologia Agilent) seguint el protocol del fabricant. Les mostres es van fraccionar en 12 fraccions no lineals de pH 3-10. Seguidament, la fracció 1 (F1) es va barrejar amb la fracció 7 (F7), la F2 amb la F8, i així amb la resta de fraccions. Es van obtenir un total de 6 fraccions i es van separar en una columna de fase reversa (RP) de C18 (75 µm de I.D, 15 cm de longitud, 3 µm de diàmetre de partícula, Nikkyo Technos Co. LTD, Japó) en un nanoLC EASY-II de Thermo Fisher. La separació cromatogràfica es va realitzar en un gradient de 90 minuts utilitzant aigua Mili-Q (0,1% d'àcid fòrmic) i acetonitril (0,1% d'àcid fòrmic) com a fase mòbil a un cabal de 300 nL/min (figura 17).

Els anàlisis d'espectrometria de masses es van realitzar en un LTQ-Orbitrap Velos Pro de Thermo Fisher mitjançant un espectròmetre de masses (R=30000 FHMW) seguit d'una adquisició FTMS/MS dependent de dades (R=15000 FHMW, 40% HCD) dels deu ions principals més intensos amb un rebuig de l'estat de càrrega d'1 i una exclusió dinàmica de 0,5 min (figura 17).

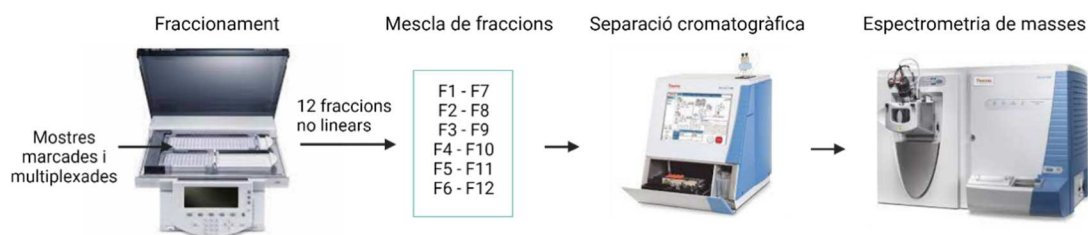


Figura suplementària 3. Esquema del procés d'anàlisi Offgel-nanoLC (Orbitrap)/Espectrometria de masses

1.4. Identificació proteica i quantificació

La identificació/quantificació es va dur a terme en el software *Proteome Discoverer v.1.4.0.288* (Thermo Fisher) mitjançant la Tecnologia d'Identificació de Proteïnes Multidimensional (MudPIT) que combina els 6 arxius de dades sense processar obtinguts després del fraccionament Off-Gel.

Per a la identificació de proteïnes, tots els espectres MS i MS/MS es van analitzar usant el cercador Mascot (v.2.5). El flux de treball configura usant 2 nodes Mascot diferents que combinen la base de dades Homo Sapiens (74449 entrades) i la base de dades de contaminants (247 entrades), ambdós cerques suposant digestió amb tripsina. Es van permetre 2 escissions omeses i un error de 0,02 Da per a la massa de fragmentació de FT-MS/MS i de 10,0 ppm per a una massa d'ions originals de FT-MS.

TMT-10plex es va configurar com a modificació de quantificació i oxidació de metionina i l'acetilació de N-terminals es va establir com a modificació dinàmica, mentre que la carbamidometilació de la cisteïna es va establir com a modificació estàtica. El rati de fals descobriment (FDR) i les probabilitats de les proteïnes es van calcular mitjançant Percolador.

Per a la quantificació de proteïnes, es van usar els ratis de cada marcatge TMT sobre el marcatge TMT-126 i els resultats de la quantificació es van normalitzar en base a la mediana de les proteïnes.

2. Anàlisi proteòmic per mostres de plasma

2.1. Extracció i quantificació proteica de les mostres de plasma

Abans de l'anàlisi proteòmic, es va fer depleció de les 7 proteïnes plasmàtiques més abundants (albúmina, IgG, antitripsina, IgA, transferrina, haptoglobina i fibrinogen) per incrementar el nombre de proteïnes identificades/quantificades. Per això, 12 µL de cada mostra es van passar dues vegades a través de l'aparell MARS (*Human-7 Multiple Affinity*

Removal Spin) de *Agilent Technologies*. El flux de les fraccions es va recollir per a l'anàlisi proteòmic seguint el protocol del fabricant. El flux de les fraccions es van concentrar i el tampó es va intercanviar per una solució d'aproximadament 100 µL d'urea 6 M en bicarbonat d'amoni (ABC) mitjançant l'ús de columnes de centrifugació 5K MWCO (Agilen 5185-5991). De la solució final, es va realitzar una quantificació proteica amb el mètode Bradford (figura 18).

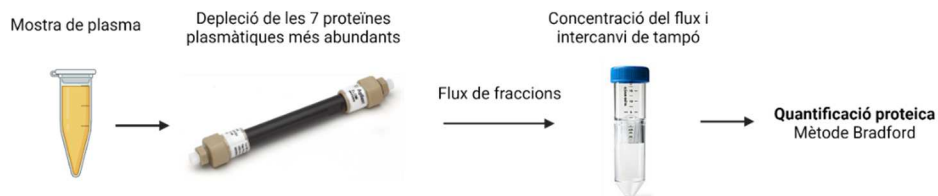


Figura suplementària 4. Esquema del procés d'extracció i quantificació proteica de mostres de plasma

2.2. Digestió proteica i marcatge peptídic 11-plex TMT

30 µg de proteïna total es van reduir amb 4mM de 1.4-Dithiothreitol (DTT) durant 1h a 37°C i es va fer una alquilació amb 8 mM de iodoacetamina (IAA) durant 30 minuts a 25°C en un ambient fosc. Després, les mostres es van sotmetre a digestió durant tota la nit (pH 8,0 i 37°C) amb la proteasa tripsina de grau de seqüenciació (Promega, Wisconsin, USA) i amb Lys-C (Wako, Richmond, USA), a una relació enzim:proteïna de 1:50. La digestió es va parar per acidificació mitjançant una solució d'àcid fòrmic al 1% v/v i els pèptids es van dessalinitzar en una columna Oasis HLB SPE (Waters, Massachusetts, USA) abans del marcatge amb TMT 11-plex (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) seguint les instruccions del fabricant (figura 19).

Per normalitzar totes les mostres del estudi d'entre els diferents lots de TMT multiplexats utilitzats, es va marcar un grup (pool) que contenia totes les mostres amb l'etiqueta TMT-126 i es va incloure en cada lot de TMT. Els diferents lots de TMT 11-plexs es van dessalinitzar en columnes Oasis HLB SPE (figura 19).

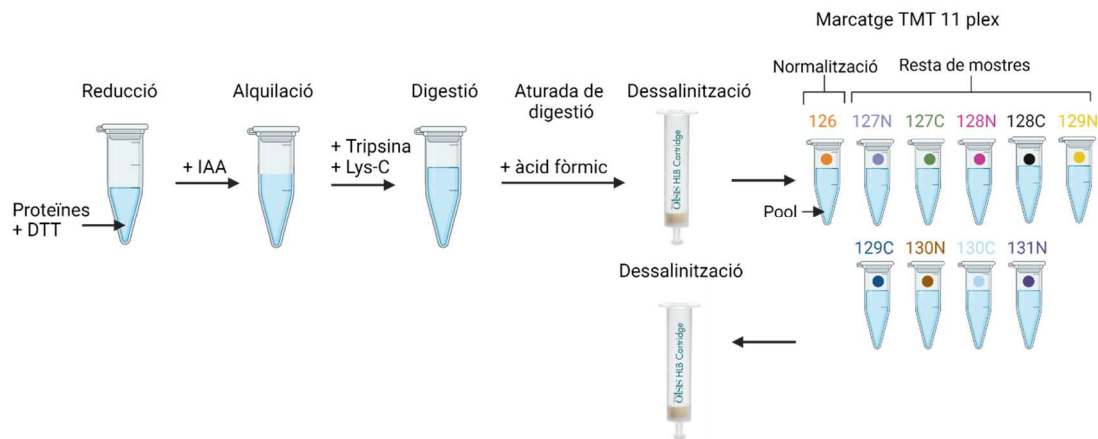


Figura suplementària 5. Esquema del procés de digestió proteica i marcatge peptídic 11-plex TMT

2.3. Anàlisi nanoLC (Orbitrap)/Espectrometria de masses (MS)

Els pèptids marcats i multiplexats es van carregar en una nanocolumna trampa (100 µm de D.I; 2 cm de longitud; 5 µm de diàmetre de partícula, *Thermo Fisher Scientific, CA, EE.UU*) i es van separar en una nanocolumna de fase reversa (RP) C-18 (75 µm de I.D, 15 cm de longitud, 3 µm de diàmetre de partícula, *Nikkyo Technos Co. LTD, Japó*) en un nanoLC EASY-II de Thermo Fisher. La separació cromatogràfica es va realitzar en un gradient de 180 minuts utilitzant aigua Mili-Q (0,1% d'àcid fòrmic) i acetonitril (0,1% d'àcid fòrmic) com a fase mòbil a un cabal de 300 nL/min. Cada mostra es va analitzar per triplicat per incrementar el rendiment del proteoma (figura 20).

Els anàlisis d'espectrometria de masses es van realitzar en un LTQ-Orbitrap Velos Pro de Thermo Fisher mitjançant un espectre de d'espectròmetre de masses millorat (R=30000 FHMW) seguit d'una adquisició FTMS/MS dependent de dades (R=15000 FHMW, 40% HCD) dels deu ions principals més intensos amb un rebuig del estat de càrrega de 1 i una exclusió dinàmica de 0,5 min (figura 20).

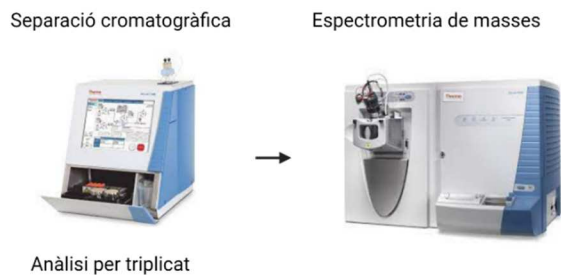


Figura suplementària 6. Esquema del procés d'anàlisi nanoLC (Orbitrap)/Espectrometria de masses

2.4. Identificació proteica i quantificació

Per a la identificació i quantificació proteica es va realitzar el mateix procediment que en el descrit per les mostres de teixit (apartat 1.4. d'annexos 1).

Taula S1. Proteïnes identificades i destacades en les comparatives entre els teixits adiposos visceral i subcutani durant l'obesitat (ordenades alfabèticament).

| ID Swiss-Prot | Nom del compost | Procés biològic |
|---------------|--|--|
| A0A1X7SC65 | Proteïna de xoc tèrmic beta-6 | Regulació de la resposta a l'exposició de condicions estressants |
| E7EQB2 | Lactoferrina | Regulació de la resposta immunitària |
| O75531 | Factor de barrera de l'autointegració | Regulació de la resposta immunitària, integració de l'ADN, segregació i condensació de cromosomes. |
| P01861 | Immunoglobulina constant pesada gamma | Regulació de la resposta immunitària adaptativa |
| P08754 | Subunitat alfa-3 de la proteïna G d'unió a nucleòtids de guanina | Regulació del cycle cel·lular |
| P09960 | Leucotriè A-4 hidrolasa | Síntesi de leucotriè |
| P30086 | Proteïna d'unió a fosfatidiletanolamina | Regulació de la cascada de MAPK |
| P55263 | Adenosina quinasa | Biosíntesi d'ATP |
| Q01469 | Proteïna d'unió a àcids grassos 5 | Regulació del metabolisme de la glucosa i de lípids. |
| Q03135 | Caveolina 1 | Regulació de processos cel·lulars com el transport del colesterol. |
| Q16853 | Membrana amino oxidasa primària | Regulació de la resposta inflamatòria |
| Q5JXI8 | Proteïna 1 de quatre dominis LIM i mig | Desenvolupament del múscul dels òrgans |
| Q5W0S5 | Proteïna RAD23 de reparació de l'escissió UV | Reparació de danys cel·lulars |
| Q969G5 | Proteïna associada a caveolae 3 | Regulació de processos cel·lulars mitjançant la unió a proteïnes quinasa |
| Q96QV6 | Histona H2A tipus 1-A | Organització de la cromatina |
| Q99584 | Proteïna S100-A13 | Regulació de la resposta immunitària |

Taula S2. Proteïnes identificades i destacades en les comparatives de plasma dels grups d'estudi (ordenades alfabèticament).

| ID Swiss-prot | Nom del compost | Procés biològic |
|----------------------|---|--|
| G3XAM2 | Factor de complement I | Regulació de l'activació del complement |
| K7ERI9 | Apolipoproteïna C-I | Transport de lípids, regulació del procés metabòlic del colesterol, de lipoproteïnes i de triglicèrids |
| O75636 | Ficolina 3 | Activació del complement |
| O95445 | Apolipoproteïna M | Transport i homeòstasi del colesterol |
| P00738 | Haptoglobina | Resposta inflamatòria i de defensa i processos sistema immunitari |
| P01031 | Complement C5 | Activació del complement |
| P02741 | Proteïna c reactiva | Regulació de l'emmagatzematge de lípids, de la resposta inflamatòria i immunitària i activació del complement. |
| P02743 | Component P del sèrum amiloide | Regulació de la resposta inflamatòria i immunitària i del procés metabòlic de glicoproteïnes i activació del complement. |
| P02747 | Subcomponent C1q de la subunitat C del complement | Activació del complement i regulació de la resposta immunitària |
| P02775 | Proteïna plaquetària bàsica | Regulació de la resposta immunitària, inflamatòria i del transport transmembrana de glucosa. |
| P02790 | Hemopexina | Regulació de la resposta immunitària, del procés metabòlic i de transport del grup heme i de la homeòstasi de l'ió ferro en la cèl·lula. |
| P04217 | Glicoproteïna alfa 1-B | Regulació de la resposta immunitària. |
| P06727 | Apolipoproteïna A-IV | Regulació del procés de biosíntesi, homeòstasi i transport del colesterol i del procés metabòlic de lipoproteïnes. |
| P15636 | Proteasa 1 | Activitat endopeptidasa tipus serina. |
| P29622 | Calistatina | Regulació negativa de l'activitat endopeptidasa |
| P68871 | Subunitat beta de l'hemoglobina | Regulació del transport d'oxigen. |
| P69905 | Subunitat alfa de l'hemoglobina | Regulació del transport d'oxigen |
| Q13790 | Apolipoproteïna F | Regulació del procés metabòlic del colesterol i del procés metabòlic i de transport de lípids. |

Annex 2. Fitxa de seguiment del tutor del TFG

*Normativa de Treball Fi de Grau Facultat d'Enologia
Aprovada per Junta de Facultat d'Enologia del dia 30 d'octubre de 2014*

ANNEX 2

FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG

Nom i Cognoms de l'Alumne/a: Núria Mimbrero Pelegrí

Nom i Cognoms del Tutor/a: Santiago Garcia Vallvé

Data de la entrevista amb l'alumne: 24 Maig 2022

Recomanacions durant el seguiment: Durant el seguiment m'ha estat explicant el que ha fet a les PE i com volia plantejar les diferents seccions de la memòria de TFG. He vist diverses versions preliminars i esborranys i l'he fet un seguit de recomanacions per millorar la memòria (com definir un objectiu principal i diversos més específics, correccions de l'estil, de forma, ...)

Observacions: Ha tingut una actitud pro-activa i ha anat contactat amb mi durant tot aquest quadrimestre. El contacte ha estat principalment a través de correu electrònic. Ha seguit les meves recomanacions.

Observacions Darrera revisió:

Tot i no estar del tot acabada, la darrera versió de la memòria de TFG està molt avançada. Falten alguns retocs i acabar de redactar algun apartat de resultats, discussió i conclusions. Tot i això, crec que la Núria no tindrà cap problema en acabar la memòria a temps i que la memòria complirà amb els requisits per a que pugui ser presentada.

Signatura del Tutor/a

GARCIA
VALLVE,
SANTIAGO
(AUTENTICACI
ÓN)
Tarragona a 24 de Maig_2022

Firmado
digitalmente por
GARCIA VALLVE,
SANTIAGO
(AUTENTICACIÓN)
Fecha: 2022.05.24
20:10:58 +02'00'

Signatura del Alumne/a



