

**EXPLORANT EL PAPER DE LA CITOCINA GDF15 EN
NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE (NAFLD)**

Rosa Laura Castillo Contreras

TREBALL FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA

Tutor acadèmic i Supervisor: Dr Ricardo Rodríguez-Calvo, Bioquímica i Biotecnologia, Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi (URLA), ricardo.rodriguez@urv.cat

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

Data de convocatòria: Juny 2022

Jo, Rosa Laura Castillo Contreras, amb DNI 39954562C, sóc coneixedora de la guia de prevenció del plagi de 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 constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 7 de juny de 2022

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

AGRAÏMENTS:

Primer voldria agrair a tot l'equip de la URLA per donar-me l'oportunitat de poder realitzar les Pràctiques Externes i el Treball de Fi de Grau al seu grup.

Agrair al meu tutor, Ricardo Rodríguez-Calvo, per les recomanacions, l'orientació, els ànims i poder fer possible l'estudi.

Voldria donar les gràcies a les dues tècniques de laboratori, en especial a la Yaiza Esteban per ensenyar-me i deixar-me aprendre al seu costat de la manera més tendre possible i en tan bon ambient. També agrair als estudiants de doctorat, per donar-me un cop de demà sempre que els hi he demanat i fer-me sentir una més del grup.

També voldria donar les gràcies als meus amics més propers, per tot el suport i els ànims que sempre m'han donat i treure'm una rialla sempre, durant aquests 4 anys de carrera. Per últim agrair als meus pares i al meu germà per ser un dels meus grans suports i pilars, creure sempre en mi i treure'm un somriure quan més ho he necessitat.

ÍNDEX

1.	DADES DEL CENTRE.....	7
2.	RESUM.....	8
3.	INTRODUCCIÓ.....	9
3.1	MALALTIA HEPÀTICA NAFLD	9
3.2	DIAGNÒSTIC DE LA MALALTIA	10
3.3	NECESSITAT DE BIOMARCADORS.....	11
3.4	CITOCINA GDF15	11
3.5	RELACIÓ ENTRE GDF15 I NAFLD	12
4.	HIPOTESI.....	14
5.	OBJECTIU.....	14
6.	METODOLOGIA.....	15
6.1	CARACTERÍSTIQUES DEL GRUP POBLACIONAL	15
6.2	FLI.....	16
6.3	MODEL D'ANIMAL.....	16
6.4	ANALITZAR L'EXPRESSIÓ DE GDF15 EN TEIXIT HEPÀTIC DE RATOLINS.	17
6.4.1	EXTRACCIÓ D'ARN	17
6.4.2	QUANTIFICACIÓ DE L'ARN.....	17
6.4.3	OBTENCIÓ D'ADNc (RT)	18
6.4.4	qRT-PCR.....	18
6.5	ELISA.....	19
6.6	ANÀLISI ESTADÍSTIC	21
7.	RESULTATS.....	22
7.1	CARACTERÍSTIQUES DE LA POBLACIÓ ESTUDIADA	22
7.2	VALORS FLI I NIVELLS SÈRICS DE GDF15 EN PACIENTS METABÒLICS.....	23
7.3	CARACTERITZACIÓ MODEL DE RATOLINS C57BL/6J.....	25
7.4	QUANTIFICACIÓ DEL TRANSCRIT (ARNm) DE <i>Gdf15</i> EN EL TEIXIT HEPÀTIC DELS RATOLINS	25
7.5	NIVELL PLASMÀTIC DE GDF15 EN RATOLINS.....	26
7.6	ASSOCIACIONS DELS NIVELLS DE GDF15 AMB UN PERFIL DE TRIGILCÈRIDS HEPÀTICS INCREMENTATS AMB LA DIETA GRASSA.....	27
8.	DISCUSSIÓ.....	28
9.	CONCLUSIONS	30

10. BIBLIOGRAFIA.....	31
11. AUTOAVALUACIÓ.....	34
ANNEXOS.....	35

1. DADES DEL CENTRE

La Unitat de Recerca en Lípids i Arterioesclerosi (URLA), es troba dins de la unitat de nutrició i metabolisme del Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV). Forma part de la URV. La unitat es troba ubicada en la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la URV a Reus.

Aquest grup es va crear al 1985, hi treballen 18 persones involucrades en diferents línies de recerca, de les quals destaquen el metabolisme de lipoproteïnes, l'arterioesclerosi i bases moleculars de la dislipèmia aterògena; genètica i epigenètica dels trastorns lipídics. El seu objectiu doncs, és la recerca dels trastorns del metabolisme lipídic així com l'activitat docent i l'atenció assistencial.

2. RESUM

Se sap que la malaltia del fetge gras no alcohòlic (NAFLD) pot arribar a afectar a una de cada 4 persones en el món. Tot i ser una patologia de gran impacte, encara hi ha una manca de mètodes de detecció i seguiment de la malaltia eficaços. Hi ha estudis que relacionen la citocina GDF15 (*grow differentiation factor 15*) amb diverses patologies hepàtiques cròniques, intervenint en les característiques metabòliques, en el desenvolupament i resolució de la patologia, trobant-se molts cops sobre-expressada. Tenint en compte aquesta informació, es planteja GDF15 com a possible biomarcador no invasiu de la malaltia. A més a més, es tenen en compte resultats d'estudis anteriors per avaluar possibles associacions amb la citocina i els lípids hepàtics. Per tal de procedir amb l'estudi, s'avalua el paper de GDF15 en fetge gras amb mostres de pacients humans i amb mostres de ratolins, prèviament recollides.

Paraules clau: NAFLD, NASH, GDF15, dieta grassa, dieta estàndard, biomarcador, triglicèrids hepàtics, fetge.

3. INTRODUCCIÓ

3.1 MALALTIA HEPÀTICA NAFLD

L'acumulació de greix al fetge, independent al consum d'alcohol es coneix com NAFLD, en anglès *non-alcoholic fatty liver disease*. A nivell clínic, es considera una malaltia progressiva que abasta des del fetge gras no alcohòlic coneguda com NAFL (*non-alcoholic fatty liver*) fins la esteatohepatitis no alcohòlica, aquesta última es coneix com NASH (*non alcoholic steatohepatitis*) i correspon a un dels estats més avançats de la malaltia (Castera et al., 2019a). Aquesta acumulació de greix afecta al 25 % de la població general, trobant la prevalença per sobre 50% en pacients amb obesitat mòrbida, diabetis tipus 2, resistents a la insulina, en situacions de dislipèmies o amb malalties cardiovasculars (Younossi et al., 2015).

Durant aquests darrers anys, per tal de destacar la forta relació fisiopatològica entre l'esteatosi i la disfunció metabòlica, alguns especialistes van proposar un canvi en la nomenclatura; MAFLD, que correspon a *metabolic-associated fatty liver disease* (Eslam et al., 2020). En la nova nomenclatura proposada s'inclouen les malalties metabòliques causades pel consum abusiu d'alcohol i les malalties metabòliques independents a l'alcohol. Així doncs, tot i tenir present el canvi en les nomenclatures, aquest treball es centra en l'acumulació de greix hepàtic independent al consum d'alcohol. Per tal de no causar confusions i ser més precisos es mantindrà la nomenclatura clàssica.

NAFL es defineix com l'acumulació desproporcionada de triglicèrids en forma de gotes, en més del 5% dels hepatòcits quan la persona no és consumidora habitual d'alcohol dia. El consum d'alcohol en dones ha de ser menor a 20g/dia i en homes ha de ser menor a 40g/dia (Arab et al., 2018). És molt important descartar el consum d'alcohol superior als nivells esmentats ja que aquesta malaltia té similituds histopatològiques amb la malaltia hepàtica alcohòlica.

Per altra banda, NASH correspon a l'estadi més avançat de la malaltia. En aquest estat de la malaltia, al igual que en l'anterior, es pot arribar a produir

esteatosis hepàtica. S'observen diferents trets importants, com una inflamació lobular, així com el que es coneix en anglès com *hepatocyte ballooning*. Aquest últim terme fa referència a la degeneració globular dels hepatòcits, es tracta d'un allargament entre 1-2 vegades més del diàmetre dels hepatòcits, es defineix amb ajuda d'una tinció d'hematoxilina i eosina. Aquest estat avançat de la malaltia, també es caracteritza per haver-hi mort cel·lular i un risc elevat de fibrosi hepàtica (Arab et al., 2018; Moreno-Vedia et al., 2022). No obstant, el desenvolupament de NASH també comporta conseqüències intracel·lulars importants en els hepatòcits i en altres cèl·lules no parenquimatoses. Se sap que l'estrès de reticle endoplasmàtic així com la disfunció mitocondrial afavoreixen a l'acumulació de lípids hepàtics (Rodríguez-Calvo et al., 2021). A més a més, l'estrès oxidatiu contribueix a la progressió de NASH. Aquest estadi avançat de NAFLD pot evolucionar de manera irreversible fins la fase final de la malaltia hepàtica, conduint a l'aparició de cirrosi i de carcinoma hepatocel·lular, essent l'única alternativa terapèutica el transplantament de l'òrgan hepàtic (Arab et al., 2018).

3.2 DIAGNÒSTIC DE LA MALALTIA

Tot i tractar-se d'una malaltia hepàtica important, segueix estant infra-diagnosticada degut a la falta de mètodes eficaços per detectar-la i procedir al seguiment de la malaltia. Avui dia, el seu diagnòstic es fa a través de tècniques d'imatge com ecografies o ressonàncies magnètiques. Tot i així, les tècniques d'imatges per al diagnòstic requereixen d'una infraestructura no disponible en tots els hospitals (Otgonsuren et al., 2014) i presenten limitacions en funció de les característiques morfològiques dels pacients. El diagnòstic de la malaltia en estats primaris, on no hi ha cirrosi, acostuma a ser més difícil pel fet que la majoria dels pacients son asimptomàtics. Així doncs, la determinació de NAFLD en estats primerencs acostuma a ser casual i requereix d'una biòpsia hepàtica del pacient, sent una tècnica invasiva necessària per al diagnòstic definitiu.

3.3 NECESSITAT DE BIOMARCADORS

Tanmateix, l'enfoc actual per a diagnosticar la malaltia en les seves etapes primàries no és del tot adient, ni tampoc el més efectiu. Les tècniques que s'utilitzen comporten limitacions com el fet de ser invasives o no disposar de la infraestructura necessària (Castera et al., 2019; Otgonsuren et al., 2014). D'aquesta manera, la cerca de potencials biomarcadors no invasius que permetin la identificació, diagnòstic i seguiment de la malaltia és un camp actiu en la investigació dels últims anys. Recentment s'ha identificat GDF15 (*growth differentiation factor 15*) com a potencial biomarcador de malalties hepàtiques (Baek & Eling, 2019; Kim & Lee, 2021), tot i que el seu paper identificant la composició de triglicèrids hepàtics no ha estat explorat prèviament.

3.4 CITOCINA GDF15

GDF15 és una citocina de resposta a l'estrès secretada principalment per macròfags o hepatòcits com a resposta a l'estrès oxidatiu i la inflamació. Aquesta citocina es troba dins de la superfamília del factor de creixement transformant beta (TGF β). GDF15 també es coneix com NAG-1 (gen activador per medicaments antiinflamatoris no esteroideos-1), MIC-1 (citocina inhibidora de macròfags-1), PLAB (proteïna morfogenètica òssia placentària) i com a PTGFB (factor de creixement transformant de creixement beta de la placenta) (Baek & Eling, 2019; Kim & Lee, 2021).

El gen codificant per GDF-15 es troba al cromosoma 19p13.11. Està compost per dos exons i un intró. L'exó I està format per 309 pb de longitud trobant 58 seqüències no traduïdes. L'exó II té 647 pb donant lloc a 38 seqüències no traduïdes. Aquests exons estan separats per una seqüència intrònica de 1800 bp (Böttner et al., 1999).

El GDF-15 humà es sintetitza com a pro-GDF15 que s'acaba dimeritzant a través de residus de cisteïna per formar el dímer pro-GDF15, posteriorment, s'escindeix el motiu RXXR formant una proteïna dimèrica C-terminal de 112

aminoàcids i un pro-pèptid que acabarà donant lloc a la proteïna dimèrica madura de 25 kDa amb 224 aminoàcids totals (Figura 1) (Xu et al., 2011).

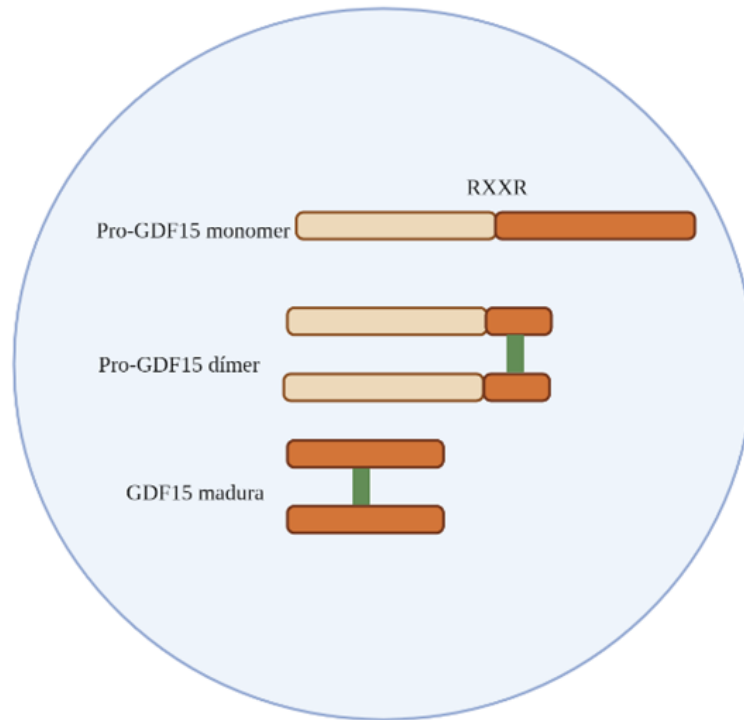


Figura 1: Procés de síntesi de GDF15.

3.5 RELACIÓ ENTRE GDF15 I NAFLD

El GDF15 es pot expressar en diversos tipus cel·lulars com poden ser els macròfags o els hepatòcits, entre d'altres. La seva expressió es pot augmentar davant de diferents situacions d'estrès d'òrgans intracel·lulars com l'estrès de reticle endoplasmàtic o davant una disfunció mitocondrial que pot generar estrès oxidatiu així com ROS (*reactive oxygen species*) (Kim & Lee, 2021). Fàrmacs antidiabètics com, la metformina, també poden arribar a induir l'expressió del GDF15 (Kim & Lee, 2021). Un cop els nivells de GDF15 han estat augmentats, aquest s'uneix al receptor GFRAL (*GDNF family receptor α -like*), produint efectes anorexigènics, reduint la ingesta i el pes corporal (Xu et al., 2011).

S'ha observat com l'expressió de GDF15 es troba incrementada en fetges de pacients diagnosticats amb malalties hepàtiques cròniques, possiblement com a conseqüència de diferents factors que influeixen en l'evolució de la malaltia.

Diferents estudis suggereixen que GDF15 podria induir-se al fetge com a mecanisme compensatori per protegir contra trastorns metabòlics com podria ser NAFLD (Adolph et al., 2018; Baek & Eling, 2019; Zhang et al., 2018). Com a conseqüència, s'arriba a pensar que GDF15 pot arribar a modular les característiques metabòliques d'aquest tipus de malaltia, tenint un paper dual en la malaltia contribuint en el desenvolupament i resolució de la malaltia (Wang et al., 2021).

Així doncs, l'estrès d'òrgans intracel·lulars com el de reticle endoplasmàtic o mitocondrial, juntament amb un estrès oxidatiu i l'acumulació de lípids hepàtics son alteracions observades durant el desenvolupament de la malaltia metabòlica NAFLD (Kim & Lee, 2021). Aquests fets, podrien induir l'expressió de GDF15, el qual podria ser utilitzat com a molècula biomarcadora de característiques representatives de NAFLD, tals com l'esteatosi hepàtica.

4. HIPOTESI

Tenint en compte el coneixement que es té de la malaltia NAFLD i de la citocina GDF15, es proposa com a hipòtesi que els nivells circulants de GDF15 podrien estimar el contingut de greix i la composició de triglicèrids hepàtics en individus amb risc de patir NAFLD. Així doncs, es podria considerar GDF15 com a possible biomarcador en potencia de la patologia estudiada.

5. OBJECTIU

Per tal d'explorar aquesta hipòtesis, els objectius específics d'aquest treball són:

1. Avaluar el paper de GDF15 com a potencial biomarcador del fetge gras en pacients amb un perfil metabòlic alterat.
2. Avaluar les possibles associacions de GDF15 amb el perfil de triglicèrids hepàtics característics del fetge gras en un model murí de la malaltia.

6. METODOLOGIA

6.1 CARACTERÍSTIQUES DEL GRUP POBLACIONAL

Se sap que una de cada quatre persones al voltant del món pateix NAFLD i concretament, en pacients metabòlics, el risc de patir la malaltia augmenta per sobre d'un 50 % (Younossi et al., 2015).

Tenint en compte aquests fets, la Unitat de Medicina Vascular i Metabolisme de l'hospital Sant Joan de Reus va procedir a fer un estudi amb 98 participants amb alteracions en el perfil metabòlic lipídic, diagnosticats amb diabetis, obesitat o síndrome metabòlica. Com a grup control van ser reclutats 58 voluntaris sense aquestes alteracions. Es van excloure pacients amb malalties pulmonars, renals o que patien hepatitis crònica així com individus amb un consum superior a d'alcohol, en dones de 20g/dia i en homes de 40g/dia d'alcohol. Cap dels participants en l'estudi estaven diagnosticats amb malaltia hepàtica viral o autoimmunitària. Es va establir com a pacient diabètic aquell amb una concentració de sucre en sang en dejú de 126 mg/dl, al sotmetre's a un test de tolerància oral; la concentració de glucosa corresponia a 200 mg/dl, també incloïen aquells pacients tractats amb medicaments antidiabètics. Es considerava un participant obès quan l'IMC (índex de massa corporal), d'aquest corresponia o superava els 30 kg/m². Pel que fa la malaltia metabòlica, es va definir segons l'acord dels criteris del *Adult Treatment Panel III criteria*. Es va obtenir el consentiment informat de tots els participants, així com l'aprovació del comitè ètic de l'hospital (Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili).

A més a més, cal destacar que es disposaven de variables clíniques prèvies d'aquests individus.

6.2 FLI

El paràmetre FLI (*fatty liver index*) és utilitzat com a eina de cribratge no invasiva (Otgonsuren et al., 2014).

FLI és un algoritme que s'obté de mesurar 4 variables clíniques: L'IMC perímetre de cintura (WC), triglicèrids (TG) i la gamma-glutamilttransferasa (GGT). És molt utilitzat en molts estudis epidemiològics en pacients metabòlics, ja que FLI es correlaciona amb la grassa hepàtica del pacient, definint la esteatosi hepàtica per sobre de 60 (Otgonsuren et al., 2014). A més a més, aquest algoritme és tracta d'una tècnica no invasiva que redueix els costos econòmics i es pot trobar a l'abast de tots els professionals.

$$FLI = \frac{(e^{0.953 \cdot \log_e(\text{triglycerides}) + 0.139 \cdot \text{BMI} + 0.718 \cdot \log_e(\text{ggt}) + 0.053 \cdot \text{waist circumference} - 15.745})}{(1 + e^{0.953 \cdot \log_e(\text{triglycerides}) + 0.139 \cdot \text{BMI} + 0.718 \cdot \log_e(\text{ggt}) + 0.053 \cdot \text{waist circumference} - 15.745})} \times 100$$

6.3 MODEL D'ANIMAL

Es treballa amb mostres prèviament recol·lectades de fetge provinents de ratolins mascles de la soca C57BL/6J. Aquests ratolins van ser distribuïts de manera aleatòria en dos grups i es van alimentar durant 12 setmanes amb dues dietes diferents. Un grup de ratolins van seguir una dieta *standard chow diet*, coneguda com dieta estàndard (STD, 10% de Kcal de grasses, n=9) que correspondrien al grup control i l'altre grup va ser alimentat seguint una dieta rica en grasses, també anomenada *high fat diet* (HFD, 60% Kcal de grasses, n=10). A les 12 setmanes, es va practicar l'eutanàsia als ratolins i es va extreure de manera immediata el fetge i el plasma. Aquests animals van ser caracteritzats prèviament i es disposaven de les variables utilitzades en aquest treball (Rodríguez-Calvo et al., 2020).

6.4 ANALITZAR L'EXPRESSION DE GDF15 EN TEIXIT HEPÀTIC DE RATOLINS.

6.4.1 EXTRACCIÓ D'ARN

Per tal d'analitzar l'expressió de GDF15 en el teixit hepàtic dels ratolins, es va extreure l'ARN d'aquest teixit. Per realitzar l'extracció d'ARN es va utilitzar el kit Ambion by Life Technologies, cat (#12183018A), seguint el protocol indicat.

Es necessari una sèrie de passos previs abans de procedir a l'extracció. En aquest cas, es va afegir buffer de lisi juntament amb mercaptoetanol a la mostra de teixit hepàtic per tal d'ajudar a disgregar el teixit. En aquest pas es podria haver guardat la mostra a -80°C fins que es realitzés l'extracció d'ARN.

Per continuar amb l'extracció de l'ARN de les mostres, es va afegir el mateix volum de buffer de lisis que d'etanol. Seguidament es va transferir a una columna juntament amb un tub recol·lector. Es va centrifugar a 12000g durant 30 segons a temperatura ambient, es va eliminar l'eluit del tub recol·lector ja que l'ARN es trobava retintut a la columna. Seguidament, es van realitzar diversos rentats amb diferents buffers a base d'alcohol. Es van anant centrifugant i eliminant l'eluit del tub recol·lector. Es va afegir RNasa-free water al centre de la columna, per tal d'eluir l'ARN del filtre de la columna. Es va procedir a incubar durant 1 minut a temperatura ambient, a continuació, es va centrifugar a 12000g durant 2 minuts per eluir l'ARN. Per últim, un cop es va obtenir l'ARN de les mostres, es va guardar a -20°C o -80°C abans de quantificar.

6.4.2 QUANTIFICACIÓ DE L'ARN

És important saber quina quantitat d'ARN s'ha extret en l'anterior procediment. Per aquest motiu es procedeix a quantificar l'ARN amb el Synergy (BioTek).

6.4.3 OBTENCIÓ D'ADNc (RT)

Per tal d'obtenir l'ADNc de les mostres es va fer una *reverse transcription* (RT). En la RT, en primer lloc, la transcriptasa reversa retrotranscriu l'ARNm per obtenir una cadena complementària monocatenària d'ADN, anomenada ADNc.

Per realitzar la RT es va utilitzar el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription; Life Technologies (#4368814). En aquesta tècnica és molt important que la mostra d'ARN no es contaminei, per aquest motiu l'espai de treball ha d'estar lliure de RNases. S'aconsella treballar sota cabina, sense aspiració. Tanmateix, és igual de important treballar amb fred.

Es va treballar amb 19 mostres. Primerament, es va fer el MIX, estava compost per RT buffer, dNTPs MIX, RT random primers, aigua lliure de nucleases i per últim es va afegir l'enzim MultiScribe Reverse Transcriptase. A continuació es va repartir 5µl de MIX a cada pou. Seguidament, es va afegir 1µg d'ARN de la mostra pertinent en un volum de 5µl amb aigua, a cada pou. Es va introduir la placa al termociclador i es va seleccionar el programa adient, en aquest cas una incubació a 37°C durant 2 hores, s'augmentava la temperatura fins a 85°C durant 5 segons i per últim la temperatura disminuïa fins 4°C. Un cop la reacció va acabar, es va recollir l'ADNc obtingut, es va diluir 10 vegades i es va congelar.

6.4.4 qRT-PCR

Per tal d'analitzar i quantificar l'expressió de GDF15 en el teixit hepàtic de ratolins C57BL/6J es va realitzar una *quantitative real time -polymerase chain reaction* (qRT-PCR).

La qRT-PCR combina l'amplificació i detecció en un únic pas, eliminant el pas de detecció mitjançant l'electroforesi en gel i permeten que el procés sigui realment quantitatiu. S'utilitzen colorants fluorescents per tal d'etiquetar els productes de PCR durant el cicle tèrmic. Els instruments de qPCR mesuren

l'acumulació durant la fase exponencial de la reacció per tal de quantificar de manera ràpida i precisa els productes, obtenint les dades.

Es va preparar el MIX que contenia l'assay-primer M1 GDF15 (*Integrated DNA Technologies IDT*), aigua i per últim TaqMan Master Mix. Es va tenir en compte un 10% d'excedent per evitar possibles pèrdues degudes al pipeteig. A cada pou es van carregar 8µl de MIX. Es van carregar 10 ng (2µl) d'ADNc de cada mostra. S'utilitzen dos pous com a control negatius, en els quals no es va amplificar res ja que no contenien ADNc, només MIX. A continuació, la placa es va introduir al termociclador (Light cycler 96, Roche), es va fer una primera pre-incubació a 50°C durant 120 segons, es realitza una segona pre-incubació a 95°C durant 120 segons. El termociclador realitza 40 cicles amb una fase de desnaturalització a 95°C durant 1 segon, a la fase d'anellament la temperatura disminueix a 60°C durant 20 segons.

Aquesta tècnica requereix d'una estratègia de normalització per garantir la fiabilitat de les dades. Normalment, es relativitza el gen diana amb un control endògen (*housekeeping*) ja que aquests s'expressen de forma constitutiva i estable en diferents tipus cel·lulars. En aquest cas es va treballar amb el gen *TATA-Box Binding Protein (Tbp)*.

6.5 ELISA

Els nivells circulants de GDF15 van ser determinats en sèrum de pacients i en plasma de ratolins. Per fer-ho es va utilitzar la tècnica *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) tipus Sandwich, utilitzant dos kits diferents. Pel que fa al plasma dels ratolins es va treballar amb el kit *Assay genie (MOFI00042)* i pel sèrum dels pacients es va utilitzar el kit *Human GDF-15/MIC-1 Elisa BioVendor RiD (RD191135200R)*. En l'ELISA tipus Sandwich, l'antigen queda immobilitzat entre dos anticossos, un de captura i un altre de detecció. Aquests anticossos s'uniran a dos epítops diferents de l'antigen i permetran la detecció indirecta d'aquest. Finalment, es catalitza una reacció enzimàtica colorimètrica que permetrà la futura quantificació.

Aquesta tècnica requereix d'una prova de dilució prèvia, amb l'objectiu d'observar que la concentració a llegir es troba dins dels límits de detecció de cada kit triat. Per altra banda, aquest pas determina si es necessari treballar amb mostres diluïdes.

S'utilitzen com a reactius el *wash buffer*, *sample dilution buffer* per tal de realitzar les dilucions seriades conjuntamet amb l'*stock solution*, el *biotin-labeled antibody*, el *HRP-Streptavidin Conjugate (SABC) working solution*, *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) substrate* com a solució fotosensible i solució STOP amb les quantitats que s'observen a la taula (Taula 1) juntament amb les mostres de sèrum i de plasma.

REACTIUS	QUANTITATS (per pous)
Wash buffer	210 µl
Sample dilution buffer	125 µl
Biotin-labeled Antibody	125 µl
SABC working solution	125 µl
TMB substrate	90 µl
STOP solution	50 µl
MOSTRES	120 µl

Taula 1: Reactius i quantitats necessàries per fer l'ELISA.

A més a més, es van fer dilucions seriades a partir de la solució stock de la qual es coneixia la concentració (125 pg/ml) amb l'objectiu d'obtenir una recta patró de referència i quantificar els nivells de GDF15. El rang de detecció es trobava entre 15,625pg/ml – 1000pg/ml. Els punts corresponents a aquesta recta van ser processats igual que els de les mostres.

Primerament es van fer rentats a la placa amb el *wash buffer*. Seguidament s'afegeix a cada pou la mostra adient i s'incuba durant el temps i a una temperatura indicada al protocol de cada kit procedir a fer una sèrie de rentats i a afegir el SABC. Es va incubar durant els temps que indicava cada protocol, seguidament es van fer rentats i es va afegir el TMB a cada pou. En els dos casos,

els períodes d'incubació van ser de 10 minuts. Ràpidament, es va afegir a cada pou la STOP solution. En aquest pas es va observar el canvi de color; de blau a groc. Finalment, es va procedir a llegir la placa a 450 nm amb el Synergy (BioTek). Per tal d'extreure els resultats, el software va facilitar l'equació de la corba estàndard, sabent els valors de l'absorbància de cada mostra; es va poder aïllar i conèixer la concentració de cada analit, en aquest cas es van poder saber els nivells circulants de GDF15 en sèrum de pacients i en plasma de ratolins.

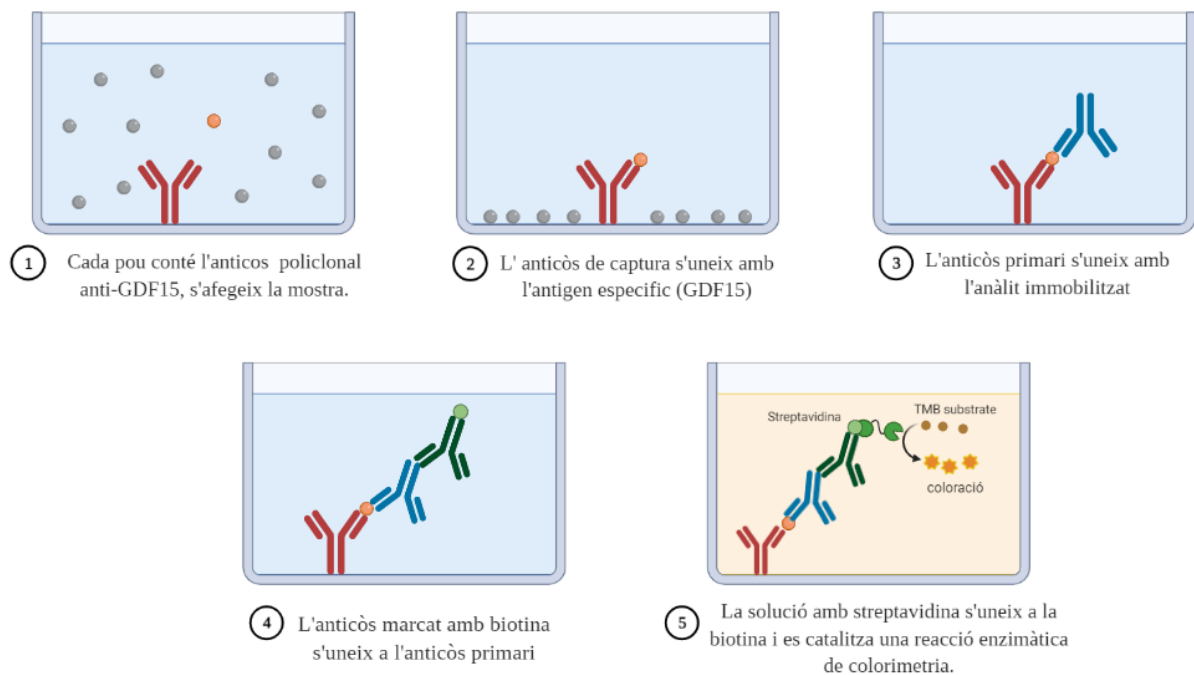


Figura 2: Descripció gràfica de la tècnica ELISA tipus Sandwich.

6.6 ANÀLISI ESTADÍSTIC

Pel que fa l'anàlisi estadístic en l'estudi en humans, les variables contínues s'expressen com a mitjana i rang interquartil. Les variables categòriques s'expressen com a nombres amb percentatge. Les diferències en els nivells circulants de GDF15 i de FLI en els estudis de cohort, es va realitzar utilitzant el test U de Mann-Whitney. Les correlacions entre les dues variables es van expressar amb el coeficients Rho de Spearman (r).

Per altra banda, a l'anàlisi estadístic de l'estudi amb ratolins les dades son expressades com a mitjana \pm error estàndard (SEM). Les diferències

significatives en els nivells d'ARN i en els nivells plasmàtics de GDF15 es van establir per t-student. Les correlacions per mesurar les associacions entre el nivell plasmàtic de GDF15 i els triglicèrids hepàtics seleccionats, es van realitzar mitjançant el coeficient Rho de Spearman (r). Es va fer una anàlisi de regressió lineal per observar la influència de GDF15 sobre els triglicèrids hepàtics. Els estudis d'associacions es van ajustar per àcids grassos no esterificats (NEFAS), per triglicèrids hepàtics i el pes dels ratolins.

Els anàlisis estadístics es van realitzar mitjançant el programa SPSS (IBM SPSS Statistics, versió 22.0). Les diferències es van considerar estadísticament significatives quan $P < 0,05$.

7. RESULTATS

7.1 CARACTERÍSTIQUES DE LA POBLACIÓ ESTUDIADA

Les característiques dels participants de l'estudi es troben a la Taula 2. Dels 156 pacients, 58 corresponen a voluntaris no metabòlics i 98 participants són pacients metabòlics. En el grup control la mitjana d'edat es situa en 48,5 anys, en canvi en el grup metabòlic la mitjana d'edat es situa en 62 anys ($P < 0,001$). Pel que fa a la diabetis, els participants del grup control cap pateix la malaltia. No obstant el 72,4% dels pacients amb un perfil metabòlic alterat pateixen diabetis. Cap participant del grup control presenta obesitat, la mitjana del pes es situa en 65,9 Kg amb una mitjana de l'IMC de 24,9 Kg/m². En canvi, el 56% dels participants del grup metabòlic presenten obesitat, amb un pes mitjà de 83 Kg acompanyat d'un IMC per sobre de 30 Kg/m². El 91,8% dels pacients d'aquest últim grup pateixen síndrome metabòlica. Els pacients metabòlics presenten nivells elevats de l'ALT (alanina aminotransferasa), GGT (gamma-glutamyl transferasa) i AST (aspartat aminotransferasa), comparats amb el grup control.

	Controls (N=58)	Metabòlic (N=98)	P-valor
Edat (Anys)	48.5 (39.8-53.3)	62.0 (53.4-68.0)	< 0.001
Gènere (D)	34 (58.6%)	49 (50%)	0.297
Diabetis	0 (0%)	71 (72.4%)	< 0.001
Obesitat	0 (0%)	55 (56.1%)	< 0.001
Síndrome Metabòlica	0 (0%)	90 (91.8%)	< 0.001
Pes (kg)	65.9 (61.4-78.4)	83.0 (74.3-94.2)	< 0.001
Perímetre de cintura (cm)	84.0 (79.0-91.0)	103.0 (97.0- 112.0)	< 0.001
IMC (Kg/m ²)	24.9 (23.1-26.8)	30.4 (28.6-33.6)	< 0.001
AST (U/L)	21.0 (19.0-24.3)	23.0 (20.8-29.3)	0.004
ALT (U/L)	13.0 (10.0-19.0)	20.0 (14.0-26.5)	< 0.001
GGT (U/L)	16.0 (13.0-20.3)	24.0 (16.8-40.3)	< 0.001

Taula 2: Característiques dels participants de l'estudi, grup control i grup metabòlic.

7.2 VALORS FLI I NIVELLS SÈRICS DE GDF15 EN PACIENTS METABÒLICS

Es va observar com en pacients metabòlics FLI es troba significativament més elevat, que en el grup control. Concretament els valors de FLI estaven 3,86 vegades més elevats en el grup metabòlic que en el grup control. (Control: [19,01 ± 2,25%]; Metabòlics: [73,45 ± 2,37 %,], P<0,001) (Figura 3-A).

Per altra banda es va voler analitzar la concentració sèrica de GDF15 en tots dos grups. Els nivells de GDF15 es trobaven 2,68 vegades incrementats en els

pacients metabòlics respecte als voluntaris sans (Controls: $[597,88 \pm 62,89]$ pg/mL; Metabòlics: $[1602,34 \pm 126,88]$ pg/mL, $P < 0.001$). (Figura 3-B)

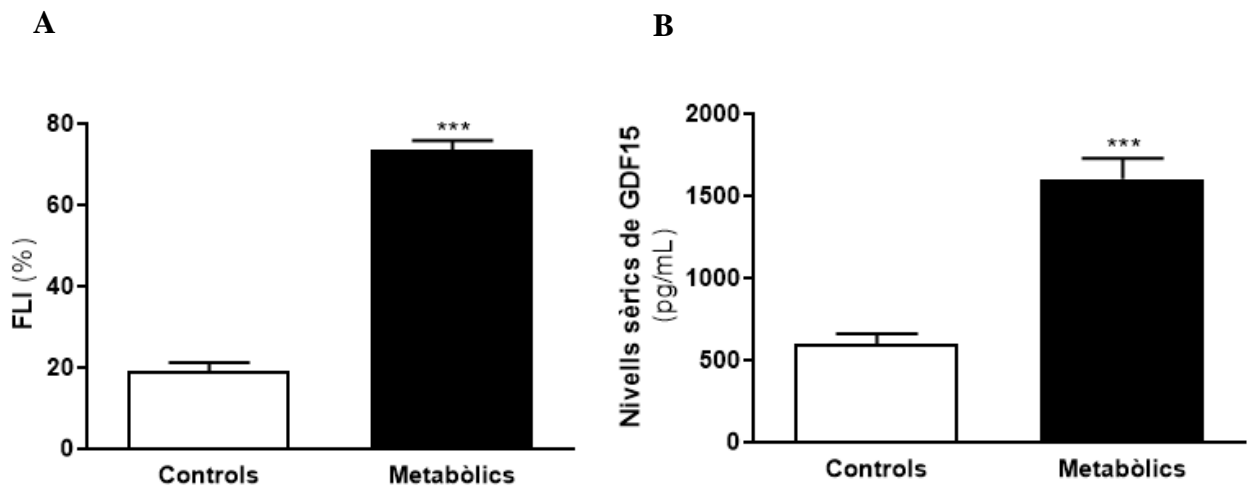


Figura 3: A) representació gràfica de FLI en el grup control i grup metabòlic. B) representació gràfica dels nivells sèrics de GDF15 en humans dels grups control i metabòlic. Amb una significació estadística a $P < 0,001$.

Seguidament, es va analitzar la correlació entre els nivells sèrics de GDF15 i els valors de FLI, trobant una correlació positiva entre aquestes dues variables ($r=0,543$, $P < 0,001$) (Figura 4)

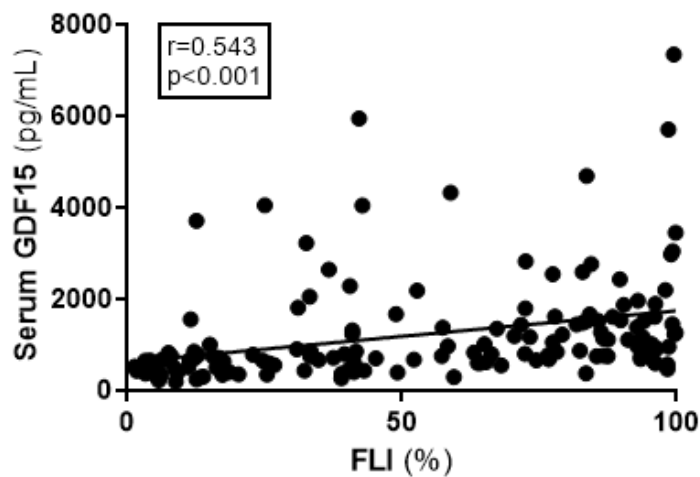


Figura 4: Associació dels nivells sèrics de GDF15 i els valors de FLI.

7.3 CARACTERITZACIÓ MODEL DE RATOLINS C57BL/6J

Com s'ha comentat en l'apartat de metodologia, es treballa amb mostres de fetges de ratolins C57BL/6J anteriorment recol·lectades (Rodríguez-Calvo et al., 2020). En estudis anteriors, utilitzant aquestes mostres, es va observar que quan els ratolins seguien una dieta grassa s'induïa un augment del pes corporal (Annex 1-Figura A), i els nivells plasmàtics de triglicèrids aproximadament es duplicaven (Annex 1-Figura B). A més a més, els nivells plasmàtics d'àcids grassos lliures no esterificats (NEFAS), també es trobaven incrementats en els ratolins alimentats amb dieta grassa, en comparació, amb els alimentats amb dieta estàndard (Annex 1-Figura C) (Rodríguez-Calvo et al., 2020).

Per altra banda, en estudis anteriors es va observar que quan els ratolins seguien una dieta grassa s'induïa l'esteatosi hepàtica (Annex 2). Es pot observar com els ratolins que han seguit una dieta grassa presenten un augment en les vesícules hepàtiques, així com un increment en l'acumulació de lípids, en comparació amb els animals que han seguit una dieta estàndard (Rodríguez-Calvo et al., 2020).

A més a més, anàlisis previs de cromatografia de líquids i espectrometria de masses (LC-MS) I MS/MS van identificar 14 triglicèrids incrementats al fetge de ratolins alimentats amb dieta grassa respecte als ratolins control. (Rodríguez-Calvo et al., 2020) (Annex 3-Taula 1)

7.4 QUANTIFICACIÓ DEL TRANSCRIT (ARNm) DE *Gdf15* EN EL TEIXIT HEPÀTIC DELS RATOLINS

Per tal d'observar i quantificar l'expressió del transcrit de *Gdf15* en el teixit hepàtic es va procedir a fer una qRT-PCR. Els resultats es veuen representats en la Figura 5. Tal i com es pot observar, l'expressió dels transcrit de *Gdf15* és 2,57 vegades superior en el grup de ratolins alimentat amb dieta grassa comparat amb els ratolins alimentats amb una dieta estàndard ($P < 0,01$).

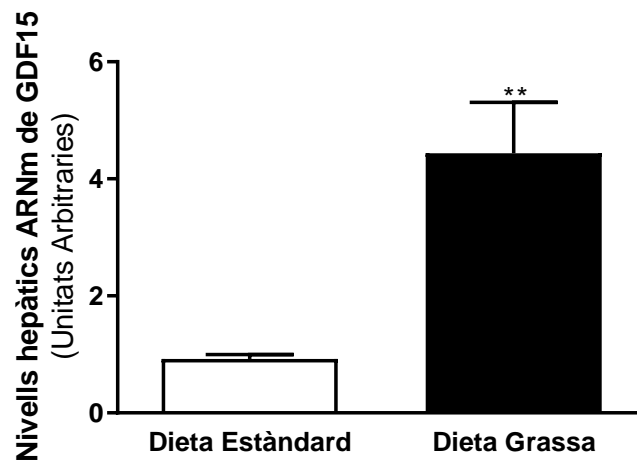


Figura 5: Representació gràfica dels nivells hepàtics del ARNm de *Gdf15* en ratolins alimentats amb dieta estàndard i dieta grassa. ($P < 0,01$).

7.5 NIVELL PLASMÀTIC DE GDF15 EN RATOLINS

Per confirmar si els canvis observats en l'expressió hepàtica de *Gdf15* es relacionaven amb els nivells circulants d'aquesta citocina, es van analitzar els nivells de GDF15 en plasma.

Com es pot observar en la Figura 6, els ratolins alimentats amb dieta grassa tenen nivells plasmàtics de GDF15 significativament més elevats que els rosegadors que segueixen una dieta estàndard. D'altra banda, amb la dieta estàndard es van obtenir els següents valors de $[39,03 \pm 4,42]$ pg/mL i amb dieta Grassa es van obtenir valors de $[61,20 \pm 8,35]$ pg/mL ($P < 0,01$).

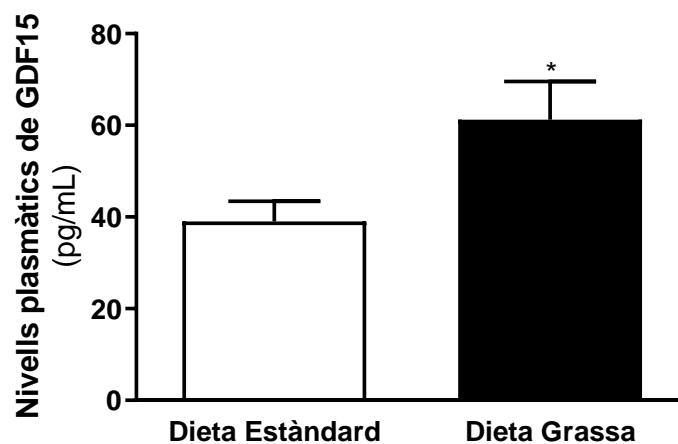


Figura 6: Representació gràfica dels nivells plasmàtics de GDF15 en ratolins alimentats amb dieta estàndard i dieta grassa. ($P < 0,01$).

7.6 ASSOCIACIONS DELS NIVELLS DE GDF15 AMB UN PERFIL DE TRIGLICÈRIDS HEPÀTICS INCREMENTATS AMB LA DIETA GRASSA

En estudis previs es van identificar 14 triglicèrids incrementats al fetge de ratolins alimentats amb dieta grassa (Rodríguez-Calvo et al., 2020) (Annex 3). Tenint en compte que sota dieta grassa els nivells plasmàtics de GDF15 també es veuen alterats, es va voler estudiar la relació entre aquesta citocina i els triglicèrids prèviament identificats.

Les correlacions parcials ajustades pels nivells plasmàtics de NEFAS, triglicèrids i el pes dels ratolins van mostrar que 9 dels 14 triglicèrids hepàtics es correlacionaven de manera positiva amb els nivells plasmàtics de GDF15 (Taula 3).

Addicionalment, es van realitzar anàlisis de regressió lineal multivariant, incloent com a variables dependents cadascun dels 9 triglicèrids hepàtics estadísticament associats amb GDF15 als anàlisis de correlació, i com a variables independents els nivells plasmàtics dels NEFAS, els triglicèrids plasmàtics i el pes dels animals (Taula 4).

	<i>p-valor</i>
TG (51:2)	<0,001
TG (51:1)	<0,001
TG (49:1)	<0,001
TG (53:1)	0.001
TG (46:0)	0.002
TG (49:2)	<0,001
TG (49:0)	0.001
TG (44:1)	0.003
TG (47:0)	<0,001
TG (44:0)	0.001
TG (13:1)	0.007
TG (48:1)	0.002
TG (52:5)	0.003
TG (48:0)	0.289

Taula 3: Correlació parcial ajustant per NEFAS, triglicèrids plasmàtics i pes de ratolins. (P<0,005).

	<i>R</i> ²	<i>B</i>	<i>p</i> -valor
TG (51:2)	0,827	0,68	0,019
TG (51:1)	0,856	0,605	0,021
TG (49:1)	0,814	0,644	0,027
TG (53:1)	0,893	0,502	0,024
TG (49:0)	0,874	0,55	0,024
TG (44:1)	0,842	0,597	0,027
TG (47:0)	0,836	0,588	0,03
TG (44:0)	0,810	0,573	0,044
TG (13:1)	0,787	0,734	0,021

Taula 4: Anàlisi de regressió lineal multivariada entre els nivells plasmàtics de GDF15 i els triglicèrids hepàtics. Ajustant per NEFAS, triglicèrids plasmàtics i pes dels ratolins. Els resultats s'expressen com a beta estandarditzat (*B*) i es mostren els *P* valors (*P*<0,005) i *R*².

8. DISCUSSIÓ

La malaltia hepàtica, NAFLD, té una elevada incidència en la població. Tanmateix, hi ha una manca de mètodes efectius pel diagnòstic primerenc i posterior seguiment. Aquest fet, desperta la necessitat de identificar nous biomarcadors no invasius per a la malaltia. Estudis suggereixen que la citocina GDF15 es troba incrementada en malalties hepàtiques, tot i que el seu paper en NAFLD no està del tot explorat, s'ha observat durant el desenvolupament de la malaltia estrès d'òrgans intreacel·lulars, l'estrès oxidatiu i una acumulació de lípids al fetge (Kim & Lee, 2021). Aquesta sèrie de fets podrien induir l'expressió de GDF15. Per tant, es va voler estudiar el paper de la citocina GDF15 com a potencial biomarcadora del contingut de greix hepàtic, tractant-se doncs, d'un mètode no invasiu per a la malaltia hepàtica estudiada.

En l'estudi realitzat amb humans es va dividir els participants en dos grups, tenint per una banda, al grup amb individus metabòlics i per l'altra banda un grup control. Es van tenir present les característiques clíniques de cada grup de pacients. Pel que fa al grup metabòlic més dels 50% d'ells patien obesitat i/o diabetis, gairebé tots estaven diagnosticats amb síndrome metabòlica. Tenint en compte que els pacients metabòlics presenten un risc més elevat de patir NAFLD, es va explorar la potencial associació entre els nivells sèrics de GDF15 i el contingut de greix hepàtic d'aquests pacients avaluats per FLI. Tant els nivells de FLI com de GDF15 sèrics es van trobar incrementats en pacients metabòlics. A més a més, es pot observar una correlació positiva entre aquestes dues variables, és a dir, quan els valors de FLI augmenten,

també ho fan els nivells sèrics de GDF15. Això indica que, a major contingut de greix hepàtic, majors nivells de GDF15 circulants. En conseqüència amb els resultats obtingut, es recolza la idea que la citocina estudiada GDF15 podria considerar-se com un possible biomarcador de la malaltia del fetge gras, en pacients amb un perfil metabòlic alterat. Tot i així, es necessiten realitzar més estudis en poblacions independents que confirmin aquestes cerques.

Per aprofundir més en el paper de GDF15 com a potencial biomarcador del greix hepàtic, es va estudiar el seu paper en un model murí d'aquesta malaltia. Així doncs, es pot observar com els nivells del transcrit i els nivells plasmàtics de GDF15 son significativament més elevats en ratolins alimentats amb dieta grassa, en comparació amb els animals que han seguit una dieta estàndard, proposant al fetge com a un dels principals òrgans productors de GDF15, en resposta a aquesta dieta. És a dir, quan els ratolins son alimentats amb una dieta excessiva en greixos els nivells de la citocina GDF15 augmenten. A més a més, tenint en compte dades d'estudis anteriors (Rodríguez-Calvo et al., 2020), se sap que els ratolins alimentats amb una dieta grassa augmenten la seva massa corporal i els lípids hepàtics. D'aquesta manera, es pot observar com sota una dieta grassa, hi ha un augment de triglicèrids hepàtics així com un increment en els nivells circulants de GDF15.

Sabent que en ratolins alimentats amb dieta grassa hi ha un augment dels triglicèrids hepàtics (Rodríguez-Calvo et al., 2020), es va voler avaluar la possible associació entre un perfil de triglicèrids hepàtics incrementats i els nivells elevats de GDF15 en aquest model murí. A través d'anàlisi estadístiques es va comprovar com els nivells de GDF15 s'associen positivament amb 9 triglicèrids hepàtics en concret [TG (51:2), TG (51:1), TG (49:1), TG (53:1), TG (49:0), TG (44:1), TG (47:0), TG (44:0), TG (13:1)]. Tots aquests triglicèrids hepàtics son de cadena llarga, 3 dels 9 triglicèrids no contenen insaturacions. No obstant, 5 dels 9 triglicèrids son monoinsaturats i únicament 1 triglicèrid conté dos insaturacions en la seva cadena. Per tant, els nivells de GDF15 s'associen positivament amb un perfil de triglicèrids hepàtics de cadena llarga, els quals es troben augmentats, a causa de seguir una dieta grassa. Es recolzen els resultats anteriors; sota una dieta grassa GDF15 s'indueix i a més a més, es capaç d'associar-se

amb certs triglicèrids augmentats en fetge. Aquestes dades proposen que, la citocina GDF15 podria ser tractada com un possible biomarcador de la malaltia del fetge gras, ja que sembla ser que GDF15 s'indueix davant un excés de lípids hepàtics.

9. CONCLUSIONS

Les conclusions extretes en aquest estudi son les següents:

Pel que fa l'estudi amb pacients, s'ha observat com la citocina GDF15 s'associa amb el greix hepàtic avaluat amb l'algoritme FLI. En l'estudi realitzat amb els models murins, quan els ratolins es troben sota dieta grassa, GDF15 s'indueix tan a nivell transcripcional com a nivell plasmàtic. Per altra banda, GDF15 s'associa amb un perfil característic de triglicèrids hepàtics, concretament amb 9.

Tenint en compte tots els resultats obtinguts a l'estudi, es pot proposar GDF15 com a un potencial biomarcador, no només de fetge gras, sinó també d'un perfil de triglicèrids hepàtics característics de la malaltia.

10. BIBLIOGRAFIA

- Adolph, T. E., Grabherr, F., Mayr, L., Grander, C., Enrich, B., Moschen, A. R., & Tilg, (2018). Weight loss induced by bariatric surgery restricts hepatic GDF15 expression. *Journal of Obesity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7108075>
- Arab, J. P., Arrese, M., & Trauner, M. (2018). Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*, 13, 321–350. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117>
- Baek, S. J., & Eling, T. (2019). Growth differentiation factor 15 (GDF15): A survival protein with therapeutic potential in metabolic diseases. *Pharmacology and Therapeutics*, 198, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.02.008>
- Böttner, M., Laaff, M., Schechinger, B., Rappold, G., Unsicker, K., & Suter-Crazzolaro, C. (1999). Characterization of the rat, mouse, and human genes of growth/differentiation factor-15/macrophage inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1). *Gene*, 237(1), 105–111. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00309-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00309-1)
- Castera, L., Friedrich-Rust, M., & Loomba, R. (2019). Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In *Gastroenterology* (Vol. 156, Issue 5, pp. 1264-1281.e4). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.12.036>
- Eslam, M., Sanyal, A. J., George, J., Sanyal, A., Neuschwander-Tetri, B., Tiribelli, C., Kleiner, D. E., Brunt, E., Bugianesi, E., Yki-Järvinen, H., Grønbaek, H., Cortez-Pinto, H., Fan, J., Valenti, L., Abdelmalek, M., Romero-Gomez, M., Rinella, M., Arrese, M., Bedossa, P., ... Younossi, Z. (2020). MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, 158(7), 1999-2014.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.11.312>

- Kim, K. H., & Lee, M. S. (2021). GDF15 as a central mediator for integrated stress response and a promising therapeutic molecule for metabolic disorders and NASH. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1865(3). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129834>
- Moreno-Vedia, J., Girona, J., Ibarretxe, D., Masana, L., & Rodríguez-Calvo, R. (2022). Unveiling the Role of the Fatty Acid Binding Protein 4 in the Metabolic-Associated Fatty Liver Disease. In *Biomedicines* (Vol. 10, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010197>
- Otgonsuren, M., Estep, M. J., Hossain, N., Younossi, E., Frost, S., Henry, L., Hunt, S., Fang, Y., Goodman, Z., & Younossi, Z. M. (2014). A single non-invasive model to diagnose non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 29(12), 2006–2013. <https://doi.org/10.1111/jgh.12665>
- Rodríguez-Calvo, R., Moreno-Vedia, J., Girona, J., Ibarretxe, D., Martínez-Micaelo, N., Merino, J., Plana, N., & Masana, L. (2021). Relationship Between Fatty Acid Binding Protein 4 and Liver Fat in Individuals at Increased Cardiometabolic Risk. *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.781789>
- Rodríguez-Calvo, R., Samino, S., Girona, J., Martínez-Micaelo, N., Ràfols, P., García-Altare, M., Guaita-Esteruelas, S., Junza, A., Heras, M., Yanes, O., Correig, X., & Masana, L. (2020). Hepatic lipidomics and molecular imaging in a murine non-alcoholic fatty liver disease model: Insights into molecular mechanisms. *Biomolecules*, 10(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/biom10091275>
- Wang, D., Day, E. A., Townsend, L. K., Djordjevic, D., Jørgensen, S. B., & Steinberg, G. R. (2021). GDF15: emerging biology and therapeutic applications for obesity and cardiometabolic disease. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 17, Issue 10, pp. 592–607). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00529-7>

- Xu, X., Li, Z., & Gao, W. (2011). Growth differentiation factor 15 in cardiovascular diseases: From bench to bedside. In *Biomarkers* (Vol. 16, Issue 6, pp. 466–475). <https://doi.org/10.3109/1354750X.2011.580006>
- Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2015). *Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes*. <https://doi.org/10.1002/hep.28431/supinfo>
- Zhang, M., Sun, W., Qian, J., & Tang, Y. (2018). Fasting exacerbates hepatic growth differentiation factor 15 to promote fatty acid β -oxidation and ketogenesis via activating XBP1 signaling in liver. *Redox Biology*, 16, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.013>

11. AUTOAVALUACIÓ

He tingut l'oportunitat de poder realitzar les Pràctiques Externes vinculades al Treball de Fi de Grau, al grup de l' Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi (URLA) dins de l'URV. L'estada ha estat molt enriquidora tan a nivell personal com a nivell professional, he pogut estar en contacte directe amb el laboratori, conèixer com és el dia a dia en un laboratori, ser conscient que la feina experimental és igual de important que el processament de les dades. Per altra banda, he sigut coneixedora de les limitacions que poden esdevenir en els estudis i com poder resoldre-les. A més a més, viure tan d'a prop aquestes experiències ha fet que el meu interès per la recerca s'incrementi.

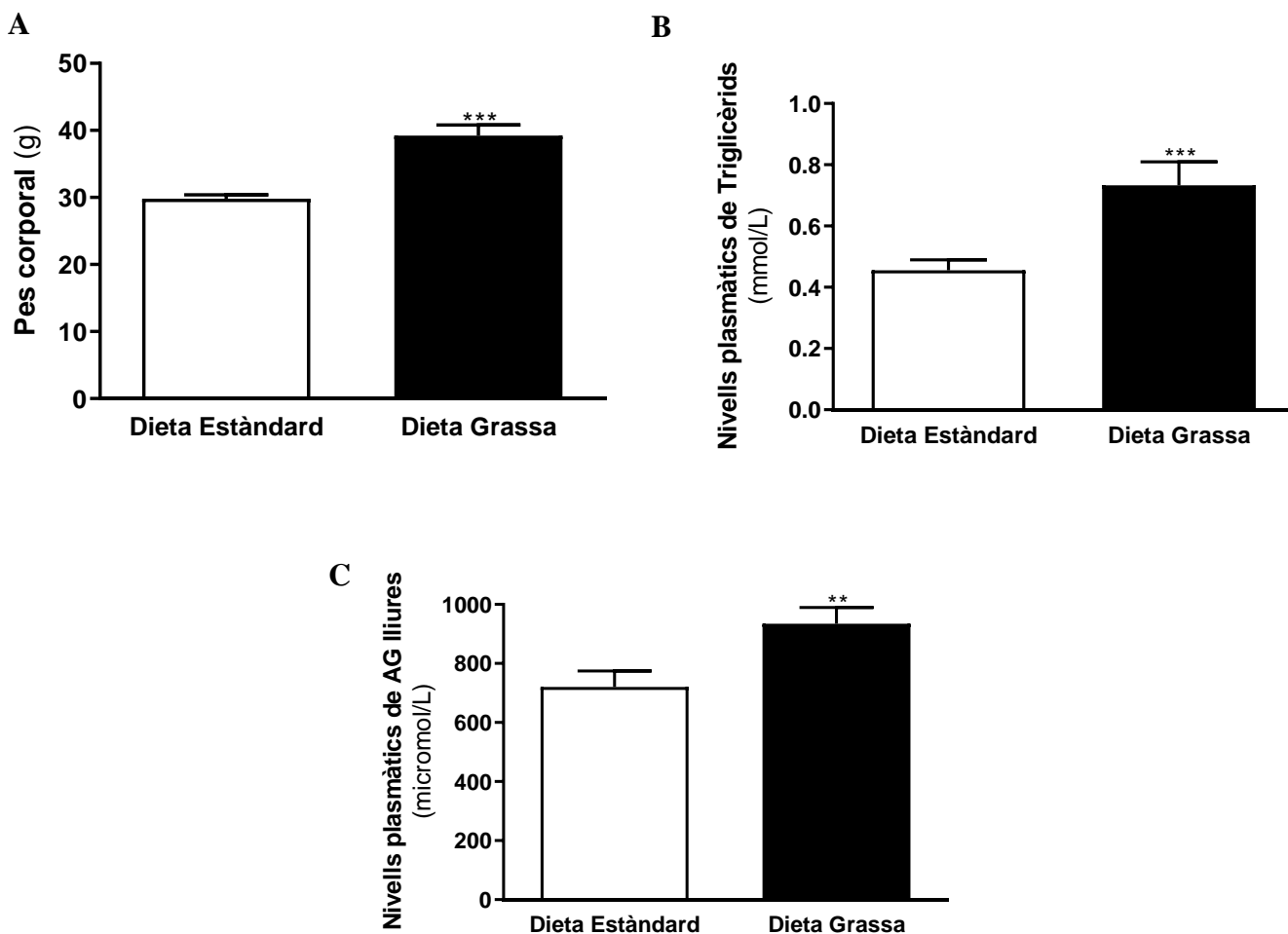
He pogut realitzar i familiaritzar-me amb tècniques de recerca bàsica com pot ser la PCR o l'ELISA. Per altra banda, se m'ha brindat l'oportunitat de poder estar en contacte amb altres tipus de tècniques les quals m'han fet molta il·lusió a nivell personal i poder sentir que tot i les limitacions que es puguin presentar en l'àmbit de la recerca, al final val la pena.

Pel que fa al treball realitzat, penso que en el curt període de temps que es té per realitzar-ho s'han obtingut resultats bastant satisfactoris. He pogut ser conscient de la importància de la organització tant a nivell experimental com a nivell informàtic. He tingut l'oportunitat de poder treballar amb un software estadístic i desenvolupar habilitats, tot i que a nivell personal és on se m'han presentat més limitacions degut a la manca de coneixements. No obstant, m'ha servit per aprendre i saber enfrontar una situació difícil. Possiblement si hagués tingut uns coneixements més forts d'anàlisis estadístiques hagués pogut extreure més suc d'aquesta part. Tot i així, trobo que el balanç final és positiu.

ANNEXOS

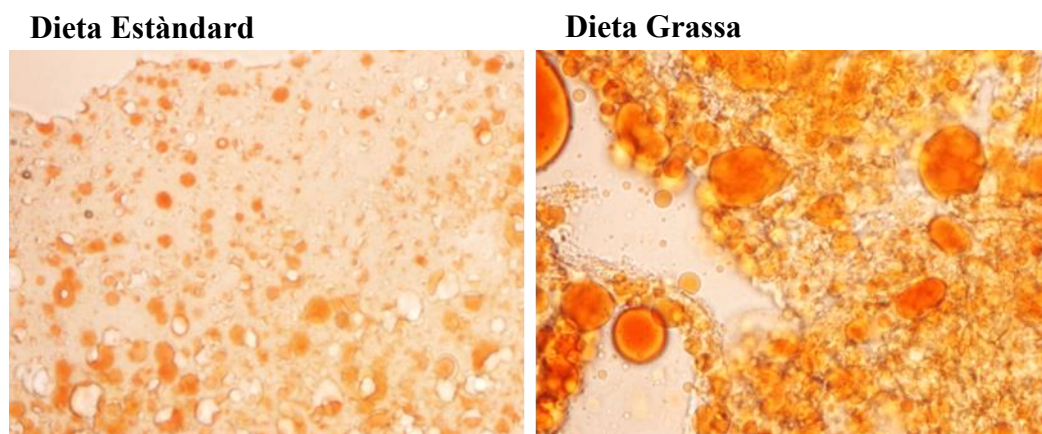
Annex 1:

La Dieta Grassa indueix el pes corporal i els nivells de lípids plasmàtics en ratolins C57BL/6J. Els animals van se alimentats durant 12 setmanes amb una Dieta Estàndard o una Dieta Grassa. (A) Pes corporal. (B) Nivells plasmàtics de Triglicèrids. (C) Nivells plasmàtics d'acids grassos lliures (no esterificats). Les dades s'expressen com a mitjanes \pm SEM. **P<0,01 i ***P <0,001 enfront de ratolins alimentats amb Dieta Estàndard.



Annex 2:

La Dieta Grassa indueix esteatòsi hepàtica en ratolins C57BL/6J mice. Tinció representativa d'Oil Red O en fetge de ratolins alimentats amb Dieta Estàndard i Dieta Grassa.



Annex 3:

Triglicèrids hepàtics incrementats amb la Dieta Grassa.

Dieta Grassa vs. Dieta Estàndard		
<i>Triglicèrids</i>	<i>Fold change</i>	<i>p-valor</i>
TG(51:2)	7.82	0.004
TG(51:1)	5.40	0.008
TG(49:1)	5.16	0.009
TG(53:1)	4.70	0.006
TG(46:0)	4.14	< 0.001
TG(49:2)	3.83	0.001
TG(49:0)	3.59	0.004
TG(44:1)	3.21	0.001
TG(47:0)	3.21	0.007
TG(44:0)	3.04	0.001
TG(43:1)	3.01	0.010
TG(48:1)	2.31	0.003
TG(52:5)	1.98	0.008
TG(48:0)	1.53	0.005

