



**UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI**



IISPV[®]
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI

**MODULACIÓN DEL PERFIL LIPOPROTEICO POR LA
ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA: AUMENTO DEL
CONTENIDO LIPÍDICO DE LAS IDL Y VLDL**

Génesis Solángel Rodríguez Rivas

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

Tutor académico: Dra. Carmen Portillo, departamento de Bioquímica y biotecnología, carmen.portillo@urv.cat

En cooperación con: Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili, Unidad de Investigación Biomédica

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

Junio 2023

Yo, Génesis Solángel Rodríguez Rivas, con DNI 49682730Q, soy conocedor de la guía de prevención del plagio en la URV Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada en julio 2017) (<https://www.crai.urv.cat/ca/serveis/suport-aprenentatge/plagi/>) y afirmo que en este TFG no constituyen ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 08 de mayo de 2023

A handwritten signature in black ink that reads "Génesis Rodríguez". The signature is written in a cursive style with a long horizontal flourish at the end.

ÍNDICE

ABREVIACIONES	3
DATOS DEL CENTRO	5
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN	7
Metabolismo lipoproteico.....	7
Homeostasis lipídica	9
Obesidad.....	12
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
METODOLOGÍA.....	16
Diseño de estudio.....	16
Obtención de muestras	17
Características Bioquímicas	17
Análisis histológico	18
Análisis estadístico.....	18
RESULTADOS.....	19
Descripción de la población.....	19
Efecto de la NASH en el perfil lipoproteico	22
Influencia de las comorbilidades en el perfil lipoproteico	28
Capacidad diagnóstica de las lipoproteínas.....	37
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIÓN	42
REFERENCIAS	44
AGRADECIMIENTOS.....	48
AUTOEVALUACIÓN	49
ANEXO 1: Script R.....	50
Librerías empleadas.....	50
Base de datos EOM	50
TableOne: Características clínicas de la población	50
Box-plot: Análisis Lipoproteico	51
Box-plot: Análisis histológico	52
Box-plot: Variables de confusión.....	53
Scatter-plot: Correlación entre esteatosis y perfil lipoproteico	54
ANEXO 2: Ficha de seguimiento del tutor.....	55

ABREVIACIONES

ACC: Acetil CoA carboxilasa

ACE-ARBS: *Angiotensin converting enzyme and angiotensin receptor blockers*
(Bloqueadores de los receptores de angiotensina)

AG: Ácidos grasos

ALT: Alanina aminotransferasa

AOS: Apnea obstructiva del sueño

AST: Aspartato aminotransferasa

CE: Colesterol esterificado

CL: Colesterol libre

CM: Quilomicrones

CoA: Coenzima A

CPAP: Presión positiva continua en la vía aérea

DNL: Lipogénesis hepática *de novo*

DLP: Dislipemia

FL: Fosfolípidos

GGT: Gamma-glutamyl transferasa

HDL: *High density lipoproteins* (Lipoproteínas de alta densidad)

HOMAIR: *Homeostatic model assessment for insulin resistance* (Modelo homeostático para la evaluación de la resistencia a la insulina).

HT: Hipertensión

IDL: *Intermediate density lipoproteins* (Lipoproteínas de densidad intermedia)

IMC: Índice de masa corporal

LDL: *Low density lipoproteins* (Lipoproteínas de baja densidad)

LSG: *Laparoscopic Sleeve Gastrectomy* (Gastrectomía vertical)

NAFLD: *Non-alcoholic fatty liver disease* (Enfermedad del hígado graso no alcohólico)

NAS: *NAFLD Activity Score* (Actividad de la NAFLD)

NASH: *Non-Alcoholic SteatoHepatitis* (Esteatohepatitis no alcohólica)

NPCL1L: Proteína *Niemann-Pick C1 Like 1*

PAD: Presión arterial diastólica

PAS: Presión arterial sistólica

SREBP: *Sterol regulatory element binding protein* (Proteína de unión a elementos reguladores de esteroides)

T2DM: Diabetes mellitus tipo 2

TG: Triglicéridos

VLDL: *Very low density lipoproteins* (Lipoproteínas de muy baja densidad)

DATOS DEL CENTRO

El Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV) fue creado en el año 2005 con el propósito de integrar la investigación en el campo de la biomedicina, garantizando así una mejora en la práctica clínica aplicada a los pacientes de los diferentes hospitales con los que colabora. Entre estos hospitales se encuentran aquellos situados en el Camp de Tarragona y las Terres de l'Ebre, como el Hospital Universitario Joan XXIII de Tarragona, Hospital Verge de la Cinta de Tortosa, Hospital Universitario Sant Joan de Reus y el Hospital Universitario Instituto Pere Mata de Reus.

El IISPV destaca entre las diferentes instituciones españolas de investigación y es parte de la Fundación Institución de Centros de Investigación de Cataluña (I-CERCA). Además, cuenta con varias unidades que cubren numerosas áreas de investigación: enfermedades metabólicas, nutrición, infección, inmunidad, medio ambiente, oncología, neurociencias y salud mental.

Cabe destacar la Unidad de Investigación Biomédica, gracias a la cual se ha podido realizar el presente trabajo. Esta unidad está dirigida por el Prof. Jorge Joven y el Dr. Jordi Camps y consta de un perfil multidisciplinario que se centra en el estudio de la relación entre el metabolismo, la oxidación y la inflamación con enfermedades no transmisibles, como la obesidad mórbida, las enfermedades hepáticas, las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y las infecciones del tracto urinario.

Entre las principales fuentes de financiación de estos proyectos se encuentran el Instituto de Salud Carlos III y El Maratón de TV3.

RESUMEN

El hígado desempeña un papel importante en la regulación de las lipoproteínas, que son responsables del transporte y almacenamiento de lípidos en el cuerpo. Las enfermedades hepáticas, como la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), pueden alterar el metabolismo y la composición de las lipoproteínas. Hay cinco clases principales de lipoproteínas: quilomicrones, VLDL, LDL, IDL y HDL. Cada una tiene diferentes características y composición lipídica. En la vía exógena, los lípidos se transportan desde el intestino y el hígado a las células periféricas. En la vía endógena, el hígado sintetiza y secreta VLDL, que se convierten en IDL y LDL en el plasma. El colesterol se absorbe de la dieta y se sintetiza en el hígado, y su metabolismo está regulado para mantener la homeostasis lipídica.

En este trabajo se estudió el perfil lipoproteico de pacientes con NASH y pacientes sin NASH y se observó que el conjunto lipoproteico característico de la NASH es consecuencia de esta misma y puede servir como diagnóstico.

Palabras clave: HDL, IDL, LDL, metabolismo lipoproteico, NAFLD, NASH, obesidad tipo III, VLDL

INTRODUCCIÓN

El hígado juega un importante papel en la regulación de la síntesis y degradación de lipoproteínas, responsables de la homeostasis metabólica y de facilitar el transporte y almacenamiento de lípidos, como el colesterol y los triglicéridos, en varios tejidos. De este modo, las enfermedades que afectan al hígado están asociadas con graves alteraciones en el metabolismo y composición de las lipoproteínas (1).

Metabolismo lipoproteico

Debido a la naturaleza hidrofóbica de los lípidos, estos dependen de la asociación con unas proteínas de transporte denominadas apolipoproteínas para poder ser transportados en el plasma, formando así las lipoproteínas. Se reconocen cinco clases principales de lipoproteínas; quilomicrones (CM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) (2). Cada una de estas lipoproteínas es heterogénea en términos de tamaño, densidad y composición lipídica (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de las lipoproteínas plasmáticas humanas. Extraída de Real JT et al., 2021 (3).

Lipoproteína	Densidad (g/ml)	Diámetro (nm)	TG%	CE%	CL%	FL%	Apolipoproteínas principales
QM	< 0,95	80-100	90-95	2-4	1	2-6	apoB48
VLDL	0,95-1,006	30-80	50-65	8-14	4-7	12-16	apoB100
IDL	1,006-1,019	25-30	25-40	20-35	7-11	16-24	apoB100, apoE
LDL	1,019-1,063	20-25	4-6	34-35	6-15	22-26	apoB100
HDL	1,063-1,210	8-13	7	10-20	5	55	apoAI, apoE

CE: colesterol esterificado; CL: colesterol libre; FL: fosfolípidos; HDL: high density lipoproteins (lipoproteínas de alta densidad); IDL: intermediate density lipoproteins (lipoproteínas de densidad intermedia); LDL: low density lipoproteins (lipoproteínas de baja densidad); CM: quilomicrones; TG: triglicéridos; VLDL: very low density lipoproteins (lipoproteínas de muy baja densidad).

En la vía exógena del metabolismo de las lipoproteínas los lípidos se transportan desde el intestino y el hígado hacia las células periféricas, especialmente al tejido adiposo (Figura 1). En los enterocitos, el colesterol se captura mediante la proteína Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) y se esterifica junto con los

triglicéridos (TG) de la dieta sintetizados en la célula. Los TG y el colesterol unidos a la apolipoproteína B48 (apoB48) forman quilomicrones (CM), que se transportan al aparato de Golgi a través de proteínas del grupo coatomere II (COPII). Los CM formados en las células intestinales se secretan a la linfa intestinal y luego a la circulación general (3).

La lipoproteína lipasa (LPL) hidroliza los TG de los CM, liberando ácidos grasos libres que son captados por diferentes tejidos, principalmente tejido adiposo y muscular. Los ácidos grasos se oxidan para producir energía o se vuelven a esterificar en forma de TG, contribuyendo al almacenamiento de lípidos (4).

Los CM intercambian colesterol, fosfolípidos y apolipoproteínas con las HDL, enriqueciéndose en apoE y resultando en lo que se conoce como CM remanentes, que son retirados rápidamente de la circulación por el hígado a través de receptores, especialmente aquellos que reconocen la apoE, incluyendo los proteoglicanos en el espacio de Disse y los receptores de VLDL y LDL (1,5).

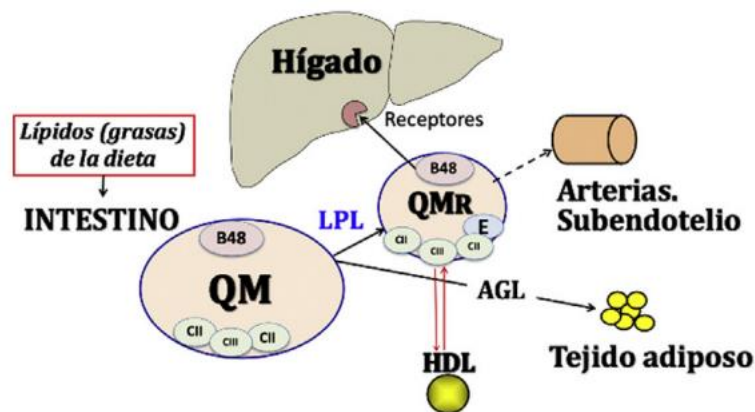


Figura 1. Metabolismo exógeno de las lipoproteínas. Extraída de Real JT et al., 2021 (3).

Por otro lado, en la vía endógena el hígado sintetiza y secreta las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que luego se transforman en IDL y LDL en el plasma (Figura 2). Las VLDL son partículas ricas en triglicéridos (TG) y contienen la apolipoproteína B100 (apoB100). Estas son hidrolizadas por la lipoproteína lipasa (LPL) en el endotelio vascular del tejido muscular y adiposo, liberando ácidos grasos que son captados por los tejidos periféricos (6).

Aproximadamente el 40% de las IDL son captadas por el hígado a través de la endocitosis mediada por el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), con la participación de apoE y otros receptores de lipoproteínas ricas en TG. La IDL restante es remodelada para formar LDL mediante la acción de la LPL y la lipasa hepática (HL). Las LDL son lipoproteínas ricas en colesterol y apoB100, y constituyen la principal forma de transporte del colesterol en el plasma (6,7).

Aproximadamente el 70% de las LDL plasmáticas son captadas por el hígado a través del receptor de las LDL, mientras que el resto es captado por las células periféricas. El receptor de las LDL es saturable y su función de captación se ve afectada por el exceso de LDL en el plasma y, además, su producción está controlada por factores de transcripción regulados por esteroides (SREBP). Cuando el colesterol está alto se inactiva el SREBP y, por el contrario, cuando hay bajos niveles de colesterol se activa SREBP, que estimula la producción de los receptores LDL y el gen que sintetiza para la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR) responsable de la síntesis de colesterol (6,8).

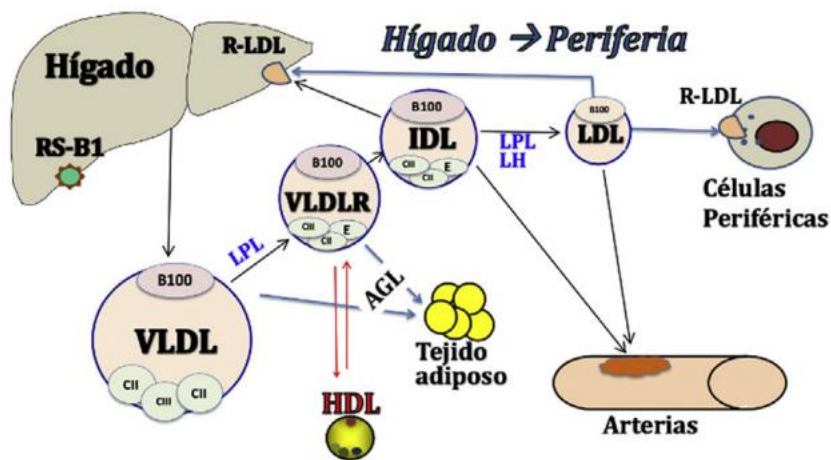


Figura 2. Metabolismo endógeno de las lipoproteínas. Extraída de Real JT et al., 2021 (3).

Homeostasis lipídica

El colesterol presente en nuestro metabolismo se obtiene de dos fuentes diferentes: a través de la absorción intestinal del colesterol dietético y biliar y mediante la síntesis *de novo* a partir de acetil-coenzima A (acetil-CoA) (9). La síntesis, absorción y excreción de colesterol son procesos altamente regulados que ayudan a mantener la homeostasis metabólica (10). De este modo, cuando

se ingieren pequeñas cantidades de colesterol, la absorción y la síntesis de colesterol aumentan. Asimismo, si el nivel de ingesta dietética es alto, su tasa de excreción aumentará y su tasa de síntesis disminuirá (11).

El colesterol se sintetiza a partir de acetil-CoA a través de una serie de reacciones que involucran enzimas clave como la HMGCR y la escualeno monooxigenasa, limitantes de la velocidad. También se puede obtener a partir de partículas de LDL a través de la captación por receptores de LDL en células polarizadas. Los enterocitos en el intestino y los hepatocitos en el hígado pueden absorber colesterol libre de fuentes dietéticas y bilis, respectivamente, facilitados por la NPC1L1 y flotilinas asociadas. El exceso de colesterol puede ser exportado de regreso a la sangre mediante los canales ABCA1 o ABCG1, o a la luz intestinal y los conductos biliares por el heterodímero ABCG5 y ABCG8. El colesterol se puede convertir en éster de colesterol mediante la enzima acetil-CoA:colesterol aciltransferasa para su almacenamiento o secreción como lipoproteínas (Figura 3) (10).

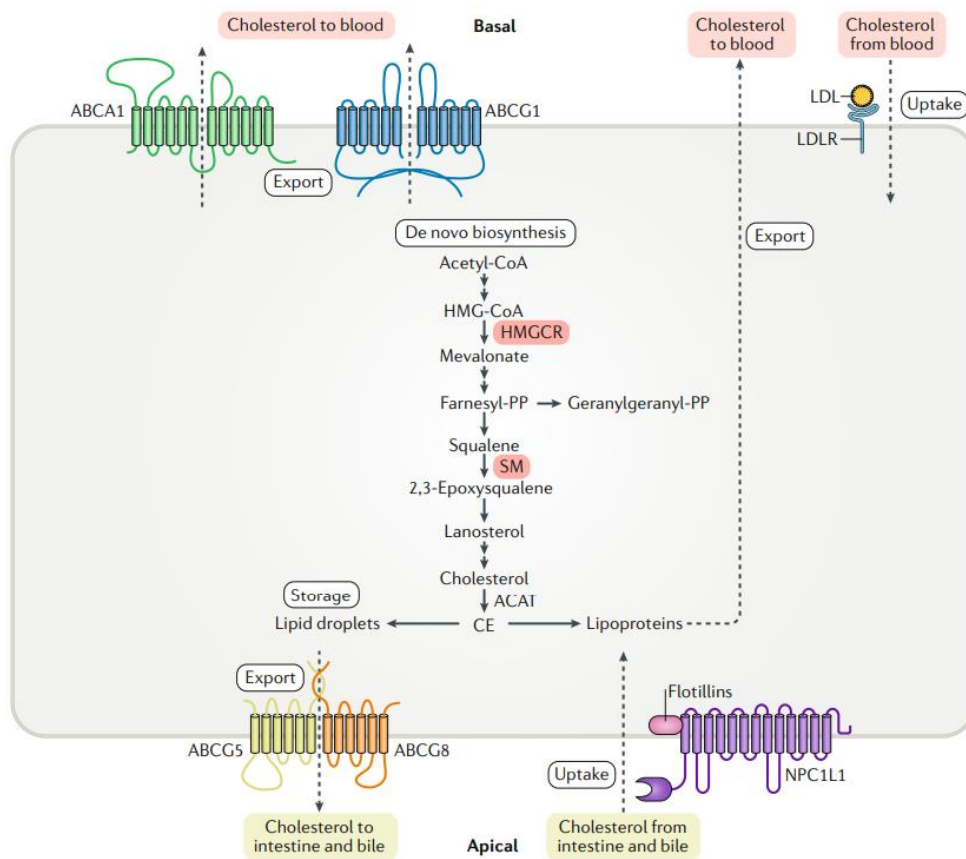


Figura 3. Principales vías del metabolismo del colesterol. Extraída de Luo J et al., 2019 (10).

El hígado procesa grandes cantidades de ácidos grasos (AG), pero almacena solo una pequeña cantidad de triglicéridos (TG) debido a un equilibrio entre la adquisición, oxidación y secreción de AG (12).

Los ácidos grasos (AG) hepáticos se originan a partir de tres fuentes principales: los lípidos de la dieta, los AG derivados del tejido adiposo y los AG sintetizados *de novo*. Los lípidos de la dieta se descomponen en la luz intestinal y se absorben como AG, que luego se reesterifican en triglicéridos (TG) y se empaquetan en quilomicrones, que los transportarán principalmente al tejido muscular y adiposo. Los TG restantes en los remanentes de quilomicrones se transportan al hígado, donde se procesan intracelularmente, liberando AG dentro de los hepatocitos. Los carbohidratos, particularmente la glucosa, se utilizan en la lipogénesis hepática *de novo* (DNL) para producir AG. Los AG deben activarse en moléculas de acetil-CoA para el metabolismo, ya sea mediante oxidación o incorporándose a lípidos complejos. Los TG sintetizados localmente pueden almacenarse en gotitas de lípidos intracelulares o empaquetarse en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y secretarse en el torrente sanguíneo (Figura 2) (13).

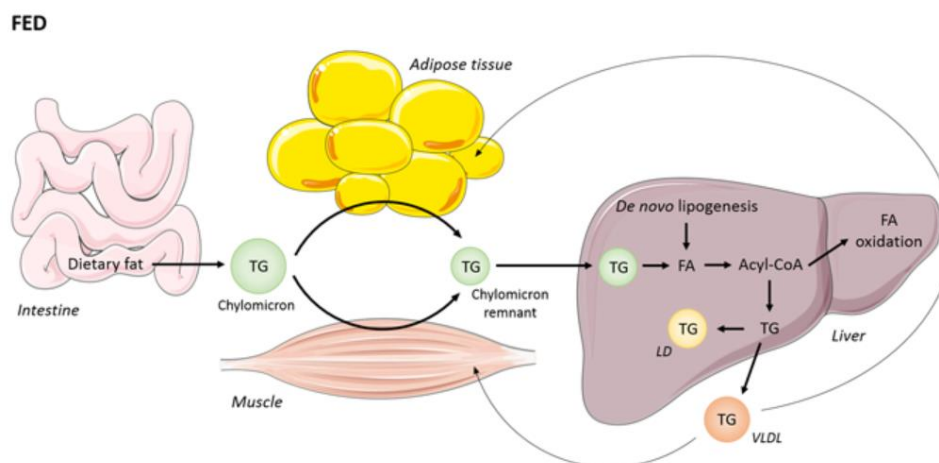


Figura 4. Principales vías del metabolismo de los triglicéridos. Extraída de Alves-Bezerra M & Cohen DE, 2017.

En casos de sobrenutrición y resistencia a la insulina, el aumento de la lipólisis en los adipocitos eleva los niveles de AG circulantes, lo que lleva a un aumento de la DNL hepática. El exceso de AG que no se puede oxidar se dirige hacia la síntesis de TG, lo que da como resultado un aumento del almacenamiento hepático de TG y una sobreproducción de VLDL (13).

Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica degenerativa caracterizada por la acumulación corporal excesiva de tejido adiposo, provocada por un exceso de consumo de calorías frente a un bajo desgaste de estas. Actualmente la obesidad constituye una de las enfermedades más comunes y preocupantes debido a los múltiples factores de riesgo a los que viene asociada y la alta mortalidad que presenta (14). El diagnóstico de esta enfermedad se realiza mediante el Índice de Masa Corporal, calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IMC} = \text{peso (kg)} / [\text{estatura (m)}]^2$$

Este índice permite la clasificación de individuos adultos en seis categorías: bajo peso, normopeso (saludable), sobrepeso, obesidad I, obesidad II, obesidad III (Figura 5) (14).

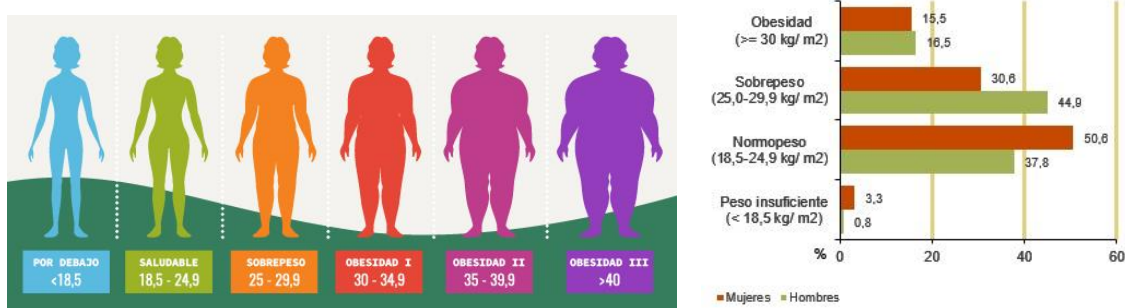


Figura 5. Índice de masa corporal y su impacto en la población española en el año 2020. Extraídas de Top Doctors [<https://www.topdoctors.mx/diccionario-medico/indice-de-masa-corporal-imc>] y Encuesta Europea de Salud en España 2020 (INE).

La obesidad es una enfermedad compleja, producto de la combinación de varios factores como la presencia de hábitos poco saludables, incluidos el consumo de bebidas alcohólicas y/o de tabaco, la falta de ejercicio físico y el exceso de ingesta. Otros factores, como la edad, la salud o el estrés también tienen impacto. Los factores genéticos y epigenéticos, implicados en la regulación del metabolismo, también juegan un papel fundamental en la determinación de la predisposición de un individuo al aumento de peso (15).

El tejido adiposo representa un tipo de tejido conjuntivo formado por adipocitos que acumulan triglicéridos en su citoplasma. Estos adipocitos tienen dos funciones primordiales: reserva de energía y termogénesis. Recientemente se

ha demostrado la relación entre la obesidad con desórdenes en la función endocrina del tejido adiposo, que resulta en disfunciones de los circuitos hipotalámicos responsables de la regulación del apetito, resistencia a la insulina y actividad anormal de las hormonas de los adipocitos (16). La hipertrofia del adipocito ocasiona un aumento en la síntesis del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), una citosina proinflamatoria sintetizada principalmente por los macrófagos. El TNF α , a su vez, aumenta la secreción de la citosina proinflamatoria llamada interleucina 6 (IL6). De esta manera, el TNF α , junto con la proteína de unión al retinol sérico y la proteína C reactiva, se consideran marcadores de inflamación en obesidad (11,17).

Las características intrínsecas de la obesidad hacen que esta esté altamente relacionada con el desarrollo de otras afectaciones. Los mecanismos que podrían estar detrás de esta conexión aún no están claros, podrían estar relacionados con la desregulación del sistema inmunológico y, por extensión, con las comorbilidades causadas o exacerbadas por la obesidad (14).

- Enfermedades cardiovasculares

Los factores de riesgo y las condiciones del sistema cardiovascular, como la hipertensión arterial, la cardiopatía coronaria, la fibrilación auricular y la insuficiencia cardíaca absoluta, se exacerbaban en pacientes con obesidad como condición preexistente.

- Resistencia a la insulina y Diabetes Mellitus tipo 2 (T2DM)

La insulina es una hormona producida por el páncreas que ayuda a que la glucosa en la sangre entre a las células de los músculos, grasa e hígado, donde se usa para obtener energía. Cuando los niveles de glucosa en la sangre aumentan, el páncreas libera insulina para reducir la glucosa en la sangre y mantenerla en el rango normal.

La resistencia a la insulina se define como la incapacidad de la insulina para estimular de manera óptima el transporte de glucosa al interior de las células. Como consecuencia, el páncreas produce más insulina para ayudar a que la glucosa entre a las células (hiperinsulinemia compensadora), y esto contribuye a que los tejidos pierdan aún más la sensibilidad para esta hormona.

Además, si la resistencia a la insulina, que genera la acumulación de altos niveles de glucosa en sangre, se combina con otros factores como el exceso de peso, el sedentarismo rutinario o una dieta inadecuada puede derivar en Diabetes Mellitus tipo 2 (T2DM), en la cual los valores de glucemia son igual o mayores a 126 mg/dL en ayunas (o igual o mayores de 200 mg/dl tras una sobrecarga oral de glucosa, o en cualquier momento en presencia de síntomas); o de hemoglobina glicosilada igual o mayor a 6,5% (18–20).

- Enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH)

Los pacientes con obesidad tipo III presentan la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), que consiste en un espectro de trastornos hepáticos caracterizado por la presencia de esteatosis, acumulación de grasa en el hígado, en más del 5% de los hepatocitos con poco o ningún consumo de alcohol (21). Esta enfermedad únicamente es diagnosticada mediante biopsias de muestras de hígado extraídas de los pacientes durante una cirugía bariátrica, un método muy invasivo.

La esteatohepatitis no alcohólica (NASH) es la forma más avanzada de NAFLD y tiene lugar por un esfuerzo de los hepatocitos por regenerar nuevas células, de manera que acaban siendo reemplazados por tejido cicatricial de colágeno tipo I, lo que acaba derivando en fibrosis, cirrosis y, finalmente, en hepatocarcinoma si no se realiza un trasplante de hígado a tiempo (Figura 6) (21,22).

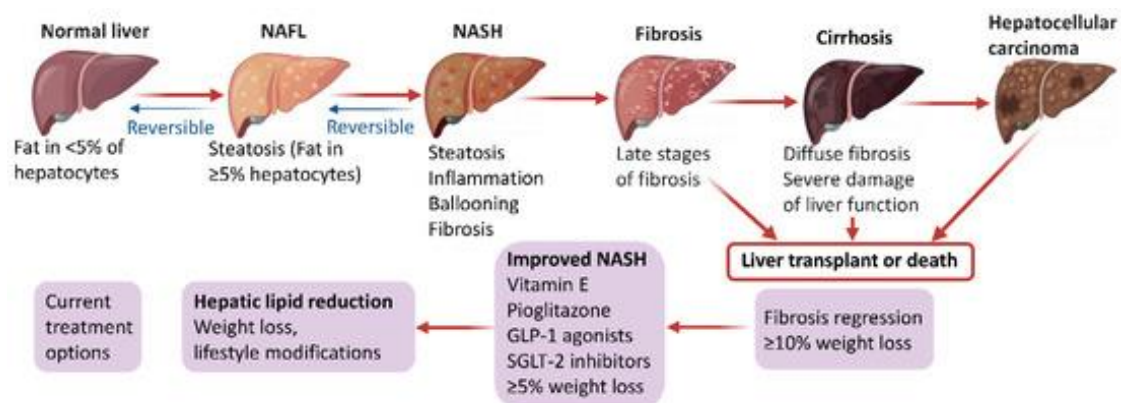


Figura 6. Fisiopatología y opciones terapéuticas de la NAFLD. Extraída de Yin X et al., 2023 (22).

Se ha demostrado que la cirugía bariátrica, entre ellas la gastrectomía vertical es un tratamiento eficaz para la reducción de peso y la remisión de las alteraciones hepáticas en estadios tempranos de la NASH (23). Sin embargo, en etapas más avanzadas, el único tratamiento para combatir la cirrosis o el hepatocarcinoma es el trasplante de hígado (Figura 6).

El nivel de daño del hígado se puede medir mediante el *NAFLD Activity Score* (NAS) midiendo la presencia de esteatosis o acumulación de grasa en el hígado, la balonización hepatocelular y la inflamación lobular (Tabla 2) (24,25).

Tabla 2. NAFLD Activity Score (NAS). Adaptada de Cui H et al., 2020 (24).

Característica histológica	Puntuación	Descripción
Esteatosis	0	<5% de hepatocitos afectados
	1	5-33% de hepatocitos afectados
	2	33-66% de hepatocitos afectados
	3	>66% de hepatocitos afectados
Balonización de hepatocitos	0	Ninguno
	1	Algunos
	2	Muchos
Inflamación lobular	0	Ninguno
	1	<2 focos por campo x200
	2	2-4 focos por campo x200
	3	>4 focos por campo x200
NAS Total	0-2	no NASH
	3-5	NASH Incierto
	6-8	NASH

La puntuación de NAS total se obtiene sumando todas las puntuaciones obtenidas en esteatosis, balonización e inflamación, y presenta un rango de 0 a 8.

Además, la resistencia a la insulina es una característica común de NAFLD que contribuye a su patogenicidad al provocar la liberación inapropiada de ácidos grasos que contribuye aún más a la alteración de la señalización de la insulina en todo el cuerpo. A mayores, la adiponectina, la IL-6 y otros péptidos liberados por el tejido adiposo tienen efectos tanto protectores como proinflamatorios en el hígado, lo que evidencia la interacción entre el hígado y otros tejidos bajo la desregulación metabólica de NAFLD (18).

Aunque se detectan variaciones en el perfil lipoproteico de los pacientes con NASH, se desconoce en la actualidad si dicha variación es la causa de la

enfermedad hepática o si, por el contrario, es una consecuencia de ella u otras comorbilidades asociadas con la obesidad.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La esteatohepatitis no alcohólica (NASH), típica de pacientes con obesidad de tipo III, induce variación en el metabolismo de las lipoproteínas, así como el número de partículas de estas, su composición y su tamaño.

El objetivo principal de este estudio es entender mejor la influencia de NASH sobre el metabolismo de las lipoproteínas y así poder presentar un nuevo método de diagnóstico fiable, eficaz y poco invasivo mediante un análisis de sangre, a diferencia del método actual que se basa en el análisis de biopsias hepáticas. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la variación en el perfil de lipoproteínas por enfermedades relacionadas con la obesidad. De este modo, determinar si la variación en el perfil de lipoproteínas es producto de las comorbilidades asociadas a la obesidad que, al alterar el perfil lipoproteico, darían lugar a la aparición o empeoramiento de la enfermedad hepática.
- Estudiar la variación en el perfil de lipoproteínas en función de las características histológicas del hígado.
- Evaluar la capacidad diagnóstica de esta variación en el perfil de lipoproteínas.

METODOLOGÍA

Diseño de estudio

De un total de 1288 pacientes, tanto hombres como mujeres, del Hospital Sant Joan de Reus diagnosticados con obesidad mórbida y que han sido sometidos a cirugía bariátrica, seleccionamos 84 que cumplieron los criterios de inclusión para este estudio: ser mayor de edad, tener un IMC igual o superior a 35 kg/m² y tener un diagnóstico NASH o No NASH.

Por otro lado, se excluyeron aquellos pacientes que padecían enfermedades crónicas, infecciosas o terminales y también aquellos que presentaban NASH incierto. De esta forma, procedieron con el estudio 84 pacientes, los cuales

fueron separados en dos grupos según su lesión hepática: NASH (n=36) y No NASH (n=48).

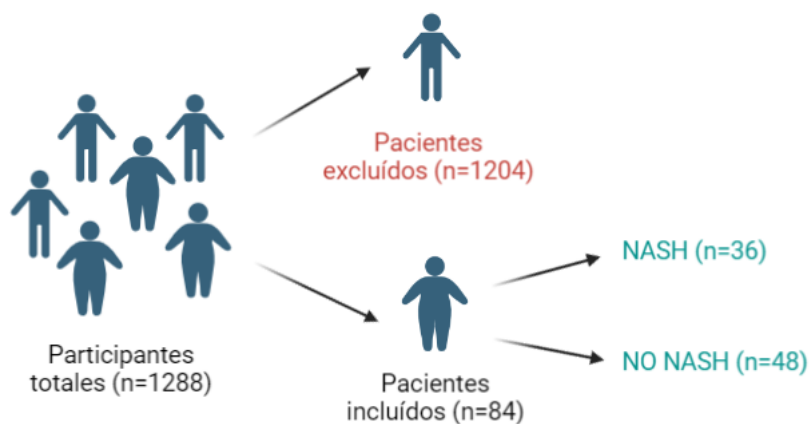


Figura 7. Representación esquemática del diseño de estudio. BioRender.

Obtención de muestras

Durante la intervención quirúrgica de los pacientes se obtuvieron muestras de sangre e hígado.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos Vacutainer para suero (con gelosa) y para plasma (con EDTA) y se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se alicuotaron las muestras y se almacenaron a -80°C para futuros análisis.

Una porción de las muestras de hígado obtenidas se fijó en formaldehido para después ser parafinada y realizar análisis histológicos. La otra parte fue congelada inmediatamente a -80°C para futuros estudios lipídicos.

Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético (Junta de Revisión Institucional) del Hospital Universitario Sant Joan de Reus (OBESPAD/14.07-31proj3), y los pacientes dieron su consentimiento informado y firmado (proyecto OM-NAFLD, ESO3/18012013). Todos los métodos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices y regulaciones pertinentes.

Características Bioquímicas

Se utilizó el analizador automático COBAS 8000 (Roche Farma) para determinar los parámetros bioquímicos: colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL,

triglicéridos, transaminasas (ALT, AST, GGT), hemoglobina, plaquetas, leucocitos, glucosa, insulina y albúmina.

Además, se estimó la resistencia a la insulina con el modelo homeostático de resistencia a la insulina (HOMA-IR) a partir de los valores de glucosa e insulina (26).

Análisis histológico

Las biopsias de hígado se procesaron de forma convencional con fines de diagnóstico y fueron examinadas por un patólogo que desconocía los datos clínicos.

La esteatosis se clasificó en cuatro categorías, según si los hepatocitos esteatósicos ocupaban <5 %, 6–33 %, 34–66 % o ≥ 67 % del campo microscópico total a 200 aumentos. La inflamación se clasificó como: no se observaron focos de inflamación lobulillar, o < 2, 2–4 y > 4 focos por campo. La fibrosis se clasificó como: ausencia de fibrosis (Estadio 0), fibrosis de leve a moderada (Estadios 1 y 2) y fibrosis en puente (Estadio 3). La presencia o ausencia de NASH se estimó utilizando la puntuación de actividad de NAFLD (puntuación NAS) y se definió como la suma de esteatosis, inflamación y balonización de hepatocitos. Los pacientes se clasificaron en tres categorías: no NASH (n = 48; $NAS \leq 2$), NASH incierto ($NAS 3-4$) y NASH definitivo (n = 36; $NAS \geq 5$) (23).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los dos grupos de estudio, NASH y No NASH, fue realizado a través del programa informático Rstudio (versión 4.2.1) y mediante la página web de MetaboAnalyst 5.0 (www.metaboanalyst.ca).

Los datos en formato Excel se gestionaron dentro del software R mediante la librería “readxl” y “tidyverse”.

Se utilizó el Saphiro-Test para estudiar la normalidad poblacional, analizando en qué medida la distribución de los datos observados difiere de los datos esperados si provienen de una distribución normal con la misma media y desviación estándar. A continuación, utilizamos el paquete “tableone” para comparar y estudiar la significación de cada variable. Este paquete es capaz de

resumir variables continuas y categóricas combinadas dentro de una tabla. Las variables categóricas se resumieron como porcentajes. Las variables continuas se resumieron como media y rango intercuartílico.

Se utilizaron las librerías “ggplot2” y “ggpubr” para representar los resultados en gráficos de barras y obtener la significancia. Se realizó un T-test para estudiar la significancia de las diferencias entre dos grupos de estudio, utilizando parámetros como la media, la varianza y los grados de libertad en función del tamaño de la muestra. Las comparaciones entre más de dos grupos se realizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre los grupos se consideran significativas cuando $p < 0.05$.

El paquete “ggplot” también se utilizó para realizar gráficos de dispersión y estudiar los valores de cada variable para un conjunto de datos, así como para estudiar la correlación entre distintas variables.

Finalmente, se utilizó el paquete “knitr” para generar un informe del código utilizado para el estudio de los datos.

Mediante la web de Metaboanalyst realizamos Heatmaps, que proporcionan una visualización directa de todos los datos en forma de cuadrados de colores que indican su abundancia relativa. También se realizó un modelo de validación cruzada de Monte Carlo que combinó aleatoria y repetidamente las variables de la NAFLD y calculó las curvas de características operativas del receptor (ROC), así como modelos lineales.

RESULTADOS

Descripción de la población

En la Tabla 3 se encuentran descritas las principales características clínicas y bioquímicas de los pacientes de estudio, que fueron estratificados en dos grupos según su *NAFLD Activity Score*: NASH y No NASH. Podemos observar que en ambos grupos existe un porcentaje elevado de mujeres, pero sin diferencias significativas en el resto de características clínicas y bioquímicas a excepción del IMC ($p=0.033$).

Observamos también diferencias significativas en las transaminasas de ambos grupos, ya que los pacientes con NASH presentan valores mucho más altos, y

en las características histológicas de la enfermedad hepática debido a lo que esta mismas supone.

Tabla 3. Principales características clínicas y bioquímicas de los pacientes objeto de estudio.

	NASH (n=36)	No NASH (n=48)	P-valor
Características clínicas			
Sexo (Mujer %)	25 (69.4)	36 (75.0)	0.751
Edad (años)	47.50 [41.75, 54.25]	51.00 [39.00, 56.00]	0.891
IMC (kg/m2)	45.33 [40.56, 50.44]	43.94 [39.16, 45.72]	0.033
Frecuencia cardíaca (lpm)	82.00 [68.25, 96.00]	68.50 [65.25, 73.00]	0.167
SAP (mmHg)	133.00 [123.00, 144.50]	135.00 [126.00, 149.25]	0.591
PAD (mmHg)	84.50 [71.00, 94.00]	87.00 [82.25, 94.25]	0.161
P cadera (cm)	141.50 [132.50, 150.00]	136.00 [128.00, 143.00]	0.130
P cintura (cm)	132.79 (13.50)	126.58 (14.68)	0.073
Síndrome Metabólico (%)	26 (72.2)	29 (60.4)	0.371
T2DM (%)	14 (38.9)	15 (31.2)	0.619
HT (%)	23 (63.9)	27 (56.2)	0.630
DLP (%)	14 (38.9)	16 (33.3)	0.767
AOS (%)	11 (30.6)	10 (20.8)	0.445
Hipotiroidismo (%)	2 (5.6)	4 (8.3)	0.951
Características bioquímicas			
Glucosa (mmol/L)	7.38 [6.27, 11.44]	6.55 [5.46, 8.79]	0.245
Insulina (pmol/L)	0.17 (0.38)	0.15 (0.36)	0.797
HOMAIR	4.98 [3.33, 8.04]	3.44 [1.90, 5.75]	0.412
Triglicéridos (mmol/L)	1.85 [1.39, 2.40]	1.47 [1.21, 2.13]	0.501
Colesterol total (mmol/L)	4.11 [3.39, 4.97]	4.09 [3.45, 4.72]	0.950
Colesterol LDL (mmol/L)	2.25 [1.76, 3.08]	2.37 [1.82, 2.74]	0.917
HDL-colesterol (mmol/L)	0.93 [0.79, 1.09]	1.01 [0.88, 1.28]	0.133
Transaminasas			
ALT (μKat/L)	0.99 [0.51, 1.28]	0.45 [0.36, 0.60]	<0.001
AST (μKat/L)	0.94 [0.56, 1.19]	0.45 [0.34, 0.60]	<0.001
GGT (μKat/L)	0.50 [0.28, 0.93]	0.30 [0.22, 0.45]	0.003
Tratamiento			
ACE_ARBS (%)	6 (16.7)	13 (27.1)	0.387
Biguanidas (%)	10 (27.8)	10 (20.8)	0.631
Sulfonilureas (%)	1 (2.8)	2 (4.2)	1.000
Diuréticos (%)	6 (16.7)	12 (25.0)	0.514
Fibratos (%)	-	2 (4.2)	0.606
Tratamiento tiroideo (%)	2 (5.6)	4 (8.3)	0.951

CPAP (%)	0.19 (0.40)	0.12 (0.33)	0.390
Características histológicas			
Esteatosis (%)			<0.001
0	-	27 (56.2)	
1	9 (26.5)	20 (41.7)	
2	16 (47.1)	1 (2.1)	
3	9 (26.5)	-	
Inflamación (%)			<0.001
0	-	15 (31.2)	
1	10 (29.4)	29 (60.4)	
2	22 (64.7)	4 (8.3)	
3	2 (5.9)	-	
Balonización (%)			<0.001
0	-	28 (58.3)	
1	9 (26.5)	18 (37.5)	
2	25 (73.5)	2 (4.2)	
Fibrosis (%)			0.001
F0	1 (3.0)	9 (18.8)	
F1	6 (18.2)	22 (45.8)	
F2	10 (30.3)	12 (25.0)	
F3	14 (42.4)	5 (10.4)	
F4	2 (6.1)	-	
NAS (%)			<0.001
0	-	2 (4.2)	
1	-	11 (22.9)	
2	-	35 (72.9)	
5	20 (58.8)	-	
6	12 (35.3)	-	
7	1 (2.9)	-	
8	1 (2.9)	-	

NASH: esteatohepatitis no alcohólica; IMC: índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; T2DM: diabetes mellitus tipo 2; HDL: lipoproteínas de alta densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HOMA-IR: evaluación del modelo homeostático para la resistencia a la insulina; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; GGT: gammaglutamil transferasa; ACE-ARBS: enzima convertidora de angiotensina y bloqueadores de los receptores de angiotensina; F0: Ninguno; F1: perisinusoidal o periportal; F2: perisinusoidal y portal/periportal; F3: Puente fibroso; F4: Cirrosis. Las variables continuas se muestran como media y RIC (25-75%). Las variables categóricas se expresan como porcentaje (%) de participantes. Los grupos se compararon utilizando el paquete "Tableone". Los valores de $p < 0,05$ indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH.

Efecto de la NASH en el perfil lipoproteico

A partir de la observación de la composición de lipoproteínas de las diferentes muestras podemos concluir que el contenido total de colesterol entre pacientes NASH y No NASH no varía de forma global significativamente (Figura 8). Sin embargo, sí que varía el contenido de colesterol específico de cada lipoproteína. En la Figura 9 podemos afirmar que las lipoproteínas con mayor contenido de colesterol son las LDL y, por el contrario, las que menor contenido tienen son las IDL. Por otra parte, también se puede observar que poseen una cantidad significativamente mayor de colesterol en las IDL y las VLDL los pacientes con NASH.

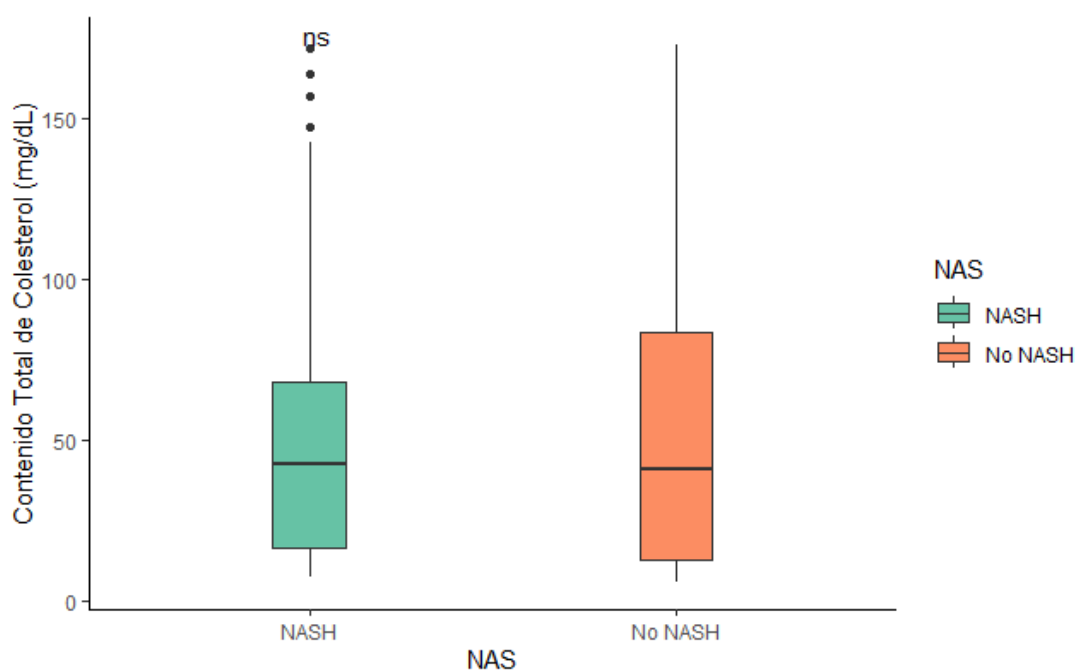


Figura 8. Contenido total de colesterol en pacientes NASH contra No NASH.

Los grupos fueron comparados mediante la prueba Wilcoxon para comparaciones coincidentes. Los valores de $p < 0,05$ () indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH. De lo contrario, aquellas diferencias no significativas están indicadas con "ns".*

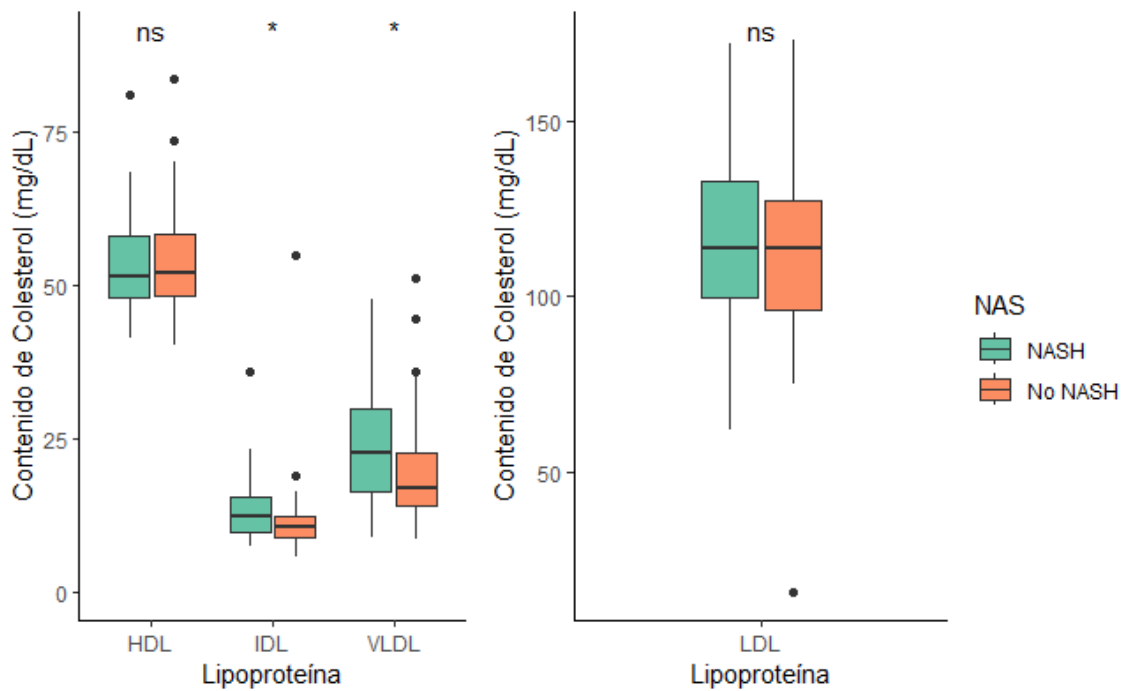


Figura 9. Carga de colesterol en las lipoproteínas de pacientes NASH contra No NASH.

Los grupos fueron comparados utilizando el Kruskal-Test para analizar las variables continuas no normales. Los valores de $p < 0,05$ (*) indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH. De lo contrario, aquellas diferencias no significativas están indicadas con "ns".

Del mismo modo, vemos en la Figura 10 y la Figura 11 que el contenido total de triglicéridos es mayor en los pacientes NASH. En concreto, comprobamos que las lipoproteínas que mayor cantidad poseen son las VLDL, siendo las IDL las que menor cantidad presentan. Finalmente, los pacientes con NASH poseen una cantidad significativamente mayor de triglicéridos en las IDL y las VLDL de pacientes con NASH.

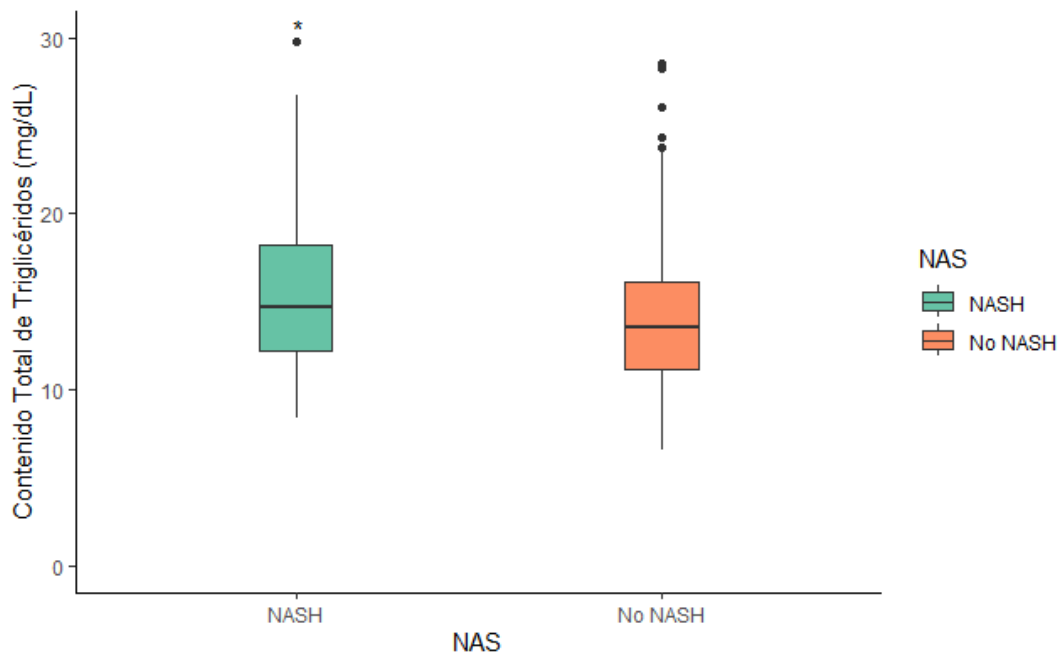


Figura 10. Contenido total de triglicéridos en pacientes NASH contra No NASH. Los grupos fueron comparados mediante la prueba Wilcoxon para comparaciones coincidentes.

Los valores de $p < 0,05$ (*) indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH. De lo contrario, aquellas diferencias no significativas están indicadas con "ns".

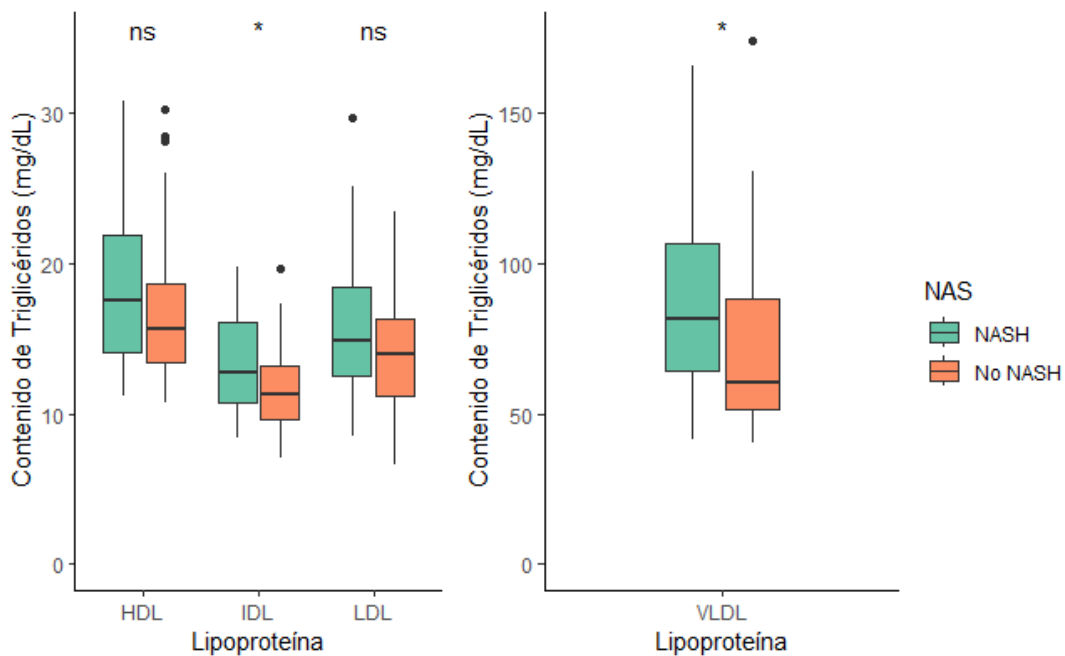


Figura 11. Contenido de triglicéridos en las lipoproteínas de pacientes NASH contra No NASH.

Los grupos fueron comparados utilizando el Kruskal-Test para analizar las variables continuas no normales. Los valores de $p < 0,05$ (*) indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH. De lo contrario, aquellas diferencias no significativas están indicadas con "ns".

Por otro lado, en cuanto al número de partículas de cada lipoproteína, contemplamos que las que mayor número tienen son las LDL y, por el contrario, las que menos tienen son las HDL. También vemos que los pacientes con NASH poseen una cantidad significativamente más grande de partículas VLDL que los pacientes No NASH (Figura 12).

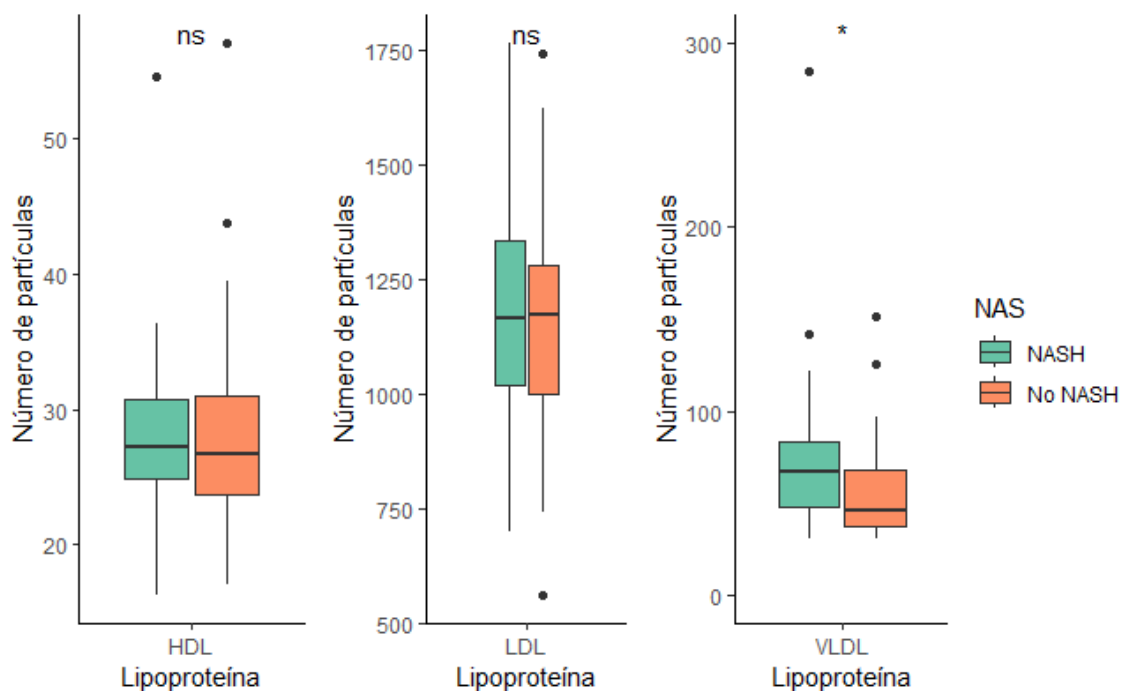


Figura 12. Número de partículas de cada lipoproteína de pacientes NASH contra No NASH.

Los grupos fueron comparados mediante la prueba Wilcoxon para comparaciones coincidentes.

Los valores de $p < 0,05$ (*) indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH.

De lo contrario, aquellas diferencias no significativas están indicadas con "ns".

Finalmente, en cuanto al diámetro de las partículas podemos destacar que las partículas más grandes son las de VLDL, mientras que las más pequeñas son las HDL, quedando en una posición intermedia las LDL (Figura 13). Esta vez, sin embargo, no encontramos ninguna diferencia significativa entre el grupo NASH y No NASH.

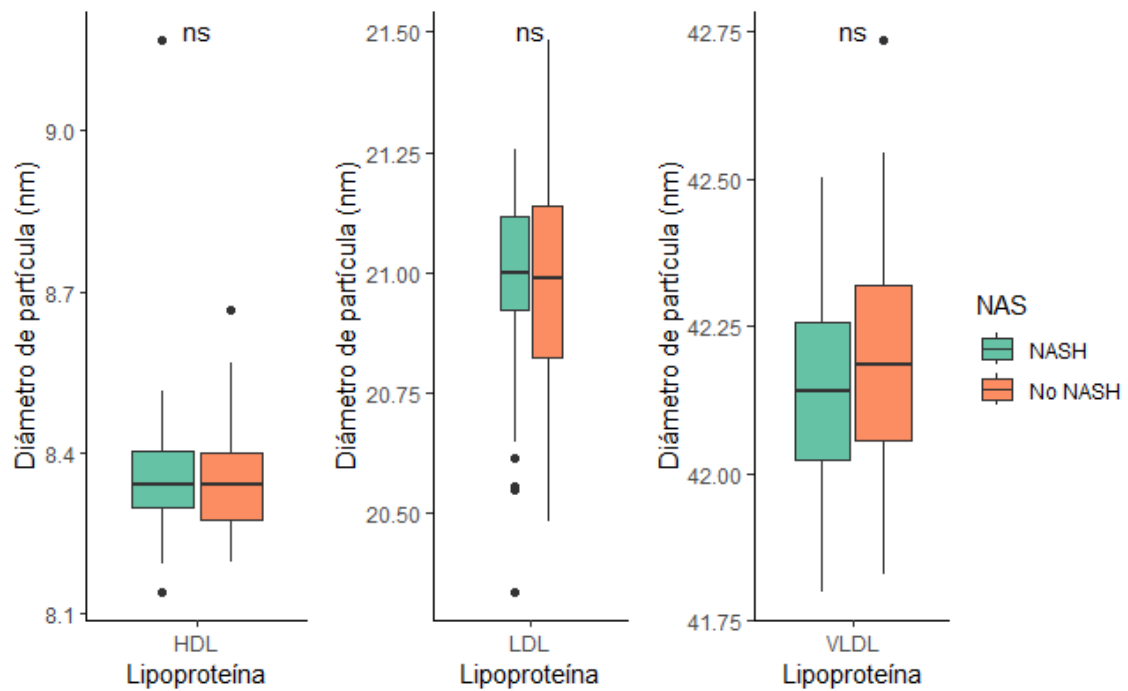


Figura 13. Diámetro medio en nm de las partículas de lipoproteínas en pacientes NASH contra No NASH.

Los grupos fueron comparados mediante la prueba Wilcoxon para comparaciones coincidentes. Los valores de $p < 0,05$ (*) indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH. De lo contrario, aquellas diferencias no significativas están indicadas con "ns".

Por otra parte, si analizamos el contenido lipídico de colesterol y triglicéridos durante la progresión de la enfermedad hepática y desarrollo de inflamación, balonización y fibrosis (Figura 14) observamos que no se produce ninguna diferencia significativa a medida que avanzan la NAFLD.

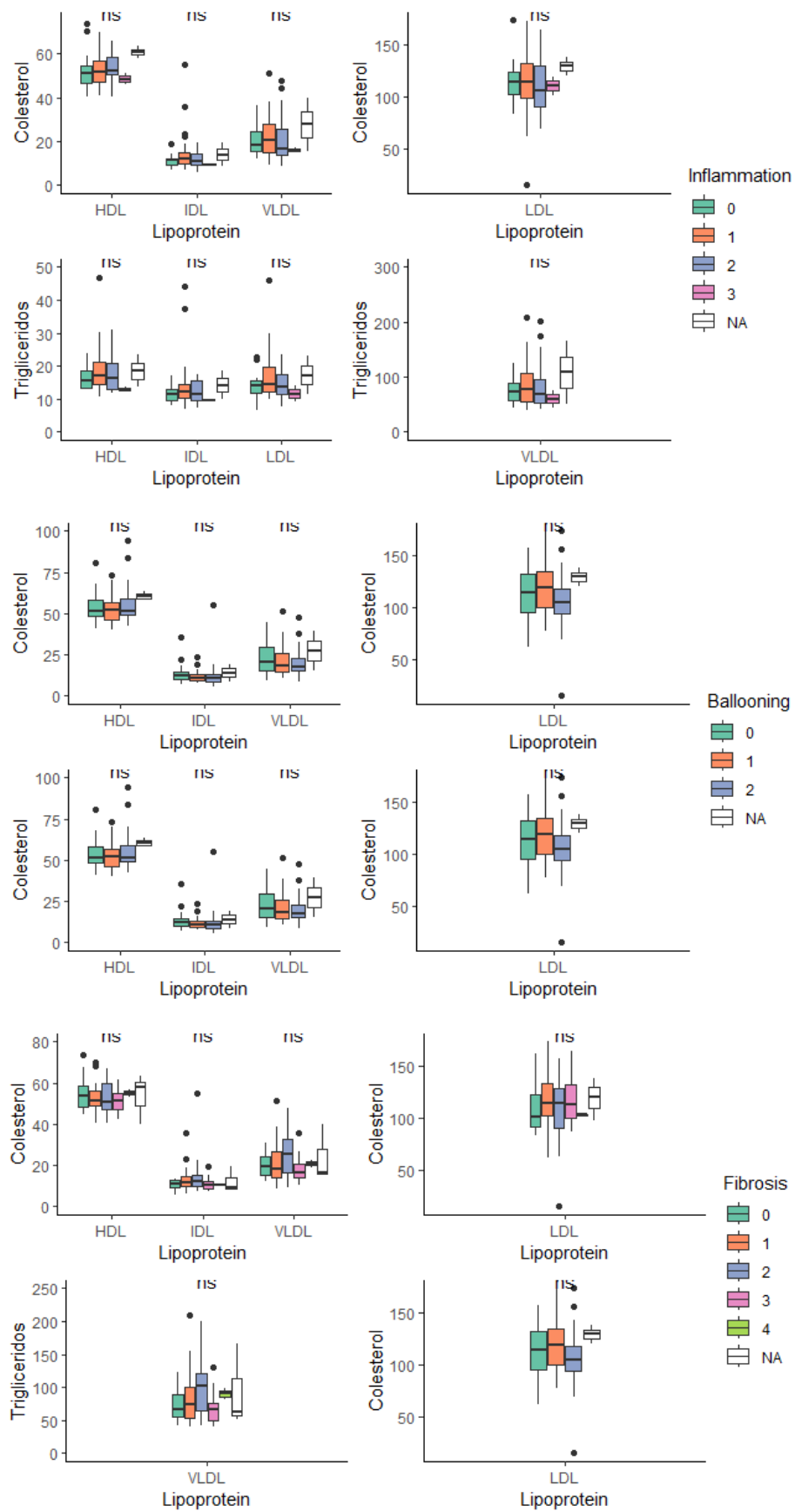


Figura 14. Contenido en mg/dL de la carga lipídica de colesterol y triglicéridos en las diferentes características histológicas de la NAFLD.

Los grupos fueron comparados utilizando el Kruskal-Test para analizar las variables continuas no normales. Los valores de $p < 0,05$ (*) indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH. De lo contrario, aquellas diferencias no significativas están indicadas con "ns".

No obstante, en la Figura 15, observamos que el grado de esteatosis de los pacientes sí que está relacionado de forma no lineal con la carga de colesterol de las IDL.

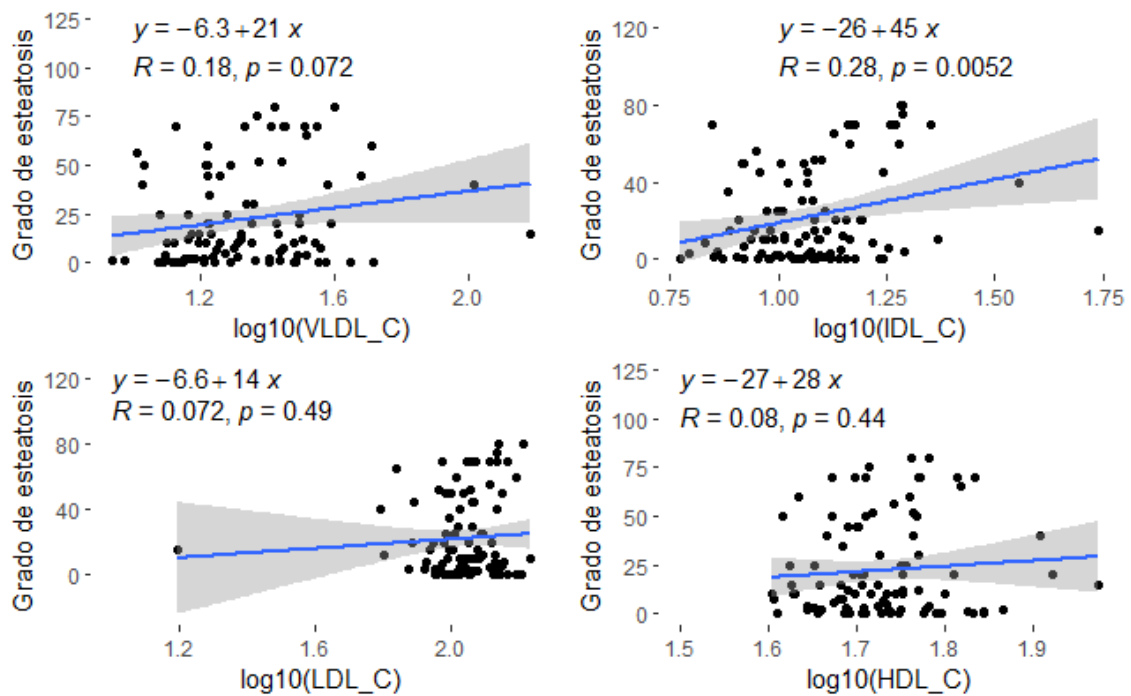


Figura 15. Relación entre el contenido de colesterol de las lipoproteínas y el grado de esteatosis presente en los pacientes de estudio. Valores de $p < 0,05$ indican una correlación significativa entre ambas variables.

Podemos concluir así que los pacientes con NASH poseen mayor número de partículas VLDL que los pacientes No NASH y, además, aumenta el contenido de colesterol y triglicéridos de las partículas de VLDL y LDL.

Influencia de las comorbilidades en el perfil lipoproteico

Como se mencionó anteriormente, la obesidad viene asociada a diversas comorbilidades, y estas podrían tener impacto sobre la composición (contenido de ésteres de colesterol y triglicéridos), el tamaño y el número de partículas lipoproteicas en los pacientes de estudio. A continuación, se muestran los resultados de los box-plot realizados para estudiar el efecto de la dislipemia (DLP), la diabetes (T2DM) o la hipertensión (HT).

Para empezar, se observa que hay más contenido de colesterol total en pacientes con DLP, aunque esta diferencia no es significativa (Figura 16). Además, en los pacientes con DLP las lipoproteínas IDL y VLDL poseen mayor cantidad de colesterol que en pacientes sin DLP (Figura 17).

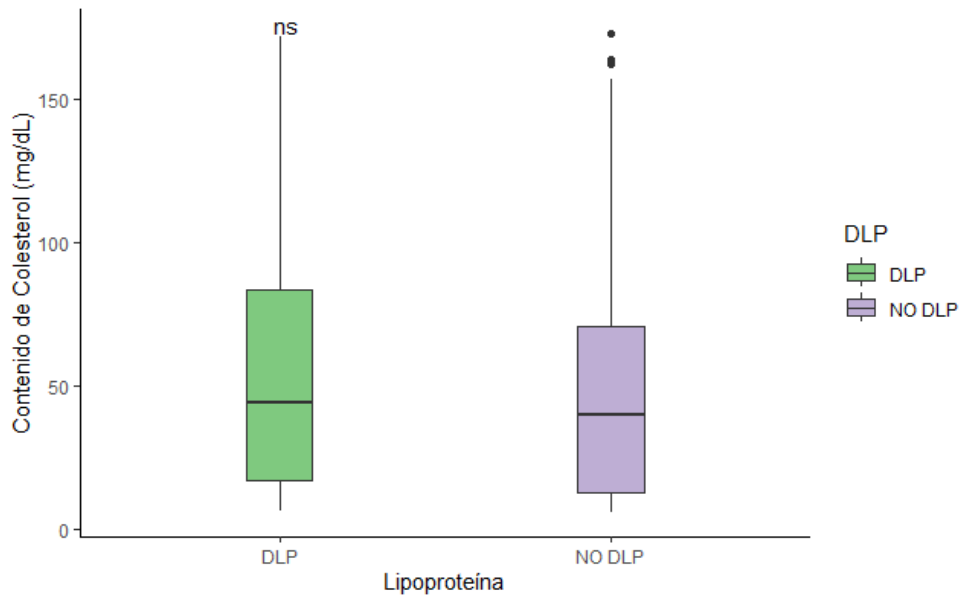


Figura 16. Efecto de la dislipemia sobre el contenido total de colesterol en los pacientes.

Los grupos fueron comparados mediante la prueba Wilcoxon para comparaciones coincidentes. Los valores de $p < 0,05$ (*) indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH.

De lo contrario, aquellas diferencias no significativas están indicadas con "ns".

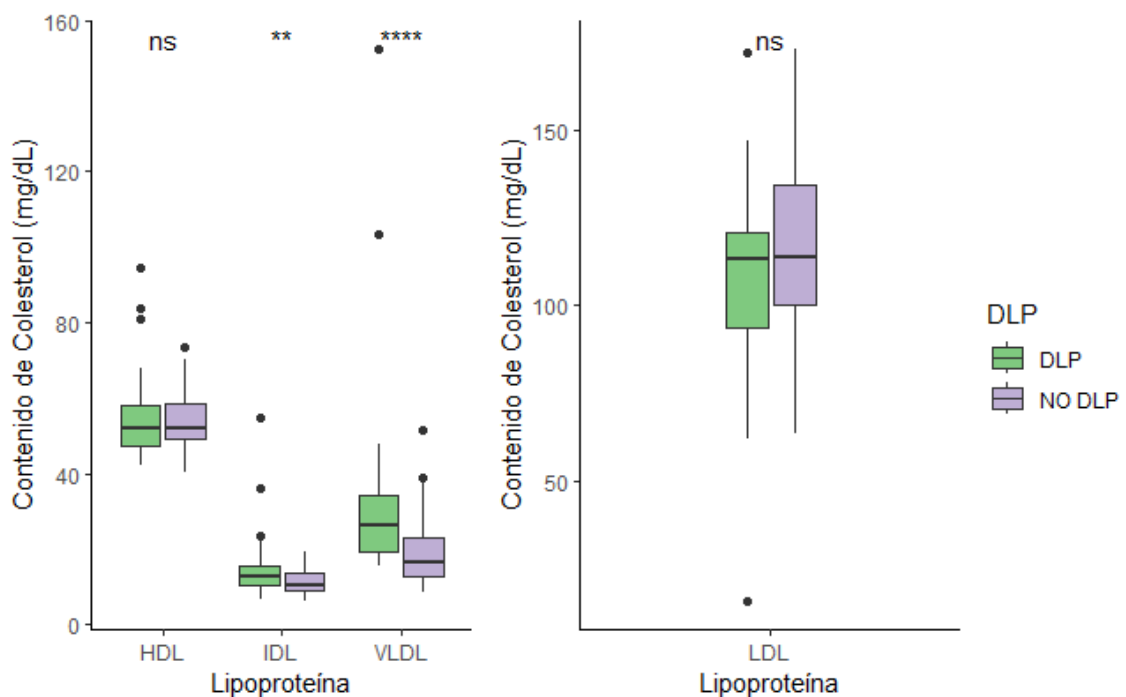


Figura 17. Efecto de la dislipemia sobre el contenido de colesterol de cada lipoproteína en los pacientes.

Los grupos fueron comparados utilizando el Kruskal-Test para analizar las variables continuas no normales. Los valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH. De lo contrario, aquellas diferencias no significativas están indicadas con “ns”.

Del mismo modo, en los pacientes con DLP se observa mayor cantidad total de triglicéridos (Figura 18). Además, en los pacientes con DLP las lipoproteínas HDL, las IDL y las VLDL poseen mayor cantidad de triglicéridos en comparación con los pacientes sin DLP (Figura 19).

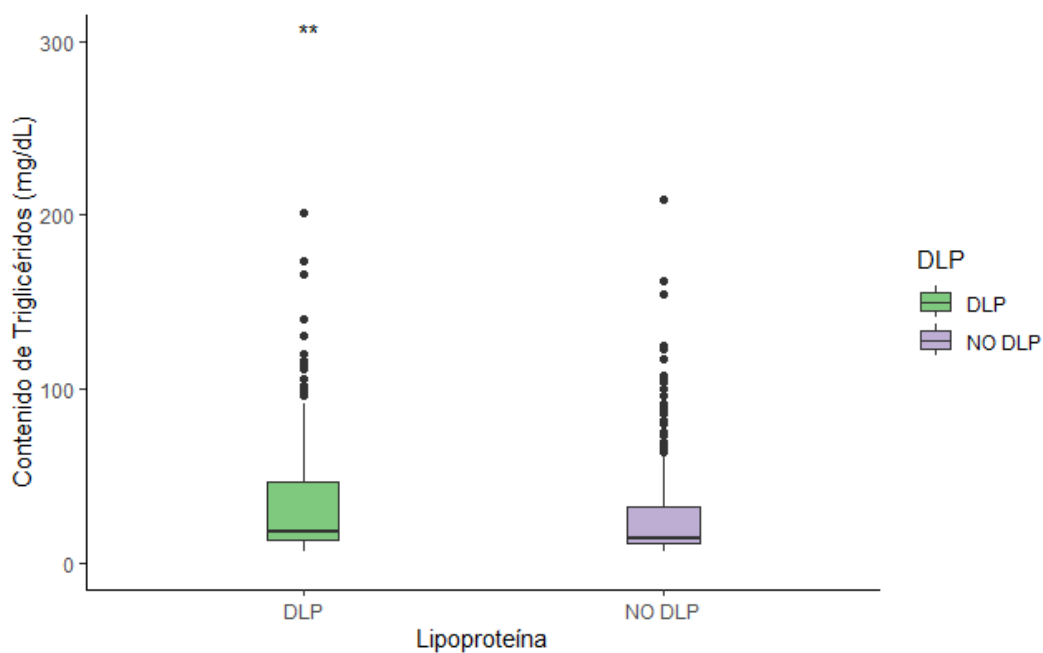


Figura 18. Efecto de la dislipemia sobre el contenido total de triglicéridos en los pacientes.

Los grupos fueron comparados mediante la prueba Wilcoxon para comparaciones coincidentes. Los valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH. De lo contrario, aquellas diferencias no significativas están indicadas con “ns”.

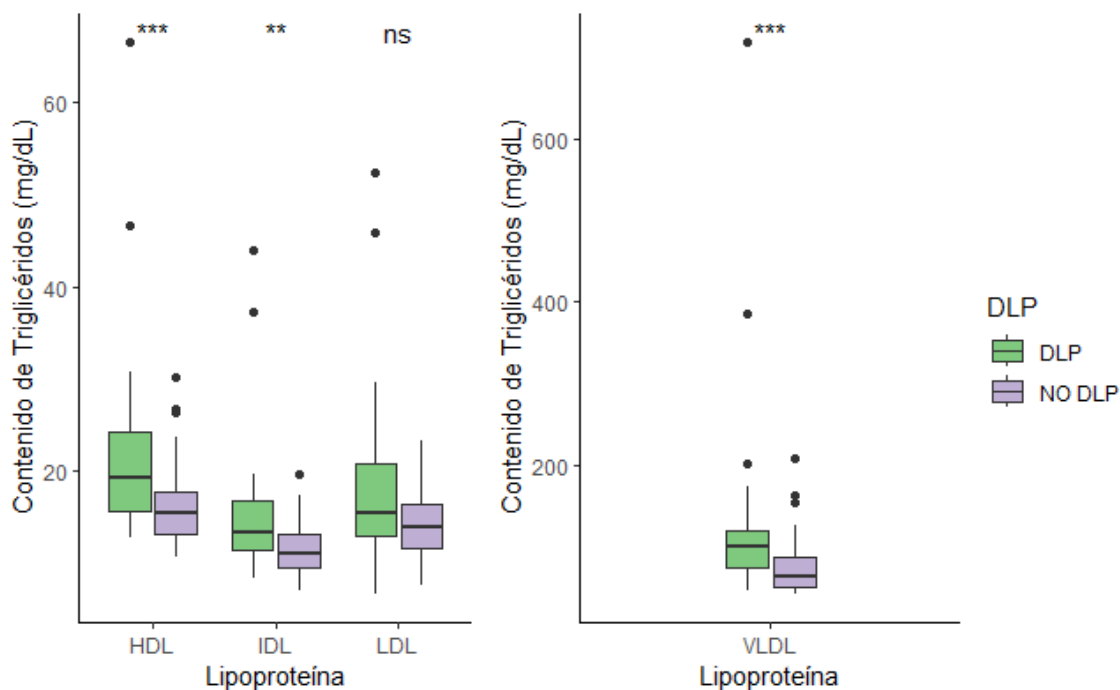


Figura 19. Efecto de la dislipemia sobre el contenido de triglicéridos de cada lipoproteína en los pacientes.

Los grupos fueron comparados utilizando el Kruskal-Test para analizar las variables continuas no normales. Los valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH. De lo contrario, aquellas diferencias no significativas están indicadas con “ns”.

Por otro lado, se ha visto que la diabetes mellitus de tipo 2 (T2DM) también puede hacer variar los valores de lipoproteínas presentes en los pacientes. Gracias a los box-plot realizados se ha podido comprobar que hay más contenido de colesterol total en pacientes con T2DM (Figura 20). Además, en los pacientes con T2DM las lipoproteínas IDL y VLDL poseen mayor cantidad de colesterol que en pacientes sin T2DM (Figura 21). De igual forma, en los pacientes con T2DM se observa mayor cantidad total de triglicéridos (Figura 22). Además, en los pacientes con T2DM las lipoproteínas HDL, las IDL y las LDL poseen mayor cantidad de triglicéridos en comparación con los pacientes sin T2DM (Figura 23).

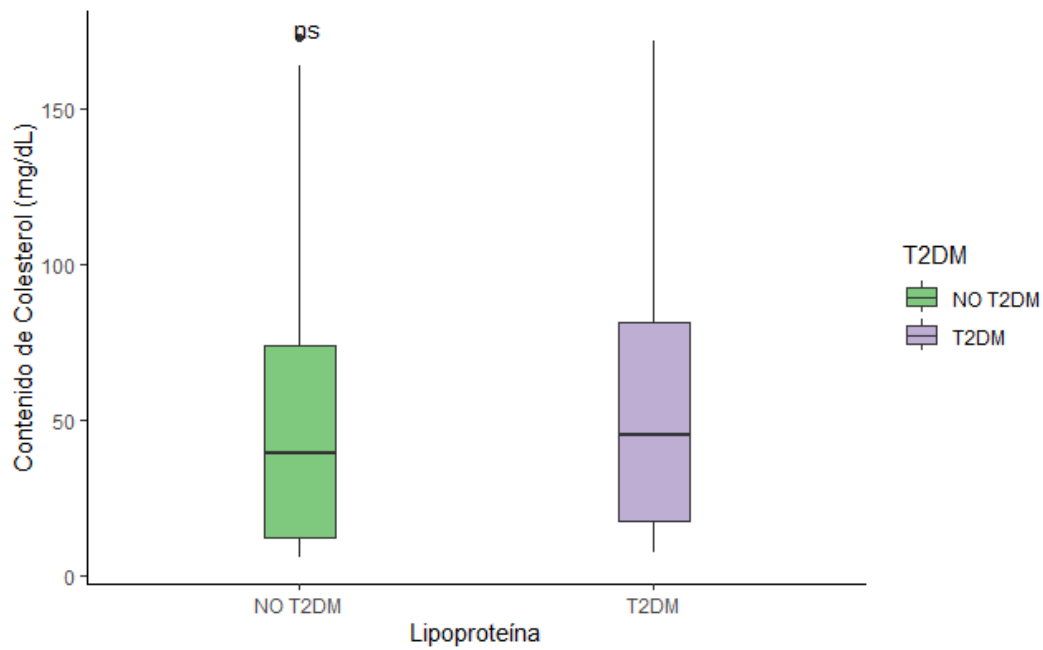


Figura 20. Efecto de la diabetes mellitus de tipo 2 sobre el contenido total de colesterol en los pacientes.

Los grupos fueron comparados mediante la prueba Wilcoxon para comparaciones coincidentes. Los valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH. De lo contrario, aquellas diferencias no significativas están indicadas con “ns”.

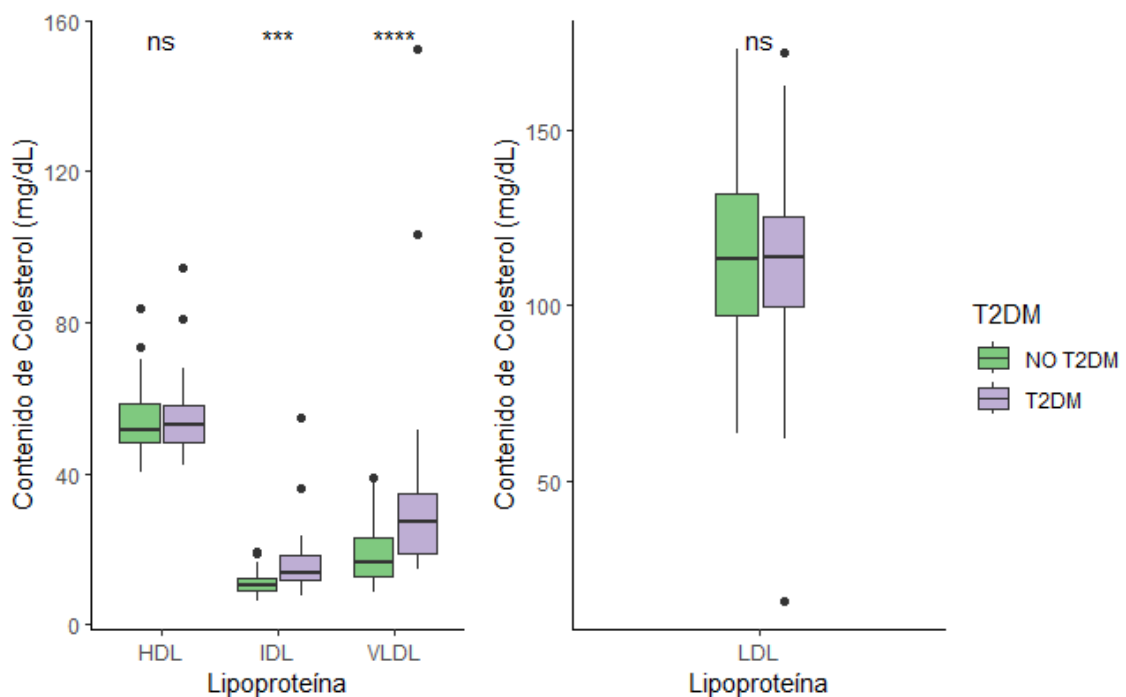


Figura 21. Efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre el contenido de colesterol de cada lipoproteína en los pacientes.

Los grupos fueron comparados utilizando el Kruskal-Test para analizar las variables continuas no normales. Los valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH. De lo contrario, aquellas diferencias no significativas están indicadas con “ns”.

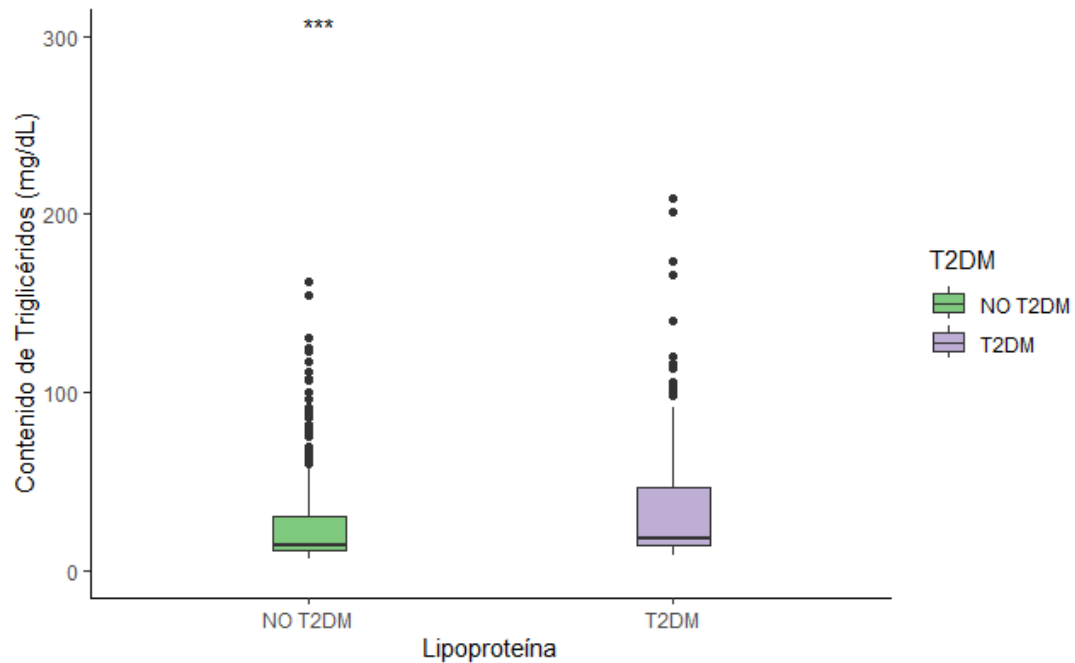


Figura 22. Efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre el contenido total de triglicéridos en los pacientes.

Los grupos fueron comparados mediante la prueba Wilcoxon para comparaciones coincidentes. Los valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH. De lo contrario, aquellas diferencias no significativas están indicadas con “ns”.

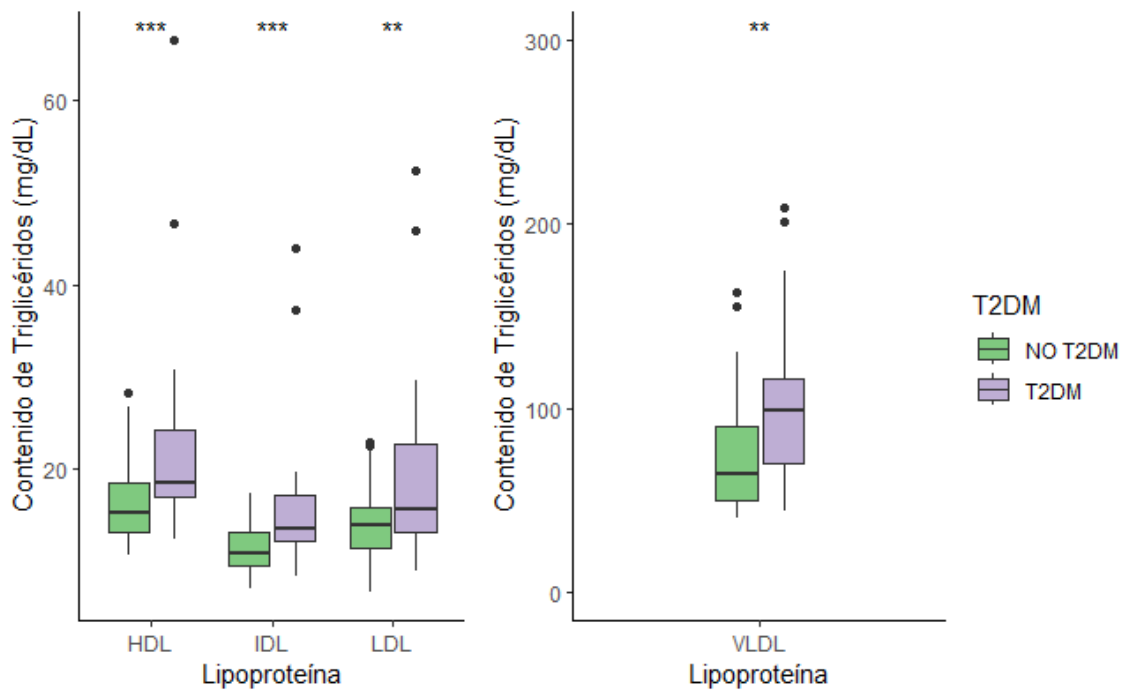


Figura 23. Efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre el contenido de triglicéridos de cada lipoproteína en los pacientes.

Los grupos fueron comparados utilizando el Kruskal-Test para analizar las variables continuas no normales. Los valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH. De lo contrario, aquellas diferencias no significativas están indicadas con “ns”.

Por último, en los pacientes con hipertensión (HT) se ha visto que, globalmente, no hay ninguna diferencia significativa en el contenido de colesterol total en pacientes con HT respecto a pacientes sin HT (Figura 24), pero cabe destacar que el contenido de colesterol en las IDL es mayor en pacientes con HT que en pacientes sin HT (Figura 25). De la misma manera, tampoco se observa mayor cantidad total de triglicéridos en los pacientes con HT (Figura 26) y, pero las IDL poseen mayor cantidad de este en pacientes con HT respecto a los pacientes sin HT (Figura 27).

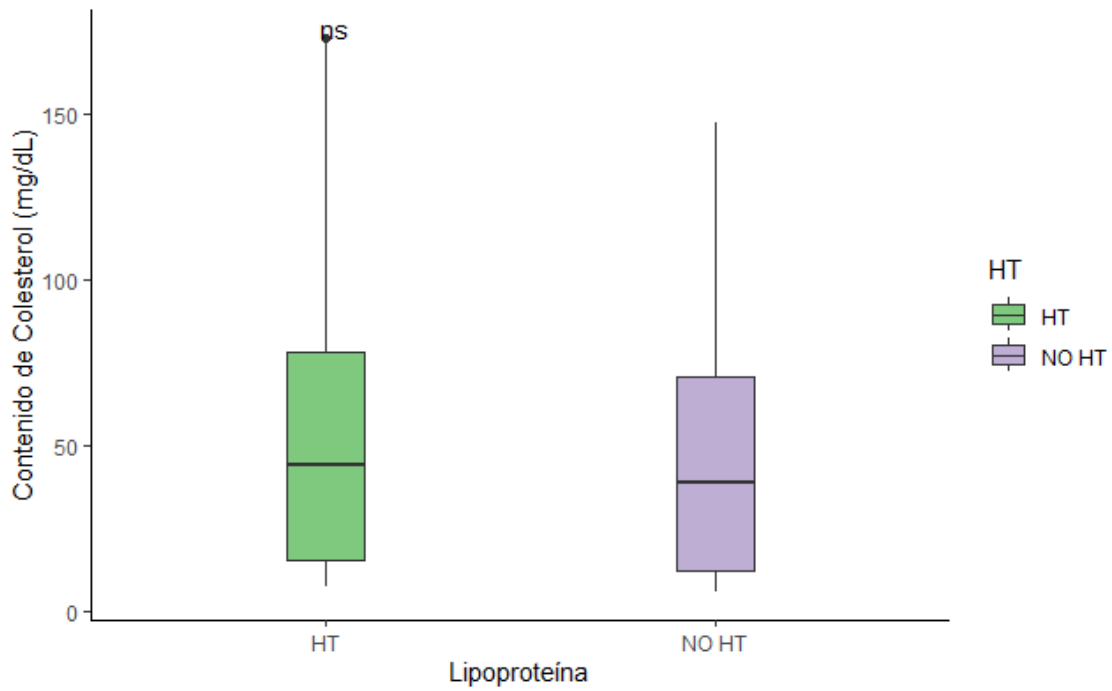


Figura 24. Efecto de la hipertensión sobre el contenido total de colesterol en los pacientes.

Los grupos fueron comparados mediante la prueba Wilcoxon para comparaciones coincidentes.

Los valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH. De lo contrario, aquellas diferencias no significativas están indicadas con "ns".

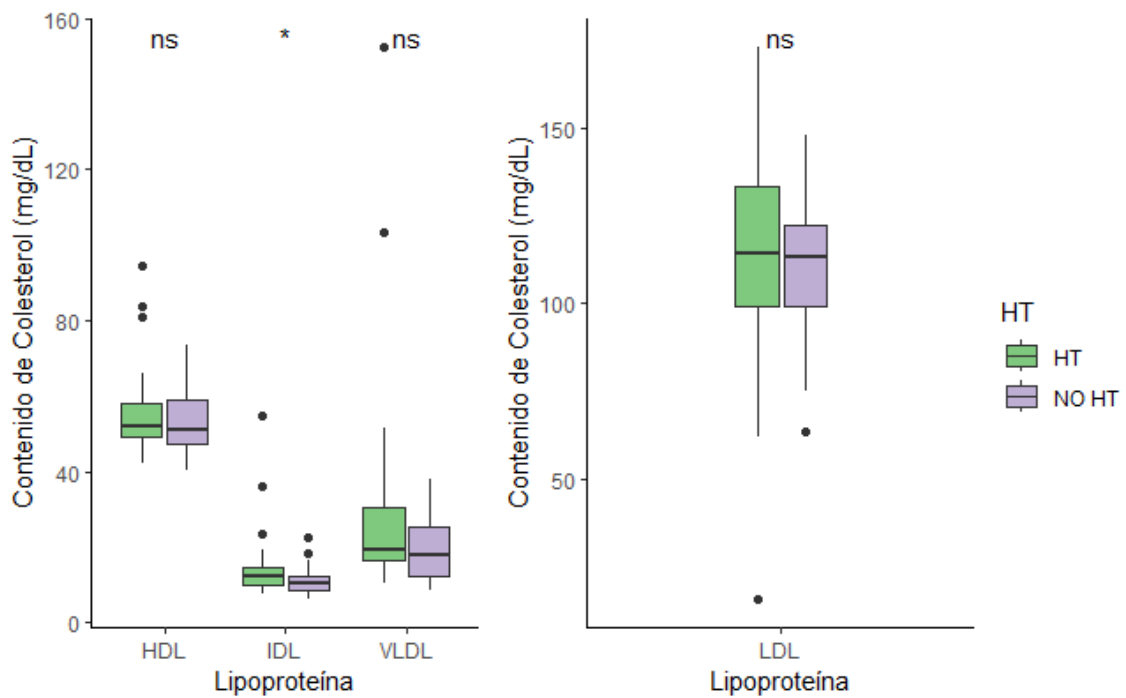


Figura 25. Efecto de la hipertensión sobre el contenido de colesterol de cada lipoproteína en los pacientes.

Los grupos fueron comparados utilizando el Kruskal-Test para analizar las variables continuas no normales. Los valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH. De lo contrario, aquellas diferencias no significativas están indicadas con “ns”.

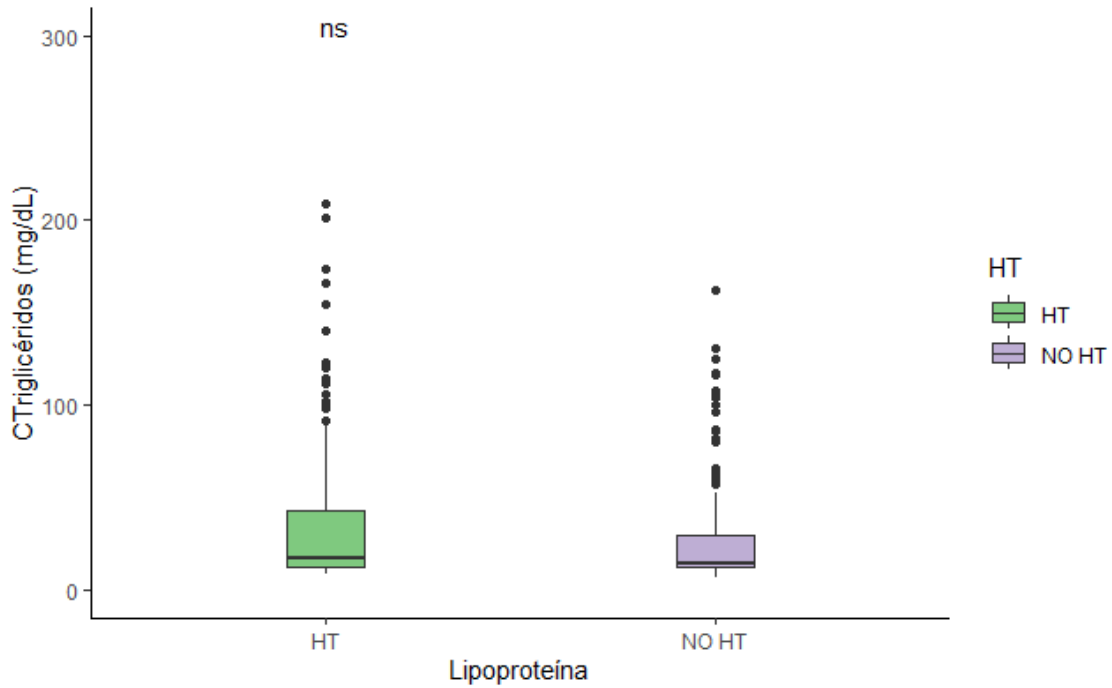


Figura 26. Efecto de la hipertensión sobre el contenido total de triglicéridos en los pacientes.

Los grupos fueron comparados mediante la prueba Wilcoxon para comparaciones coincidentes. Los valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH. De lo contrario, aquellas diferencias no significativas están indicadas con “ns”.

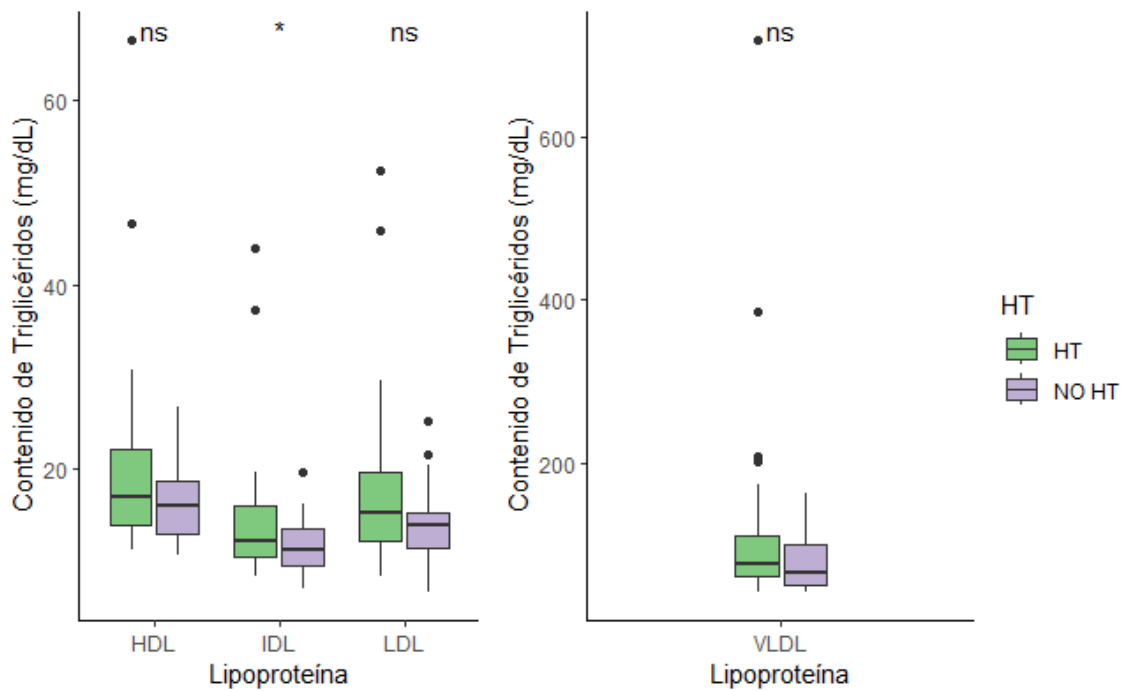


Figura 27. Efecto de la hipertensión sobre el contenido de triglicéridos de cada lipoproteína en los pacientes.

Los grupos fueron comparados utilizando el Kruskal-Test para analizar las variables continuas no normales. Los valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) indican diferencias significativas entre los grupos NASH y No NASH. De lo contrario, aquellas diferencias no significativas están indicadas con "ns".

Con esto podemos concluir que tanto la DLP como la T2DM parecen tener un rol importante en la disrupción del metabolismo lipoproteico, sobre todo cuando se trata de partículas VLDL e IDL.

Capacidad diagnóstica de las lipoproteínas

Para evaluar el grado en el que estas lipoproteínas son capaces de determinar si un individuo padece NASH o no, medimos, a través de un ajuste lineal, la variable más significativa para la variación lipoproteica entre los grupos de estudio, siendo esta la *NAFLD Activity Score* (Figura 28). En esta figura observamos que el bajo p-valor ($10E-30$) de la variable NAS está relacionado con cambios lipoproteicos, confirmando así que es la NASH la que tiene impacto sobre el perfil lipoproteico.

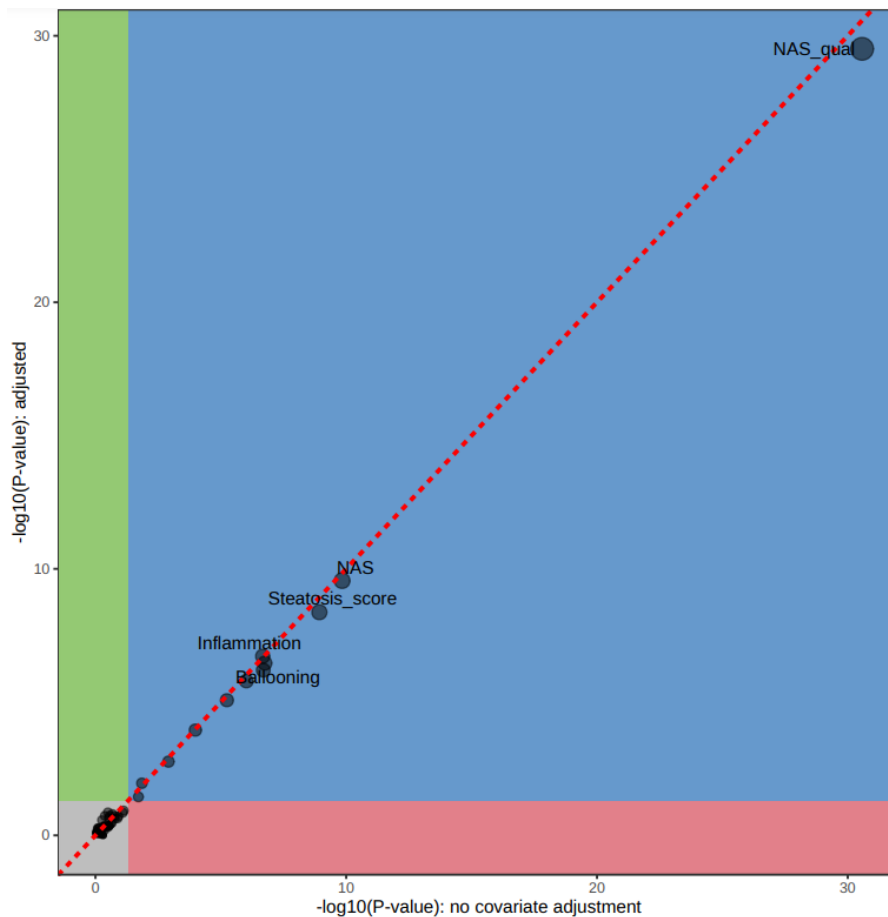


Figura 28. Ajuste lineal de las variables de la NAFLD. Obtenida mediante Metaboanalyst.

También se realizó un Heatmap en el que se muestra cómo varía para cada paciente el perfil de las lipoproteínas, en conjunto con otras variables, según las principales comorbilidades de la NAFLD (Figura 29), síndrome metabólico, T2DM, DLP y HT. Como se puede ver, los pacientes se agrupan claramente por el contenido lipídico de las diferentes lipoproteínas y las características histológicas del hígado. Sin embargo, no se parecían diferencias notorias entre los pacientes que padecen (1) o no (0) diferentes enfermedades concomitantes de la obesidad.

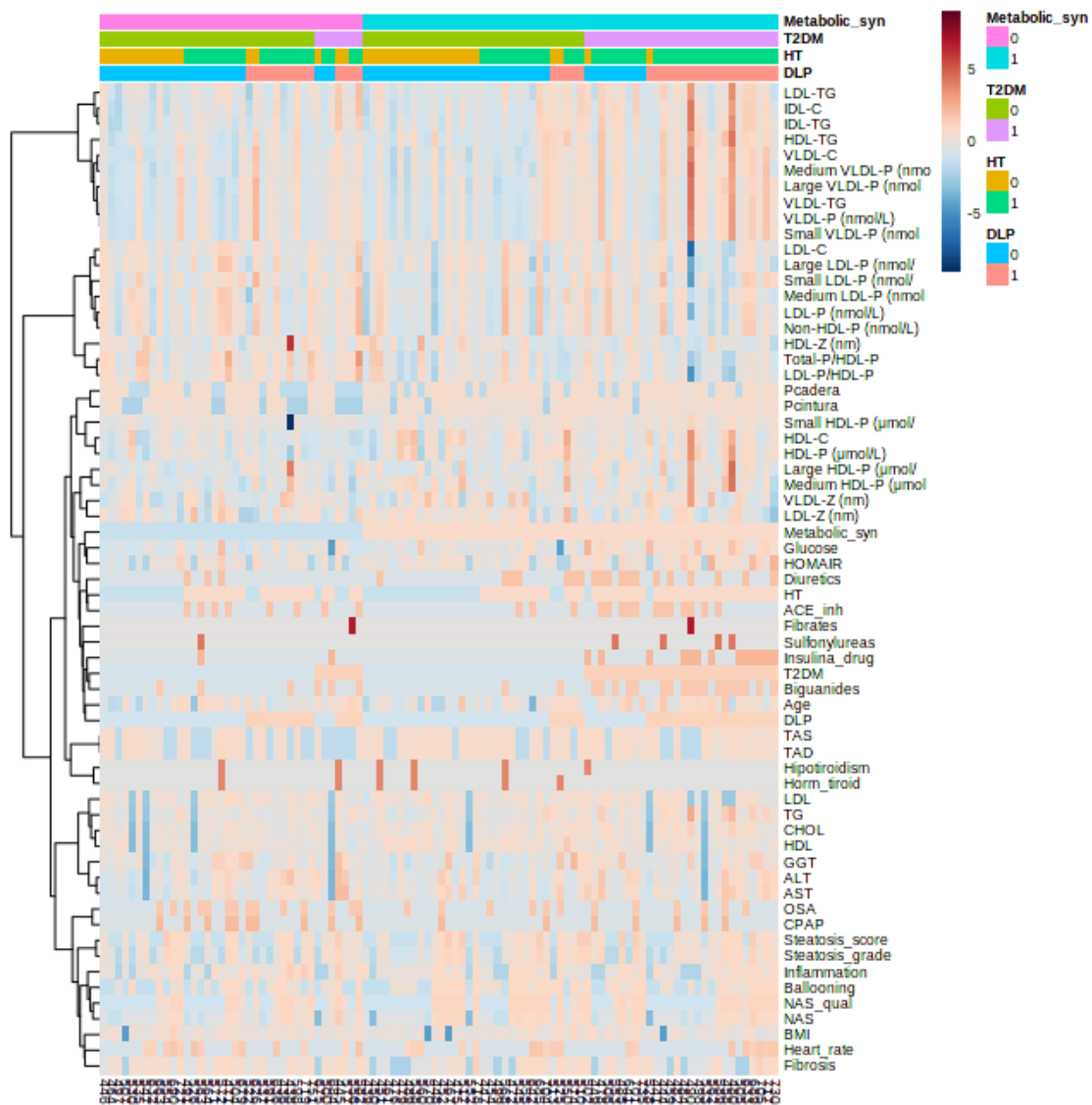


Figura 29. Diagrama de Heatmap y clusters para la variación de características clínicas y bioquímicas de los pacientes según diferentes comorbilidades. Obtenida mediante Metaboanalyst.

Para medir la precisión de la predicción de NASH de las lipoproteínas se realizó un análisis ROC (*Receiver operating characteristic* o característica operativa del receptor) estratificando a los pacientes según su NAS y combinando diferente número de variables (Figura 30). Vemos que para una combinación de 3 variables el test presenta un área bajo la curva (AUC) de 0,977 que, en comparación con la AUC=1 que representa una capacidad de diagnóstico perfecta, representa un valor bastante de diagnóstico bastante bueno y aceptable. Así, esta prueba confirma que el conjunto de lipoproteínas sí tiene capacidad diagnóstica, pero no es así cuando estas se miden por separado.

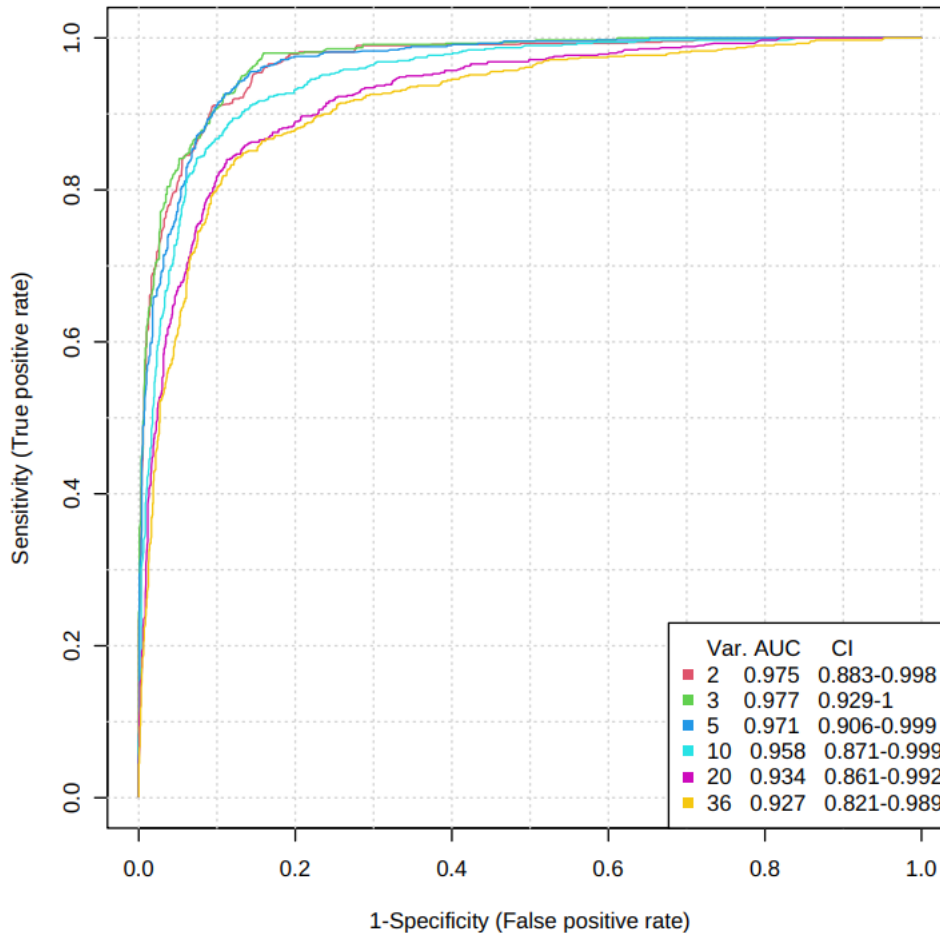


Figura 30. Curva ROC para el análisis de la especificidad y la sensibilidad de los modelos generados. Obtenida mediante Metaboanalyst.

DISCUSIÓN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) es hoy en día una de las formas más comunes de enfermedad hepática crónica en todo el mundo y se espera que su prevalencia siga aumentando. La NAFLD se ha considerado tradicionalmente una consecuencia de la obesidad y el síndrome metabólico (27). Sin embargo, este vínculo es mucho más complejo de lo que se pensaba anteriormente y ahora se estudia la posibilidad de un vínculo bidireccional entre la NAFLD y otras comorbilidades del síndrome metabólico (28).

Tal y como pudimos observar en la Tabla 3, las características clínicas y bioquímicas de los grupos de estudio únicamente eran significativas cuando estaban directamente implicadas en la enfermedad hepática: IMC, esteatosis, fibrosis, etc. Además, a diferencia de lo que esperaríamos, vemos que no hay

diferencias significativas en el desarrollo de comorbilidades entre pacientes NASH y No NASH. Esto puede explicarse gracias a la Figura 15, que sugiere que la gravedad de NASH no comporta cambios progresivos en el metabolismo lipoproteico.

El metabolismo de las lipoproteínas está íntimamente ligado a la homeostasis de los lípidos en el hígado y, en consecuencia, se ve alterado por la enfermedad hepática. La acumulación de lípidos en los hepatocitos está determinada primero por la salida de lípidos, predominantemente a través de la secreción de VLDL, segundo por la captación de ácidos grasos y lipoproteínas, y tercero por la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Cualquier mecanismo que interrumpa este equilibrio podría ser el punto de partida de la NAFLD (29). No solo influyen los hábitos personales, sino que tanto los polimorfismos genéticos que lleven a la alteración funcional en proteínas individuales de estas vías (30) como la desregulación de enzimas, hormonas (31), mitocondrias (32) y microbiota (33) que resulte en un incremento de la absorción de colesterol o una disminución de su eliminación puede ser suficiente para inducir NAFLD.

Con el perfil lipoproteico de nuestros pacientes podemos observar que se produce un incremento de la parte lipídica (colesterol y triglicéridos) en la composición de las lipoproteínas IDL y VLDL en aquellas personas que padecen NASH. Esto seguramente se deba al rol que desempeñan estas lipoproteínas, ya que, como se menciona en la introducción, las VLDL son las encargadas de almacenar y transportar ácidos grasos (34). Estas, posteriormente, se convierten en IDL y después en LDL para ser captadas por el hígado mediante receptores LDL. Además, vemos también que en pacientes con NASH hay un número mayor de partículas de VLDL que en los pacientes No NASH, que se podría explicar por la saturación del receptor LDL a altos niveles de colesterol o por la disminución de la lipofagia (6,35).

Por otra parte, la bibliografía sugiere una clara relación entre las NAFLD con otras comorbilidades de la obesidad (36), cosa que corroboran nuestros resultados ya que vemos, una vez más, una disrupción importante en la carga lipídica de las partículas VLDL e IDL en aquellos pacientes que sufren de T2DM o de DLP. Sin embargo, la relación entre estas enfermedades sigue sin estar clara hoy en día (37). En contraposición, existe otro estudio que establece que

la hipertensión y la disminución de las partículas VLDL de colesterol son indicadores de riesgo de la NAFLD (38).

La necesidad de desarrollar biomarcadores no invasivos para diferenciar la esteatosis simple de NASH y NASH de fibrosis temprana es cada vez mayor. De ahí, el estudio de biomarcadores no invasivos que han surgido en los últimos años como los RNA no codificantes (39), los circRNA (40) y los long noncoding RNAs (lncRNAs) (41) debido a su relación con la severidad con la NAFLD.

Sin embargo, a pesar de que la NASH tiene otros métodos de detección no invasivos, como la elastografía hepática por ultrasonido (42), estos pueden complicarse cuando coexisten la fibrosis con la esteatosis (43).

Finalmente, en este estudio hemos podido comprobar el impacto de NASH sobre el perfil de lipoproteínas y la capacidad diagnóstica de estas. Los resultados muestran que un análisis de estas lipoproteínas en conjunto puede tener un carácter predictivo significativo.

CONCLUSIÓN

En conclusión, el perfil lipoproteico de los pacientes con NASH muestra alteraciones en el contenido, número de partículas y diámetro de las lipoproteínas IDL y VLDL, lo cual está relacionado con la acumulación de lípidos en el hígado. También se observa una asociación entre la NAFLD y otras comorbilidades de la obesidad, como la diabetes mellitus tipo 2 y la dislipidemia, aunque se desconoce el mecanismo que las une. Nuestros resultados han demostrado que hay un incremento importante en la carga de colesterol de las IDL cuando el hígado padece esteatosis, confirmando así el vínculo entre el metabolismo lipoproteico con la desregulación de la homeostasis lipídica en el hígado que lleva a la progresión de la enfermedad. Sin embargo, no parece que se produzcan muchos más cambios en el perfil lipoproteico a medida que avanza la enfermedad hepática y empeoran las características histológicas.

A pesar de que existen métodos no invasivos para detectar la NAFLD, estos pueden ser limitados cuando hay presencia de fibrosis e inflamación, por lo que es necesario seguir investigando el mecanismo detrás de la enfermedad para poder encontrar marcadores biológicos lo suficientemente fiables para el diagnóstico de la enfermedad.

Gracias a este estudio, podemos afirmar que el conjunto lipoproteico característico de la NASH es consecuencia de esta misma y puede servir como diagnóstico.

REFERENCIAS

1. Seidel D. Lipoproteins in liver disease. *J Clin Chem Clin Biochem Z Klin Chem Klin Biochem*. septiembre de 1987;25(9):541-51.
2. Illingworth DR. Lipoprotein metabolism. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. julio de 1993;22(1):90-7.
3. Real JT, Ascaso JF. Metabolismo lipídico y clasificación de las hiperlipemias. *Clínica E Investig En Arterioscler* [Internet]. 1 de mayo de 2021 [citado 23 de mayo de 2023];33:3-9. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-clinica-e-investigacion-arteriosclerosis-15-articulo-metabolismo-lipidico-clasificacion-hiperlipemias-S0214916821000097>
4. Feingold KR. Introduction to Lipids and Lipoproteins. En: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editores. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [citado 23 de mayo de 2023]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>
5. Kroon PA, Powell EE. Liver, lipoproteins and disease: I. Biochemistry of lipoprotein metabolism. *J Gastroenterol Hepatol*. 1992;7(2):214-24.
6. Feingold KR. Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am* [Internet]. 1 de septiembre de 2022 [citado 23 de mayo de 2023];51(3):437-58. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889852922000238>
7. Hirano T. Pathophysiology of Diabetic Dyslipidemia. *J Atheroscler Thromb*. 1 de septiembre de 2018;25(9):771-82.
8. Vergès B. Lipid Disorders in Type 1 Diabetes. En: *Type 1 Diabetes - Complications, Pathogenesis, and Alternative Treatments* [Internet]. IntechOpen; 2011 [citado 23 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/24084>
9. Cerqueira NMFSA, Oliveira EF, Gesto DS, Santos-Martins D, Moreira C, Moorthy HN, et al. Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry*. 4 de octubre de 2016;55(39):5483-506.
10. Luo J, Yang H, Song BL. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. abril de 2020;21(4):225-45.
11. Wang HH, Garruti G, Liu M, Portincasa P, Wang DQH. Cholesterol and Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis: Recent Advances in Reverse Cholesterol Transport. *Ann Hepatol* [Internet]. 1 de noviembre de 2017 [citado 23 de mayo de 2023];16:S27-42. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1665268119310415>
12. Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, et al. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr*. junio de 2008;92(3):272-83.

13. Alves-Bezerra M, Cohen DE. Triglyceride metabolism in the liver. *Compr Physiol* [Internet]. 12 de diciembre de 2017 [citado 23 de mayo de 2023];8(1):1-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6376873/>
14. Safaei M, Sundararajan EA, Driss M, Boulila W, Shapi'i A. A systematic literature review on obesity: Understanding the causes & consequences of obesity and reviewing various machine learning approaches used to predict obesity. *Comput Biol Med* [Internet]. 1 de septiembre de 2021 [citado 23 de mayo de 2023];136:104754. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010482521005485>
15. Lin X, Li H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front Endocrinol* [Internet]. 6 de septiembre de 2021 [citado 23 de mayo de 2023];12:706978. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8450866/>
16. Dyaczyński M, Scanes CG, Koziiec H, Koziiec H, Pierzchała-Koziiec K. Endocrine implications of obesity and bariatric surgery. *Endokrynol Pol*. 2018;69(5):574-97.
17. Bases moleculares de la obesidad | Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud | AccessMedicina | McGraw Hill Medical [Internet]. [citado 23 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473§ionid=102744936#1118681039>
18. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* [Internet]. julio de 2018 [citado 23 de mayo de 2023];24(7):908-22. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41591-018-0104-9>
19. Ros Pérez M, Medina-Gómez G. Obesidad, adipogénesis y resistencia a la insulina. *Endocrinol Nutr* [Internet]. 1 de agosto de 2011 [citado 23 de mayo de 2023];58(7):360-9. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-nutricion-12-articulo-obesidad-adipogenesis-resistencia-insulina-S157509221100218X>
20. Resistencia insulínica e hipertensión arterial I: mecanismos [Internet]. 2006 [citado 23 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.medwave.cl/2001-2011/2305.html>
21. Cobbina E, Akhlaghi F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) – pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Rev* [Internet]. 17 de marzo de 2017 [citado 23 de mayo de 2023]; Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03602532.2017.1293683>
22. Yin X, Guo X, Liu Z, Wang J. Advances in the Diagnosis and Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. enero de 2023

- [citado 30 de mayo de 2023];24(3):2844. Disponible en:
<https://www.mdpi.com/1422-0067/24/3/2844>
23. Cabré N, Gil M, Amigó N, Luciano-Mateo F, Baiges-Gaya G, Fernández-Arroyo S, et al. Laparoscopic sleeve gastrectomy alters 1H-NMR-measured lipoprotein and glycoprotein profile in patients with severe obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*. 14 de enero de 2021;11(1):1343.
 24. Cui H, Li Y, Cao M, Liao J, Liu X, Miao J, et al. Untargeted Metabolomic Analysis of the Effects and Mechanism of Nuciferine Treatment on Rats With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Front Pharmacol* [Internet]. 2020 [citado 27 de mayo de 2023];11. Disponible en:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.00858>
 25. de Alwis NMW, Anstee QM, Day CP. How to Diagnose Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis* [Internet]. 22 de agosto de 2016 [citado 27 de mayo de 2023];34(Suppl. 1):19-26. Disponible en:
<https://doi.org/10.1159/000447277>
 26. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. julio de 1985;28(7):412-9.
 27. Mikolasevic I, Milic S, Turk Wensveen T, Grgic I, Jakopcic I, Stimac D, et al. Nonalcoholic fatty liver disease - A multisystem disease? *World J Gastroenterol*. 21 de noviembre de 2016;22(43):9488-505.
 28. Lonardo A, Nascimbeni F, Mantovani A, Targher G. Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH: Cause or consequence? *J Hepatol*. febrero de 2018;68(2):335-52.
 29. Heeren J, Scheja L. Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism. *Mol Metab*. agosto de 2021;50:101238.
 30. Chen L, Chen XW, Huang X, Song BL, Wang Y, Wang Y. Regulation of glucose and lipid metabolism in health and disease. *Sci China Life Sci*. noviembre de 2019;62(11):1420-58.
 31. Mavromati M, Jornayvaz FR. Hypothyroidism-Associated Dyslipidemia: Potential Molecular Mechanisms Leading to NAFLD. *Int J Mol Sci* [Internet]. 26 de noviembre de 2021 [citado 29 de mayo de 2023];22(23):12797. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8657790/>
 32. Prasun P. Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 1 de octubre de 2020;1866(10):165838.
 33. Katsiki N, Mikhailidis DP, Mantzoros CS. Non-alcoholic fatty liver disease and dyslipidemia: An update. *Metabolism* [Internet]. 1 de agosto de 2016 [citado 30 de mayo de 2023];65(8):1109-23. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002604951630018X>

34. Shepherd J. Lipoprotein metabolism. An overview. *Drugs*. 1994;47 Suppl 2:1-10.
35. Filali-Mouncef Y, Hunter C, Roccio F, Zagkou S, Dupont N, Primard C, et al. The ménage à trois of autophagy, lipid droplets and liver disease. *Autophagy* [Internet]. [citado 30 de mayo de 2023];18(1):50-72. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8865253/>
36. Morrison AE, Zaccardi F, Khunti K, Davies MJ. Causality between non-alcoholic fatty liver disease and risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes: A meta-analysis with bias analysis. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. marzo de 2019;39(3):557-67.
37. Muzurović E, Mikhailidis DP, Mantzoros C. Non-alcoholic fatty liver disease, insulin resistance, metabolic syndrome and their association with vascular risk. *Metabolism*. junio de 2021;119:154770.
38. Yuan S, Chen J, Li X, Fan R, Arsenault B, Gill D, et al. Lifestyle and metabolic factors for nonalcoholic fatty liver disease: Mendelian randomization study. *Eur J Epidemiol*. julio de 2022;37(7):723-33.
39. Fang Z, Dou G, Wang L. MicroRNAs in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Biol Sci* [Internet]. 29 de abril de 2021 [citado 30 de mayo de 2023];17(7):1851-63. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8120467/>
40. Pirola CJ, Gianotti TF, Castaño GO, Mallardi P, Martino JS, Ledesma MMGL, et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut* [Internet]. mayo de 2015 [citado 30 de mayo de 2023];64(5):800-12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4277726/>
41. Ding LJ, Li Y, Wang SD, Wang XS, Fang F, Wang WY, et al. Long Noncoding RNA IncCAMTA1 Promotes Proliferation and Cancer Stem Cell-Like Properties of Liver Cancer by Inhibiting CAMTA1. *Int J Mol Sci* [Internet]. 23 de septiembre de 2016 [citado 30 de mayo de 2023];17(10):1617. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5085650/>
42. Tapper EB, Loomba R. Noninvasive imaging biomarker assessment of liver fibrosis by elastography in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. mayo de 2018 [citado 30 de mayo de 2023];15(5):274-82. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7504909/>
43. Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA, Ikramuddin S. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. *JAMA*. 24 de marzo de 2020;323(12):1175-83.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer la ayuda brindada por mi tutora académica, la Dra. Carmen Portillo, que se aseguró de darme recomendaciones y correcciones para poder presentar un buen trabajo.

También me gustaría agradecer al Prof. Jorge Joven por darme la oportunidad de llevar a cabo mis prácticas en su laboratorio y formar parte de su equipo de investigación

Gracias también a todo el equipo de laboratorio del que formé parte durante dos meses y, sobre todo, muchas gracias a mi tutora profesional, Helena Castañé. Por tu dedicación, por todo el conocimiento que me has aportado, por las explicaciones que me dabas cuando no entendía algo y por tu supervisión a lo largo de este trabajo me has inspirado y espero algún día llegar a ser tan buena científica como tú. Agradecer también a mis compañeros de prácticas, Lara, Juanma y Carles, por los buenos momentos vividos en el laboratorio, espero que logréis todas vuestras metas.

Por último, agradecer también a mi familia, pareja y amigos por todo el apoyo ofrecido durante estos cuatro años de carrera.

AUTOEVALUACIÓN

Durante la realización de mi Trabajo de Fin de Grado, he tenido la oportunidad de aplicar y demostrar los conocimientos adquiridos a lo largo de mi formación académica en el grado de Biotecnología.

Además, gracias a mi estancia en el laboratorio, he descubierto nuevos aspectos fuera del ámbito teórico como la importancia de un buen ambiente de trabajo, el trabajo en equipo y las técnicas científicas actuales. En especial, y en relación con mi TFG, he aprendido a manejar herramientas y software especializados para el análisis de datos.

Con el seguimiento tanto de mi tutora académica como de mi tutora profesional, he sido capaz de gestionar de forma eficiente el tiempo empleado para la realización de este trabajo. He revisado la literatura existente sobre mi tema y he recopilado datos relevantes para poder llevar a cabo una buena conclusión de mi estudio. Sin embargo, reconozco que a veces encontré dificultades a la hora de interpretar ciertos resultados y podría haber buscado más información por parte de expertos.

En resumen, considero que he aplicado de manera efectiva los conocimientos adquiridos y he obtenido resultados valiosos. Sin embargo, siempre hay margen de mejora y estoy abierta a aprender de esta experiencia para futuros proyectos.

ANEXO 1: Script R

Librerías empleadas

```
{r}
library(tidyverse)
library(readxl)
library(ggplot2)
library(tableone)
library(viridisLite)
library(viridis)
library(ggpubr)
library(miceRanger)
library(gridExtra)
```

Base de datos EOM

Especificamos la carpeta en la que se encuentran nuestras base de datos sobre pacientes con obesidad mórbida y, a partir de estas, creamos nuevas bases de datos más pequeñas y específicas.

```
Lipos <- read_excel("C:/Users/Genesis/Desktop/TFG/IISPV/TrabajoFinGrado/NMR_Metabolomic_Results_JovenJ002.xls", skip = 6)
EOM <- read_excel("C:/Users/Genesis/Desktop/TFG/IISPV/TrabajoFinGrado/EOM_120522 (1).xlsx", skip = 1)
EOM_0 <- subset(EOM, select = c("ID", "NAS_qual", "Sex", "Age", "BMI", "Heart_rate", "TAS", "TAD", "Pcadera", "Pcintura", "Metabolic_syn", "T2DM", "HT", "DLP", "OSA", "CPAP", "Hipotiroidism", "Hipertiroidism", "Glucose", "Insulina_drug", "HOMAIR", "TG", "CHOL", "LDL", "HDL", "ALT", "AST", "GGT", "Steatosis_score", "Steatosis_grade", "Inflammation", "Ballooning", "Fibrosis", "NAS", "ACE_inh", "Biguanides", "Sulfonylureas", "Inh_HMG", "Diuretics", "Fibrates", "Horm_tiroid"))
EOM_lipos <- merge(Lipos, EOM_0, by.x = "Sample ID Client", by.y = "ID", all.x = TRUE)
EOM_lipos <- EOM_lipos %>% relocate("NAS_qual", .after = "Sample ID Client")
write.csv(EOM_lipos, "EOM_lipos.csv", row.names = FALSE)
```

TableOne: Características clínicas de la población

Hacemos una lista de las variables que queremos incluir en nuestro estudio y realizamos un Shapiro-Test para determinar qué variables numéricas tienen una distribución normal.

```
listvars <- c("Sex", "Age", "BMI", "Heart_rate", "TAS", "TAD", "Pcadera", "Pcintura", "Metabolic_syn", "T2DM", "HT", "DLP", "OSA", "CPAP", "Hipotiroidism", "Hipertiroidism", "Glucose", "Insulina_drug", "HOMAIR", "TG", "CHOL", "LDL", "HDL", "ALT", "AST", "GGT", "Steatosis_score", "Inflammation", "Ballooning", "Fibrosis", "NAS", "ACE_inh", "Biguanides", "Sulfonylureas", "Inh_HMG", "Diuretics", "Fibrates", "Horm_tiroid", "NAS_qual")

shapiro <- lapply(Clinica[c("Age", "BMI", "Heart_rate", "TAS", "TAD", "Pcadera", "Pcintura", "Glucose", "Insulina_drug", "HOMAIR", "TG", "CHOL", "LDL", "HDL", "ALT", "AST", "GGT")], shapiro.test)
```

Aplicamos la biblioteca Tableone, que indica los p-valores de cada variable, pudiendo así obtener cuáles son significativas. Es importante estratificar utilizando la variable NAS_qual, que agrupa a los pacientes en NASH y No NASH.

```

nonnormales<-c("Age", "BMI", "Heart_rate", "TAS", "TAD", "Pcadera", "Pcintura",
", "Glucose", "Insulin2", "HOMAIR", "TG", "CHOL", "LDL", "HDL", "ALT", "AST",
"GGT")

tab1 <- CreateTableOne(strata = "NAS_qual", data = Clinica)
tab1

write.csv(tab1Mat, file = "myTableNew1.csv")

```

Box-plot: Análisis Lipoproteico

Las variables numéricas categóricas como “NAS_qual” y “Lipoprotein” son interpretadas como numéricas, por lo que las pasamos a factores.

```

EOM_lipos_vertical$NAS_qual <- as.factor(EOM_lipos_vertical$NAS_qual)
EOM_lipos_vertical$Lipoprotein <- as.factor(EOM_lipos_vertical$Lipoprotein)

```

Utilizamos la librería Ggplot2 para realizar gráficas de cajas y comparar el perfil lipoproteico entre pacientes NASH y No NASH. Los gráficos generados pueden modificarse en cuanto a estilo.

```

ggplot(EOM_lipos_vertical_copia, aes(x=NAS, y=Colesterol, fill=NAS))+
  geom_boxplot(width=0.20)+
  scale_fill_brewer(palette = "Set2" )+
  stat_compare_means(label="p.signif")+
  theme_classic()+
  labs(x="NAS", y="Contenido Total de Colesterol (mg/dL)")

```

Agrupamos diversos gráficos relacionados para que aparezcan en único panel.

```

p1 <- ggplot(subset(EOM_lipos_vertical_copia, Lipoprotein != "LDL"), aes(x
=Lipoprotein, y=Colesterol, fill=NAS))+
  geom_boxplot()+
  scale_fill_brewer(palette = "Set2" )+
  ylim(0,90)+
  stat_compare_means(label="p.signif")+
  theme_classic()+
  labs(x="Lipoproteína", y="Contenido de Colesterol (mg/dL)")
p2 <- ggplot(subset(EOM_lipos_vertical_copia, Lipoprotein != "HDL" & Lipoprotein !=
"IDL" & Lipoprotein != "VLDL"), aes(x=Lipoprotein, y=Colesterol, fill=NAS))+
  geom_boxplot(width=0.40)+
  scale_fill_brewer(palette = "Set2" )+
  stat_compare_means(label="p.signif")+
  theme_classic()+
  labs(x="Lipoproteína", y="Contenido de Colesterol (mg/dL)")
ggarrange(p1, p2, ncol=2, nrow=1, common.legend = TRUE, legend="right")

```

Realizamos el mismo procedimiento con el resto de gráficos.

```

p1 <- ggplot(subset(EOM_lipos_vertical_copia, Lipoprotein != "LDL" & Lipoprotein
!= "IDL" & Lipoprotein != "VLDL" ), aes(x=Lipoprotein, y=`Numero de particulas`,
fill=NAS))+
  geom_boxplot()+
  scale_fill_brewer(palette = "Set2" )+
  stat_compare_means(label="p.signif")+
  theme_classic()+
  labs(x="Lipoproteína", y="Número de partículas")
p2 <- ggplot(subset(EOM_lipos_vertical_copia, Lipoprotein != "HDL" & Lipoprotein
!= "VLDL" & Lipoprotein != "IDL"), aes(x=Lipoprotein, y=`Numero de particulas`,
fill=NAS))+
  geom_boxplot(width=0.40)+
  scale_fill_brewer(palette = "Set2" )+
  stat_compare_means(label="p.signif")+
  theme_classic()+
  labs(x="Lipoproteína", y="Número de partículas")
p3 <- ggplot(subset(EOM_lipos_vertical_copia, Lipoprotein != "LDL" & Lipoprotein
!= "HDL" & Lipoprotein != "IDL" ), aes(x=Lipoprotein, y=`Numero de particulas`,
fill=NAS))+
  geom_boxplot()+
  scale_fill_brewer(palette = "Set2" )+
  ylim(0,300)+
  stat_compare_means(label="p.signif")+
  theme_classic()+
  labs(x="Lipoproteína", y="Número de partículas")

ggarrange(p1, p2, p3, ncol=3, nrow=1, common.legend = TRUE, legend="right")

```

```

p4 <- ggplot(subset(EOM_lipos_vertical_copia, Lipoprotein != "LDL" & Lipoprotein
!= "IDL" & Lipoprotein != "VLDL" ), aes(x=Lipoprotein, y=Diametro, fill=NAS))+
  geom_boxplot()+
  scale_fill_brewer(palette = "Set2" )+
  stat_compare_means(label="p.signif")+
  theme_classic()+
  labs(x="Lipoproteína", y="Diámetro de partícula")
p5 <- ggplot(subset(EOM_lipos_vertical_copia, Lipoprotein != "HDL" & Lipoprotein
!= "VLDL" & Lipoprotein != "IDL"), aes(x=Lipoprotein, y=Diametro, fill=NAS))+
  geom_boxplot(width=0.40)+
  scale_fill_brewer(palette = "Set2" )+
  stat_compare_means(label="p.signif")+
  theme_classic()+
  labs(x="Lipoproteína", y="Diámetro de partícula")
p6 <- ggplot(subset(EOM_lipos_vertical_copia, Lipoprotein != "LDL" & Lipoprotein
!= "HDL" & Lipoprotein != "IDL" ), aes(x=Lipoprotein, y=Diametro, fill=NAS))+
  geom_boxplot()+
  scale_fill_brewer(palette = "Set2" )+
  stat_compare_means(label="p.signif")+
  theme_classic()+
  labs(x="Lipoproteína", y="Diámetro de partícula")
ggarrange(p4, p5, p6, ncol=3, nrow=1, common.legend = TRUE, legend="right")

```

Box-plot: Análisis histológico

Las variables numéricas categóricas como “Inflamación” y “Balonización” y “Fibrosis” son interpretadas como numéricas, por lo que las pasamos a factores.

Utilizamos la librería Ggplot2 para realizar gráficas de cajas y comparar el perfil lipoproteico entre pacientes NASH y No NASH. Los gráficos generados pueden modificarse en cuanto a estilo.

Agrupamos diversos gráficos relacionados para que aparezcan en único panel.

```

EOM_lipos_vertical_copia$Inflammation <- as.factor
(EOM_lipos_vertical_copia$Inflammation)
p1 <- ggplot(subset(EOM_lipos_vertical_copia, Lipoprotein != "LDL"), aes(x
=Lipoprotein, y=Colesterol, fill=Inflammation))+
  geom_boxplot()+
  scale_fill_brewer(palette = "Set2" )+
  ylim(0,75)+
  stat_compare_means(label="p.signif")+
  theme_classic()
p2 <- ggplot(subset(EOM_lipos_vertical_copia, Lipoprotein != "HDL" & Lipoprotein
!= "VLDL" & Lipoprotein != "IDL"), aes(x=Lipoprotein, y=Colesterol, fill
=Inflammation))+
  geom_boxplot(width=0.30)+
  scale_fill_brewer(palette = "Set2" )+
  stat_compare_means(label="p.signif")+
  theme_classic()

p3 <- ggplot(subset(EOM_lipos_vertical_copia, Lipoprotein != "VLDL"), aes(x
=Lipoprotein, y=Trigliceridos, fill=Inflammation))+
  geom_boxplot()+
  ylim(0,50)+
  scale_fill_brewer(palette = "Set2" )+
  stat_compare_means(label="p.signif")+
  theme_classic()
p4 <- ggplot(subset(EOM_lipos_vertical_copia, Lipoprotein != "HDL" & Lipoprotein
!= "LDL" & Lipoprotein != "IDL"), aes(x=Lipoprotein, y=Trigliceridos, fill
=Inflammation))+
  geom_boxplot(width=0.30)+
  ylim(0,300)+
  scale_fill_brewer(palette = "Set2" )+
  stat_compare_means(label="p.signif")+
  theme_classic()

ggarrange(p1, p2, p3, p4, ncol=2, nrow=2, common.legend = TRUE, legend="right")

```

Box-plot: Variables de confusión

Utilizamos la librería Ggplot2 para realizar gráficas de cajas y comparar el perfil lipoproteico entre pacientes NASH y No NASH. Los gráficos generados pueden modificarse en cuanto a estilo.

Agrupamos diversos gráficos relacionados para que aparezcan en único panel.

```

ggplot(EOM_lipos_vertical_copia, aes(x=DLP, y=Colesterol, fill=DLP))+
  geom_boxplot(width=0.20)+
  scale_fill_brewer(palette = "Accent" )+
  stat_compare_means(label="p.signif")+
  theme_classic()

```

```

p1 <- ggplot(subset(EOM_lipos_vertical_copia, Lipoprotein != "LDL"), aes(x
=Lipoprotein, y=Colesterol, fill=DLP))+
  geom_boxplot()+
  scale_fill_brewer(palette = "Accent" )+
  stat_compare_means(label="p.signif")+
  theme_classic()
p2 <- ggplot(subset(EOM_lipos_vertical_copia, Lipoprotein != "HDL" & Lipoprotein !=
"IDL" & Lipoprotein != "VLDL"), aes(x=Lipoprotein, y=Colesterol, fill=DLP))+
  geom_boxplot(width=0.30)+
  scale_fill_brewer(palette = "Accent" )+
  stat_compare_means(label="p.signif")+
  theme_classic()
ggarrange(p1, p2, ncol=2, nrow=1, common.legend = TRUE, legend="right")

```

Scatter-plot: Correlación entre esteatosis y perfil lipoproteico

Con la librería Ggplot2 realizamos un gráfico de dispersión que estudie la correlación entre esteatosis y carga lipídica de las lipoproteínas. Los gráficos generados pueden modificarse en cuanto a estilo.

```
ggplot(ScatterPlot, aes(x=log10(VLDL_C), y=Steatosis_grade)) + geom_point() +  
geom_smooth(method=lm) + stat_regline_equation(label.x=1, label.y=120)+ stat_cor  
(label.x=1, label.y=100) + theme(panel.background = element_blank())
```

```
ggplot(ScatterPlot, aes(x=log10(IDL_C), y=Steatosis_grade)) + geom_point() +  
geom_smooth(method=lm)+ stat_regline_equation(label.x=1, label.y=120)+ stat_cor  
(label.x=1, label.y=100) + theme(panel.background = element_blank())
```

```
ggplot(ScatterPlot, aes(x=log10(LDL_C), y=Steatosis_grade)) + geom_point() +  
geom_smooth(method=lm)+ stat_regline_equation(label.x=1, label.y=120)+ stat_cor  
(label.x=1, label.y=100) + theme(panel.background = element_blank())
```

```
ggplot(ScatterPlot, aes(x=log10(HDL_C), y=Steatosis_grade)) + geom_point() +  
geom_smooth(method=lm)+ stat_regline_equation(label.x=1.50, label.y=120)+ stat_cor  
(label.x=1.50, label.y=100) + theme(panel.background = element_blank())
```

ANEXO 2: Ficha de seguimiento del tutor

*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: Génesis Solángel Rodríguez Rivas

Nom i Cognoms del Tutor/a: María del Carmen Portillo Guisado

Data de la entrevista amb l'alumne: 1 juny 2023

Recomanacions durant el seguiment: Aprofundir més a resultats, corregir el format de les referències i la descripció de les figures i taules amb format adequat. Falta l'autoavaluació i paraules clau.

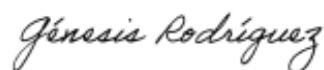
Observacions: Génesis té ben estructurada la memòria escrita amb tots els seus apartats ordenats i complets mancant completar una mica més la interpretació dels gràfics i figures. El format de figures i taules és correcte, encara que la descripció de taules ha d'anar-hi abans i falta completar el peu d'algunes figures. La bibliografia al text s'ha d'incloure abans d'acabar les frases. En definitiva, la memòria escrita està ben estructurada i amb bona expressió i només falten uns darrers retocs per a la seva presentació definitiva.

Observacions Darrera revisió:

Hem quedat per a la consulta de la propera versió de la memòria escrita abans del dia 7 de juny, data en què es pujarà la memòria definitiva.

Signatura del Tutor/a

Signatura del Alumne/a



Tarragona, a 1 de juny 2022