



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI



MoBioFood Research Group
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES AMARGOS EN MUESTRAS
DE YEYUNO DE PACIENTES CON OBESIDAD MÓRBIDA NO
ASOCIADOS A SÍNDROME METABÓLICO**

Sandra Les Bueno

TRABAJO FINAL DE GRADO - BIOTECNOLOGÍA

Tutora académica: Anna Ardévol Grau, Doctor en Ciencias Biológicas, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, anna.ardevol@urv.cat

En cooperación con: Grupo de investigación MOBIOFOOD-Molecular Bioactivity of Food- Bioactividad Molecular de los Alimentos

Supervisores: Anna Ardévol Grau, Doctor en Ciencias Biológicas, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, anna.ardevol@urv.cat

Florijan Jalševac, Máster en Farmacia, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, florijan.jalsevac@urv.cat

Tarragona, Junio 2023

Yo, Sandra Les Bueno, con DNI 78777061-Z, soy concedora 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) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/queusoferim/formaciocompetencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, Junio 2023

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer al grupo MoBioFood la oportunidad de poder formar parte de su equipo de investigación. En especial a Anna Ardèvol Grau por acogerme desde el primer momento en el equipo y a Florijan Jalševac, por ser mi guía durante todo este trabajo. A lo largo de estos meses su cercanía, dedicación y constante disponibilidad han sido esenciales para mí.

Gracias a los datos facilitados por Teresa Auguet y su equipo, al grupo de investigación GEMMAIR (AGAUR)-Medicina Aplicada (URV), Departamento de Medicina y Cirugía, Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV); al Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario de Tarragona Joan XXIII, al Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario de Tarragona Joan XXIII, y al Servicio de Cirugía, Hospital Sant Joan de Reus, Departamento de Medicina y Cirugía, IISPV; he podido realizar el análisis y discusión de este trabajo.

Durante estos 4 años de carrera, Joan Almellones Ferrer ha sido un pilar fundamental para mí. Muchas gracias por acompañarme en esta etapa. Juntos formamos un gran equipo.

En especial, quiero dedicar este trabajo a mi familia. Agradecer a mis padres la oportunidad que me han dado, su confianza en mí y su apoyo en todas mis decisiones. También a mi hermana, Laura Les Bueno, todo un referente para mí. Su ayuda ha sido indispensable durante esta etapa, enorgulleciéndose siempre de todos mis logros.

ACRÓNIMOS

ALP → Fosfatasa alcalina

BGYR → *Bypass* gástrico en Y de Roux

CALHM → Canales del modulador de la homeostasis del calcio

DAG → Diacilglicerol

GGT → Gamma-glutamyltransferasa

GLP → Péptido 1 similar al glucagón

GOT → Glutámico oxalacético transaminasa

GPCR → Receptores acoplados a proteína G

GPT → Transaminasa glutámico-pirúvica

HbA1c → Hemoglobina glicosilada

HDL-C → Colesterol de lipoproteínas de alta densidad

HOMA IR → Modelo homeostático de resistencia a la insulina

HOMA β → Modelo homeostático de la actividad del páncreas

HSKP → Gen housekeeping

IL7 → Interleucina 7

IMC → Índice de masa corporal

IP₃ → Inositol 1,4,5-trifosfato

IP₃R → Receptor tipo 3 del inositol 1,4,5-trifosfato

LDL-C → Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad

MetS → Síndrome metabólico

OM → Obesidad mórbida

P2X2/P2X3 → Receptores purinérgicos ionotrópicos P2X 2 y 3

Panx1 → Poros de hemicanales panexina1

PDE → Fosfodiesterasa

PIP₂ → Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PLC β 2 → Isoforma β 2 de la fosfolipasa C

TAD → Tensión arterial diastólica

TAS → Tensión arterial sistólica

TAS1R → Receptores de sabor dulce y umami

TAS2Rs → Receptores amargos extraorales

TLR4 → Receptor de tipo Toll 4

TRC → Células receptoras del gusto

TRPM → Transportadores transmembrana selectivos de sodio

VGNC → Canales de sodio dependientes de voltaje

ÍNDICE

1. DATOS DEL CENTRO.....	6
2. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	7
3. INTRODUCCIÓN	9
3.1. Obesidad y tracto gastrointestinal	11
3.2. Tracto gastrointestinal y cerebro	12
3.3. Receptores del gusto	13
3.3.1. Receptores de gusto amargo.....	14
3.3.2. Receptores de gusto amargo y obesidad.....	18
4. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVO.....	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1. Sujetos de estudio	22
5.2. Expresión de genes yeyunales.....	22
5.2.1. Preparación de la muestra.....	23
5.2.2. Proceso de extracción de RNA.....	23
5.2.3. Cuantificación de la expresión de RNA extraída.....	24
5.2.4. Tratamiento con DNasa	24
5.2.5. Retrotranscripción	24
5.2.6. PCR.....	24
5.3. Análisis estadístico.....	25
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
6.1. Características basales de los sujetos.....	26
6.2. Abundancia relativa de los distintos receptores en yeyuno.....	27
6.3. Cambios de expresión de cada receptor en función del cambio observado en el peso corporal 12 meses postcirugía.....	31
6.4. Correlación de cada TAS2R con los parámetros bioquímicos y antropométricos analizados.....	34
7. CONCLUSIÓN	39
8. BIBLIOGRAFÍA	40
9. AUTOEVALUACIÓN	44
ANEXOS	46

1. DATOS DEL CENTRO

El equipo de investigación MoBioFood - Bioactividad Molecular de los Alimentos, coordinado por Montserrat Pinent Armengol, se encuentra dentro del departamento de Bioquímica y Biotecnología de la URV dirigido por Maria Josepa Salvadó Rovira.

MoBioFood estudia la bioactividad molecular de los alimentos a nivel del tracto gastrointestinal, evaluando el efecto tanto beneficioso como adverso que causa en nuestro intestino la ingesta de determinados alimentos, y como esta interacción puede influenciar en la salud del resto del organismo.

Principalmente trabajan en la interacción de componentes de la dieta con el sistema enteroendocrino, la capacidad de estos compuestos de modificar la integridad de la barrera intestinal y su efecto inmunomodulador, así como el estudio de las alteraciones en la microbiota intestinal provocadas por ciertos alimentos, y el análisis de los efectos epigenéticos de distintos compuestos bioactivos en situaciones de estrés metabólico como la obesidad o el envejecimiento.

El grupo de investigación está formado por 6 investigadores senior, 6 estudiantes de doctorado, 1 estudiante de máster y 2 técnicos de laboratorio.

MoBioFood ha ganado una sólida reputación tanto en el estudio de los mecanismos de señalización en células endocrinas e inflamatorias, como en ensayos de actividad enzimática, expresión génica (qPCR), expresión y cuantificación de proteínas (ELISA e inmunoblotting) o en ensayos de toxicidad.

Con el fin de garantizar la máxima calidad en la investigación, el grupo de investigación de MoBioFood sigue la certificación ISO 9001, incluyendo en esta certificación todas las actividades de investigación, desarrollo, innovación, transferencia de conocimiento y tecnología.

2. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Fundamento: Los receptores del gusto se utilizan ampliamente para la detección de sustancias nocivas. En concreto, los receptores de sabor amargo desempeñan un papel en la protección del cuerpo contra este tipo de sustancias que pueden estar presentes en los alimentos.

Estos receptores pueden ubicarse en otros tejidos como el sistema gastrointestinal, el cerebro o tejido adiposo. El hallazgo de que los TAS2Rs se expresan en múltiples órganos fuera de la cavidad oral ha impulsado estudios sobre su función fisiológica. Algunos de ellos han evidenciado la posible asociación entre la obesidad y una reducción en los genes relacionados con el gusto en las papilas gustativas humanas. Esto puede afectar la preferencia por los alimentos y la ingesta de energía, considerando que la obesidad puede modificar la expresión y sensibilidad de los TAS2Rs en el tracto gastrointestinal.

Sin embargo, todavía faltan investigaciones que aclaren el papel de los TAS2Rs en el intestino. En este estudio se busca ampliar el conocimiento sobre que receptores amargos están presentes en el tracto gastrointestinal, y determinar su utilidad como posibles dianas para mejorar el estado de salud de las personas con obesidad.

Objetivo: Caracterizar la expresión de TAS2Rs en muestras de yeyuno de mujeres con obesidad mórbida no asociadas a síndrome metabólico, y su posible relación a la respuesta dada tras someterse a la cirugía bariátrica.

Materiales y Métodos: Para este estudio se ha utilizado yeyuno de mujeres con OM y sin MetS. Entre las técnicas utilizadas se encuentran: RT, qPCR, análisis de correlaciones con parámetros plasmáticos y fisiológicos.

Resultados: No se han observado diferencias significativas en la expresión relativa de TAS2Rs entre los dos grupos de estudio. TAS2R14 es el receptor con una mayor abundancia relativa en el yeyuno humano, mientras que TAS2R39 presenta la abundancia más baja. Entre los receptores amargos y los parámetros bioquímicos y antropométricos han aparecido correlaciones significativas.

Conclusión: En condiciones de pacientes no asociados a síndrome metabólico los TAS2Rs analizados no han mostrado relación con respuesta a la cirugía. Sin embargo, se han identificado correlaciones significativas entre TAS2Rs con parámetros bioquímicos y antropométricos.

Palabras clave: GPCR, TAS2R, intestino, yeyuno, extracción, RNA, RT-cDNA, cDNA, qPCR, alimentación, mujeres obesas, pérdida de peso, síndrome no metabólico, cirugía bariátrica.

3. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad crónica que se caracteriza por una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal, que puede ocasionar consecuencias negativas para la salud. Se define generalmente como un índice de masa corporal igual o mayor a 30 kg/m².

Esta enfermedad puede tener múltiples causas, incluyendo factores ambientales, genéticos y de estilo de vida (Moreno, 2012). El tratamiento de la obesidad puede incluir cambios en la dieta, la terapia conductual y, en algunos casos, la cirugía.

Es considerada un problema de salud global que afecta a personas de todas las edades, géneros y grupos étnicos. La incidencia de la obesidad ha aumentado significativamente en todo el mundo en las últimas décadas y se ha convertido en una de las principales causas de enfermedad. Según la OMS, más de 650 millones de adultos en todo el mundo padecen obesidad, lo que representa el 13% de la población mundial. Además, la prevalencia de la obesidad en niños y adolescentes ha aumentado de manera constante en las últimas décadas, y se estima que más de 340 millones de niños y adolescentes en todo el mundo tienen sobrepeso u obesidad (Tseng & Wu, 2019).

La obesidad es un factor de riesgo importante para una serie de enfermedades crónicas, incluyendo la diabetes tipo 2, enfermedades cardíacas, enfermedades cerebrovasculares, enfermedades del hígado y algunos tipos de cáncer. También se asocia con una mayor mortalidad y una disminución de la calidad de vida (Scharf & Ahima, 2004).

Para entender la complejidad de la obesidad y lograr el desarrollo de tratamientos y estrategias de prevención eficaces es importante diferenciar entre el término 'tipo de obesidad' y 'perfil de obesidad'.

El tipo de obesidad describe la ubicación de la grasa en el cuerpo de una persona, mientras que el perfil de obesidad se refiere a otros factores que pueden afectar la salud y el riesgo de enfermedad asociados con la obesidad. Existen varios tipos de obesidad: central, periférica, generalizada, metabólica y

mórbida. Así como varios perfiles de obesidad: visceral, subcutánea, androide, ginoide y la metabólicamente sana.

La obesidad mórbida se refiere a un nivel extremo de obesidad con un IMC igual o mayor a 40 kg/m². Los pacientes con este tipo de obesidad están expuestos a un mayor riesgo de complicaciones médicas graves y pueden requerir tratamiento quirúrgico.

Un perfil de obesidad metabólicamente sano está asociado a personas que padecen obesidad, pero no presentan factores de riesgo metabólicos como niveles altos de colesterol, presión arterial alta o resistencia a la insulina. Este perfil de obesidad se ha descrito como un "obeso sano".

El procedimiento quirúrgico que se utiliza para tratar la obesidad y los problemas de salud relacionados con la misma es la cirugía bariátrica. Estos procedimientos se llevan a cabo con la finalidad de ayudar a los pacientes a perder peso, y mejorar su salud en casos de obesidad grave o enfermedades relacionadas con la obesidad.

Existen distintos tipos de cirugía bariátrica, entre las que destacan: derivación gastroyeyunal en Y de Roux o *bypass* gástrico, manga gástrica y banda gástrica.

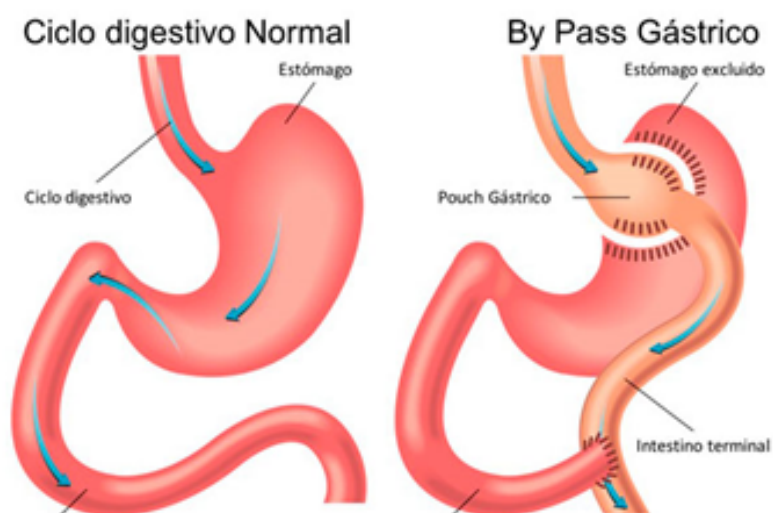


Figura 1. Diferencias entre un ciclo digestivo normal y uno tras someterse a una cirugía de *bypass* gástrico. Fuente: (ObesiMad, 2021)

La cirugía de *bypass* gástrico es considerada como cirugía restrictiva y malabsortiva, ya que además de reducir el tamaño del estómago, permite al intestino absorber menos cantidad de grasas y azúcares alternando el ciclo digestivo. Para ello se modifica la ruta que sigue la comida una vez es ingerida evitando su paso por el duodeno (Climent et al., 2020). Esta cirugía implica la unión entre la parte superior del estómago y el yeyuno.

3.1. Obesidad y tracto gastrointestinal

La obesidad puede tener un efecto significativo en el tracto gastrointestinal, y los pacientes con esta enfermedad pueden sufrir un mayor riesgo de desarrollar trastornos gastrointestinales.

El tracto gastrointestinal se encarga de procesar los nutrientes ingeridos en el estómago optimizando su digestión y absorción. La motilidad gastrointestinal, el apetito y la glucemia pueden verse afectados por una amplia variedad de hormonas, resultantes de los mecanismos de señalización a partir de la activación de receptores acoplados a proteínas G específicas (Xie et al., 2018).

De esta forma la obesidad influye en la motilidad gastrointestinal, que se refiere a la capacidad del tracto gastrointestinal para mover los alimentos a través del sistema digestivo. Los pacientes obesos pueden tener un retraso en el vaciamiento gástrico, lo que significa que el alimento permanece en el estómago durante un período prolongado de tiempo, lo que puede aumentar el riesgo de reflujo gastroesofágico y otros trastornos gastrointestinales.

Además, la obesidad se ha relacionado con una mayor prevalencia de síndrome de intestino y colon irritable. La inflamación crónica asociada con la obesidad también puede afectar la salud gastrointestinal al causar daño a las células del intestino y aumentar el riesgo de cáncer colorrectal.

Es importante para las personas obesas prestar atención a la salud de su tracto gastrointestinal y tomar medidas para reducir el riesgo de complicaciones gastrointestinales a través de la pérdida de peso y un estilo de vida saludable.

3.2. Tracto gastrointestinal y cerebro

El tracto gastrointestinal y el cerebro están conectados a través del sistema nervioso central y el sistema enteroendocrino, lo que permite una comunicación bidireccional entre ellos. El sistema enteroendocrino produce y libera hormonas que regulan la secreción de enzimas digestivas, la motilidad intestinal, la absorción de nutrientes y la sensación de saciedad y apetito. Por otro lado, el sistema nervioso central es el encargado de controlar funciones corporales importantes incluyendo el apetito, el control del peso corporal y la regulación del metabolismo.

El conocimiento actual sobre el control del apetito proviene mayoritariamente del estudio de la genética de la obesidad, así como de la alteración de las vías de señalización implicadas en esta enfermedad (Hussain & Bloom, 2013).

Al recibir una amplia variedad de señales homeostáticas, el cerebro se ha convertido en el principal regulador del apetito, pudiendo generar a partir de dichas señales una respuesta general de hambre que promueva la ingesta de alimentos, o producir el efecto contrario limitando la ingesta de estos (Perry & Wang, 2012).

El tracto gastrointestinal y el centro de control del peso corporal en el cerebro están conectados por varios mecanismos de comunicación. Entre ellos destacan: hormonas gastrointestinales, señales nerviosas y la microbiota intestinal (Martchenko et al., 2020).

La microbiota intestinal es la comunidad de microorganismos que habita en el intestino, ayudando a digerir los alimentos y a mantener la salud del tracto gastrointestinal. Se ha descubierto que la microbiota intestinal también puede influir en la regulación del apetito y la saciedad a través de la producción de hormonas y la modulación de las señales nerviosas, ya que juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis fisiológica, metabólica y enzimática (Greenwood-Van Meerveld et al., 2017).

Cuando los alimentos entran al estómago, las células enteroendocrinas liberan señales químicas que actúan como mensajeras para enviar información al cerebro, como la colecistoquinina, la grelina y la leptina (Wang et al., 2020). Estas señales son detectadas por el hipotálamo, una región del cerebro que

actúa como el centro de control del apetito y el peso corporal. Dependiendo de la señal recibida, el hipotálamo puede estimular o inhibir la sensación de hambre, lo que puede afectar a la cantidad de alimentos que una persona consume. Además de las señales químicas, también hay señales mecánicas que se transmiten desde el tracto gastrointestinal al cerebro. Un ejemplo de ello es cuando el estómago se llena con alimentos, este se estira y envía señales al cerebro indicando que la persona está satisfecha y no necesita seguir comiendo (Gribble & Reimann, 2019; Martin et al., 2019).

En conjunto, estos mecanismos de comunicación entre el tracto gastrointestinal y el cerebro ayudan a regular el apetito y la saciedad. Sin embargo, cuando estos mecanismos no funcionan correctamente como en el caso de la obesidad, puede llevar a un desequilibrio y a un aumento en el consumo de alimentos y, por tanto, del peso corporal.

3.3. Receptores del gusto

El gusto es la sensación que se produce cuando las sustancias químicas presentes en los alimentos, bebidas o medicamentos ingeridos interactúan con los receptores del gusto ubicados en las papilas gustativas. Esta sensación distingue entre 5 sabores básicos: amargo, dulce, umami, agrio y salado.

Por regla general los sabores amargos y agrios son innatamente aversivos y sirven para advertir contra el consumo de alimentos tóxicos o en mal estado.

Las papilas gustativas, órganos periféricos de la degustación, contienen 3 subtipos principales de células receptoras del gusto. Las TRC tipo II, constituyen células quimiosensoriales debido a la expresión de receptores acoplados a proteínas G. Estos a su vez se dividen en los de tipo I (TAS1R) para la sensación dulce y umami, y los de tipo II (TAS2R) para estímulos amargos. Sin embargo, cada persona experimenta los sabores de forma diferente, reaccionando de manera distinta a ciertas sustancias (Bachmanov & Beauchamp, 2007; Grau-Bové et al., 2022).

Actualmente en humanos se conocen 25 subtipos de TAS2R, que los podemos clasificar en tres grupos dependiendo de la respuesta que den frente a los agonistas amargos:

- Generalistas: ampliamente sintonizados y responden a varios agonistas amargos
- Intermedios: se ven representados por la mayoría de los agonistas amargos
- Especialistas: solo pueden activarse por unos pocos agonistas amargos

3.3.1. Receptores de gusto amargo

La principal función de TAS2Rs es detectar el sabor amargo. El hallazgo de que los TAS2Rs se expresan en múltiples órganos fuera de la cavidad oral ha impulsado estudios sobre su función fisiológica (Behrens et al., 2014). Estos receptores pueden estar presentes en otros tejidos como el sistema gastrointestinal, el cerebro o tejido adiposo, entre otros. En estos casos, los TAS2Rs pueden estar involucrados en otros eventos fisiológicos que no implican la percepción de sabor, como pueden ser: la inflamación, la relajación bronquial en el sistema respiratorio y el control de los sistemas enteroendocrinos (Harmon et al., 2021).

En el intestino existe una variedad de células enteroendocrinas que expresan componentes de los sistemas de transducción de señales. Además, se ha detectado la presencia de nutrientes que anteriormente eran considerados selectivos de las papilas gustativas, como los receptores acoplados a proteína G apical para sustancias químicas dulces y amargas.

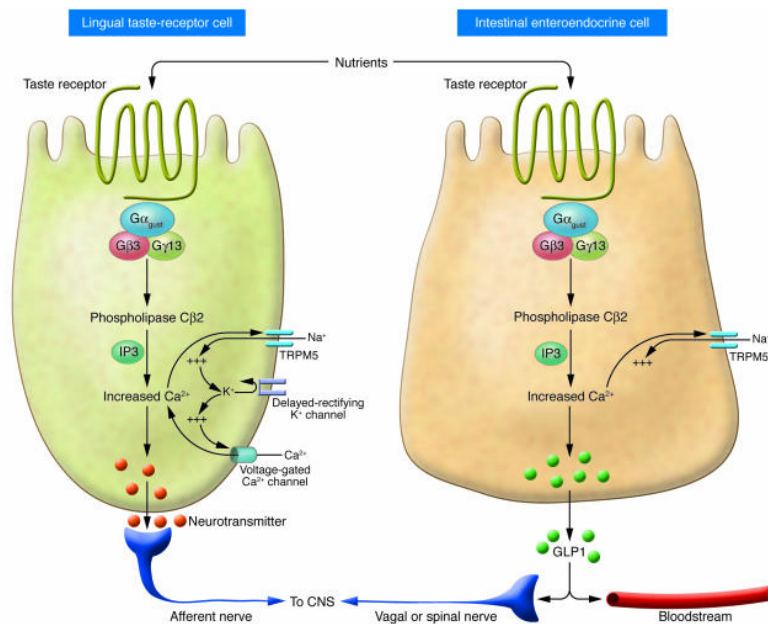


Figura 2. Similitudes en los mecanismos de detección de nutrientes utilizados por las células receptoras del gusto de la lengua y las células enteroendocrinas del intestino. Fuente: (Cummings & Overduin, 2007)

Diversos grupos de investigación han estudiado como los ácidos grasos actúan sobre los TAS2Rs en el tracto gastrointestinal y el núcleo hipotalámico, regulando de manera crítica el equilibrio energético al modificar el comportamiento de ingesta, el almacenamiento y la utilización de energía (ZhuGe et al., 2020). En individuos obesos se ha demostrado que la sensibilidad de TAS2R es menor que en individuos delgados, lo que podría explicar el excesivo consumo de grasas en personas con obesidad (Ichimura et al., 2012).

Otros estudios han demostrado como los TAS2R y las proteínas G gustativas, α -gustducina y α -transducina, se expresan en el intestino y están involucradas en la quimiosensación de nutrientes (Liszt et al., 2022). Se ha descubierto como los agonistas de TAS2R estimulan la secreción de la hormona del hambre grelina, afectando tanto a la liberación de grelina en plasma a través de α -gustducina como a la ingesta de alimentos y el vaciamiento gástrico a través de la liberación de grelina (Janssen et al., 2011).

La vía de activación de estas señales causa un aumento en la concentración de calcio intracelular en las células enteroendocrinas, desencadenando la liberación

desde la membrana basolateral de moléculas de señalización, incluidos los péptidos de saciedad (Cummings & Overduin, 2007).

Estudios en roedores sugieren que los ácidos grasos libres se liberan del esqueleto de glicerol de los triglicéridos en la cavidad oral por la reacción de la lipasa lingual, cuya actividad también se ha demostrado en humanos, a pesar de presentar una actividad mucho menor que en roedores (Liu et al., 2016).

Tanto los estudios en humanos como en animales han logrado identificar una asociación entre la sensibilidad oral a los ácidos grasos con el consumo de grasas y la regulación del peso corporal (Liu et al., 2016). Los animales que presentan mayor probabilidad de consumir grasas en exceso y aumentar de peso rápidamente, es a causa de la hiposensibilidad oral a los ácidos grasos. Sin embargo, los animales que consumen menos grasas en la dieta evitando el aumento de peso, son considerados hipersensibles. Además, se ha informado una relación similar en humanos. Individuos hipersensibles a los ácidos grasos, consumen menos grasa presentando así un IMC más bajo, en comparación con los individuos hiposensibles (Liu et al., 2016). Por tanto, este estudio sugiere que la detección de ácidos grasos se ha relacionado con respuestas en el tracto gastrointestinal.

Los TAS2Rs pertenecen a una familia de GPCR, este receptor acoplado a la proteína G se activa una vez segregado el sabor amargo. Las proteínas G heterotriméricas están formadas por múltiples subunidades de proteínas G diferentes, siendo la α -gustducina la principal.

La unión del ligando al TAS2R (Figura 3) induce un cambio conformacional que a su vez, desencadena la disociación de la subunidad α de la gustducina de las subunidades β y γ . De esta forma surgen dos vías divergentes de transducción de señales. Las subunidades β y γ activan la isoforma β 2 de la fosfolipasa, que escinde el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato.

En el retículo endoplasmático se encuentra el receptor (IP_3R) de IP_3 . Cuando IP_3 se une a su receptor, se produce la secreción de Ca_2^+ del RE al citoplasma. Este

aumento de Ca_2^+ intracelular causa la activación de los transportadores transmembrana selectivos de sodio, TRPM4 y 5, despolarizando así la membrana celular. La activación de los canales de sodio dependientes de voltaje a causa de la despolarización, aceleran dicha despolarización. Cuando se alcanza el potencial de acción, se activan los canales del modulador de la homeostasis del calcio 1 y 3 y los canales de la panexina 1, lo que conduce al transporte de ATP desde el citoplasma al espacio intercelular. A través de los receptores purinérgicos ionotrópicos P2X2 y 3, se lleva el ATP al nervio aferente, propagando así la señal (Jalševac et al., 2022).

Por otro lado, existe otra vía que ocurre a través de la subunidad α de la gustducina. La α -gustducina disminuye el nivel de cAMP al activar su hidrolización a través de la fosfodiesterasa, pero se desconoce el mecanismo exacto de propagación de la señal (Figura 3). El aumento de Ca_2^+ intracelular induce la liberación de hormonas de la saciedad y la homeostasis metabólica (Tordera & Feynman, 2017).

El tracto gastrointestinal forma una interfaz crítica entre el exterior y el cuerpo humano, monitoreando continuamente la presencia de posibles compuestos amargos tóxicos derivados de alimentos, bebidas, productos farmacéuticos o fuentes bacterianas ingeridas (Jeruzal-Świątecka et al., 2020).

Tras conocer que los TAS2Rs se encuentran a lo largo del tracto gastrointestinal, estudios recientes han demostrado que tienen una relación con los trastornos metabólicos (Bertran et al., 2021).

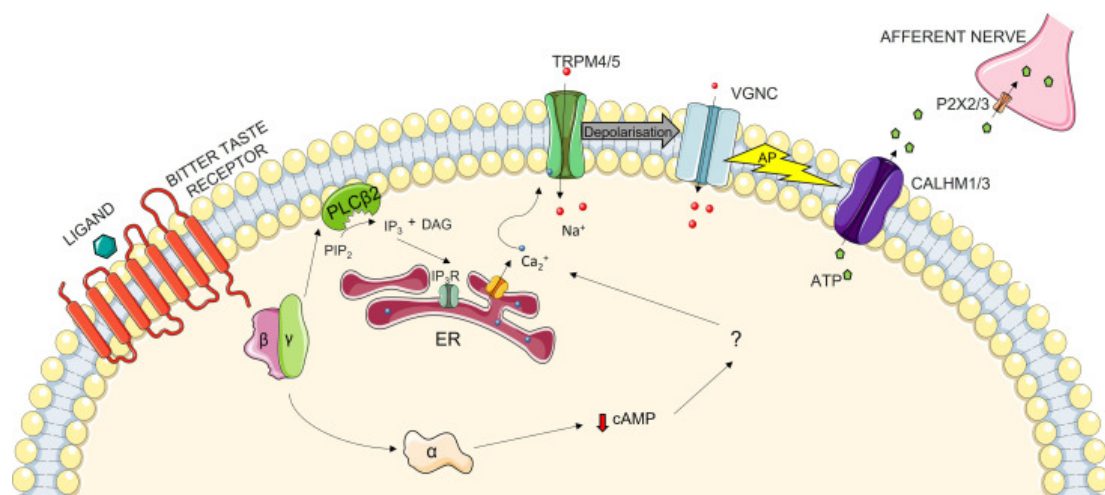


Figura 3. Vía de señalización del receptor del sabor amargo. Fuente: (Jalševac et al., 2022)

3.3.2. Receptores de gusto amargo y obesidad

Los TAS2Rs pueden desempeñar un papel en la protección del cuerpo contra sustancias nocivas, como toxinas y patógenos, que pueden estar presentes en los alimentos (Turner et al., 2018). Cuando estos receptores son estimulados por compuestos amargos, pueden iniciar una respuesta que conduce a una mayor secreción mucosa y péptidos antimicrobianos, lo que puede ayudar a prevenir infecciones y proteger el revestimiento intestinal.

La activación de TAS2R puede influir en el peso corporal a través de 4 mecanismos: liberación de hormonas intestinales, regulación de la motilidad gastrointestinal, activación cerebral y metabolismo de adipocitos. Además, se ve involucrado en el impacto de la obesidad al estar asociada con una reducción en los genes relacionados con el gusto en las papilas gustativas humanas. Por lo que se considera que la obesidad afecta a la expresión y la sensibilidad de los TAS2R en el tracto gastrointestinal (Wang et al., 2020).

Además, la aparición de polimorfismos individuales en los receptores amargos podría influir en el índice de masa corporal, el alcoholismo, la adicción tanto a medicamentos como al tabaco, y en la esperanza de vida humana. Estos polimorfismos, influyen tanto en la función como estructura de los TAS2Rs, y al comprenderlos podrían explicarse los comportamientos humanos (Fernández, 2020).

En resumen, tal y como observamos en la Figura 4, existen principalmente 4 mecanismos a partir de los cuales los receptores amargos pueden promover una pérdida de peso.

Trabajos previos han descrito en el yeyuno humano la presencia de receptores de sabor amargo en la superficie de las células enteroendocrinas (Wu et al., 2002). La exposición de células enteroendocrinas a sabores amargos se ha relacionado con un aumento en la señalización del calcio intracelular, estimulando la liberación de hormonas, entre las que se incluyen: CCK (Miyata et al., 2014), PYY y GLP-1 (Kok et al., 2018; van Bloemendaal et al., 2014).

Los compuestos amargos tienen la capacidad de estimular la secreción de hormonas intestinales, en particular las incretinas, por lo que estudios sugieren que la activación de TAS2Rs puede ser beneficiosa en enfermedades como la diabetes, y la obesidad (Kok et al., 2018). A pesar de ello, hoy en día no se conoce hasta donde estos efectos pueden verse *in vivo* y en una magnitud suficiente para ser terapéuticos, ya que debido a la falta de agonistas selectivos para TAS2R, su potencial terapéutico se ha visto afectado.

Un ejemplo es la quinina, ya que, aunque emite señales a través de TAS2R, también activa el canal catiónico activado por calcio TRPM5 y varios canales de potasio (Kok et al., 2018).

Las células del músculo liso gastrointestinal juegan un papel importante en una de las principales funciones fisiológicas del intestino, la contracción del músculo liso (Wang et al., 2020). El tracto gastrointestinal es el encargado de inducir una motilidad específica en las diferentes fases de la ingesta de alimentos. Por ejemplo, durante la ingesta de alimentos, surge lo que se conoce como acomodación gástrica. El estómago proximal se relaja para acomodar los alimentos e induce un efecto saciante. La siguiente fase corresponde con la digestión de los alimentos en la parte distal, y mediante fuertes contracciones se vacía el duodeno al moler los alimentos en partículas de menor tamaño. Por tanto, estudios (Wang et al., 2020) sugieren que es probable que la motilidad gastrointestinal *in vivo* sea resultado de la activación de TAS2R en las células del músculo liso y en la secreción de hormonas intestinales.

Por otro lado, el tracto gastrointestinal y el cerebro se comunican mediante un sistema de comunicación neurohumoral. Este eje intestino-cerebro desencadena un papel fundamental en la homeóstasis energética. La administración intragástrica de quinina en personas sanas causa un aumento en la actividad cerebral en el hipotálamo y las regiones cerebrales hedónicas. Además, provoca una disminución en las respuestas hormonales y una reducción en la ingesta de alimentos (Wang et al., 2020).

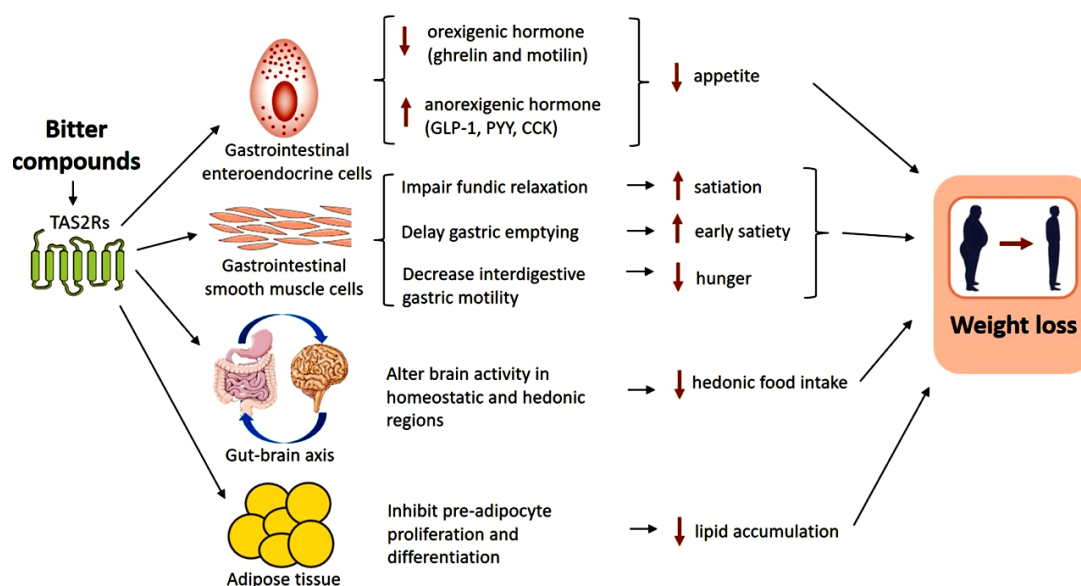


Figura 4. Descripción general de los mecanismos que median la pérdida de peso corporal inducida por compuestos amargos. Fuente: (Wang et al., 2020)

La expresión de los TAS2Rs ha sido objeto de interés en la investigación de la obesidad. Se ha estudiado como la activación de los receptores amargos puede reducir la ingesta de alimentos y, por lo tanto, podría ser un objetivo terapéutico para el control del peso corporal (Liszt et al., 2022).

Los factores dietéticos regulan la expresión de los TAS2Rs, siendo un factor importante en la regulación del apetito y el control del peso corporal. Sin embargo, se necesitan más estudios para comprender mejor la relación entre la expresión de los TAS2Rs y la obesidad en humanos, así como para evaluar el potencial terapéutico de la activación de estos receptores en el tratamiento de la obesidad.

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVO

Actualmente, el estudio de los receptores amargos todavía es un tema en desarrollo que requiere investigación. Sin embargo, estudios recientes en humanos y animales han definido que la obesidad regula a la baja la expresión de TAS2R (Liszt et al., 2022).

A pesar de la importancia de los TAS2Rs en la salud humana, los factores que determinan la especificidad de los ligandos todavía no se conocen adecuadamente. Cada receptor es capaz de alcanzar una alta especificidad, así como presentar una gran variedad de estructuras químicas. Estos receptores pueden dar un número sustancial de polimorfismos impactando en la salud y en las enfermedades (Fernández, 2020).

Todo ello hace relevante consolidar el conocimiento de la expresión relativa entre los receptores amargos para determinar su papel y consensuar el perfil de TAS2Rs en el intestino. Por tanto, esta investigación tiene como hipótesis:

Determinados receptores de gusto amargo podrían ser dianas en la mejora del estado de salud de personas con obesidad mórbida sin síndrome metabólico.

El objetivo principal de este trabajo es analizar el perfil de diversos receptores de gusto amargo y el estado de salud basal y post cirugía bariátrica en mujeres con obesidad mórbida no asociados a síndrome metabólico. Además de determinar los receptores amargos que presentan una mayor abundancia en el yeyuno, se busca realizar una correlación entre los valores de expresión del mRNA obtenidos de cada TAS2R, y todos los valores conocidos sobre el estudio que me permitan ayudar a explicar los resultados.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Sujetos de estudio

El estudio del cual proceden las muestras utilizadas fue aprobado por el “Comitè d'Ètica d'Investigació Clínica, Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona”. En él, mujeres caucásicas con OM (IMC > 40 kg/m²) que se sometieron a un *bypass* gástrico en Y de Roux metabólico y bariátrico se incluyeron en la cohorte estudiada. Todas ellas firmaron un consentimiento informado para participar en la investigación, obteniendo biopsias hepáticas y yeyunales durante la cirugía.

Los criterios de exclusión del estudio fueron: (1) una ingesta de etanol superior a 10 g/día u otras toxinas; (2) sujetos que tenían una enfermedad hepática o inflamatoria aguda o crónica, una enfermedad infecciosa o una enfermedad neoplásica; (3) mujeres menopáusicas o mujeres que usan anticonceptivos; (4) mujeres con diabetes que reciben insulina u otro medicamento que puede modular los niveles de insulina endógena y (5) pacientes tratados con fibratos. (Bertran et al., 2021).

En este proyecto, se ha utilizado una cohorte de pacientes con OM sin MetS. Por tanto, las mujeres con OM que siguieron los criterios del estudio se incluyeron en la investigación, obteniendo una n=28.

Comenzamos definiendo dos grupos de pacientes. Grupo L (del inglés, *low*) y grupo M (del inglés, *more*) para aquellas mujeres que habían perdido menos y más de 35 kg de peso tras 12 meses de la intervención respectivamente. Tras esta clasificación, obteníamos un total de 12 muestras para el grupo L y 16 muestras para el grupo M.

5.2. Expresión de genes yeyunales

Las muestras de yeyuno se obtuvieron en la cirugía y se conservaron en tubos *RNAlater* (Qiagen, Hilden, Alemania) a 4 °C, luego se procesaron y almacenaron a -80 °C (Bertran et al., 2021).

La extracción del RNA total de las muestras de tejido se realizó mediante un mini kit *RNeasy® Plus* (Qiagen, Hilden, Alemania). La transcripción inversa a cDNA

se hizo con el *kit High-Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems, Waltham, USA). Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real con el *TaqMan Assay* (Applied Biosystems, Waltham, USA) para la detección de TAS2R3, -4, -5, -13, -14, -20, -30, -31, -39, -42, -43 y -46. La expresión de cada gen se calculó en relación con la expresión de la proteína ribosomal S9 (RPS9), un gen codificador de proteínas, también conocido como “*housekeeping gene*” o gen constitutivo, expresado como resultado de la interacción entre la RNA polimerasa y el promotor sin necesidad de regulación adicional.

5.2.1. Preparación de la muestra

Durante el tiempo de obtención del tejido de la muestra inicial, se trabajó con nitrógeno líquido a -80°C. Se utilizó entre 10-17µg de la muestra de tejido yeyunal. La obtención del material genético se realizó mediante lisis por bolas magnéticas.

5.2.2. Proceso de extracción de RNA

Para la extracción de RNA yeyunal se usó el kit de extracción *RNeasy® Plus Mini Kit*. Es un kit de extracción de RNA de Qiagen, que combina la purificación de RNA de alta calidad con la eliminación efectiva de gDNA con columnas de *gDNA Eliminator*.

Primero se lisó y homogeneizó el tejido en un tampón RLT altamente desnaturizante, que inactiva inmediatamente las RNasas para garantizar el aislamiento del RNA intacto. Luego, el lisado se pasó a través de una columna giratoria *gDNA Eliminator* que, en combinación con el tampón con alto contenido de sal, elimina selectiva y eficientemente el DNA genómico. Se añadió etanol para proporcionar las condiciones de unión adecuadas para el RNA y la muestra se aplicó a una columna giratoria *RNeasy*. Estas columnas especializadas contienen una membrana de sílice que se une específicamente al RNA de las células lisadas (Anexo 2).

Durante el procedimiento es importante evitar todo tipo de contaminación, por lo que se usó *DNAZap*, para que, en el caso de haber DNasa poder degradarla.

5.2.3. Cuantificación de la expresión de RNA extraída

La medida de la expresión del RNA se realizó en el equipo *Nanodrop 1000 Spectrophotometer* (*Thermo Scientific*), obteniendo las concentraciones en ng/μl de cada muestra. Finalmente, las muestras se almacenaron a -80°C.

5.2.4. Tratamiento con DNasa

Una vez obtenido el RNA de cada muestra, se hizo un tratamiento con *DNasa* (*Thermo Scientific™, Vilnius, Lithuania*) para evitar una posible contaminación con DNA. Para ello, se diluyeron las muestras de RNA a 200 ng/μl con *RNase-Free Water* y en tubos de PCR se formó una solución 1:1 de muestra:*Máster Mix DNasa* (Anexo 3). Se incubó a 37°C en el termociclador durante 30 minutos. Se añadió 1 μl de EDTA por 10 ng/μl, e incubó en el termociclador 10 minutos a 65°C. Finalmente se obtuvo una concentración de 100 ng/μl.

5.2.5. Retrotranscripción

Se transformó el RNA (100 ng/μl) en DNAc (45,45 ng/μl) utilizando el kit de transcripción inversa de DNAc de alta capacidad (*Applied Biosystems, Waltham, EE. UU.*). Se utilizó una proporción 1:1 de muestra:*Máster Mix RT*.

Además, se preparó un control negativo juntando todas las muestras en un tubo (*DNA mixed*). Para el control negativo se utilizó una proporción 1:1 de *DNA mixed:Máster Mix RT* negativo, el cual no contendrá la enzima retrotranscriptasa (Anexo 4).

5.2.6. PCR

La qPCR se realizó utilizando una sonda TaqMan particular (*Applied Biosystems, Waltham, EE. UU.*) y TaqMan Universal PCR *Máster Mix* que incorpora dNTP y DNA polimerasa.

Tabla 1. Sondas Taqman utilizadas para cada receptor amargo y el HSKP RPS9.

Receptor amargo	Sonda Taqman
RPS9	Hs02339424_g1
TAS2R3	Hs00249942_s1
TAS2R4	Hs00249946_s1
TAS2R5	Hs01549633_s1
TAS2R13	Hs00256781_s1
TAS2R14	Hs00256800_s1
TAS2R20	Hs00604340_s1
TAS2R30	Hs03054740_Sh
TAS2R31	Hs00604313_Sh
TAS2R39	Hs00603443_s1
TAS2R42	Hs00704057_s1
TAS2R43	Hs00853105_sH
TAS2R46	Hs00853124_s1

Para establecer un factor de corrección y reducir la variabilidad técnica de los resultados obtenidos se creó un cDNApool. A la hora de realizar el cDNApool, se obtuvo la cantidad requerida para analizar 9/12 receptores amargos.

Se realizó un segundo cDNApool, para analizar los 3 receptores restantes, en concreto, TAS2R5, TAS2R31 y TAS243. Se utilizó el sistema de PCR en tiempo real rápido CFX96 (Bio-Rad) (Anexo 5). Los resultados de la expresión se analizaron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ con RPS9.

5.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con XLSTAT 2023 1.2 (*Addinsoft, Barcelona, España*), GraphPad Prism 7 (*GraphPad software, San Diego, CA, USA*) y SPSS (*SPSS Statistics IBM, Nueva York*). Las medidas de laboratorio se informan como la media \pm SEM. Si existen dos o más grupos de estudio, y siguen una distribución normal, se utiliza el análisis ANOVA. Si presentan una distribución no normal se utiliza la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Ambas informan únicamente sobre la existencia o no de diferencias significativas. Para estudiar con exactitud cuáles son las diferencias entre los grupos, se realiza un ajuste de Tukey o de Dunn respectivamente. La fuerza de asociación entre las variables analizadas se calculó utilizando el método de Spearman. La significación estadística para cada prueba se estableció en valores de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Características basales de los sujetos

Las medidas bioquímicas y características clínicas de la cohorte estudiada se muestran en la Tabla 2. Los pacientes eran mujeres con OM que no padecen síndrome metabólico (Non-MetS; $n = 28$).

Se establecieron como parámetros de estudio: el peso, la edad del paciente, el índice de masa corporal, la tensión arterial sistólica, tensión arterial diastólica, el método de evaluación del modelo homeostático de resistencia a la insulina, modelo homeostático de la actividad del páncreas, insulina, colesterol, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad, colesterol de lipoproteínas de alta densidad, aspartato aminotransferasa, gamma-glutamilttransferasa, transaminasa glutámico-pirúvica, fosfatasa alcalina y hemoglobina glicosilada.

Tabla 2. Variables clínicas y bioquímicas de mujeres obesas sin síndrome metabólico asociado. Los datos se expresan como media \pm SEM. Se ha usado una $n = 13-28$.

Variables	Non-MetS
Peso (kg)	115,8 \pm 3,15
Edad (años)	44,8 \pm 1,83
IMC (kg/m ²)	44,6 \pm 0,89
TAS (mmHg)	111,3 \pm 2,43
TAD (mmHg)	63,1 \pm 1,78
HOMA IR	2,1 \pm 0,45
HOMA β	1,3 \pm 0,24
Glucosa (mg/dL)	85,7 \pm 3,79
Insulina (mUI/L)	10,1 \pm 1,89
Triglicéridos (mg/dL)	103,9 \pm 9,95
Colesterol (mg/dL)	163,7 \pm 9,02
HDL (mg/dL)	41,4 \pm 2,31
LDL (mg/dL)	101,5 \pm 7,62
GOT (UI/L)	24,6 \pm 3,16
GPT (UI/L)	27,2 \pm 3,19
GGT (UI/L)	29,3 \pm 6,86
ALP (UI/L)	64,3 \pm 3,18
HbA1c (mmol/mol)	5,3 \pm 0,07

6.2. Abundancia relativa de los distintos receptores en yeyuno

Hoy en día, todavía se necesitan más estudios para lograr una visión global de la expresión de TAS2R a lo largo del tracto intestinal en humanos. Sin embargo, los estudios referidos a la expresión de los 25 receptores del sabor amargo sostienen que sus expresiones varían dependiendo de la parte específica del tracto intestinal, siendo su expresión generalmente baja (Liszt et al., 2022; Raka et al., 2019).

En este estudio, nos centraremos en la investigación de TAS2R en muestras de yeyuno humano, aprovechando la operación que se les realizó a mujeres con obesidad mórbida tal y como relatan (Bertran et al., 2021). Los receptores empleados para el estudio fueron seleccionados en función de la expresión relativa de mRNA obtenida en el estudio de (Liszt et al., 2022).

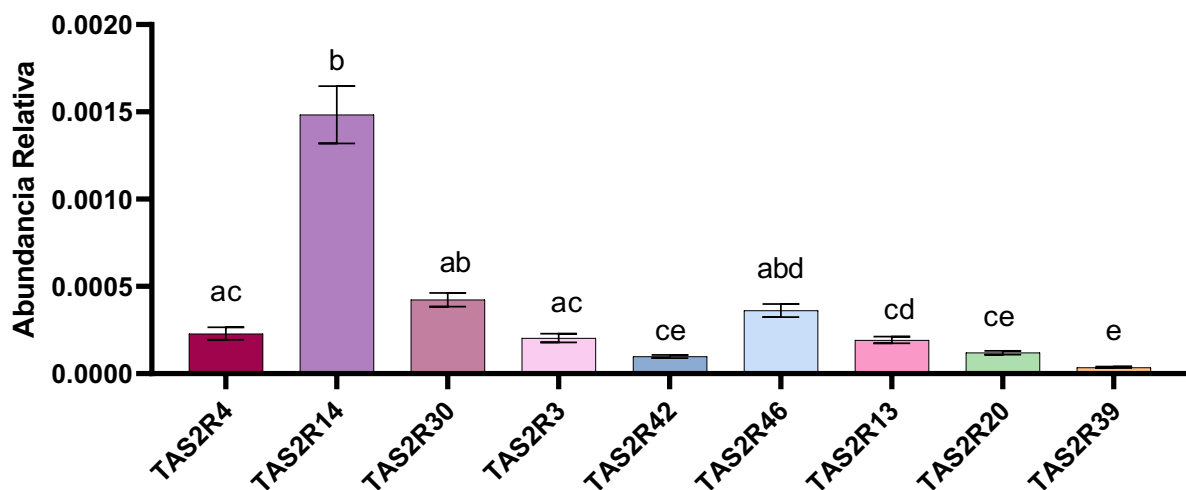


Gráfico 1. Abundancia relativa de mRNA en TAS2Rs normalizando en función de la expresión génica del housekeeping RPS9. Post-hoc Kruskal-wallis con ajuste de Dunn. Se ha utilizado cDNAPool 1 para este grupo de receptores. TAS2R4, -14, -30, -13, -20, y -39 (n=27); TAS2R3, -42 y 46 (n=28). El código de letras representa el grado de similitud entre los distintos receptores.

En el Gráfico 1 se observa el perfil de expresión relativa de TAS2Rs. En él, se muestran las diferencias significativas en abundancia entre dichos receptores. TAS2R14 es el receptor más expresado en comparación con el resto de los

receptores que presentan una expresión media, excepto TAS2R39, cuya expresión es baja.

El código de letras observado en el gráfico 1, muestra que el receptor TAS2R14, respecto TAS2R30 y -46, presenta similitud, ya que, en la prueba de comparación múltiple de Dunn, no muestran diferencias significativas (p -valor $> 0,05$). Sin embargo, TAS2R14, presenta diferencias significativas con TAS2R4, -3, -42, -13, -20 y -39 (p -valor $< 0,0001$).

Al diferir tanto en su expresión respecto a la gran mayoría de receptores, eliminamos TAS2R14, para poder visualizar mejor la expresión de los receptores restantes.

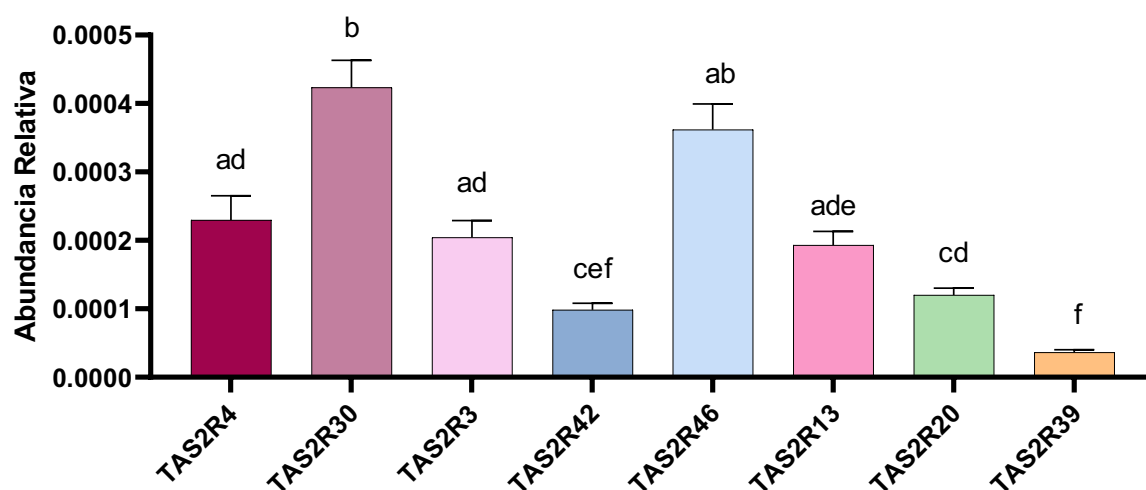


Gráfico 2. Abundancia relativa de mRNA en TAS2Rs normalizando en función de la expresión génica del housekeeping RPS9. Post-hoc Kruskal-wallis con ajuste de Dunn. Se ha utilizado cDNApool 1 para este grupo de receptores. TAS2R4, -30, -13, -20, y -39 ($n=27$); TAS2R3, -42 y 46 ($n=28$). El código de letras representa el grado de similitud entre los distintos receptores.

En el Gráfico 2, se puede observar con mayor exactitud la abundancia de estos 8 receptores amargos en muestras de yeyuno humanas. TAS2R39, cuya expresión es la más baja, presenta similitud únicamente con el receptor TAS2R42 (p -valor = 0,3041).

La prueba de comparaciones múltiples de Dunn muestra como TAS2R4 presenta diferencias significativas respecto TAS2R30, -42 y -39. TAS2R30 presenta un p-valor $<0,001$ respecto al resto de receptores excepto al TAS2R46 (p-valor $>0,9999$). Por otro lado, TAS2R3 presenta diferencias significativas con TAS2R30, -42 y -39. TAS2R46, difiere significativamente respecto TAS2R42, -20 y -39.

Dado que no tuvimos suficiente cDNApool 1 para corregir las cuantificaciones de RNA obtenidas de cada uno de los receptores, tuvimos que preparar un segundo cDNApool (cDNApool 2) utilizado en la cuantificación de RNA en TAS2R5, -31 y -43. El cDNApool se utiliza como factor de corrección para eliminar el sesgo técnico, logrando una comparación más precisa entre las muestras. De esta manera, los resultados obtenidos serán más confiables y comparables. Esto explica por qué al haber empleado dos cDNApool diferentes, los resultados de TAS2R5, -31 y -43, no se pueden comparar con el resto.

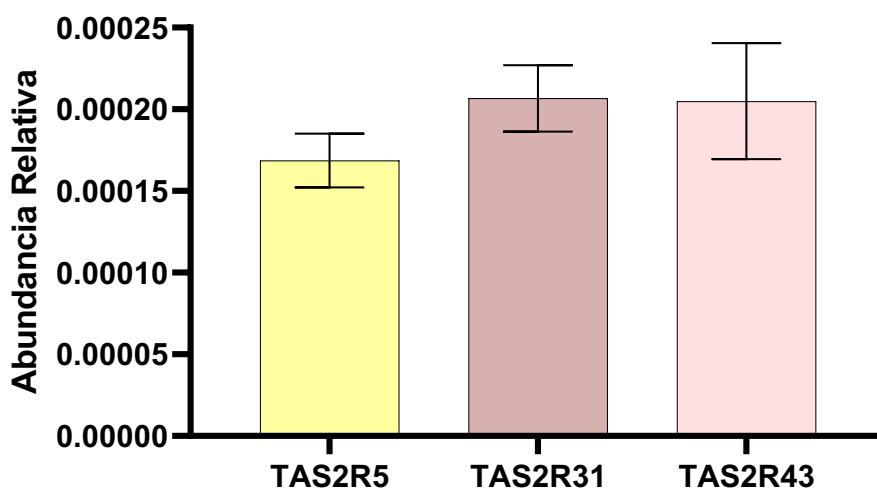


Gráfico 3. Abundancia relativa de mRNA en TAS2Rs normalizando en función de la expresión génica del housekeeping RPS9. Post-hoc Kruskal-wallis con ajuste de Dunn. Se ha utilizado cDNApool 2 para este grupo de receptores. TAS2R5, -31 y -43 (n=25). El código de letras representa el grado de similitud entre los distintos receptores.

En el Gráfico 3 aparece la expresión relativa de mRNA de TAS2R5, -31 y -43, presentando ambos similitud entre ellos (p-valor $> 0,05$).

Estos resultados definen el perfil de TAS2Rs asociado a mujeres obesas sin síndrome metabólico. El perfil de estos pacientes está formado por una alta expresión de TAS2R14 y niveles medios de expresión en TAS2R3, -4, -5, -13, -30, -31, -42, -43 y -46. Sin embargo, en TAS2R20, -39 y -42 los niveles de expresión fueron bastante bajos.

El estudio realizado por (Liszt et al., 2022), presenta una cohorte de donantes magros (IMC < 25, no diabéticos) de múltiples órganos y de pacientes con obesidad (IMC > 30, no diabéticos) que se sometieron a cirugía de bypass gástrico en Y de Roux. Tal y como relatan en la Figura 5 complementaria, estudiaron la expresión relativa de mRNA de varios TAS2R en criptas yeyunales de personas con obesidad (n=6-8) y donantes magros (n=4-6). Sus resultados muestran que en pacientes obesos TAS2R14 fue el receptor más expresado, TAS2R4, -5, -10, -13, -20, -30, -43 se expresaron en niveles medios, mientras que en TAS2R7, -8, -31, -38, -39, -40, -46 los niveles de expresión fueron bastante bajos.

Si comparamos este perfil de expresión con el obtenido en nuestro estudio, observamos que ambos presentan la misma cohorte de pacientes. Sin embargo, nuestro estudio tiene un número de muestras superior (n=28), consolidando así los resultados. Por ello, con nuestra investigación se puede confirmar que el perfil de expresión obtenido es correcto.

Además, estos resultados son comparables con un estudio realizado previamente por el grupo MoBioFood en el cual estudiaron la expresión de TAS2Rs en muestras de yeyuno obtenidas de mujeres con obesidad mórbida asociada a síndrome metabólico. Los resultados de este estudio son confidenciales, pero respaldan el perfil de expresión obtenido en nuestra investigación. Demostrando así que tanto el perfil de expresión de TAS2Rs asociado a pacientes con obesidad mórbida en yeyuno con o sin síndrome metabólico coincide mayoritariamente.

6.3. Cambios de expresión de cada receptor en función del cambio observado en el peso corporal 12 meses postcirugía

El objetivo principal de este trabajo es identificar una posible relación entre el perfil de diversos receptores de gusto amargo y el estado de salud basal y post cirugía bariátrica en mujeres con obesidad mórbida no asociadas a síndrome metabólico. Por este motivo se dividió el grupo de estudio en dos, en función de su respuesta a la cirugía bariátrica realizada.

Tabla 3. Variables clínicas y bioquímicas iniciales y tras 12 meses de la cirugía bariátrica de mujeres obesas sin síndrome metabólico asociado en el Grupo Less y Grupo More. Los datos se expresan como media \pm SEM. Se ha usado una $n= 3-15$. Variables analizadas mediante la prueba de datos apareados. Valores de significancia; * p -valor $< 0,05$; ** p -valor $< 0,01$; *** p -valor $< 0,001$; **** p -valor $< 0,0001$.

Variables	Non-MetS			
	Grupo Less		Grupo More	
	0 meses	12 meses	0 meses	12 meses
Peso (kg)	106,6 \pm 4,54	79,4 \pm 3,91****	122,8 \pm 4,1	73,5 \pm 3****
IMC (kg/m ²)	43,2 \pm 1,22	32 \pm 0,77****	45,7 \pm 1,35	27,3 \pm 0,89****
HOMA IR	2,9 \pm 1,87	1,5 \pm 0,39	1,8 \pm 0,32	1,1 \pm 0,38
Glucosa (mg/dL)	85,3 \pm 5,98	84,7 \pm 1,55	84,7 \pm 5,09	78,8 \pm 2,05
Insulina (mUI/L)	12,5 \pm 6,94	7,1 \pm 1,83	9,2 \pm 1,84	5,5 \pm 1,7
Triglicéridos (mg/dL)	101,3 \pm 29,95	83,6 \pm 1,58	104,7 \pm 10,02	79,1 \pm 6,89**
Colesterol (mg/dL)	150,3 \pm 3,48	166 \pm 9,58	164,8 \pm 12,89	147,2 \pm 6,56
HDL (mg/dL)	44,6 \pm 4,48	63,3 \pm 4,14*	38,4 \pm 2,37	55,5 \pm 2,57***
LDL (mg/dL)	85,5 \pm 10,61	88,8 \pm 8,83	105,5 \pm 10,04	75,9 \pm 5,64*
GOT (UI/L)	27,7 \pm 7,29	21 \pm 2,04	23,9 \pm 3,52	22,1 \pm 3,07
GPT (UI/L)	32,3 \pm 8,01	24,2 \pm 3,55	25,2 \pm 3,22	20,3 \pm 2,45
GGT (UI/L)	20,1 \pm 3,23	21,5 \pm 7,72	33,9 \pm 10,33	15 \pm 3,88*
ALP (UI/L)	63,8 \pm 5,57	84,6 \pm 10,48*	63,9 \pm 4,51	85,9 \pm 5,4*
HbA1c (mmol/mol)	5,4 \pm 0,12	5,3 \pm 0,14	5,2 \pm 0,09	5,1 \pm 0,07

En la Tabla 3 se estudia de forma concreta el cambio entre las variables presentes en la Tabla 2, tras 12 meses de la cirugía bariátrica en cada uno de los grupos establecidos: grupo *Less* y grupo *More*.

En ambos grupos, se muestran diferencias significativas respecto al promedio de peso inicial y post cirugía bariátrica, y, por tanto, en los valores de IMC, pasando de obesidad mórbida (IMC > 30kg) a sobrepeso (IMC entre 25kg-29,9kg).

También se observa en ambos grupos un aumento en los niveles de HDL, conocido como colesterol “bueno”, siendo coherente al hablar de pérdida de peso. Además, podemos observar una mayor sensibilidad a la insulina, aunque no de manera significativa. Esta mayor sensibilidad está asociada con una disminución de los niveles de triglicéridos y un aumento de los niveles de HDL (Teng et al., 2014). Sin embargo, mientras los niveles de HDL aumentan, los de LDL disminuyen significativamente en el grupo *More*. La reducción de los niveles de LDL se considera beneficioso, ya que se asocia con una disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares. Esto explicaría porque únicamente podemos ver una disminución en los niveles de LDL en el grupo que ha sufrido una mayor pérdida de peso.

Respecto al nivel de triglicéridos, se muestra una disminución en el promedio del grupo *More* post cirugía. La pérdida de peso resultante de la cirugía de bypass gástrico ha demostrado reducir los niveles de triglicéridos en la sangre y mejora los perfiles de lípidos en general. Esto puede deberse a cambios en la secreción de hormonas intestinales y enzimas pancreáticas, así como a una mejora en la sensibilidad a la insulina (Ibrahim & El-Sayed, 2021).

La pérdida de peso también se asocia con un aumento en la ALP, tanto por cambios en la composición corporal como en el metabolismo óseo. En la Tabla 3, podemos visualizar en ambos grupos de estudio este aumento de manera significativa. Al producirse una reducción en la grasa corporal, se da un aumento en la masa muscular, donde está presente la ALP. Además, observamos una disminución en el grupo *More* de los niveles de GGT. En este caso, la pérdida de peso causa una disminución en las transaminasas, asociada a una mejora en

la salud hepática. Aunque aparentemente el resto de los parámetros de estudio muestran una variación post cirugía, el análisis de datos apareados no ha resultado ser significativo en ninguno de ellos.

Por tanto, al analizar la expresión relativa de cada receptor amargo en función del grupo de estudio, se busca establecer una relación entre el perfil de TAS2R y la respuesta a la cirugía bariátrica realizada a los pacientes.

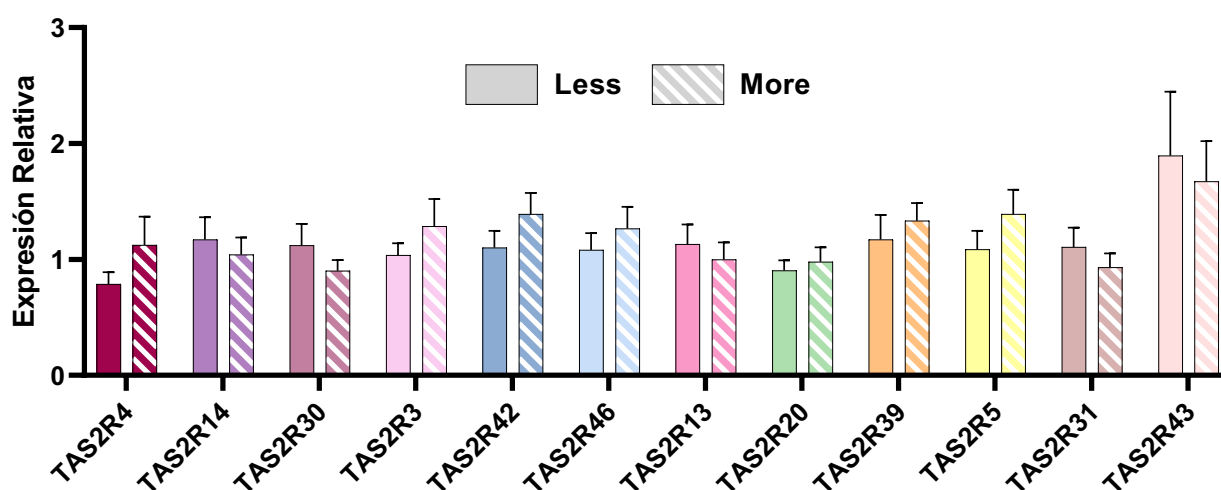


Gráfico 4. Expresión relativa de mRNA en TAS2Rs. Se observa la diferencia entre el grupo Less (pérdida de peso < 35kg tras cirugía bariátrica) y More (pérdida de peso >35kg tras cirugía bariátrica) en cada receptor. La expresión relativa de mRNA se ha calculado individualmente para cada receptor amargo normalizando en función del grupo Less de cada TAS2R.

El Gráfico 4 muestra que el cambio de peso corporal que ha tenido lugar como respuesta a la cirugía, no tiene relación directa con la abundancia inicial de los receptores amargos analizados en el grupo de estudio considerado, obesas mórbidas sin síndrome metabólico.

Aunque estos resultados indican que en este grupo de pacientes no se ha mostrado relación entre los receptores amargos y la pérdida de peso, otros estudios (Raka et al., 2019) han determinado que una disminución de los receptores del sabor amargo puede conducir a la obesidad, lo que se puede traducir en que una mayor expresión de TAS2Rs pueda favorecer en el tratamiento de esta enfermedad. Además, la expresión de TAS2R14 ha

demostrado una disminución en su expresión en pacientes con síndrome metabólico respecto a pacientes con obesidad (Bertran et al., 2021). Otros estudios como el de (Janssen et al., 2011), demostraron en modelos animales que la activación del sabor amargo regula la saciedad, mejorando la homeostasis energética y metabólica.

En particular, un estudio sobre TAS2Rs refleja que la activación del TAS2R108 en ratones remodela la liberación de las hormonas enteroendocrinas y el metabolismo de los ácidos biliares disminuyendo el riesgo de síndrome metabólico (Kok et al., 2018).

A pesar de estos descubrimientos, no hay informes acerca de los receptores amargos en sujetos humanos en el contexto de la obesidad que ayuden a profundizar esta investigación.

6.4. Correlación de cada TAS2R con los parámetros bioquímicos y antropométricos analizados

Dado que nuestro objetivo es identificar posibles TAS2Rs que guarden relación con la respuesta a la cirugía bariátrica, seguimos analizado la posible relación entre la expresión de TAS2Rs con el resto de los resultados obtenidos en este estudio. En este caso, mediante análisis de correlación, relacionamos la expresión de TAS2Rs con los parámetros iniciales y post cirugía descritos en las Tablas 2 y 3, y los parámetros hormonales y de respuesta inflamatoria a tiempo cero (Anexo 6). En la Tabla 4 se recogen únicamente aquellas correlaciones que se han considerado más relevantes.

Los criterios establecidos para que resulte una correlación significativa varían en los parámetros iniciales respecto a los parámetros tras 12 meses de la intervención. Para los parámetros basales de los pacientes, hemos establecido que una correlación sea significativa cuando tiene una $N > 10$, $p\text{-valor} < 0,05$ y un coeficiente de correlación $< -0,65$ o $> +0,65$. Sin embargo, pasados 12 meses de la cirugía, se disminuyó el grado de exigencia en los parámetros para identificar posibles correlaciones, considerando significativo el coeficiente de correlación en valores $< -0,5$ o $> +0,5$.

Es importante considerar que los resultados de la expresión se cuantifican con valores de ΔCt , ya que proporciona una medida relativa de la expresión génica. Esto nos permite normalizar los datos y obtener mediciones más precisas de la expresión génica. Cuanto mayor es el ΔCt , menor es la expresión relativa del gen de interés en comparación con el gen de referencia. Existen dos tipos de correlaciones dependiendo de la dirección de la relación: positivas o negativas.

Una correlación positiva, significa que a medida que el valor de una variable aumenta, el valor de la otra variable también tiende a aumentar. Por tanto, un ΔCt positivo puede interpretarse como que a medida que aumenta la variable analizada, hay una mayor expresión del gen de interés en relación con el gen de referencia. Sin embargo, si hay una correlación negativa, a medida que el valor de una variable aumenta, el valor de la otra variable tiende a disminuir. En este caso, un ΔCt negativo se interpreta como una menor expresión del gen de interés en relación con el gen de referencia a medida que aumenta la variable analizada.

Tabla 4. Correlaciones significativas de cada TAS2Rs con los parámetros bioquímicos y antropométricos estudiados inicialmente (violeta) y post cirugía (naranja). Los datos se expresan como el coeficiente rho de Spearman y el p-valor (* $p < 0,05$ como estadísticamente significativo; ** $p < 0,1$ como tendencia). Los coeficientes negativos (azul) representan correlaciones negativas y los positivos (verde) son correlaciones positivas. NSD=no diferencias significativas.

		Correlaciones							
		TAS2R4	TAS2R14	TAS2R3	TAS2R13	TAS2R20	TAS2R39	TAS2R5	TAS2R43
HOMA_IR	Coefficiente Correlación	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	0,655*	NSD
	N	13	13	13	13	13	13	11	11
HOMA_β	Coefficiente Correlación	NSD	NSD	NSD	NSD	0,659*	NSD	NSD	0,673*
	N	13	13	13	13	13	13	11	11
INSULINA mUI/L	Coefficiente Correlación	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	0,655*
	N	13	13	13	13	13	13	11	11
COLESTEROL mg/dL	Coefficiente Correlación	-,736**	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD
	N	14	14	14	14	14	14	12	12
IL7 pg/mL	Coefficiente Correlación	NSD	-,686**	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD
	N	22	22	22	22	22	22	19	19
TLR4 ng/mL	Coefficiente Correlación	NSD	NSD	NSD	NSD	-,741**	NSD	NSD	NSD
	N	22	22	22	22	22	22	19	19
COLESTEROL mg/dL 12M	Coefficiente Correlación	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	-,525**	NSD	NSD
	N	25	25	26	25	25	25	23	23
TRIGLICÉRIDOS mg/dL 12M	Coefficiente Correlación	-,564**	-,624**	-,530**	-,585**	-,562**	-,539**	-,623**	NSD
	N	25	25	26	25	25	25	23	23

Respecto a las variables estudiadas a tiempo cero, aparecen mayoritariamente correlaciones significativas positivas, destacando HOMA-IR con TAS2R5, HOMA- β con TAS2R20 y -43, y la insulina con TAS2R43. Sin embargo, la correlación más destacable se muestra entre los niveles de colesterol basales y la expresión relativa en el yeyuno de TAS2R4.

Los pacientes con IMC más altos pueden potenciar el efecto de las variantes genéticas en las vías de resistencia a la insulina, un efecto que podría atribuirse a las respuestas específicas de los tejidos al entorno obesogénico (Cerf, 2013). La obesidad puede aumentar la demanda de insulina, llegando a provocar una disfunción de las células beta pancreáticas. Por tanto, un aumento en estos parámetros favorecería la persistencia de la obesidad en los pacientes, por lo que inicialmente no se esperarían estos resultados.

En este caso, debemos tener en cuenta que el número de pacientes empleado para la correlación es bajo, por lo que se necesitaría mayor cantidad de pacientes para poder analizar las correlaciones entre los TAS2Rs y estas variables. Además, la relación entre la insulina y la obesidad es compleja y puede estar influenciada por múltiples factores.

Los niveles de colesterol basales se han asociado negativamente con la expresión relativa en el yeyuno de TAS2R4. Para controlar y mantener los niveles de colesterol es fundamental llevar una alimentación sana y equilibrada. Tal y como mencionan (Bertran et al., 2021), los pacientes con OM implicados en el estudio realizaron una dieta muy hipocalórica tres meses antes de la cirugía bariátrica, lo que puede haber modulado los niveles de colesterol antes de la extracción de sangre.

Sin embargo, el estudio de (Pydi et al., 2016) constituye el primer informe de base molecular de la sensibilidad al colesterol en la función de los receptores gustativos. Sus resultados, han demostrado que la lisina en la secuencia consenso de aminoácidos de reconocimiento de colesterol (CRAC) de TAS2R4 desempeña un papel crucial en la sensibilidad de la señalización del receptor al

colesterol de membrana. En resumen, demuestran que TAS2R4 exhibe sensibilidad al colesterol de membrana en su función. Además, informan que el efecto del colesterol de membrana en la organización y función de GPCR podría deberse a efectos directos y/o indirectos.

En el estudio de los parámetros hormonales y de respuesta inflamatoria a tiempo cero, destaca la correlación entre la expresión de TAS2R yeyunal con algunos niveles de adipocitoquinas, observando una correlación negativa entre IL-7, una adipocitocina proinflamatoria, y la expresión relativa en el yeyuno de TAS2R14.

Estudios como el de (Germain et al., 2016) realizados en mujeres con obesidad metabólicamente sanas han obtenido niveles plasmáticos bajos de IL-7. Otros estudios han determinado que pacientes obesos presentan una regulación a la baja de los niveles de adipocitoquinas en la sangre y una inflamación crónica de bajo grado (Esser et al., 2014). Sin embargo, la gran mayoría de ellos sugieren que en pacientes obesos la IL-7 podría secretarse en exceso en condiciones de inflamación y resistencia a la insulina. Por tanto, todavía no se comprende completamente la relación exacta entre la obesidad y los niveles de IL-7.

No obstante, parece que la inflamación crónica de bajo grado reduce la expresión de receptores amargos, al igual que (Widmayer et al., 2011) informó para el receptor dulce TAS1R3.

La expresión relativa en el yeyuno de TLR4 se ha relacionado negativamente con TAS2R20. En comparación con personas delgadas, pacientes obesos han mostrado una mayor expresión de TLR2 y TLR4 en las células mononucleares de sangre periférica y en el tejido adiposo (Dasu et al., 2010). Otros estudios mencionan que la vía de señalización TLR4 ha sido reconocida como uno de los principales desencadenantes del aumento de la respuesta inflamatoria inducida por la obesidad (Rogero & Calder, 2018). Sin embargo, al igual que se relata en el estudio realizado por (Bertran et al., 2021), la correlación entre TAS2Rs y TLR4 es controvertida, por lo que se necesitan más investigaciones que permitan estudiarla y comprenderla.

Los triglicéridos presentan una correlación significativa negativa con la gran mayoría de los receptores pasados 12 meses de la cirugía. Esto indica que una mayor expresión de estos receptores se asocia con una menor presencia de triglicéridos post operatorio. Estos se obtienen principalmente a través de la dieta, siendo una forma de grasa que se encuentra en el cuerpo humano y en muchos alimentos. Sin embargo, niveles altos de triglicéridos en la sangre se puede asociar con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Al disminuir el nivel de triglicéridos, reduciendo así el riesgo de padecer enfermedades como la obesidad, es coherente que se favorezca un posible aumento en el contenido de TAS2Rs.

Generalmente, una baja expresión de los receptores del sabor amargo se correlaciona con un aumento de la ingesta, y, por tanto, del peso corporal, IMC, niveles de glucosa y colesterol. La falta del sentido del gusto amargo hace que comamos más, lo que lleva a una acumulación de energía en el tejido adiposo y aumenta el peso total. Las hormonas anorexigénicas (PYY y GLP-1) se elevan para promover el abandono de la alimentación debido a los niveles plasmáticos de glucosa y colesterol (Shah & Vella, 2014; Smith et al., 2019). Pero tal vez sea la falta de los receptores lo que hace que sigamos comiendo.

En algunos casos se ha visto una desensibilización de los receptores del sabor amargo limitando la eficacia terapéutica por la presencia de agonistas (Robinett et al., 2011).

7. CONCLUSIÓN

Los receptores del sabor amargo son un tema emergente que todavía requiere de mucha investigación. En este estudio, hemos profundizado en la relación entre la expresión de TAS2Rs y la respuesta a cirugía bariátrica en pacientes con obesidad mórbida, sin síndrome metabólico.

El análisis de la expresión relativa de mRNA de los 12 TAS2Rs estudiados, nos ha permitido caracterizar el perfil de expresión de estos receptores amargos en condiciones de mujeres obesas no asociadas a síndrome metabólico. Además, mediante la bibliografía encontrada, hemos validado el perfil obtenido para este conjunto de receptores amargos a nivel del tracto intestinal.

A partir de los resultados obtenidos en la cohorte estudiada concluimos que los receptores TAS2R14, seguido del TAS2R30, presentan una mayor expresión en yeyuno de pacientes obesas mórbidas, mientras que el TAS2R39 y TAS2R42 tienen una expresión más baja. A pesar de ello, la expresión de los TAS2Rs analizados en condiciones de mujeres con OM sin MetS no han mostrado relación con respuesta a la cirugía bariátrica.

Sin embargo, si se han identificado correlaciones significativas tanto positivas como negativas entre los receptores amargos y distintos parámetros bioquímicos y antropométricos. Entre ellas destacan los niveles de colesterol basal con TAS2R4; la interleucina 7 con TAS2R14; TLR4 con TAS2R20 y los niveles de triglicéridos en TAS2Rs.

Estudiar con más detalle el papel que tienen tanto el TAS2R14 como el TAS2R39, siendo los receptores más y menos expresados respectivamente, sería interesante de cara a futuros proyectos. Además, considero que trabajar con pacientes asociados y no asociados a síndrome metabólico simultáneamente podría ser beneficioso, ya que esto nos puede abrir más puertas a la hora de interpretar y comprender los resultados, buscando siempre mejorar la visión global de los TAS2Rs a lo largo del tracto gastrointestinal.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Bachmanov, A. A., & Beauchamp, G. K. (2007). Taste Receptor Genes. *Annual Review of Nutrition*, 27, 389.
- Behrens, M., Prandi, S., & Meyerhof, W. (2014). Taste Receptor Gene Expression Outside the Gustatory System. *Topics in Medicinal Chemistry*, 23, 1–34.
- Bertran, L., Portillo-Carrasquer, M., Martínez, S., Aguilar, C., Lopez-Dupla, M., Riesco, D., Binetti, J., Vives, M., Sabench, F., Castillo, D. Del, Richart, C., & Auguet, T. (2021). Expression of Jejunal Taste Receptors in Women with Morbid Obesity. *Nutrients*, 13(7).
- Cerf, M. E. (2013). Beta Cell Dysfunction and Insulin Resistance. *Frontiers in Endocrinology*, 4(MAR).
- Climent, E., Benaiges, D., Goday, A., Villatoro, M., Julià, H., Ramón, J. M., Flores, J. A., & Pedro-Botet, J. (2020). Obesidad mórbida y dislipemia: impacto de la cirugía bariátrica. *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis*, 32(2), 79–86.
- Cummings, D. E., & Overduin, J. (2007). Gastrointestinal regulation of food intake. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 13–23.
- Dasu, M. R., Devaraj, S., Park, S., & Jialal, I. (2010). Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*, 33(4), 861–868.
- Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A. J., & Paquot, N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 105(2), 141–150.
- Fernández. (2020). *Modelado molecular del receptor del gusto amargo TAS2R16 y su unión a compuestos de interés | DIGITAL.CSIC*. Digital CSIC.
- Germain, N., Viltart, O., Loyens, A., Bruchet, C., Nadin, K., Wolowczuk, I., Estour, B., & Galusca, B. (2016). Interleukin-7 Plasma Levels in Human Differentiate Anorexia Nervosa, Constitutional Thinness and Healthy Obesity. *PloS One*, 11(9).
- Grau-Bové, C., Grau-Bové, X., Terra, X., Garcia-Vallve, S., Rodríguez-Gallego, E., Beltran-Debón, R., Blay, M. T., Ardévol, A., & Pinent, M. (2022). Functional and genomic comparative study of the bitter taste receptor family TAS2R: Insight into the role of human TAS2R5. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 36(3).
- Greenwood-Van Meerveld, B., Johnson, A. C., & Grundy, D. (2017). Gastrointestinal Physiology and Function. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 239.

- Gribble, F. M., & Reimann, F. (2019). Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nature Reviews. Endocrinology*, *15*(4), 226–237.
- Harmon, C. P., Deng, D., & Breslin, P. A. (2021). Bitter Taste Receptors (T2Rs) are Sentinels that Coordinate Metabolic and Immunological Defense Responses. *Current Opinion in Physiology*, *20*, 70–76.
- Hussain, S. S., & Bloom, S. R. (2013). The regulation of food intake by the gut-brain axis: implications for obesity. *International Journal of Obesity (2005)*, *37*(5), 625–633.
- Ibrahim, K. S., & El-Sayed, E. M. (2021). Dietary conjugated linoleic acid and medium-chain triglycerides for obesity management. *Journal of Biosciences*, *46*(1).
- Ichimura, A., Hirasawa, A., Poulain-Godefroy, O., Bonnefond, A., Hara, T., Yengo, L., Kimura, I., Leloire, A., Liu, N., Iida, K., Choquet, H., Besnard, P., Lecoeur, C., Vivequin, S., Ayukawa, K., Takeuchi, M., Ozawa, K., Tauber, M., Maffeis, C., ... Froguel, P. (2012). Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature*, *483*(7389), 350–354.
- Jalševac, F., Terra, X., Rodríguez-Gallego, E., Beltran-Debón, R., Blay, M. T., Pinent, M., & Ardévol, A. (2022). The Hidden One: What We Know About Bitter Taste Receptor 39. *Frontiers in Endocrinology*, *13*.
- Janssen, S., Laermans, J., Verhulst, P. J., Thijs, T., Tack, J., & Depoortere, I. (2011). Bitter taste receptors and α -gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(5), 2094–2099.
- Jeruzal-Świątecka, J., Fendler, W., & Pietruszewska, W. (2020). Clinical Role of Extraoral Bitter Taste Receptors. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(14), 1–23.
- Kok, B. P., Galmozzi, A., Littlejohn, N. K., Albert, V., Godio, C., Kim, W., Kim, S. M., Bland, J. S., Grayson, N., Fang, M., Meyerhof, W., Siuzdak, G., Srinivasan, S., Behrens, M., & Saez, E. (2018). Intestinal bitter taste receptor activation alters hormone secretion and imparts metabolic benefits. *Molecular Metabolism*, *16*, 76–87.
- Liszt, K. I., Wang, Q., Farhadipour, M., Segers, A., Thijs, T., Nys, L., Deleus, E., van der Schueren, B., Gerner, C., Neuditschko, B., Ceulemans, L. J., Lannoo, M., Tack, J., & Depoortere, I. (2022). Human intestinal bitter taste receptors regulate innate immune responses and metabolic regulators in obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, *132*(3).
- Liu, D., Archer, N., Duesing, K., Hannan, G., & Keast, R. (2016). Mechanism of fat taste perception: Association with diet and obesity. *Progress in Lipid Research*, *63*, 41–49.

- Malnick, S., Chertin, L., & Neuman, M. (2020). Gamma glutamyl transferase - an underestimated marker for cardiovascular disease and the metabolic syndrome. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, 23(1), 65–74.
- Martchenko, A., Martchenko, S. E., Biancolin, A. D., & Brubaker, P. L. (2020). Circadian Rhythms and the Gastrointestinal Tract: Relationship to Metabolism and Gut Hormones. *Endocrinology*, 161(12).
- Martin, A. M., Sun, E. W., & Keating, D. J. (2019). Mechanisms controlling hormone secretion in human gut and its relevance to metabolism. *The Journal of Endocrinology*, 244(1), R1–R15.
- Miyata, M., Kurogi, M., Oda, M., & Saitoh, O. (2014). Effect of five taste ligands on the release of CCK from an enteroendocrine cell line, STC-1. *Biomedical Research (Tokyo, Japan)*, 35(2), 171–176.
- Moreno, M. (2012). Definición y clasificación de la obesidad definition and classification of obesity. *Rev. Med. Clin. Condes*, 23(2), 124–128.
- Otto-Ślusarczyk, D., Graboń, W., & Mielczarek-Putna, M. (2016). [Aspartate aminotransferase--key enzyme in the human systemic metabolism]. *Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 70, 219–230.
- Perry, B., & Wang, Y. (2012). Appetite regulation and weight control: the role of gut hormones. *Nutrition & Diabetes*, 2(1).
- Pydi, S. P., Jafurulla, M., Wai, L., Bhullar, R. P., Chelikani, P., & Chattopadhyay, A. (2016). Cholesterol modulates bitter taste receptor function. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(9).
- Qin, S. (2020). LDL and HDL Oxidative Modification and Atherosclerosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1276, 157–169.
- Raka, F., Farr, S., Kelly, J., Stoianov, A., & Adeli, K. (2019). Metabolic control via nutrient-sensing mechanisms: role of taste receptors and the gut-brain neuroendocrine axis. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 317(4), E559–E572.
- Robinett, K. S., Deshpande, D. A., Malone, M. M., & Liggett, S. B. (2011). Agonist-promoted homologous desensitization of human airway smooth muscle bitter taste receptors. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 45(5), 1069–1074.
- Rogero, M. M., & Calder, P. C. (2018). Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients*, 10(4).
- Scharf, M. T., & Ahima, R. S. (2004). Gut peptides and other regulators in obesity. *Seminars in Liver Disease*, 24(4), 335–347.

- Shah, M., & Vella, A. (2014). Effects of GLP-1 on appetite and weight. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 15(3), 181–187.
- Smith, N. K., Hackett, T. A., Galli, A., & Flynn, C. R. (2019). GLP-1: Molecular mechanisms and outcomes of a complex signaling system. *Neurochemistry International*, 128, 94–105.
- Teng, K. T., Chang, C. Y., Chang, L. F., & Nesaretnam, K. (2014). Modulation of obesity-induced inflammation by dietary fats: mechanisms and clinical evidence. *Nutrition Journal*, 13(1), 12.
- Tordera, M. P., & Feynman, R. (2017). El sabor amargo y el olor en el asma. *Revista de Asma*, 2(1), 1–8.
- Tseng, C. H., & Wu, C. Y. (2019). The gut microbiome in obesity. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi*, 118 Suppl 1, S3–S9.
- Turner, A., Veysey, M., Keely, S., Scarlett, C., Lucock, M., & Beckett, E. L. (2018). Interactions between Bitter Taste, Diet and Dysbiosis: Consequences for Appetite and Obesity. *Nutrients*, 10(10).
- van Bloemendaal, L., ten Kulve, J. S., La Fleur, S. E., Ijzerman, R. G., & Diamant, M. (2014). Effects of glucagon-like peptide 1 on appetite and body weight: focus on the CNS. *The Journal of Endocrinology*, 221(1).
- Wang, Q., Liszt, K. I., & Depoortere, I. (2020). Extra-oral bitter taste receptors: New targets against obesity? *Peptides*, 127.
- Widmayer, P., Küper, M., Kramer, M., Königsrainer, A., & Breer, H. (2011). Altered expression of gustatory-signaling elements in gastric tissue of morbidly obese patients. *International Journal of Obesity* 2012 36:10, 36(10), 1353–1359.
- Wu, S. V., Rozengurt, N., Yang, M., Young, S. H., Sinnott-Smith, J., & Rozengurt, E. (2002). Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 2392–2397.
- Xie, C., Wang, X., Young, R. L., Horowitz, M., Rayner, C. K., & Wu, T. (2018). Role of Intestinal Bitter Sensing in Enteroendocrine Hormone Secretion and Metabolic Control. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 576.
- Yip, T. C. F., Wong, V. W. S., & Wong, G. L. H. (2021). Alanine Aminotransferase Level: The Road to Normal in 2021. *Hepatology Communications*, 5(11), 1807–1809.
- ZhuGe, R., Roura, E., & Behrens, M. (2020). Editorial: Extra-Oral Taste Receptors: Function, Disease and Evolution. *Frontiers in Physiology*, 11, 607134.

9. AUTOEVALUACIÓN

El primer día que me reuní con el grupo de investigación MoBioFood me explicaron los proyectos en los que estaban trabajando actualmente, así como alguno de los resultados ya obtenidos por el grupo. Además, me introdujeron en detalle el tema en el que se iba a centrar mi TFG, el cual me llamó mucho la atención y me pareció una gran oportunidad para poder desarrollarme en el laboratorio y aprender más sobre el amplio mundo de la investigación.

Meses después puedo confirmar que no me equivoqué. Este trabajo me ha permitido no sólo poner en práctica los conocimientos adquiridos a lo largo de la carrera, sino ampliarlos.

Durante mi estancia en el laboratorio, conté con el apoyo de todo el grupo de investigadores que forman parte del grupo MoBioFood, integrándome completamente hasta el punto de ser considerada una más en el grupo.

Desarrollar de primera mano este proyecto, me permitió aprender a realizar diferentes técnicas estudiadas en asignaturas como técnicas de bioquímica y biología molecular, entre las que destacan: extracción de RNA, retrotranscripción y PCR cuantitativa. Esto me ayudó a adquirir más experiencia en el laboratorio, así como a familiarizarme con el manejo de programas informáticos para la interpretación y representación de los resultados obtenidos. Utilizando las herramientas aprendidas en bioinformática para el estudio de pruebas no paramétricas como la de Kruskal-Wallis ANOVA o la de Mann-Whitney.

Poder alternar el trabajo diario en el laboratorio con la búsqueda de información respecto al tema estudiado, y el análisis de resultados, ha supuesto para mí uno de los aspectos más enriquecedores. Gracias a ello, he aprendido la importancia de la constancia, el esfuerzo y el interés en la investigación para poder obtener un trabajo bien realizado.

Además, contar con la supervisión y cercanía de mi tutora de TFG ha sido para mí de gran ayuda, ya que en todo momento ha estado dispuesta a orientarme y aconsejarme.

Sin duda, mis ganas de aprender día tras día han sido fundamentales para que esta experiencia sea lucrativa, tratando de buscar siempre la mejor de las soluciones desde el punto de vista científico, frente a cualquier imprevisto en el laboratorio.

A nivel general, estoy muy satisfecha tanto con el trabajo realizado como con los conocimientos adquiridos durante su elaboración.

Anexo 1. Glosario de términos

- **Tensión/Presión arterial:** La presión arterial está formada por dos números: la presión sistólica (TAS, momento de contracción del corazón) y la diastólica (TAD, momento de relajación del corazón). La presión sistólica es la presión cuando los ventrículos bombean sangre fuera del corazón. La presión diastólica es la presión entre latidos cuando el corazón se está llenando de sangre.
- **HOMA IR:** Acrónimo que representa el modelo homeostático de resistencia a la insulina, por sus siglas en inglés. Emplea dos parámetros de laboratorio: la glucosa y la insulina en ayunas. Se encarga de valorar si existe un "bloqueo o resistencia" periférica a la acción de la insulina. Existe un equilibrio en condiciones normales entre la producción hepática de glucosa y la secreción de insulina por las células beta del páncreas. La "Resistencia a la Insulina" en un paciente causa una disminución de la función biológica de esta hormona, obligando a generar un incremento en sus concentraciones plasmáticas con el fin de mantener la homeostasis (Cerf, 2013).
- **HOMA β :** Acrónimo que representa el modelo homeostático de la actividad del páncreas, por sus siglas en inglés. Cuando los valores del índice HOMA β están por debajo del valor de referencia (167-175), indica el mal funcionamiento de las células del páncreas, por lo que no se produce suficiente insulina, pudiendo causar un aumento de la glucosa en sangre.
- **LDL-C, HDL-C:** Colesterol unido a lipoproteínas de baja (LDL-C) y alta (HDL-C) densidad. HDL, se conoce como colesterol "bueno", ya que transporta el colesterol de otras partes de su cuerpo al hígado, donde posteriormente se elimina del cuerpo. Sin embargo, LDL es considerado como colesterol "malo", ya que un nivel alto de LDL lleva a una acumulación de colesterol en las arterias. El nivel de LDL se puede ver influenciado por la dieta, el peso, el ejercicio, enfermedades, entre otras (Qin, 2020).

- **GOT o AST:** Enzima glutámico oxalacético transaminasa o aspartato aminotransferasa. La cantidad de AST que hay en la sangre es directamente proporcional a la cantidad de tejido lesionado. Se emplea para valorar el perfil hepático. Una disminución en los valores de AST no presenta repercusión clínica. Sin embargo, el aumento de esta puede causar enfermedades hepáticas, cardíacas, etc (Otto-Ślusarczyk et al., 2016).
- **GGT:** Enzima gamma-glutamilttransferasa. Se emplea como índice de disfunción hepática y marcador de consumo de alcohol. Está presente en todo el cuerpo, aunque en mayor cantidad en el hígado. Los niveles altos de GGT en la sangre pueden ser un signo de enfermedad del hígado o de daño en las vías biliares. Se usa junto con la prueba de ALP para un diagnóstico más específico (Malnick et al., 2020).
- **ALT o GPT:** Alanina animotransferasa o Transaminasa glutámico-pirúvica. Los niveles de ALT en sangre son bajos. Sin embargo, cuando el hígado sufre alguna lesión que destruye las células hepáticas, se libera ALT al torrente circulatorio. La cantidad de ALT que hay en la sangre es directamente proporcional a la cantidad de tejido lesionado. Para valorar el perfil hepático de paciente se solicita ALT junto con AST. En la mayoría de las enfermedades hepáticas, los niveles de ALT son mayores que los de AST (Yip et al., 2021).
- **ALP:** Enzima fosfatasa alcalina. La mayor parte se encuentra en el hígado, huesos y sistema digestivo. Niveles anormales de ALP en la sangre pueden ser un signo de una gran cantidad de afecciones de salud, incluyendo enfermedad hepática, trastornos de los huesos y enfermedad renal crónica.
- **HbA1c:** La prueba de hemoglobina glicosilada es un examen de sangre para la diabetes tipo 2 y prediabetes. Se utiliza para medir el promedio de glucosa o azúcar en la sangre durante los últimos tres meses.

- **cDNApool:** Técnica en la cual se combinan y mezclan muestras de DNA de múltiples individuos para la creación de un "pool". Este se utiliza como factor de corrección en análisis cuantitativos de muestras de DNA. Cuando se trabaja con un cDNApool, se pueden realizar comparaciones entre diferentes grupos o condiciones utilizando la misma cantidad de DNA total en cada pool. Esto permite reducir la variabilidad técnica que puede surgir al analizar muestras individuales de forma separada.
- **SEM:** *Standard Error of Measurement* en inglés. Es una medida de precisión que nos indica cuanto error aleatorio o fluctuación se espera en los valores obtenidos en una prueba debido a la variabilidad inherente al proceso de medición.
- **Prueba Shapiro-Wilk:** Es una prueba estadística que se basa en una hipótesis nula de que los datos siguen una distribución normal. Es una prueba paramétrica para verificar el supuesto de normalidad de los datos antes de aplicar pruebas estadísticas paramétricas como la prueba t de Student o el análisis de varianza (ANOVA).
- **Prueba Mann-Whitney:** Es un método estadístico no paramétrico utilizado para comparar las medianas de dos grupos independientes, cuando los datos no cumplen los supuestos de normalidad. Se considera como prueba alternativa a la t de Student. Al ser una prueba no paramétrica, proporciona resultados basados en rangos y no en valores exactos de las observaciones.
- **Método de Spearman:** Es una medida estadística utilizada para evaluar la relación o asociación entre dos variables. Esta prueba busca patrones de cambio conjunto sin necesariamente ser lineales. El coeficiente de correlación de rangos de Spearman varía entre -1 y 1. Un valor de 1 indica una correlación positiva perfecta, mientras que un valor de -1 indica una correlación negativa perfecta. Un valor de 0 significa ausencia de correlación.

- **Prueba de Kruskal-Wallis:** Es una prueba estadística no paramétrica utilizada para comparar las medianas de tres o más grupos independientes. Esta prueba estudia si hay diferencias significativas en las medianas entre los grupos. La hipótesis nula de la prueba de Kruskal-Wallis muestra que no hay diferencias significativas en las medianas de los grupos, mientras que la hipótesis alternativa sugiere que al menos un grupo difiere significativamente de los demás en términos de medianas.
- **Prueba de comparaciones múltiples de Dunn:** Es una prueba estadística no paramétrica utilizada para realizar comparaciones entre pares de grupos. Se realizan este tipo de comparaciones si después de realizar una prueba de Kruskal-Wallis, se obtienen resultados estadísticamente significativos.

Anexo 2. Extracción de RNA

- **Procedimiento**
 1. Añadir 600 μ l de Buffer RTL Plus, encargado de realizar la lisis del tejido.
 2. Llevamos los tubos al tissue lyser durante 2 minutos.
 3. Centrifugar a 9000g durante 30 segundos.
 4. Repetir el punto 2 y 3 sucesivamente 2 veces más.
 5. Centrifugar a máxima velocidad 3 minutos.
 6. Verter con una jeringuilla el contenido de los tubos en una columna de gDNA, para eliminar el posible contenido de gDNA presente en nuestras muestras de RNA.
 7. Centrifugar a 9000g durante 30 segundos.
 8. Eliminar la columna manteniendo el contenido que ha atravesado el filtro.
 9. Añadir 600 μ l de etanol al 70% en cada tubo.
 10. Verter 600 μ l del contenido en una columna de RNA (x2).
 11. Centrifugar a 9000g durante 30 segundos.
 12. Eliminar el líquido que ha atravesado el filtro.
 13. Añadir 650 μ l de Buffer RWE y centrifugar a 9000g durante 30 segundos, eliminar el líquido que ha atravesado el filtro, mantener el mismo tubo que en el paso anterior.

14. Añadir 500 μl de Buffer RPE y centrifugar a 9000g durante 30 segundos, eliminar el líquido que ha atravesado el filtro, mantener en el mismo tubo.
15. Añadir 500 μl de Buffer RPE y centrifugar a 9000g durante 2 minutos, eliminar el líquido que ha atravesado el filtro.
16. Cambiar la columna a un tubo nuevo de 2 mL y centrifugar 1 minuto a máxima velocidad.
17. Cambiar la columna a un tubo nuevo de 1,5 mL, añadir 30 μl de agua RNasa free, centrifugar 1 minuto a 9000g.

Anexo 3. Tratamiento con DNasa

- **Procedimiento**

1. Preparar un eppendorf con el volumen de *Máster Mix 2X* necesario y mantenerlo en hielo.
2. Pipetear 10 μL de Máster Mix 2X a cada eppendorf de 200 μL .
3. Pipetear 10 μL de muestra a cada eppendorf de 200 μL .
4. Mezclar cada muestra con el vórtex y dar un spin rápido en la centrifuga.
5. Encender el termociclador MultiGene, apretar ENTER, abrir la tapa, colocar los tubos y cerrar bien la tapa. En la pantalla, seleccionar el programa DNasa 1 (37°C, 30 minutos). Cambiar el volumen a 20 μL y pulsar START.
6. Añadir 1 μl de EDTA por 10 ng/ μl .
7. Incubar en el termociclador MultiGene, apretar ENTER, abrir la tapa, colocar los tubos y cerrar bien la tapa. En la pantalla, seleccionar el programa DNasa 2 (65°C, 10 minutos).

- ***Máster Mix DNasa***

DNase Treatment 200 ng/uL	
DNase Máster Mix	para 1 (μL)
RNA	5
10X reaction buffer with MgCl ₂	1
DNase I, RNase-free	1
Water	3
Volumen Total TaqMan PreMix	10

Anexo 4. Retrotranscripción

- **Procedimiento**

1. Preparar un eppendorf con el volumen de *Máster Mix 2X* necesario y mantenerlo en hielo.
2. Pipetear 20 μL de *Máster Mix 2X* a cada eppendorf de 200 μL .
3. Pipetear 20 μL de muestra a cada eppendorf de 200 μL .
4. Mezclar cada muestra con el vórtex y dar un spin rápido en la centrifuga.
5. Encender el termociclador MultiGene, apretar ENTER, abrir la tapa, colocar los tubos y cerrar bien la tapa. En la pantalla, seleccionar el programa RT-PCR. Cambiar el volumen a 40 μL y pulsar START y esperar 2 horas, aproximadamente.

- **Programa RT-PCR:**

Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Tiempo	10 minutos	120 min	5 minutos	∞

- ***Máster Mix RT***

RT	
RT Máster Mix	para 1 (μL)
H ₂ O	4,2
10X RT buffer	2
25X dNTPs Mix	0,8
10X RT Random Primers	2
MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/ μL)	1
Volumen Total TaqMan PreMix	10

- ***Máster Mix RT negative***

RT	
RT Máster Mix	para 1 (μL)
H ₂ O	4,2
10X RT buffer	2
25X dNTPs Mix	0,8
10X RT Random Primers	2
H ₂ O	1
Volumen Total TaqMan PreMix	10

Anexo 5. PCR

• Procedimiento

1. Preparar una *Máster Mix* de Taqman para cada gen que se vaya a cuantificar.
2. Repartir la *Máster Mix* de cada gen a tantos pocillos como sean necesarios y luego cargar el cDNA de la muestra correspondiente por duplicados o triplicados (atender al diseño de placa). El volumen en Taqman corresponde con 9 μ L de máster mix + 3.5 μ L de cDNA (Volumen de reacción = 12.5 μ L)
3. Tapar la placa con adhesivo y dar un spin de unos 15-20 segundos en la centrífuga de microplacas.

• Programa RT-qPCR Taqman:

Etapa	Incubación	Activación	Desnaturalización	Extensión
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Tiempo	2 minutos	10 minutos	15 segundos	1 minuto
			40 ciclos	

• *Máster Mix PCR*

TaqMan Universal Máster Mix	Para 1
H2O	2,4375
Taqman PCR MasterMix	6,25
Sonda	0,3125
Premix Volumen Total	9,0

Anexo 6. Variables hormonales y de respuesta inflamatoria a tiempo cero

Los valores se muestran como el promedio \pm SEM.

Variables	Non-MetS
Edad	44,9 \pm 1,84
Talla	1,6 \pm 0,017
TLR2 YEYU gapdh	0,005 \pm 0,001
TLR4 YEYU gapdh	0,006 \pm 0,001
TLR5 YEYU gapdh	0,003 \pm 0,001
TLR9 YEYU gapdh	0,003 \pm 0,0003
DPP4 YEYU gapdh	0,1 \pm 0,009
FXR YEYU gapdh	0,03 \pm 0,002
PPARg YEYU gapdh	0,03 \pm 0,004
il1beta	4,6 \pm 0,5
IL6 pg/mL	3,7 \pm 0,36
IL7 pg/mL	6,5 \pm 0,85
IL8 pg/mL	3,8 \pm 0,73
IL22 pg/mL	5,3 \pm 0,12
hs IL10 pg/ML	4,6 \pm 0,79
hs IL17 pg/mL	0,2 \pm 0,033
IL13 pg/mL	24,4 \pm 5,99
TNF ALFA	9,4 \pm 0,56
Resistina ng/mL	26,9 \pm 2,35
Lipocalin Ngal ng/mL	94,8 \pm 8,17
Adiponectina ng/mL	12150,2 \pm 1107
PAI_Total ng/mL	57,1 \pm 6,71
TLR4 ng/mL	2,3 \pm 0,31
Ghrelin pg/mL	41,6 \pm 30,26
GIP pg/mL	32,1 \pm 3,21
PYY pg/mL	249,8 \pm 36,84
Leptin pg/mL	27084,8 \pm 2662,9
MCP1 pg/mL	82,2 \pm 6,91

Variables	Non-MetS
GCDCA nM	209,9 \pm 45,5
GCA nM	90,3 \pm 18,9
GDCA nM	68,6 \pm 12,9
LCA nM	11,5 \pm 0,98
UDCA nM	52,2 \pm 10,47
TCA nM	25,3 \pm 8,06
TLCA nM	1,3 \pm 0,17
TCDCA nM	69,9 \pm 25,68
TDCA nM	17,6 \pm 4,91
TUDCA nM	5,3 \pm 1,6
GLCA nM	31,1 \pm 5,84
GUDCA nM	556,4 \pm 139,35
TMA nM	44,9 \pm 4,85
Choline μ M	17,4 \pm 1,39
TMAO μ M	2,9 \pm 0,49
Betaine μ M	27,9 \pm 1,85
ETHANOL ng/ μ L	3,9 \pm 0,81
Acetat SCFA ng/mL	2335,5 \pm 380,39
Acetat SCFA μ M	38,9 \pm 6,34
Propionat SCFA ng/mL	272,7 \pm 24,99
Propionat_SCFA_ μ M	3,7 \pm 0,34
Isobutirat_SCFA_ngmL	37,9 \pm 2,05
Isobutirat_SCFA_ μ M	0,4 \pm 0,02
Butirat SCFA ng/mL	103,1 \pm 35,76
Butirat SCFA μ M	1,2 \pm 0,41
Isovalerat SCFA ng/mL	52,3 \pm 27,16
Isovalerat SCFA μ M	0,5 \pm 0,27
TAS1R2 yeyu	0,9 \pm 0,25

TLR: receptor de tipo Toll, DPP4: dipeptidil peptidasa 4, FXR: receptor X fernesioide, PPARg: receptor activado por proliferadores peroxisómicos g, IL: interleucina, TNF: factor de necrosis tumoral, PAI: inteligencia de actividad personal, GIP: polipéptido inhibidor gástrico, MCP1: proteína quimiotáctica de monocitos 1, CDCA: ácido quenodesoxicólico, DCA: ácido desoxicólico, GCDCA: ácido glicoquenodesoxicólico, GCA: ácido glucocólico, GDCA: ácido glucosoxicólico, UDCA: ácido ursodesoxicólico, TCA: taurocolato, TLCA: ácido taurolitocólico, TCDCA: ácido tauroquenodesoxicólico, TDCA: ácido taurodesoxicólico, TUDCA: ácido tauroursodesoxicólico, GLCA: ácido D-Glucurónico, GUDCA: ácido glucursodesoxicólico, TMAO: óxido de trimetilamina