



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Efecto de una intervención del estilo de vida en el perfil metabólico de sujetos prepuberales con obesidad

María Jesús Leal Witt

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

FACULTAD DE FARMACIA Y
CIENCIAS DE LA SALUD

MARÍA JESÚS LEAL WITT

**“EFECTO DE UNA INTERVENCIÓN DEL ESTILO DE
VIDA EN EL PERFIL METABÓLICO DE SUJETOS
PREPUBERALES CON OBESIDAD”**

TESIS DOCTORAL
2017



A mi linda familia, Rosario y Oscar

A mis padres Gabriela y Carlos

Primero que todo quiero agradecer a los miembros del tribunal por dedicarle tiempo a esta tesis doctoral.

Fue hace 5 años cuando comencé a ser parte de este grupo, empecé con el trabajo de fin de máster y terminé quedándome para realizar el doctorado. Sin duda han sido unos años intensos, de mucho aprendizaje y de trabajo intenso pero sobretodo de alegrías y de cumplir metas.

Quiero agradecer a todos los niños, niñas y sus familias que colaboraron con este estudio porque sin ellos nada de esto sería posible. Agradecer la buena disposición para realizarse las pruebas, venir a las visitas, atender a mis llamadas telefónicas y emails constantes.

Al Servicio de Endocrinología del Hospital Sant Joan de Déu:

Gracias a Juani por ayudarme con la organización de las visitas y analíticas, por atenderme en cada momento independiente de la inmensa carga de trabajo que significa su puesto, por hacerme la parte administrativa lo más fácil posible.

Gracias a cada uno de los que forman parte del servicio. Gracias Dra.

Casano, Dra. Marín, Dr. Cardona, Dra. Suarez, Dra. Ibañez, Irune, Carmen, Maite, Tere, Carmen y Nani. Gracias por ayudarme en todo momento que les pedí algún consejo, a reclutar pacientes, con alguna petición de analítica que se me había quedado en el tintero, por dejarme sus despachos para visitar fuera de agenda, con las mediciones antropométricas de los niños y lo más importante por haberme hecho

sentir durante estos 5 años (incluido mi año del máster) como una más del equipo y haber compartido con tanto cariño una de las etapas más lindas de mi vida, el haberme hecho mamá. Siempre las recordaré como personas muy importantes en mi desarrollo profesional y personal.

Gracias a la Unidad de Recerca, principalmente a Laura y a Marta Cubells, por estar siempre con buena disposición para la realización de toma de muestras y procesado, gracias por enseñarme y solucionar mis dudas y errores. Fueron fundamentales en el desarrollo de este proyecto.

Gracias a Biobanco, a Jesús y Anna por haberme enseñado mucho en relación al proceso de almacenamiento de muestras y así haber podido comenzar con nuestra colección en biobanco.

Gracias Laura, Silvia y Oscar, por ayudarme en todo lo que involucraba al laboratorio, por haber hecho que mi falta de experiencia allí no se notará tanto y haberme enseñado todo lo que les pedía cuando quizás era algo que no les correspondía. Gracias Josep Carles por haberme acogido desde que nos presentaron. Gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme en lo que necesitara, por tener siempre una sonrisa y una buena conversación y sobretodo gracias por confiar en mi profesionalmente.

Gracias a mis favoritas M&M, mis queridas Marinas, que finalmente más que compañeras de profesión y trabajo se transformaron en unas grandes amigas. Marina Llobet has sido un gran pilar en toda esta etapa, desde que llegue al hospital siempre has estado a mi lado, la vida nos puso frente a la otra en un momento que necesitábamos un apoyo profesional,

complementando nuestras ideas y haciéndolas realidad trabajando en equipo. Hemos vivido juntas momentos importantísimos, gracias por haberme dejado formar parte de ellos. Marina García, apareciste de sorpresa y fue una de las mejores adquisiciones al equipo de trabajo. Gracias por estar pendiente siempre de como estoy, de contenerme, por ser un gran complemento profesional y una súper amiga.

Durante estos 5 años, no he tenido una jefa si no como te he dicho hace tiempo, he tenido una "tutora espiritual". Dra. Ramon, para mi Marta, has sido mi ángel de la guarda, mi consejera, una gran jefa, una súper amiga. Gracias haber confiado en mi y haberme dado la oportunidad de formar parte de un lindo equipo de trabajo. Gracias por decirme siempre lo malo y lo bueno y por mostrarte orgullosa de mi cada vez que me presentabas a alguien. Gracias por demostrarme todo lo que he crecido tanto profesionalmente como personalmente. Te voy a echar mucho de menos.

A mi súper director de tesis, Carles Lerín. Ha sido un largo viaje que con mucha paciencia has recorrido conmigo. Para mi un experimentado bioquímico con una nutricionista que sólo tenía experiencia clínica y se le ocurrió meterse en esto. Nunca voy a olvidar las primeras palabras, ¿estás segura que quieres meterte en esto de la metabolómica y el metabolismo? Pero yo con lo porfiada que soy sin pensar dije que si. Así tuviste que enseñarme desde metabolómica y estadística hasta diseño y gramática. Gracias por estar siempre disponible a todas mis preguntas, escuchar mis quejas y angustias pero sobretodo por confiar en mi. Gracias por tu dedicación constante a nuestros trabajos y sobretodo a esta tesis.

Quiero agradecer a mis amigas y amigos,

Gracias a mi familia de amigos en Barcelona, que el destino se encargó de juntarnos y ser cómplices de una gran experiencia de vida y como les he dicho muchas veces ustedes sin duda han sido lo mejor que me ha regalado la vida en estos 6 años en el extranjero. Gracias a mis lindas, Tania, Xandra, Lore y Maga por admirarme y quererme tanto, por ayudarme en todo momento, conteniéndome y dejándome formar parte de sus vidas.

Gracias mis Gardella-Aldunce y Calle-Reyes porque han sido mi gran familia, hemos compartido la vida en circunstancias difíciles y hemos celebrado las penas y alegrías juntos, los quiero mucho.

A mis queridos Verdugo-Henríquez, gracias por ser los mejores amigos que uno pueda tener, gracias por todo el apoyo, ánimo y cariño que me han dado por más de 10 años, los adoro y sobretodo durante esta tesis.

Gracias a mi familia, a mis tíos, primos, suegros, cuñados y cuñada gracias por cada palabra de ánimo, por el cariño y por apoyarme siempre que lo he necesitado.

Gracias a mis abuelos, en especial a mis abuelas mis dos referentes de vida, mi querida Juani y Yela, mis mujeres favoritas gracias por enseñarme que la vida no es fácil pero es hermosa, que hay que cuidarla y vivirla al máximo y que lo que me proponga aunque me cueste tengo que seguir hasta el final.

Cuando me doy cuenta que soy muy afortunada es porque tengo detrás de

mi a mis hermanas y sus familias, a mis padres y mis dos grandes tesoros Oscar y Rosario.

Gracias hermanas, Gabriela y Karla, a mis cuñados Fernando y Pedro por ser unos increíbles hermanos mayores, por apoyarme y mimarme siempre. Gracias a mis sobrinos Ignacio, Emilia, Gustavo y Bruno por haberme hecho la tía más afortunada del mundo, por que con ustedes fui con quienes experimenté por primera vez el amor más cercano a la maternidad. Gracias por quererme tanto y contar conmigo cada día.

A mis padres, Gabriela y Carlos, gracias por ser tan buenos papás, porque nunca han descuidado este súper trabajo que nos da la vida, gracias por haberme educado en el amor y haberme hecho una mujer sensible, carismática, luchadora y porfiada. Gracias por haberme ayudado a que esta tesis saliera a flote. Los adoro con mi vida

A ti Oscar por la familia que hemos formado. Cuando nos vinimos hace 6 años apostamos todo lo que teníamos a cumplir nuestros sueños y lo estamos logrando. Eres el mejor partner de vida que a pesar de altos y bajos, seguimos incondicionalmente uno al lado del otro. Gracias por tu paciencia, por tu admiración, por ser mi fans número uno.

Y finalmente a ti mi Rosarito Montserrat, que llegaste a mi vida en pleno doctorado, has vivido cada momento desde que estabas dentro de mi hasta hoy día que te sientas al lado a pintar mientras escribo esta tesis. Gracias por ser la luz que ilumina mi día a día, soy muy afortunada de tenerte como hija.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



SJD Sant Joan de Déu
Barcelona · Hospital

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

MARÍA JESÚS LEAL WITT

**“EFECTO DE UNA INTERVENCIÓN DEL ESTILO DE VIDA
EN EL PERFIL METABÓLICO DE SUJETOS PREPUBERALES
CON OBESIDAD”**

TESIS DOCTORAL

2017



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



SJD Sant Joan de Déu
Barcelona · Hospital

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT

“EFECTO DE UNA INTERVENCIÓN DEL ESTILO DE VIDA EN EL PERFIL
METABÓLICO DE SUJETOS PREPUBERALES CON OBESIDAD”

Memòria presentada per María Jesús Leal Witt per optar al títol de doctor
per la Universitat de Barcelona

Carles Lerín Martínez
Director Tesis Doctoral

María Izquierdo Pulido
Tutora Tesis Doctoral

María Jesús Leal Witt
Doctorando

2017

ÍNDICE

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS | 7 |
| RESUMEN | 9 |
| INTRODUCCIÓN | 11 |
| 1. Obesidad | 13 |
| 1.1. Definición de obesidad | 15 |
| 1.2. Clasificación de obesidad en adultos | 17 |
| 1.3. Obesidad: Anormalidades en el tejido adiposo | 18 |
| 2. Obesidad y enfermedad cardiovascular en el adulto | 20 |
| 3. Obesidad en la infancia y adolescencia | 22 |
| 3.1. Clasificación de la obesidad en la infancia y adolescencia | 23 |
| 3.1.1. Tablas Fundación Orbeagozo | 23 |
| 3.1.2. Organización Mundial de la Salud | 24 |
| 3.1.3. International Obesity Task Force | 24 |
| 4. Obesidad infantil: Factor de riesgo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares | 25 |
| 4.1. Descripción de la obesidad infantil como precursor de enfermedad cardiovascular | 26 |
| 4.2. Efectos secundarios relacionados con la obesidad | 28 |
| 4.2.1. Síndrome metabólico | 28 |
| 4.2.2. Diabetes mellitus tipo 2 | 29 |
| 5. Obesidad infantil y hábitos en el estilo de vida | 30 |
| 5.1. Efecto de las conductas ambientales en el estado nutricional de los niños | 30 |
| 6. Tratamientos para la obesidad | 33 |
| 6.1. Intervenciones en el estilo de vida en individuos con obesidad infantil | 33 |

| | |
|--|----|
| 6.2. Tratamiento farmacológico | 34 |
| 6.3. Tratamiento quirúrgico | 35 |
| 7. Guías de alimentación para la obesidad infantil | 35 |
| 8. Metabolómica | 38 |
| 8.1. Metabolómica, nutrición y obesidad | 38 |
| OBJETIVOS | 41 |
| Objetivo principal | 43 |
| Objetivos específicos | 43 |
| METODOLOGÍA | 45 |
| Diseño del estudio | 47 |
| 1. Sujetos del estudio | 47 |
| 1.1. Criterios de inclusión | 48 |
| 1.2. Criterios de exclusión | 48 |
| 2. Estructura de la intervención del estilo de vida | 48 |
| 3. Variables del estudio | 50 |
| 3.1. Análisis antropométrico | 50 |
| 3.2. Análisis de parámetros bioquímicos | 51 |
| 3.3. Estudio nutricional | 51 |
| 3.4. Cuantificación de la actividad física | 52 |
| 3.5. Análisis metabólico | 52 |
| 3.5.1. Análisis metabólico del plasma | 52 |
| 3.5.2. Análisis metabólico de la orina | 53 |
| 4. Análisis estadístico | 54 |
| RESULTADOS | 57 |
| 1. Evaluación de los efectos en hábitos alimentarios y en la composición nutricional inducidos por una intervención en el estilo de vida | 59 |
| 2. Efecto de la intervención en el estilo de vida en el metaboloma del | 68 |

| | |
|--|-----|
| plasma | |
| 3. Efecto de la intervención en el estilo de vida en el metaboloma de la orina | 73 |
| DISCUSIÓN | 81 |
| CONCLUSIONES | 101 |
| BIBLIOGRAFÍA | 105 |
| ANEXOS | 127 |
| Anexo 1. Manuscrito en revisión | 129 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------|---|
| AGM | Ácidos grasos monoinsaturados |
| AGP | Ácidos grasos polinsaturados |
| AGS | Ácidos grasos saturados |
| AHA | Asociación Americana del Corazón |
| ALT | Alanina transaminasa |
| AST | Aspartato aminotransferasa |
| ATP III | Adult Treatment Panel III |
| BCAA | Aminoácidos de cadena ramificada |
| CI | Consentimiento Informado |
| D.E. | Desviación estándar |
| DEXA | Densitometría Ósea |
| diGalCer | Galabiosilceramida |
| EFSA | Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria |
| FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura |
| FDA | Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (Food and drug administration) |
| FDR | Falsos positivos |
| FMO1 | Human hepatic flavin-containing monooxygenases 1 |
| FMO3 | Human hepatic flavin-containing monooxygenases 3 |
| GalCer | Galactosilceramida |
| GlcCer | Glucosilceramida |
| gr | gramos |
| HbA1c | Hemoglobina Glicosilada |
| HOMA-IR | Modelo homeostático para Insulino resistencia |
| IDF | Federación Internacional de Diabetes |
| IL-6 | Interleuquina 6 |
| IMC | Índice de masa corporal |
| IOTF | International Obesity Task Force |
| IQR | Rango intercuartil |
| Kcal | Kilocalorías |
| LacCer | Lactosilceramida |
| LC | Cromatografía líquida |
| MS | Espectrometría de masas |
| NCEP | National Cholesterol Education Programme |

| | |
|---------------|--|
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PAI-1 | Inhibidor del activador del plasminógeno 1 |
| PC | Componente principal |
| PCR | Proteína C reactiva |
| PREDIMED | Estudio Prevención con Dieta Mediterránea |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| SAM | Análisis de significancia de microarrays/metabolitos |
| T4 libre | Tiroxina libre |
| TA | Tensión Arterial |
| TMA | Trimetilamina |
| TMAO | Trimetilamina N-oxidada |
| TNF- α | Factor necrótico tumoral α |
| TSH | Hormona tiroidea estimulante |
| TTOG | Test de tolerancia oral a la glucosa |

RESUMEN

Introducción: La obesidad es uno de los mayores factores de riesgo para trastornos metabólicos y cardiovasculares. El exceso de peso ganado durante la infancia aumenta el riesgo de enfermedad en el adulto, sin embargo revertiendo esta condición tempranamente se reduce el riesgo futuro mejorando la calidad de vida de los individuos.

Objetivos: Una intervención en el estilo de vida de individuos prepuberales con obesidad podría provocar cambios en firmas metabólicas en paralelo con mejoras del IMC. Nuestro objetivo principal fue determinar los efectos de una intervención en el estilo de vida en el perfil metabólico tanto del plasma como de la orina en individuos prepuberales con obesidad.

Métodos: Estudio longitudinal prospectivo en 40 individuos prepuberales con obesidad ($\text{IMC} > 2$ D.E.) entre las edades de 7 a 10 años. La intervención fue principalmente educativa, focalizada a los individuos y sus familias durante 6 meses. Se analizaron parámetros nutricionales, antropométricos y bioquímicos antes y después de la intervención. También se realizó metabolómica no dirigida para muestras de plasma mediante LC-MS y dirigida para muestras de orina mediante RMN, obteniendo así un perfil metabólico completo antes y después de la intervención.

Resultados: La intervención disminuyó el IMC de 3,55 D.E. (3,30 - 3,79) a 3,09 D.E. (2,86 - 3,32), la circunferencia de cintura de 83 cm (79,6 - 85,8) a 81 cm (77,8 - 84,5) y los niveles de HbA1c de 5,4% (5,3 - 5,4) a 5,2% (5,2 - 5,3), las variables se analizaron mediante Test t-Student pareado. Se disminuyó la ingesta de calorías, carbohidratos, azúcares libres y grasas. No se logró modificar las horas de actividad física. En el perfil metabólico del plasma se identificaron 2581 picos y se aplicó el Análisis de Componentes Principales para consolidarlos en 8

RESUMEN

componentes (PC). El PC1 fue el único factor que tuvo diferencia después de la intervención ($p= 0,008$) incluso ajustando por comparaciones múltiples. El PC1 está compuesto por metabolitos relacionados con el metabolismo de esfingolípidos observando la disminución de los niveles circulantes de las especies identificadas. En relación al perfil metabólico de las muestras de orina, se identificaron 32 metabolitos. Los niveles de TMAO fueron significativamente menores después de la intervención (FDR $q < 0,05$). El cambio en los niveles de TMAO se relacionaron inversamente con el cambio en la ingesta de fibra.

Conclusiones: Una intervención en el estilo de vida reduce el IMC D.E. y modifica el metaboloma del plasma y de la orina. En particular, la intervención disminuyó los niveles de ceramidas, asociadas estrechamente con enfermedades metabólicas. Además, se redujeron los niveles de TMAO, biomarcador de riesgo cardiovascular. Por lo tanto podemos sugerir que una intervención en el estilo de vida de individuos prepuberales con obesidad puede ser un importante mecanismo para reducir el riesgo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares.

INTRODUCCIÓN

1. Obesidad

La obesidad ha aumentado exponencialmente en las últimas décadas, convirtiéndose en epidemia a nivel mundial. Esta patología conlleva consecuencias negativas para la salud, principalmente relacionadas con el desarrollo de enfermedades metabólicas, cardiovasculares, e incluso algunos tipos de cáncer. Junto con esto, la obesidad se relaciona con un alto coste económico, tanto por la morbilidad que arrastra, como por la invalidez que puede llegar a ocasionar. Esta patología afecta a todos los grupos de edad, razón por la cual se debe contar con un conocimiento global y abarcar su tratamiento de manera multidisciplinar teniendo como principal objetivo mejorar la calidad de vida de la población.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2014 más de 1900 millones de adultos mayores de 18 años padecían exceso de peso, de los cuales más del 13% eran obesos, 10% hombres y 14% mujeres (1). La OMS ha publicado que un 65 % de la población mundial vive en países en los que la obesidad es causa de muerte en más gente que el bajo peso. En la Fig. 1 podemos observar la prevalencia de sobrepeso y obesidad determinadas en el año 2013 (2), la cual es mayor en países desarrollados que en aquellos en vías de desarrollo. En ambos casos se ve un gran incremento a partir de los 19-20 años que se ha ido manteniendo hasta alrededor de los 50 años.

En Europa entre los años 1990 a 2010, el sobrepeso y la obesidad aumentaron su porcentaje de participación en la morbilidad a un 39% (3). En España la situación no es muy distinta. Según la Encuesta Nacional de Salud, el 57,7% de adultos a partir de 18 años padecen sobrepeso u obesidad. Esta última clasificación ha aumentado de un 7,4% a un 17% en los últimos 25 años (4).

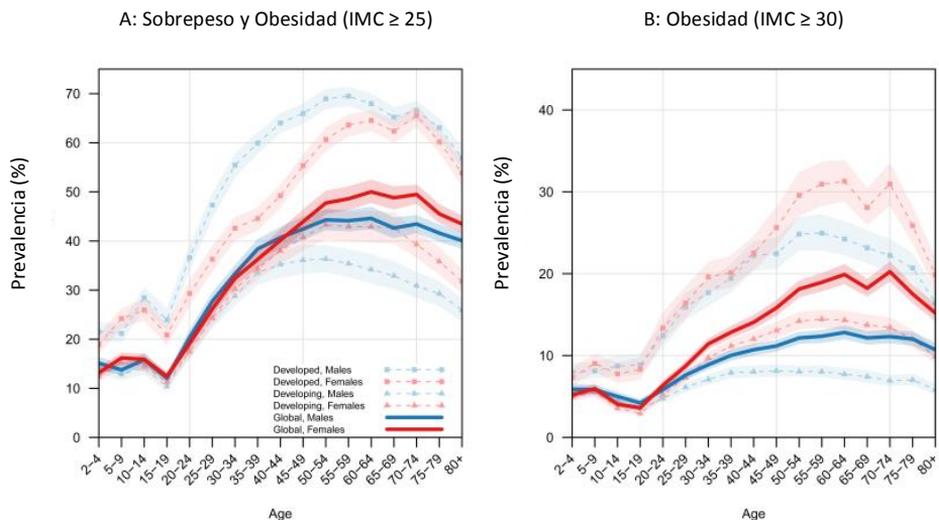


FIG 1. Prevalencia de Obesidad descrita según el nivel de desarrollo de los países a nivel mundial. A: sobrepeso y obesidad (Índice de Masa Corporal: ≥ 25); B: Obesidad (Índice de Masa Corporal: ≥ 30) (2).

El coste que provoca la obesidad en la sociedad europea es de más de mil millones de euros al año, considerando además del gasto sanitario directo otros gastos como la baja productividad y el absentismo laboral por baja médica debido a enfermedades asociadas (3).

La educación y el estado socioeconómico juegan un rol muy importante en el riesgo de desarrollar obesidad. Así, las personas con un estado socioeconómico y nivel educacional bajo pueden tener un riesgo 2 a 3 veces superior de convertirse en sujetos obesos en comparación a personas con niveles educacionales y económicos medios o altos, arrastrando con esto la aparición posterior de enfermedades cardiovasculares y una mayor mortalidad prematura. Un ejemplo encontrado en un reporte de la OMS, muestra que mujeres con bajos niveles de educación pueden aumentar hasta 5 veces su probabilidad de convertirse en mujeres obesas en comparación a mujeres con un nivel educacional alto.

1.1. Definición de obesidad

El exceso de peso u obesidad se define según la OMS como una acumulación excesiva y anormal de grasa, la cual, mantenida en el tiempo, presenta riesgos para la salud.

La obesidad puede ser caracterizada por su etiología:

- Primaria o común: No se reconoce un factor específico que la produzca, se observa el resultado de la interacción genética con el ambiente.
- Secundaria: Es el resultado de una patología que, al ser corregida por un tratamiento, desaparece.

La obesidad también se puede clasificar dependiendo de la distribución de la grasa corporal (Fig. 2). La obesidad Androide se refiere a la acumulación de grasa en la zona abdominal o visceral, relacionada con un mayor riesgo para la salud debido a que existe una correlación positiva de la grasa central con el desarrollo de enfermedades metabólicas como son la diabetes mellitus tipo 2 o la hipertensión arterial, entre otras.

La obesidad de tipo *Genoide* está caracterizada por la acumulación de grasa en las zonas de las caderas y glúteos, y se relaciona con un menor riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas. Igualmente, ambos tipos de obesidad deben ser

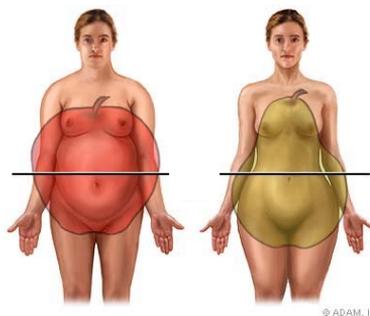


FIG. 2: Distribución de grasa corporal, Androide vs Genoide.

Fuente: Imágenes A.D.A.M.S.

INTRODUCCIÓN

tratados, con el objetivo de disminuir el riesgo cardiovascular que la acumulación de grasa implica.

Dada la dificultad de medir la cantidad y distribución de la grasa corporal en la población general, la manera más común para determinar el grado de exceso de peso y diagnosticar el sobrepeso o la obesidad es mediante el Índice de Masa Corporal (IMC). Éste se calcula con una fórmula que incluye el peso y la altura de un individuo de la siguiente manera: peso en kilogramos, dividido por el valor de la estatura expresada en metros al cuadrado (Fig. 3).

$$\text{IMC} = \text{Peso (kg)} / \text{Estatura (m)}^2$$

FIG.3: Fórmula del Índice de Masa corporal

Aunque el IMC puede llevar a un error diagnóstico de sobrepeso u obesidad en individuos con una musculatura muy desarrollada, es una buena herramienta para la mayor parte de la población.

Otra medida sencilla utilizada para complementar el diagnóstico de sobrepeso y obesidad, es la circunferencia de cintura, principalmente relacionada con la obesidad central. Se mide en el punto medio de una línea recta entre la última costilla y la cresta iliaca. Se ha definido tanto para la población infantil a partir de 5 años hasta los 18 años según el género (5), como también para la población adulta, hombres < 94 cm y mujeres < 80 cm, siendo diferente según la etnia (6).

Además de las mediciones de peso, estatura y circunferencia de cintura que normalmente se utilizan para identificar el exceso de peso en la práctica clínica, también es de importante consideración la evaluación del porcentaje de masa grasa y magra. Las metodologías más comúnmente utilizadas son:

- La medición de pliegues cutáneos: es una técnica de bajo coste pero de

moderada complejidad, en la cual se requiere de personal capacitado y con experiencia, además de material calibrado para no inducir a error. Normalmente se utilizan los protocolos de Lohman (7) y la ecuación que corresponda para edad y género del individuo.

- Bioimpedanciometría: es una técnica bioeléctrica no invasiva, sencilla pero de un coste moderado. Se basa en el principio que el tejido adiposo es un mal conductor de electricidad a diferencia de la masa magra que posee agua y electrolitos. Esta medición puede variar dependiendo del grado de hidratación que tenga el individuo.

- Densitometría ósea (DEXA): Es una de las técnicas de mayor exactitud pero tiene un muy coste elevado, por lo que la mayoría de veces se utiliza para fines de investigación. El DEXA utiliza dos fuentes de rayos X con energías diferentes. Estos haces de rayos X se ven atenuados de forma diferente por los distintos tejidos corporales, reconociendo la masa grasa y cuantificándola por regiones.

1.2. Clasificación de obesidad en adultos

Una de las clasificaciones que más se utiliza actualmente a nivel internacional en la población adulta es la presentada en la Tabla 1. Se estructuró con datos de personas de distintos países y razas. Posteriormente, debido a la proporción de la población asiática en el mundo en las cuales se ha identificado un alto riesgo de diabetes tipo 2 y de riesgo cardiovascular presentando un IMC menor, se propusieron puntos de cortes adicionales (8).

Tabla 1. Clasificación del Índice de Masa Corporal IMC (kg/m²), OMS.

| | Principales puntos de corte | Puntos de corte adicionales |
|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Bajo peso | < 18,50 | <18,50 |
| Delgadez severa | < 16,00 | <16,00 |
| Delgadez moderada | 16,00 - 16,99 | 16,00 - 16,99 |
| Delgadez media | 17,00 - 18,49 | 17,00 - 18,49 |
| Rango de Normalidad | 18,50 - 24,99 | 18,50 - 22,99 |
| | | 23,00 - 24,99 |
| Sobrepeso | ≥ 25,00 | ≥ 25,00 |
| Pre-obeso | 25,00 - 29,99 | 25,00 - 27,49 |
| | | 27,50 - 29,99 |
| Obesidad | ≥ 30,00 | ≥ 30,00 |
| Obesidad clase I | 30,00 - 34,99 | 30,00 - 32,49 |
| | | 32,50 - 34,99 |
| Obesidad clase II | 35,00 - 39,99 | 35,00 - 37,49 |
| | | 37,50 - 39,99 |
| Obesidad clase III | ≥ 40,00 | ≥ 40,00 |

Fuente: Adaptación de OMS 1995, 2000, 2004.

1.3. Obesidad: Anormalidades en el tejido adiposo

El tejido adiposo, considerado tradicionalmente como una forma de reservar grasa en el organismo, en las últimas décadas se ha descubierto su dinamismo, su capacidad de secreción hormonal y la actividad reguladora considerándose actualmente como un importante órgano endocrino. Éste participa en procesos como la ingesta alimentaria, el gasto energético, la inmunidad y en la homeostasis del metabolismo glucídico y lipídico (9,10).

El desarrollo de este órgano varía dependiendo del género y la edad. Los cambios morfológicos y funcionales que ocurren en la adipogénesis dependen de la expresión de los factores de transcripción y el ambiente en que se estén desarrollando los adipocitos que la conforman, lo que puede llevar a una

alteración en la forma celular en el caso de mayor acumulación de grasa.

Existen 3 tipos principales de tejido adiposo (9,11):

- Tejido adiposo blanco: Se extiende por todo el organismo, tiene una gran capacidad de aislante térmico y cuando es necesario acumular o proporcionar energía es el sistema más importante para el balance energético de lípidos. Sus adipocitos se caracterizan por formar en el interior sólo una gran vacuola de lípidos, llegando a ocupar un 90% del espacio en su citoplasma y el núcleo se desplaza hacia la periferia.

- Tejido adiposo marrón: Principalmente este tejido se especializa en proporcionar calor a partir de la oxidación de lípidos. Se encuentra en los seres humanos al nacer y disminuye progresivamente en adultos. Sus adipocitos son más pequeños, presentan gran vascularización, pequeñas gotas de grasa en su citoplasma, una gran densidad de mitocondrias y un núcleo central.

- Tejido adiposo beige (12,13): Se ha descrito como adipocitos marrones inmersos en el tejido adiposo blanco y expresándose de manera similar a sus adipocitos. Presentan una baja de UCP-1 basal, pero responden al estímulo β -adrenérgico incrementando la expresión de UCP-1 de la misma manera que los adipocitos marrones.

Cuando nos referimos a la distribución del tejido adiposo, reconocemos el tejido adiposo visceral al almacenamiento de grasa presente entre los órganos principalmente en la zona abdominal y al almacenamiento subcutáneo bajo la epidermis (hipodermis).

El tejido adiposo es un órgano dinámico implicado en la regulación de nuestro organismo de manera endocrina, cuando ejerce su acción en tejidos distantes, y paracrina o autocrina, cuando el efecto de su acción es local.

En el caso de obesidad primaria, el tejido adiposo se afecta aumentando exageradamente el depósito de grasa, lo que provoca una desregulación de la secreción de adipocinas y un aumento en la infiltración de macrófagos, incrementando la inflamación. Se observa un aumento en el nivel de Proteína C-Reactiva (PCR), Interleucina-6 (IL-6), del Factor Necrótico Tumoral α (TNF- α), Inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), Resistina, como también de la Leptina y una disminución en los niveles de Adiponectina (14).

Por lo tanto, relacionamos que con la obesidad el tejido adiposo se ve alterado de manera importante presentándose un grado de inflamación leve pero crónico, el cual, manteniéndose en el tiempo, está asociado al desarrollo de enfermedades secundarias, particularmente diabetes de tipo 2 y enfermedades cardiovasculares.

2. Obesidad y enfermedad cardiovascular en el adulto

Desde un tiempo a esta parte se han realizado numerosos estudios que han demostrado la asociación de la obesidad con el riesgo cardiovascular (Fig.4). Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que niveles elevados de IMC, circunferencia de cintura, tensión arterial, colesterol-LDL, triglicéridos y tabaquismo principalmente, tienen un efecto sinérgico mediando el aumento de la morbilidad y mortalidad a largo plazo, debido al desarrollo de enfermedades cardiovasculares que se manifiestan como eventos agudos y consecuentemente incrementan la mortalidad en edades tempranas (15,16).



FIG. 4: Relación entre obesidad y la presencia de enfermedades de alto riesgo cardiovascular

Se ha descrito que al comparar adultos con obesidad y normopeso, los sujetos con mayor IMC tienen aproximadamente un 64% mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares como la diabetes mellitus tipo 2, un 54% mayor riesgo de hipertensión arterial, 9% mayor riesgo de presentar el colesterol total elevado y 34% mayor riesgo de artritis (17).

Afortunadamente, se describe también que con la reducción de peso repliega el riesgo metabólico, mejorando la tensión arterial y el metabolismo de la glucosa, llevando en su conjunto a disminuir las enfermedades relacionadas con el riesgo cardiovascular (18).

3. Obesidad en la infancia y adolescencia.

En el año 2013 la OMS declaró que más de 42 millones de niños menores de 5 años padecían un exceso de peso, una cifra que había aumentado en 10 millones desde el año 1990. En países en vías de desarrollo la prevalencia de sobrepeso y obesidad en preescolares supera el 30% (19).

En España, según la última Encuesta Nacional de Salud (2011-2012), la prevalencia de sobrepeso y obesidad en la población de 2 a 17 años fue de un 27% (4). Según el reporte del estudio ALADINO del año 2011, la prevalencia de sobrepeso era de un 26,2% y la de obesidad un 18,3% en niños de 6 a 9 años (20). En el último reporte de este estudio, en el que se evaluaron niños de este mismo rango de edad, entre noviembre 2015 y marzo 2016, se obtuvo un ligero descenso a un 23,2% de la prevalencia del sobrepeso y a un 18,1% de obesidad, predominando más en los niños que en las niñas (21). A pesar de esto, al evaluar por edad se observó que a partir de los 7 años la prevalencia del exceso de peso es significativamente mayor que en el resto de los rangos de edad.

Estos valores clasifican a España en uno de los países de más alta prevalencia de obesidad en Europa, presentando importantes variaciones regionales muy relacionadas a factores económicos (22). Complementando estos datos, según la última encuesta de salud realizada en España (2011-2012), el 44% de la población mayor de 15 años y el 12,1% de la población infantil de 5 a 14 años se declara sedentaria (4).

Estas cifras son alarmantes y preocupantes, no sólo por su posible persistencia en el tiempo, sino porque esta condición en la infancia está asociada a muerte prematura y discapacidad en la edad adulta. Además de los riesgos futuros claramente descritos, los niños sufren dificultad respiratoria, efectos psicológicos, mayor riesgo de fracturas e hipertensión, así como también la manifestación

temprana de marcadores de enfermedad cardiovascular de manera importante. Como hemos mencionado anteriormente, se debe considerar que esta patología tiene una gran carga económica tanto para los individuos como para las administraciones, en gastos médicos/salud, incremento de las pensiones por invalidez y mortalidad prematura (23).

3.1. Clasificación de la obesidad en la infancia y adolescencia

En relación al diagnóstico infantil la definición de sobrepeso y obesidad es más compleja porque los puntos de corte de peso, talla e IMC varían dependiendo de la edad y el género. Para eso se necesitan establecer unos percentiles en una población de referencia.

Dado que existe una gran diversidad auxológica según etnias y países, los expertos recomiendan en la práctica clínica diaria utilizar tablas de población local. En el caso de España existen varias curvas de crecimiento entre las que destacan las de la Fundación Orbegozo y las del Estudio Español del Crecimiento (24). En Cataluña, las gráficas utilizadas en los Centros de Atención Primaria y, por tanto, las más utilizadas para el diagnóstico de sobrepeso y obesidad son las de la Fundación Orbegozo.

3.1.1. Tablas Fundación Orbegozo (25): Fueron creadas a partir de un estudio de crecimiento iniciado el año 1978 en la población de Vizcaya. Se tomaron las medidas a 600 recién nacidos entre los años 1978 y 1980 (300 recién nacidos de cada sexo) y fueron controlados hasta el año 2000. Además, se realizó un estudio transversal en el año 2000 de chicos y chicas (54% mujeres) de edades comprendidas entre 0 y 18 años. En relación al sobrepeso y obesidad se determinaron en el percentil 85 y 95 respectivamente. Se consideraron los siguientes indicadores:

INTRODUCCIÓN

- Gráficas de distancia (longitud/talla, peso, peso-longitud)
- Gráficas de Índice de Masa Corporal (IMC)
- Gráficas de velocidad de crecimiento.

Existen referencias a nivel internacional útiles para los países o zonas que no tienen gráficas propias. Además, estas referencias internacionales son más utilizadas a nivel de estudios por la estandarización en el diagnóstico. Las referencias internacionales más utilizadas son las de la OMS y las de International Obesity Task Force.

3.1.2. Organización Mundial de la Salud (OMS) (26,27): Se han desarrollado curvas de crecimiento para las edades comprendidas entre 0 y 5 años, y entre 6 y 19 años, separadas por género. Estos datos fueron recopilados multicéntricamente (Brasil, Gana, India, Noruega, Oman y Estados Unidos) entre los años 1997 y 2003. Aunque existen tablas y curvas que determinan el estado nutricional representado en percentiles o desviaciones estándar (D.E.), se recomienda realizar el diagnóstico en base a la puntuación z (D.E.) (Tabla 2). Se consideran los siguientes indicadores que serán utilizados e interpretados según la edad del niño/a:

- Longitud/talla para la edad
- Peso para la edad
- Peso para la longitud/talla
- Índice de masa corporal para la edad

3.1.3. International Obesity Task Force (IOTF) (28): Estas tablas se han creado para entregar otra definición aceptable para el exceso de peso ya sea sobrepeso u obesidad. En ellas se han considerado datos de 6 países (Brasil, Gran Bretaña, China (Hong Kong), Países Bajos, Singapur y Estados Unidos) desde el nacimiento hasta los 25 años de edad. Para el diagnóstico infantil y adolescente se han

extrapolado los valores definidos de sobrepeso ($25 \text{ kg/m}^2 - 30 \text{ kg/m}^2$) y obesidad ($\geq 30 \text{ kg/m}^2$), para cada edad desde los 2 años hasta los 18 años para mujeres y hombres.

| Tabla 2. Criterios de diagnóstico de sobrepeso y obesidad según el criterio de la OMS, de 0 a 19 años (27). | | |
|---|--------------------------------------|------------------|
| Puntuación z | Peso para la longitud/talla | IMC para la edad |
| Por encima de 3 | Obeso | Obeso severo |
| Por encima de 2 | Sobrepeso | Obeso |
| Por encima de 1 | Posible riesgo de sobrepeso (Nota 1) | Sobrepeso |
| 0 (mediana) | Rango normal | Rango normal |
| Nota 1: un punto marcado por encima de 1 muestra un posible riesgo, pero una tendencia hacia la línea de puntuación z 2 muestra un riesgo definitivo. | | |

4. Obesidad infantil: Factor de riesgo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, podemos decir que la obesidad afecta a un gran número de niñas, niños y adolescentes, llevando a un bajo bienestar físico y emocional en esta población. Los efectos que tiene esta patología en la pubertad se ven reflejado en el acelerado desarrollo que presentan estos individuos, además del desbalance hormonal y cambios endocrinos que conlleva esta etapa. A lo anterior, se le suma que la obesidad es un condicionante importante como factor de riesgo para el desarrollo de obesidad en la etapa adulta, aumentando la incidencia de enfermedades metabólicas asociadas como es la diabetes mellitus tipo 2 y de enfermedades cardiovasculares (29).

4.1. Descripción de la obesidad infantil como precursor de enfermedad cardiovascular

La obesidad en la infancia se ha visto relacionada con episodios cardiovasculares importantes en la etapa de la adolescencia y manteniendo el exceso de peso también se presentan tempranamente en el adulto. Al analizar las arterias aorta y coronarias de autopsias realizadas a jóvenes, se encontraron engrosamiento de las paredes, lesiones y calcificaciones en los sujetos que tenían como antecedente la obesidad infantil y un riesgo cardiovascular determinado (30).

El riesgo cardiovascular se utilizó por primera vez en el estudio Bogalusa realizado en niños (31), en el que se determinó una sumatoria referente a la presencia o no de un factor alterado relacionado con el riesgo cardiovascular. Los factores de riesgo se definieron de la siguiente manera: Triglicéridos > 130 mg/dL; Colesterol-LDL > 130 mg/dL; Colesterol-HDL < 35 mg/dL; Insulina > percentil 95 (para edad y sexo); Tensión Arterial Sistólica > percentil 95 (para edad, sexo y estatura) ó Tensión Arterial Diastólica > percentil 95 para edad, sexo y estatura). Seguido a esto, la clasificación del riesgo cardiovascular se determinó con valores del 0 al 5, donde 0 es presentar ninguna alteración y 5 es presentar al menos 5 de estos factores alterados. Después de obtener esta clasificación, se observó que existía un aumento en las placas fibrosas de las arterias coronarias en aquellos individuos que presentaron de 3 a 4 factores. Muy importante de destacar es que a medida que aumentó el número de factores de riesgo, aumentó la proporción de niños con obesidad. También se observó una relación muy estrecha del exceso de peso con la presencia de insulina alterada. En relación al perfil lipídico, se determinó que un niño con exceso de peso tiene 7,1 veces más probabilidad de tener los triglicéridos elevados y 2,4 veces incrementado el colesterol total.

En conjunto al estudio Bogalusa, Juonala et al. (32) analizaron 3 estudios epidemiológicos más que siguieron a una población infantil hasta su etapa adulta analizando distintos aspectos (33–35), entre ellos el efecto que provoca la obesidad en la infancia a largo plazo. Se observó que la obesidad infantil tiene una repercusión muy importante en la salud cardiovascular y cardiorrespiratoria en la etapa adulta. En esta revisión se clasificaron todos los sujetos de los 4 grandes estudios, según el IMC en la infancia y su IMC en la etapa adulta en 4 grupos (I: participantes con IMC normal sin obesidad adulta; II: sobrepeso u obesidad infantil sin obesidad adulta; III: sujetos con obesidad infantil y adulta; IV sin obesidad infantil pero con obesidad adulta). Los resultados principales indicaron que la obesidad infantil fue el mayor predictor de DM2 en 3 de los 4 estudios analizados. En 2 de ellos se demostró que existe una asociación entre el exceso de peso en la infancia, ya sea sobrepeso u obesidad, con un alto riesgo de niveles incrementados de colesterol-LDL y en todos se demostró la asociación con el riesgo de hipertensión arterial y de niveles altos de triglicéridos. Lo más consistente de este estudio fue la determinación del riesgo a partir de si existe o no obesidad infantil: El grupo II tuvo el mismo riesgo de factores cardiovasculares que el grupo I, en contraste con el grupo III y IV que independiente de la presencia de la obesidad infantil presentaron un alto riesgo.

Con esta revisión se concluyó que el evitar la obesidad infantil o revertirla y ser adultos con un IMC saludable, el riesgo cardiovascular es bajo. Por el contrario, en el caso de los grupos 3 y 4, se aumenta la probabilidad en 5,4 veces de padecer diabetes mellitus tipo 2; 2,7 veces de padecer hipertensión arterial; 3 veces de padecer niveles elevados de triglicéridos y 1,7 veces de presentar aterosclerosis (representado por el grosor de la íntima) de la arteria carótida en la etapa adulta.

Otro indicador que se ha considerado dentro de los factores de riesgo cardiovascular es la circunferencia de cintura. Se ha estudiado y demostrado que

tiene una estrecha relación con la cantidad de grasa visceral, por lo que podría, al igual que el IMC, ser un buen predictor de riesgo cardiovascular (36). Se observó en una población pediátrica de 3 a 6 años, que tanto el IMC como la circunferencia de cintura, se correlacionan con niveles elevados de colesterol total, colesterol-LDL, triglicéridos y también con niveles elevados de Proteína C reactiva, considerada como una referencia de inflamación presente en condiciones de obesidad.(37)

Con estas referencias y nuevas publicaciones se confirma que ya en edades tempranas existe la presencia de los diferentes factores de riesgo cardiovascular en niños con obesidad o con una corta historia de exceso de peso (38). También se ha reforzado la teoría que estas manifestaciones y el riesgo metabólico comienzan a mostrarse muy tempranamente y que probablemente el origen del riesgo cardiovascular y la enfermedad debería buscarse en el periodo intrauterino (39).

4.2. Efectos secundarios relacionados con la obesidad.

4.2.1. Síndrome metabólico: Como consecuencia del exceso de peso y la alteración metabólica, se ha descrito el síndrome metabólico como un conjunto de diferentes factores de riesgo que colectivamente aumentan el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular.

Está asociado a diferentes anormalidades metabólicas, principalmente a la presencia de insulino resistencia (40), razón por la cual la primera definición que se le dió en 1988 fue “Síndrome de Insulino Resistencia”.

Existen 2 criterios de diagnóstico: por “National Cholesterol Education Programme (NCEP)” como ATP III (Adult Treatment Panel III) determinado en el año 2001 y

revisado el 2004 (41) y por la “Federación Internacional de Diabetes (IDF)” en 2006 (6). Se considera muy importante tener en cuenta el género y la etnia de las personas para poder diagnosticar correctamente este síndrome.

En la población infantil y adolescente, el síndrome metabólico aún no está bien definido del todo. Por ello, la propuesta más adecuada es el criterio formulado por IDF (Tabla 3) (42) :

| Obesidad central: Medido a través de la Circunferencia de Cintura en cm. | Edades | | | | | |
|--|-------------------------------|---|--|----------------------------|-----------|--|
| | 6 a < 10 años | | 10 a 16 años | | ≥ 16 años | |
| | ≥ percentil 90 | ≥ percentil 90 | Hombre ≥ 90 cm | Mujer ≥ 80 cm | | |
| Glucosa en ayunas | Sin datos para esta población | ≥ 100 mg/dL (5,6 mmol/L) | ≥ 100 mg/dL (5,6 mmol/L) | | | |
| Niveles de Triglicéridos | Sin datos para esta población | ≥ 150 mg/dL (1.7 mmol/L) ó con tratamiento previo por Dislipidemia | ≥ 150 mg/dL (1.7 mmol/L) o con tratamiento previo por Dislipidemia. | | | |
| Niveles de Colesterol-HDL | Sin datos para esta población | ≤ 40 mg/dL (1.03 mmol/L) | ≤ 40 mg/dL (1.03mmol/L) | ≤ 50 mg/dL (1.29mmol/L) | | |
| Tensión Arterial (TA) | Sin datos para esta población | TA Sistólica: > 130 mm Hg y TA Diastólica: > 85 mm Hg ó con tratamiento previo por Hipertensión Arterial | TA Sistólica: > 130 mm Hg y TA Diastólica: > 85 mm Hg ó con tratamiento previo por Hipertensión Arterial. | | | |

4.2.2. Diabetes mellitus 2: La aparición de diabetes tipo 2 en edades tempranas tiene consecuencias importantes debido a sus complicaciones macro y microvasculares, las cuales incrementan no sólo con la duración de la enfermedad sino también con la falta de un estricto control glicémico (43). En población adolescente, la obesidad ha afectado notablemente el incremento de la incidencia

de esta patología, observándose además una ineficacia en el control glicémico comparado con la población adulta, ya sea con tratamiento farmacológico o con intervenciones del estilo de vida (44). Por tanto volvemos a recalcar la importancia de la prevención y del tratamiento de la obesidad en edades tempranas.

5. Obesidad infantil y hábitos en el estilo de vida

Una de las causas principales del incremento en la prevalencia de la obesidad en los últimos años han sido los cambios de hábitos tanto en la alimentación como en el modo de vida, ya sea en países desarrollados como en vía de desarrollo.

Al analizar cómo ha evolucionado la sociedad, se ha podido observar en varias culturas cómo el comportamiento referente al estilo de vida ha ido mutando, principalmente que la población está cada día más sedentaria y desarrollando un mayor número de actividades relacionadas con esta conducta. Además, las horas de “pantalla” refiriéndome a las horas destinadas a ver la televisión, estar frente al ordenador, realizar actividades con tecnología digital como los móviles o tablets son cada vez mayores, disminuyendo las horas de sueño (45).

5.1. Efecto de las conductas ambientales en el estado nutricional de los niños

El efecto que causan en el estado nutricional de los niños algunas conductas del círculo familiar o social, pueden ser claves en el desarrollo o no del exceso de peso. Por ejemplo:

- Transición de la alimentación en la primera infancia: Se ha descrito que la lactancia materna, preferentemente exclusiva hasta los 6 meses, es un factor protector para el desarrollo de sobrepeso. Esta tendencia se ha visto disminuida y relacionada principalmente a: la educación de la madre, la maternidad en edades

mayores, la suplementación con leche de fórmula en hospitales y la introducción de otros tipos de alimentos antes de los 6 meses (46,47). En relación a este último concepto, la introducción temprana de alimentación sólida se ha asociado con una mayor probabilidad de dejar la leche materna, disminuyendo el beneficio inmunológico y a un mayor riesgo de consumo de alimentos ricos en grasas y azúcar al año de vida.

- El rol de la familia: Muchos factores pueden influir en la ingesta diaria de los niños, uno de ellos es la familia. La familia es el lugar donde absorben y aprenden los primeros olores, gustos y sensaciones referentes a la comida. Se ha descrito que algunas preferencias o gustos por diferentes alimentos pueden ser transmitidos de padres a hijos, lo que puede influenciar en el estado nutricional de estos pequeños, alterando la disponibilidad y accesibilidad a alimentos saludables (48,49). Incluso se ha demostrado que el estado nutricional tanto de la madre como del padre tienen una activa responsabilidad en el desarrollo psico-social de los niños durante la primera infancia (50). Se ha relacionado también en un estudio multicéntrico, que según el número de hijos en una familia existe mayor probabilidad de sobrepeso u obesidad en niños que no tienen hermanos (46).

- Patrones y tendencias actuales de alimentación: El consumo elevado de energía a temprana edad, principalmente proporcionado por un alto consumo de azúcar refinado, bebidas azucaradas, alimentos ricos en grasas saturadas y snacks, como también un bajo consumo de frutas y verduras parecen ser los principales factores dietéticos que contribuyen al desarrollo de la obesidad infantil (51,52). Existen posibles factores en el medio ambiente que promueven el consumo excesivo de energía. En el mercado se ofrece una amplia variedad de alimentos de buen sabor y de reducido precio, pero ricos en azúcares y grasas saturadas. Junto con esto, para hacerlos más atractivos y que el consumidor quede más satisfecho, se ha recurrido a diferentes estrategias de márketing, como ofrecer alimentos en

grandes porciones emulando un abaratamiento del precio o con obsequiar algún objeto de moda (51,53). En relación a los tiempos de comida, se ha identificado que las comidas regulares en la familia, como los horarios, la frecuencia y la disposición de ellas, son un pilar fundamental en la alimentación saludable. El patrón que más se ha relacionado al exceso de peso, tanto en la población infantil como adolescente, es el pasar por alto el desayuno y se ha asociado a un mayor consumo de alimentos de alta densidad energética durante el día. A la vez, esto se ve reflejado también en los hábitos y en el estado nutricional de los padres (54,55).

- Sedentarismo: Otro factor ambiental que contribuye al bajo gasto energético que experimentan los niños y adolescente hoy en día es el sedentarismo. Esta tendencia se ha enfatizado por la presencia diaria de la televisión, los videojuegos, los ordenadores, la carga académica, la falta de espacios libres para jugar y la reducción de los horarios de actividad física y recreativa dirigida tanto en las escuelas como en la vida diaria (56). En niños europeos preescolares, se han asociado conductas sedentarias como mirar televisión más de una hora al día, con un alto consumo de alimentos y bebidas de alta densidad energética (57).

- Sueño: El aumento del uso de móviles, ordenadores y una vida sedentaria se relaciona estrechamente con la falta de higiene del sueño. Se ha asociado a la falta de sueño la presencia de enfermedades cardiovasculares, pudiendo ser un factor de riesgo importante para su aparición. Se ha descrito la relación de una baja calidad de sueño o la falta de horas de sueño con la obesidad, tanto en niños como en adultos. Se ha observado el aumento de hormonas como el cortisol y la grelina, así como también el descenso de la leptina, lo que podrían favorecer la ingesta de alimentos, especialmente alimentos ricos en azúcares, carbohidratos complejos y grasas, aumentando la sensación de hambre-apetito, provocando una disminución en la sensibilidad a la insulina lo que llevaría a disminuir la tolerancia

a la glucosa y alterar el perfil de lípidos en nuestro organismo (58–60).

6. Tratamientos para la obesidad infantil

Cuando hablamos del tratamiento de la obesidad, ya sea en niños como en adultos, la primera herramienta a utilizar es la modificación del estilo de vida actual que lleva el individuo, los hábitos de alimentación y de actividad física, como también la salud mental (61,62).

6.1. Intervenciones en el estilo de vida en sujetos con obesidad infantil

Muchas situaciones en nuestras vidas se pueden dar debido al estilo de vida que llevamos. Un estilo de vida saludable se ha definido en varios aspectos por la OMS y la Comunidad Europea como, cumplir con una alimentación sana que incluya frecuentemente frutas y vegetales, reduciendo el consumo de grasas principalmente las saturadas, el azúcar y la ingesta de sal; preferir alimentos frescos y de temporada, eligiendo técnicas culinarias adecuadas que no disminuyan la calidad del alimento; en relación a la alimentación en la infancia, favorecer la lactancia materna exclusiva hasta los 6 meses de vida e introducir los alimentos de forma adecuada a los lactantes y ofrecer una variedad de alimentos desde temprana edad; mantener un peso adecuado para la estatura controlándolo a través del IMC y tomar como un hábito la realización de ejercicio, practicándolo diariamente y con los niños desde edades tempranas.

De algunas publicaciones sobre intervenciones en estilo de vida, se ha concluido que se produce una reducción de peso significativo a los 6 y 12 meses de tratamiento en los que se involucra a los niños y se trabaja con la modificación de los hábitos existentes a hábitos saludables más que en tratamientos convencionales enfocados sólo a la disminución de peso proporcionando una alimentación rígida (63).

Se ha demostrado en una revisión realizada con 15 trabajos que involucraban un tratamiento de cambio en el estilo de vida en sujetos con obesidad infantil, que a corto plazo se obtiene una mejoría importante en la pérdida de peso y en el perfil metabólico. En esta revisión, los trabajos reclutados se separaron en 2 grupos, los que recibieron sólo indicaciones para el cambio y mejora de la alimentación y los que además de esto, recibieron como “plus” la realización de actividad física programada. En ambos grupos se obtuvo una reducción del IMC y del porcentaje de masa grasa como también una disminución o mantenimiento del colesterol total, colesterol-LDL y triglicéridos. Pero en el grupo en que se contemplaba el programa de ejercicio de forma regular, se obtuvieron además mejorías en el colesterol-HDL, y en los valores de insulina y glicemia en ayunas después de 6 meses de intervención (64).

En otra revisión se observó que los programas de intervención para la prevención del exceso de peso que únicamente se basaban en la orientación nutricional, mostraban cambios sólo en la calidad de la alimentación pero no se reflejaba en el cambio antropométrico (65).

Para cambiar un estilo de vida es indispensable una alta motivación y la ayuda del entorno. En base a que los niños aún dependen mucho del ambiente familiar en el que están insertos, se debe tener en cuenta a la hora del tratamiento su entorno más próximo como son los padres. Se ha demostrado que intervenciones enfocadas en la educación sobre nutrición y ejercicio incluyendo a los padres pueden ser más efectivos a largo plazo en relación a la pérdida de peso, a la adiposidad y en la mejora de los hábitos, tanto de alimentación como de ejercicio (66,67).

6.2. Tratamiento farmacológico

En la etapa adulta, aunque ya se está empezando a actuar en la adolescencia, si el

tratamiento de cambios en el estilo de vida no da resultados beneficiosos dentro de 6 meses, se comienza con tratamiento farmacológico de manera complementaria. Actualmente el único fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de la obesidad crónica es Orlistat, el cual debe ser indicado médicamente a partir de los 12 años. Otros fármacos como: Lorcaserin, Fentermina/Topiramato, Bupropion/Naltrexona y Metformina entre otros, han sido relacionados con el tratamiento de obesidad pero no como objetivo principal, alcanzando una disminución del peso corporal menor al 5% (68–70).

6.3. Tratamiento quirúrgico

Si la obesidad es extrema y corre riesgo la salud del individuo, se plantea la opción de una cirugía reductiva. Podemos clasificar los distintos tipos de cirugía según su mecanismo de acción: restrictivas (gastroplastía, banda gástrica) y las restrictivas/malabsortivas (bypass gástrico en Y de Roux, derivación biliopancreática con o sin switch duodenal). Un candidato apto en la adolescencia para que se realice una cirugía reductiva debería tener un IMC ≥ 40 , haber alcanzado la madurez esquelética y tener comorbilidades asociadas. Actualmente existen datos que demuestran en pacientes adolescentes con obesidad extrema sometidos a cirugía bariátrica, unos resultados comparables o mejores que los resultados observados en adultos (71), pero aún siguen habiendo inconvenientes a largo plazo. Por lo tanto la seguridad/eficacia debe seguir evaluándose.

A pesar de estos datos los procedimientos quirúrgicos y farmacológicos utilizados en el tratamiento de la obesidad en adultos, continúa siendo no recomendada para la población infantil (61,72).

7. Guías de alimentación para la obesidad infantil

La Asociación Americana del Corazón (AHA), en referencia al aumento en la

INTRODUCCIÓN

prevalencia de enfermedades cardiovasculares ha planteado algunas recomendaciones específicas para la población infantil (73) y para la población adulta (74), reforzadas últimamente por la Guía Dietaria para Americanos, 2015-2020 (75):

- Comer vegetales y frutas diariamente, cereales y pan integral.
- Aumentar el consumo de pescado.
- Utilizar aceites vegetales y en caso de margarinas que sean bajos en ácidos grasos saturados y libres de ácidos grasos trans.
- Consumir lácteos desnatados.
- Evitar el consumo de grasas trans y limitar el consumo de grasas saturadas.
- Reducir el consumo de azúcar, bebidas azucaradas o edulcoradas.
- Reducir el consumo de sal o productos salados procesados.

Los pre-adolescentes y adolescentes suelen consumir diariamente una cantidad inferior a las recomendaciones de frutas, vegetales y granos. Además una gran proporción de su dieta se compone de alimentos altos en energía, grasas, azúcar libre, normalmente con un alto contenido de sal (76).

En la población europea, principalmente en la zona mediterránea, la recomendación ha sido retomar la alimentación propia de la región, definida como dieta Mediterránea. Esta dieta está caracterizada por favorecer el consumo de cereales, en especial los ricos en fibra, consumir frutas y verduras frescas y naturales de temporada, preferir siempre el uso de aceite de oliva extra virgen, aumentar el consumo de legumbres y pescados, reduciendo el consumo de carnes principalmente las rojas.

La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria, OMS y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), recomiendan (77–79):

- Consumir de un 45 a 60% de calorías provenientes de carbohidratos, cuidando que menos del 10% sea a partir de azúcares simples o refinados (80), e incluso se ha sugerido por la AHA que la ingesta de azúcares refinados sea menos al 5% (74).
- Consumir de un 20 a 35% de calorías provenientes de grasas, cuidando que no más del 7 al 10% sea a partir de grasas saturadas.
- Consumir de un 10 a 15% de calorías provenientes de proteínas, verificando que se cubra entre 0,85 - 1 gramo por kilogramos de peso del niño con proteínas de alto valor biológico.
- Cumplir con 5 comidas durante el día (desayuno, media mañana, comida, merienda, cena) y evitar picar entre comidas.
- Favorecer el consumo de frutas y verduras, tratando de cubrir las 5 raciones al día (3 de fruta y 2 de verduras) que se han propuesto, más el consumo de legumbres secas.
- Incorporar en nuestros hábitos alimentarios el consumo de frutos secos.
- Aumentar el consumo de agua, potenciando su ingesta como la bebida básica.
- Fomentar un estilo de vida activo, incluyendo de 40 a 60 minutos diarios ya sea de caminata, juegos en el parque, realización de algún deporte, etc.
- Reducir la ingesta frecuente de bollería, bebidas azucaradas y zumos, golosinas, cremas de chocolates, lácteos elaborados y procesados, "*fast food*" y cárneos procesados.
- Reducir las horas de pantalla referentes a la televisión, el ordenador, las consolas, los móviles, etc, a un máximo de 2 horas diarias.

8. Metabolómica: Una herramienta para estudiar las enfermedades metabólicas.

En las últimas décadas, la aplicación de metodologías “-ómicas” ha permitido un innegable avance en el conocimiento de las bases moleculares de numerosas enfermedades, mostrando cómo la variabilidad en la secuencia genética (genómica), en los niveles de transcritos de mRNA (transcriptómica) y en la expresión de proteínas (proteómica) puede determinar la predisposición o la aparición de determinadas enfermedades. Cuando ya hablamos de procesos en el cual distinguimos metabolitos, nos estamos refiriendo a la *metabolómica*.

La metabolómica utiliza un conjunto de técnicas basadas principalmente en la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear, permitiendo así la caracterización muy detallada del perfil metabólico de muestras biológicas como plasma, orina, músculo esquelético o hígado (81).

8.1. Metabolómica, nutrición y obesidad

El rol de la metabolómica en el ámbito de la nutrición ha ayudado a ampliar la gama de metabolitos relacionados con este tema aumentando la utilidad para la realización de diversos estudios. Al ser los metabolitos sustratos y productos en reacciones de rutas metabólicas, la aplicación de la metabolómica al estudio de enfermedades metabólicas tiene un claro interés. El nivel de los metabolitos en un estado fisiológico concreto es el resultado neto de la variabilidad genética, transcripcional y de expresión de proteínas. Por tanto, una de las ventajas más importantes de la metabolómica sobre el resto de técnicas “-ómicas” es la integración de todas ellas, permitiendo una detallada caracterización del estado fisiológico del individuo.

Los perfiles de metabolómica generados por resonancia nuclear magnética y

espectrometría de masas por cromatografía de gas y líquido en eritrocitos versus plasma muestra una información complementaria en varios biomarcadores específicos los cuales pueden ser ampliados a una evaluación nutricional (82).

Estudios en los cuales se ha utilizado esta tecnología, principalmente en obesidad, enfermedades cardiovasculares y diabetes, han demostrado los siguientes datos de gran interés: en sujetos con obesidad se demostró que los niveles de aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina y valina) estaban incrementados en plasma, en comparación con individuos normopeso (83) y también diferencias en la alteración de niveles de metabolitos durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral (84); reforzando este dato una revisión ha demostrado la relación que existe entre el IMC, principalmente comparando individuos con obesidad y normopeso, con aminoácidos de cadena ramificada y sus metabolitos asociados, y la relación con insulino resistencia y diabetes (85), como también junto con metabolitos andrógenos asociados, se han relacionado con adiposidad y riesgo cardiovascular durante la infancia (86); también se han observado niveles incrementados en plasma de fenilalanina, tirosina y aminoácidos ramificados en individuos sanos pero que se preveía el desarrollo de diabetes en los siguientes 12 años (81). En sujetos con obesidad infantil, luego de realizar un tratamiento relacionado con cambios en el estilo de vida, además de la reducción de peso, se observó cambios en fosfolípidos, glutamina y metionina, sustancias asociadas a la obesidad y sus comorbilidades(87); también se ha visto en otro grupo de niños y adolescentes sometidos a este tipo de tratamiento, una mejora del perfil lipídico, sobretodo en menores de 10 años (88). Así es como mediante esta técnica se ha podido demostrar también que la obesidad en la infancia afecta la composición del metaboloma sérico y que con la metabolómica se pueden identificar biomarcadores y formas moleculares implicados en la fisiopatología de una enfermedad específica (89,90).

OBJETIVOS

Objetivo principal:

El objetivo principal del estudio es caracterizar los cambios nutricionales, fisiológicos y metabólicos asociados a una intervención en el estilo de vida en niños prepuberales con obesidad, con el objetivo último de diseñar nuevas estrategias de intervención para mejorar el tratamiento de la obesidad infantil.

Objetivos específicos:

- Evaluar los efectos en los hábitos alimentarios y en la composición nutricional de la dieta inducidos por una intervención en el estilo de vida.
- Analizar los efectos de la intervención en el metaboloma del plasma en niños prepuberales con obesidad.
- Analizar los efectos de la intervención en el metaboloma de la orina en niños prepuberales con obesidad.

METODOLOGÍA

Diseño del estudio

El diseño del proyecto consistió en un estudio longitudinal prospectivo en el que se investigó el efecto de una intervención en el estilo de vida de individuos prepúberales con obesidad en el cambio de su perfil nutricional y metabólico. La intervención se llevó a cabo durante 6 meses. El efecto se midió a partir del estudio detallado de la alimentación, la antropometría, y las muestras de sangre y orina de los participantes. Todos los datos se recogieron al inicio y final de la intervención.

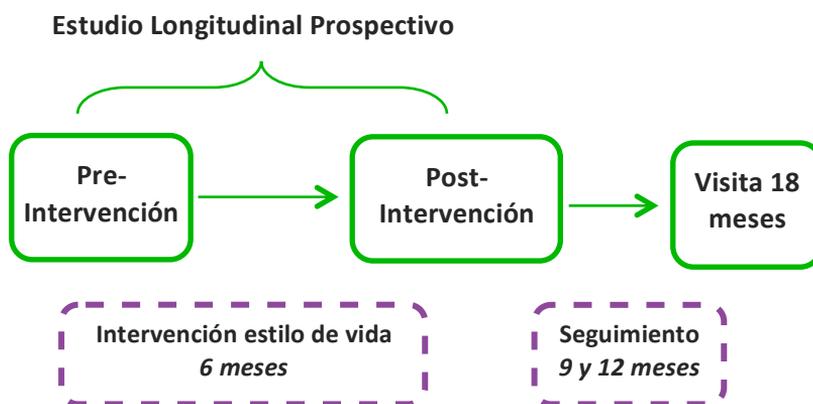


FIG 5. Representación del diseño del estudio realizado.

1. Sujetos del estudio: reclutamiento y caracterización

Los individuos que presentan un alto grado de obesidad y que no responden al tratamiento en la atención primaria, son referidos a la Unidad de Obesidad del Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona. De ellos, se reclutaron pacientes entre los años 2013 y 2014 para participar en el proyecto “Identificación de nuevas dianas moleculares para el diseño de estrategias de prevención y tratamiento de la

obesidad”. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Sant Joan de Déu (CEIC) para el protocolo y el formulario de consentimiento informado en el cual se declaró la privacidad y confidencialidad del uso de los datos.

Criterios de inclusión: Individuos de edad entre 7 y 10 años con obesidad definida como un IMC mayor de dos veces la desviación estándar ($IMC > 2DE$) para una determinada edad y género, según establecido por la OMS; presentar un estadio prepuberal en el momento del screening, definido como Tanner I en niñas y testes < 4 mL de volumen en niños.

Criterios de exclusión: Sujetos que ya estén en tratamientos para la obesidad; obesidad de causa endógena, secundaria a fármacos o a alguna patología crónica; presencia de enfermedad crónica (incluyendo diabetes de tipo 2) o toma de medicación que pueda aumentar el riesgo cardiovascular, excepto la obesidad en sí; se excluirán a los pacientes que desarrollen pubertad durante el estudio; sin firma del consentimiento informado para la participación del estudio.

2. Estructura de la intervención del estilo de vida

Los individuos fueron reclutados en la unidad de obesidad y tras la firma del consentimiento informado (CI) siguieron el flujograma (Fig. 6) programado para la intervención. Las visitas fueron individuales para cada participante y sus padres. La intervención fue fundamentalmente educativa, dirigida tanto a los niños como a las familias. El objetivo fue conseguir una mejora de estilo de vida modificando hábitos, entre los que destacan la alimentación saludable y la práctica regular de actividad física.



FIG. 6: Flujograma del programa de intervención en el estilo de vida.

Las pautas de alimentación se basaron en las recomendaciones establecidas por el Ministerio de Sanidad y la *Conselleria de Salut* de la Generalitat de Catalunya, referentes a la Dieta Mediterránea y respaldadas por la OMS. Estas recomendaciones tienen como pilar fundamental ser una dieta normocalórica basada en peso aceptable para una altura determinada y equilibrada de la siguiente manera:

- De un 45 a 55% de las calorías totales deben ser proporcionadas por hidratos de carbono, de los cuales menos del 10% en forma de azúcares simples.
- De un 10 a un 15% de las calorías totales deben ser proporcionado por proteínas.
- De un 30 a un 35% de las calorías totales deben ser proporcionado por grasas, de las cuales menos del 10% en forma saturada.

Se incidió particularmente en la calidad de los alimentos, en un bajo consumo de alimentos ricos en grasas saturadas y azúcar libre, así como en el aumento de la ingesta de fibra dietética.

Se utilizó material visual durante las visitas con el objetivo de que los participantes

(y sus familias) pudieran visualizar de mejor manera las recomendaciones de las pautas de alimentación, cómo servir los alimentos en los platos y en diferentes preparaciones. Se les facilitó herramientas y ayuda a las familias en el diseño de sus menús acordes a las recomendaciones, dando gran importancia a la variedad y calidad, así como también a la técnica culinaria utilizada para la preparación de éstos.

Las pautas de actividad física se basaron en las recomendaciones de la OMS para niños de 5 a 17 años, reforzando la realización de un mínimo de 30 minutos diarios de ejercicio y 3 veces a la semana, algún tipo de actividad extra escolar relacionada con algún deporte, con una duración de por lo menos 60 minutos.

3. Variables del estudio

Se estudiaron pre- y post-intervención diferentes variables demográficas y clínicas como el peso, talla, IMC, tensión arterial y perímetro de cintura. También se determinó la composición corporal mediante pliegues cutáneos.

3.1 Análisis antropométrico

- Peso: Se midió con una báscula electrónica (SECA S.A.) el peso en kilogramos, con sólo una capa de ropa.
- Estatura: Se midió con un estadiómetro (SECA S.A.) la estatura en metros, descalzos.
- Índice de masa corporal (IMC): Se utilizó la fórmula de IMC: peso (kg) / (altura (m))². Se calculó el IMC en desviaciones estándar (D.E.), utilizando el software Anthro Plus (91), proporcionado por la OMS.
- Perímetro de cintura: Se midió en el punto medio entre la última costilla y la cresta iliaca. Los valores se midieron con una cinta métrica plástica de 0,1 mm, sólo con uso para este estudio.

- Estimación del porcentaje de masa grasa: Cálculo de porcentaje de grasa se realizó a través de la ecuación de Slaughter, considerando la medición del pliegue tricípital y subescapular según la técnica de Lohman (7,92).
- Tensión Arterial: Se midió en el brazo derecho utilizando un sistema automático. El manguito utilizado fue el apropiado para el diámetro del brazo de los sujetos.

3.2. Análisis de parámetros bioquímicos

A partir de una muestra de sangre en ayunas se obtuvieron datos bioquímicos que incluyeron: hemograma, perfil lipídico (triglicéridos, colesterol total, HDL y LDL), glucosa, insulina, hemoglobina glicosilada (HbA1C), enzimas hepáticas (ALT y AST), hormonas tiroideas (TSH y T4 libre), creatinina, urea y PCR ultrasensible. Se realizó una prueba de tolerancia oral a la glucosa (TTOG) en algunos pacientes por indicación médica, pero esta variable no fue considerada ya que no formaba parte del protocolo del estudio. Las determinaciones se realizaron en el laboratorio de la Unidad de Investigación del Hospital Sant Joan de Déu, como parte de la atención al paciente.

3.3. Estudio nutricional

Se recogieron datos nutricionales a partir de la ingesta de los individuos, previo y posterior a la intervención:

- Análisis cualitativo: En la visita de *screening* y después en la visita a los 6 meses de intervención se realizó el test KidMed, ampliamente utilizado por ser un test rápido y sencillo con sólo 12 ítems. Este test valora el grado de adherencia del paciente al patrón de dieta Mediterránea.
- Análisis cuantitativo: Se recogió la información de la ingesta mediante registros alimentarios durante 4 días consecutivos (3 laborables y 1 festivo). En la visita de *screening* se dieron las instrucciones para realizar estos registros, recogándose

previo a la intervención. El registro de la ingesta fue basado en medidas caseras a partir de las que se calculó la cantidad ingerida en gramos de un alimento mediante patrones utilizados en la práctica clínica diaria. La valoración de la ingesta a través de los registros se realizó por medio del software DIAL (DIAL.EXE, versión 3.3.0.0) (93). De cada registro se obtuvo el valor promedio de la ingesta de cada nutriente por día y luego calculamos el promedio respecto a los 4 días registrados. Por lo tanto, a partir de estos datos analizamos la ingesta calórica y la composición de macro y micronutrientes, pudiendo evaluar el impacto de la intervención realizada al finalizar el estudio.

3.4. Cuantificación de la actividad física

Se obtuvieron datos cualitativos de actividad física expresados en la cantidad de horas extraescolares destinadas a su realización a la semana. Junto con esto, se determinó también mediante un registro definido la cantidad de horas destinadas a la pantalla (televisión, ordenador, móviles, videojuegos, tablets).

3.5. Análisis metabólico

El análisis metabólico, describe tanto el análisis del metaboloma del plasma realizado mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, como el análisis del metaboloma de la orina realizado mediante resonancia magnética nuclear. Ambas determinaciones fueron realizadas en la Plataforma Metabólica perteneciente al CIBERdem, ubicada en la Universidad Rovira i Virgili, Reus, en colaboración con el Dr. Óscar Yanes.

3.5.1. Análisis metabólico del plasma: Una vez tomada la muestra se procedió a la separación del plasma inmediatamente y se dividió en alícuotas adecuadas. Las muestras se almacenaron a -80°C , en la Unidad de Biobanco (Banco de Muestras Biológicas) del Hospital Sant Joan de Déu hasta su posterior uso. En la

Plataforma Metabolómica, una vez transportadas las muestras, se descongelaron las alícuotas (25 µL) a 4°C. Los metabolitos fueron separados por cromatografía líquida (columna HILIC, ACQUITY UPLC BEH 1.7 µm, Waters) e identificados mediante espectrometría de masas (6550 Agilent Technologies). Se realizaron controles de calidad periódicamente de las muestras (QC) para filtrar la variación analítica. Los datos de LC-MS fueron procesados usando el software XCMS (versión 1.38.0)(94) para detectar y alinear los picos de espectro. Cada pico está definido como una entidad molecular con una única masa (m/z) y un tiempo de retención específico. El análisis XCMS de estos datos nos da una matriz que contiene el tiempo de retención, valor de m/z , y un área integrada de los picos detectados en el cromatograma. Para la cuantificación se consideraron sólo el área integrada de características de metabolitos por sobre 5000 recuentos espectrales en cada grupo para la cuantificación. Los datos fueron importados al Rstudio (95).

Resultaron 2647 picos del espectro, de las cuales en 66 de ellas se encontraron valores por debajo de los niveles detectables de lectura en alguna muestra y fueron eliminados del análisis. Resultó una matriz de 2581 picos que se utilizó en el análisis multivariante, las cuales fueron identificadas usando la base de datos "Human Metabolomic Data Base (HMDB)"(96) y la base de datos Metlin. De los metabolitos identificados, mediante el programa MBRole 2.0 (97) se realizó el análisis de "*pathway enrichment*" (KEGG *pathways*). Finalmente para validar las características metabolómicas, se realizó la determinación de modo dirigido. Para mayor detalle del protocolo utilizado consultar el anexo 1.

3.5.2. Análisis metabolómico de la orina: Se consideró una orina en ayunas, la cual se recogió en el laboratorio del Hospital Sant Joan de Déu. Una vez obtenida la muestra se separó en 2 alícuotas para cada paciente de 500 µL orina. Las muestras se almacenaron a -80°C, en la Unidad de Biobanco (Banco de Muestras

Biológicas) del Hospital Sant Joan de Déu hasta su posterior uso. En la Plataforma Metabólica, una vez transportadas las muestras, se procesaron y se identificaron los metabolitos mediante resonancia magnética nuclear (RMN). Se utilizaron bases de datos (BBioRef AMIX database (Bruker), Chenomx y HMDB) para la identificación de metabolitos a partir de los espectros de resonancia. Para el análisis, los metabolitos descritos fueron normalizados por el contenido de creatinina presente en cada muestra de orina y transformados a logaritmo con base 2. La matriz resultante fue utilizada para la identificación de biomarcadores.

4. Análisis estadístico

Para expresar las variables recolectadas, primero se corroboró si presentaban distribución normal o no normal mediante el test Shapiro-Wilk. En el caso de las variables con distribución normal los datos están descritos como la media y 95% del intervalo de confianza. En el caso de las variables con distribución no normal los datos se presentan como la mediana y el rango intercuartil (IQR).

Se compararon los datos recogidos al inicio del tratamiento y a los 6 meses de la intervención utilizando el test t-Student de dos colas pareado (variables con distribución normal) o test Wilcoxon pareado (variables con distribución no normal). Para el análisis de variables cualitativas se utilizó la Prueba χ^2 de Pearson.

Para analizar los datos obtenidos de la metabolómica del plasma, se realizó un análisis de Componentes Principales para consolidar los 2581 picos obtenidos en 8 componentes, que acumularon el 54% de la varianza total de la muestra. Los componentes se extrajeron mediante rotación Varimax para facilitar la interpretación. Para la comparación de cada componente principal entre en el tiempo basal y los 6 meses utilizamos test Wilcoxon pareado, aplicando luego la corrección de Bonferroni para ajustar por comparaciones múltiple. Al analizar los

componentes principales, consideramos los picos que indicaron mayor peso en el componente principal, definido como *factor loading* mayor a 10,751, estos son los que contribuyen significativamente a un factor determinado. Para analizar las diferencias en los metabolitos individualmente entre el tiempo basal y a los 6 meses de la intervención, las concentraciones se analizaron después de haberlos centrados a media 0 y luego estandarizados, es decir convertidos a z-score.

Para el análisis del metaboloma de la orina, utilizamos uno de los métodos para identificar biomarcadores, el Análisis de Significancia de Microarrays/Metabolitos (SAM), incorporado en MetaboAnalyst 3.0 (98). SAM está diseñado para identificar falsos positivos (FDR), asignando un puntaje de significación a cada variable basado en su cambio (muestras pareadas), en relación a la desviación estándar de mediciones repetidas. Para las variables con mayor puntuación se compara su diferencia relativa con la distribución estimada por permutaciones aleatorias.

Para las correlaciones, se utilizó la correlación de Spearman, ajustada por edad, género y por el IMC D.E. basal.

Para todos los cálculos estadísticos se utilizó R 3.3.2 (2016, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Se consideró, para todas las pruebas realizadas, un p-valor significativo $< 0,05$ y a una tendencia con p-valor $> 0,1$.

RESULTADOS

1. Evaluación de los efectos en hábitos alimentarios y en la composición nutricional inducidos por una intervención en el estilo de vida

Se reclutaron 53 individuos de los cuales 5 dejaron el programa antes de terminar la intervención y 6 presentaron un estadio puberal avanzado en la visita de los 6 meses, excluyéndolos de la cohorte. De los 42 individuos, 2 de ellos presentaron alterada la glicemia a los 120 min en la prueba oral de tolerancia a la glucosa (TTOG) (> a 200 mg/dl) por lo que se excluyeron del estudio.

1.1. Análisis demográfico

De los 40 individuos analizados, el 80% (n=29) era de etnia caucásica, el 10% (n=4) etnia hispana, el 7% (n=3) del norte de África o magrebí y el 3% (n=1) de Asia.

En la Tabla 4 se describe la caracterización del grupo de individuos al inicio y final del programa de intervención, destacando la reducción significativa del IMC, tanto en valor absoluto o, más notoriamente, analizado como z-score. También hubo una disminución significativa de la circunferencia de cintura en 1,54 cm. En relación a la estimación de la masa grasa no se modificó su contenido a los 6 meses.

| Tabla 4. Caracterización demográfica y antropométrica | | | | | |
|---|----------------------|-----------------|------------------------------|---------------|----------------|
| | Basal | | Post 6 meses de intervención | | *p-valor |
| | Número de individuos | 40 (M:20; H:20) | | | |
| Edad (años) | 8,94 | (8,6 - 9,3) | 9,45 | (9,1 - 9,8) | |
| Peso (kg) | 54,1 | (49,8 - 58,3) | 54,2 | (49,9 - 58,6) | 0,7388 |
| Estatura (m) | 1,39 | (1,36 - 1,42) | 1,42 | (1,39 - 1,45) | < 0,001 |
| IMC (kg/m ²) | 27,50 | (26,4 - 28,6) | 26,46 | (25,3 - 27,6) | 0,0006 |
| IMC (D.E) | 3,55 | (3,30 - 3,79) | 3,09 | (2,86 - 3,32) | < 0,001 |
| Cir. de Cintura (cm) | 83 | (79,6 - 85,8) | 81 | (77,8 - 84,5) | 0,0070 |
| Masa grasa (%) | 35 | (32,5 - 36,9) | 35 | (32,9 - 36,7) | 0,7565 |
| Tensión Sistólica (mmHg) | 112 | (109 - 114) | 110 | (107 - 113) | 0,3936 |
| Tensión Diastólica (mmHg) | 70 | (68 - 72) | 69 | (67 - 71) | 0,7123 |

Los valores representan la media y el 95% del intervalo de confianza. *, Test t-Student pareado considerando valor p significativo < 0,05.

1.2. Análisis nutricional

Mediante el análisis de los registros alimentarios entregados por los pacientes, contabilizamos y evaluamos la calidad de la dieta y el efecto que tuvo en ella la intervención en el estilo de vida. De los 40 sujetos sólo 36 proporcionaron estos datos completos antes y después de la intervención. Hubo una disminución significativa en la cantidad de calorías totales a los 6 meses (Tabla 5).

Esto se da tanto por la reducción del consumo de carbohidratos, principalmente de azúcar libre, como por la disminución de la ingesta de grasas totales, destacando las grasas saturadas. A pesar de la disminución en la ingesta, proporcionalmente la distribución de los macronutrientes no cambió entre el inicio y el final de la intervención.

En relación a la ingesta de fibra dietética, de frutas y de verduras a los 6 meses, no hay diferencias con el registro basal.

Al analizar los micronutrientes, sólo hubo una diferencia significativa en la ingesta de sodio a los 6 meses ($p= 0,045$). El resto de vitaminas y minerales contabilizados no cambiaron después de la intervención en el estilo de vida.

| Tabla 5. Caracterización de la composición de la ingesta alimentaria | | | | | |
|--|-----------------|------------------|------------------------------|------------------|---------------|
| | Basal | | Post 6 meses de intervención | | *p-valor |
| | 36 (M:19; H:17) | | | | |
| Número de individuos | | | | | |
| Ingesta total (Kcal) | 1765 | (1653 - 1876) | 1581 | (1479 - 1683) | 0,0052 |
| Proteína (gr) | 75,54 | (70,9 - 80,2) | 72,8 | (67,9 - 77,5) | 0,3436 |
| (%) | 17 | (16 - 18) | 19 | (18 - 20) | 0,0698 |
| Carbohidratos (gr) | 199,3 | (180,8 - 217,8) | 176,2 | (161,1 - 191,2) | 0,0244 |
| (%) | 45 | (43 - 47) | 44 | (42 - 47) | 0,6646 |
| Azúcar libre (gr) | 34,9 | (26,9 - 43,0) | 22,7 | (17,5 - 27,9) | 0,0011 |
| (%) | 8 | (6 - 10) | 6 | (4 - 7) | 0,0166 |
| Fibra Vegetal (gr) | 16,7 | (15,1 - 18,4) | 17,4 | (13,9 - 20,9) | 0,6875 |
| Grasas (gr) | 70,2 | (63,0 - 77,3) | 61,6 | (56,2 - 67,1) | 0,0344 |
| (%) | 36 | (33 - 38) | 35 | (33 - 37) | 0,6254 |
| AG ^a saturados (gr) | 21,9 | (19,5 - 24,4) | 18,5 | (16,6 - 20,4) | 0,0089 |
| (%) | 11 | (10 - 12) | 10 | (10 - 11) | 0,1047 |
| AG monoinsaturados (gr) | 33,2 | (29,2 - 37,20) | 29,5 | (26,5 - 32,5) | 0,0931 |
| (%) | 17 | (15 - 18) | 17 | (16 - 18) | 0,9195 |
| AG poliinsaturados (gr) | 8,9 | (7,95 - 9,8) | 8,0 | (7,4 - 8,7) | 0,0705 |
| (%) | 5 | (4 - 5) | 5 | (4 - 5) | 0,8844 |
| Ingesta colesterol (gr) | 265 | (239,6 - 290,5) | 253 | (227 - 279) | 0,5082 |
| Ingesta de sodio (mg) | 1775 | (1627 - 1923) | 1633 | (1493 - 1771) | 0,0456 |
| Ingesta de calcio (mg) | 768,3 | (684,7 - 851,8) | 757,2 | (679,8 - 834,6) | 0,6936 |
| Ingesta hierro (mg) | 11,2 | (10,2 - 12,3) | 11,4 | (10,0 - 12,9) | 0,7371 |
| Ingesta zinc (mg) | 8,4 | (7,9 - 8,9) | 8,2 | 7,6 - 8,8) | 0,6730 |
| Ingesta vitamina B6 (gr) | 2,0 | (1,8 - 2,2) | 2,0 | (1,83 - 2,3) | 0,8603 |
| Ingesta vitamina B12 (µg) | 4,8 | (3,7 - 5,9) | 4,7 | (3,9 - 5,5) | 0,9159 |
| Ingesta vitamina A (µg equivalentes de retinol) | 857,2 | (608,8 - 1105,5) | 760,5 | (641,4 - 879, 7) | 0,4535 |
| Ingesta vitamina D (µg) | 2,2 | (1,8 - 2,6) | 2,4 | (1,9 - 2,9) | 0,3147 |
| Ingesta ácido fólico (µg equivalentes de folato dietético) | 237,1 | (210,4 - 263,7) | 234,4 | (208,8 - 259,9) | 0,8654 |
| Ingesta colina (gr) | 123 | (107,1 - 138,1) | 126 | (111,2 - 141,8) | 0,7123 |
| Ingesta de frutas (porciones) | 1,36 | (1,1 - 1,7) | 1,49 | (1,2 - 1,8) | 0,5338 |
| Ingesta de verduras (porciones) | 1,23 | (0,9 - 1,5) | 1,29 | (1,0 - 1,6) | 0,6375 |

^a AG: Ácidos Grasos; Los valores representan la media y el 95% del intervalo de confianza. *, Test t-Student pareado considerando valor p significativo < 0,05.

RESULTADOS

Seguidamente, analizamos la adherencia a la dieta mediterránea mediante el test Kidmed. Al final de la intervención disminuyó un 18% la categoría de muy baja calidad y aumentó en un 25% la categoría que representa una adherencia óptima a este patrón alimentario (Fig. 7), obteniendo un p valor significativo de 0,033.

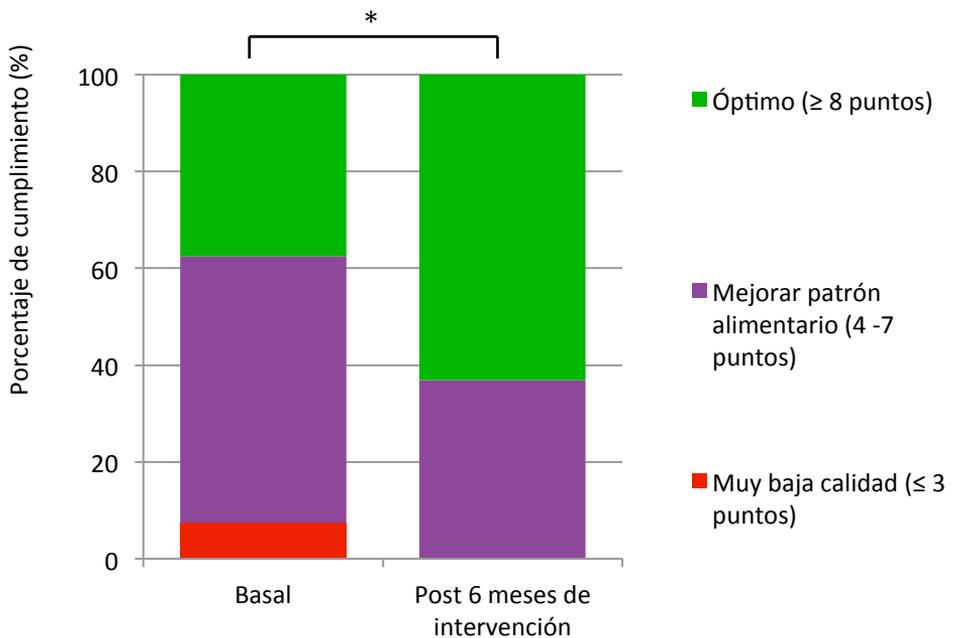


FIG. 7: Representación del porcentaje para cada categoría del Test Kidmed por grupo. *, Prueba Chi cuadrado de Pearson, p valor significativo > 0,05

Al desglosar estas encuestas y analizar las preguntas individualmente, observamos que los cambios significativos que obtuvimos fueron incrementar a más de una vez por día la ingesta de verduras ($p= 0,006$), incluir los frutos secos como parte de los alimentos frecuentes ($p= 0,016$) y disminuir a 0 la ingesta de golosinas o dulces cada día ($p= 0,009$). Además, observamos una tendencia a utilizar aceite de oliva diariamente ($p= 0,054$) y disminuir la bollería industrial en el desayuno ($p= 0,069$). Al analizar el test KidMed por el promedio de la puntuación total obtenida observamos que dicha puntuación aumentó significativamente después de la intervención ($p < 0,001$).

| | Basal | Post intervención | *p valor |
|---|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| Número de encuestas | 40 | 35 | - |
| 1. Toma una fruta o zumo de fruta todos los días (+1) | 80,0 | 94,3 | 0,694 |
| 2. Toma una segunda fruta todos los días (+1) | 47,5 | 62,9 | 0,1826 |
| 3. Toma verdura fresca o cocidas regularmente una vez al día (+1) | 72,5 | 85,7 | 0,1634 |
| 4. Toma verdura fresca o cocida más de una vez en el día (+1) | 12,5 | 40,0 | 0,0063 |
| 5. Toma pescado con regularidad (+1) | 77,5 | 85,7 | 0,3624 |
| 6. Acude una vez o más a la semana a un centro de fast-food (-1) | 5,0 | 8,6 | 0,5362 |
| 7. Le gustan las legumbres (+1) | 62,5 | 65,7 | 0,7723 |
| 8. Toma pasta o arroz casi a diario (5 o +) (+1) | 37,5 | 48,6 | 0,3335 |
| 9. Desayuna un cereal o derivado (+1) | 87,5 | 85,7 | 0,8205 |
| 10. Toma frutos secos con regularidad (min 2 por semana) (+1) | 7,5 | 28,6 | 0,0162 |
| 11. Utiliza aceite de oliva (+1) | 90,0 | 100,0 | 0,0545 |
| 12. No desayuna (-1) | 7,5 | 14,3 | 0,3422 |
| 13. Desayuna un lácteo (+1) | 87,5 | 85,7 | 0,8205 |
| 14. Desayuna bollería industrial (-1) | 20,0 | 5,7 | 0,0694 |
| 15. Toma 2 yogurt y/o 40 gr de queso cada día (+1) | 50,0 | 65,7 | 0,1698 |
| 16. Toma varias veces al día dulces/golosinas. (-1) | 17,5 | 0,0 | 0,0093 |
| Promedio de puntuación test Kidmed por grupo (máx 12) | 6,6 (5,9 – 7,2) ^a | 8,2 (7,5 – 8,9) ^a | 0,0002^b |

Los valores representan el porcentaje de cumplimiento del total de respuestas para cada pregunta del test. *, Prueba Chi cuadrado de Pearson. ^a Representación de la media y el 95% del intervalo de confianza; ^b Test t-Student pareado. Se consideró un valor p significativo < 0,05

1.3. Análisis de la actividad física y horas de pantalla

Obtuvimos los datos al inicio y final de la intervención mediante una encuesta que recogía las horas de actividad extraescolar programada que realizaban los individuos. De los 40 individuos, 36 rellenaron las encuestas y observamos un aumento de las horas destinadas a esto, sin embargo, no alcanzó la significancia ($p=0,068$, test Wilcoxon pareado). Aumentaron de una mediana de 2 horas con un intervalo de confianza de 0 a 3 horas, a una mediana de 2 horas con un intervalo de confianza de 1 a 4 horas.

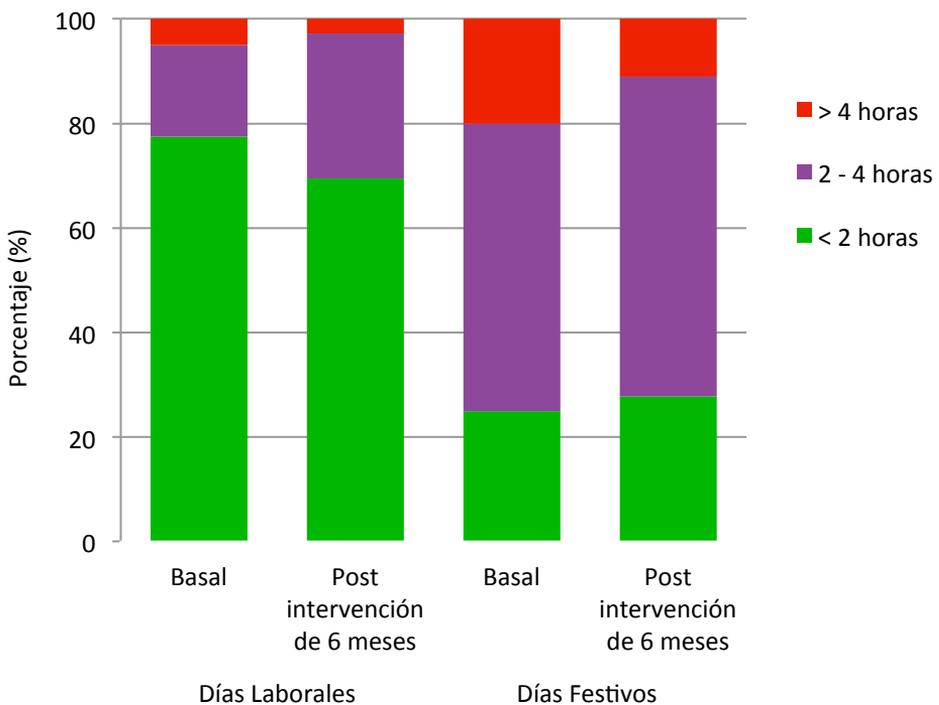


FIG. 8: Representación del porcentaje para cada categoría en relación a las horas de pantalla. Para la comparación se realizó la Prueba Chi cuadrado de Pearson, p valor significativo > 0,05

Al analizar las horas frente a la pantalla no obtuvimos disminución significativa. En la Fig. 8, podemos observar que en los días laborales posterior a la intervención las horas de pantalla de los individuos disminuyen levemente de un 5% a un 2,8% y los fines de semana de un 20% a un 11%. ($p= 0,522$ y $0,569$ respectivamente).

1.4. Análisis bioquímico

En la Tabla 7 se describe el análisis bioquímico. De los 40 individuos que analizamos hubo 2 que no quisieron realizarse la analítica a los 6 meses de la intervención, por lo tanto, sólo analizamos 38 muestras pareadas. Los individuos mostraron un ligero incremento significativo de la glicemia en ayunas, al igual que en perfil lipídico. Sin embargo, los valores de insulina en ayunas y del modelo homeostático para medir la insulino resistencia (HOMA-IR) no cambiaron y el porcentaje de HbA1c disminuyó significativamente comparado con el valor inicial.

Los perfiles tiroideo y hepático se mantuvieron estables a los 6 meses de intervención. En relación a la proteína c reactiva existió un leve incremento, sin ser significativo que fue relacionado con episodios de infección descritos por los participantes.

A pesar de estos cambios, todos los parámetros estaban dentro de los valores normales indicados como referencias para estas edades.

En relación a citoquinas asociadas con la obesidad, medimos la adiponectina encontrando una tendencia a incrementar a los 6 meses pero no alcanzó a ser significativo ($p= 0,11$).

| Tabla 7. Caracterización bioquímica | | | | | |
|--|-----------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------|-----------------|
| | Basal | | Post 6 meses de intervención | | *p valor |
| Número de individuos | 38 (M:19; H:19) | | | | |
| Glicemia (mg/dl) | 84,4 | (81,7 - 87,2) | 88,4 | (86,3 - 90,4) | 0,0072 |
| Insulina (mU/L) | 13,1 | (10,9 - 15,3) | 13,1 | (10,8 - 15,3) | 0,9908 |
| HOMA-IR | 2,75 | (2,3 - 3,2) | 2,87 | (2,4 - 3,4) | 0,5059 |
| HbA1c (%) | 5,4 | (5,3 - 5,4) | 5,2 | (5,2 - 5,3) | 0,0001 |
| Colesterol Total (mg/dl) | 162,9 | (154,3 - 171,7) | 174,7 | (164,8 - 187,6) | 0,0042 |
| Colesterol-LDL (mg/dl) | 103,7 | (95,5 - 111,9) | 110,8 | (102,5 - 119,2) | 0,0304 |
| Colesterol-HDL (mg/dl) | 43,6 | (40,1 - 47,0) | 44,4 | (41,4 - 47,4) | 0,5086 |
| Triglicéridos (mg/dl) ^a | 67,0 | (58,5 - 95,2) | 78,5 | (64,3 - 117,5) | 0,0086 |
| TSH (mU/L) ^a | 2,9 | (2,01 - 3,67) | 2,9 | (2,0 - 4,1) | 0,8197 |
| T4 libre (pmol/L) | 14,8 | (14,4 - 15,2) | 14,1 | (13,7 - 14,6) | 0,0039 |
| ALT (UI/L) | 20,9 | (18,8 - 23,1) | 21,1 | (18,9 - 23,4) | 0,8057 |
| AST (UI/L) | 21,9 | (20,5 - 23,3) | 22,1 | (20,3 - 23,9) | 0,8138 |
| Creatinina (mg/dl) | 0,6 | (0,5 - 0,6) | 0,6 | (0,6 - 0,6) | 0,4524 |
| PCR ultrasensible (mg/L) | 3,6 | (2,5 - 4,8) | 9,1 | (1,3 - 16,9) | 0,1617 |
| Adiponectina (µg/ml) | 7108,5 | (5804,8 - 8412,3) | 7519,8 | (5999,1 - 9040,6) | 0,1128 |

Los valores representan la media y el 95% del intervalo de confianza. *, Test T-Student pareado con un p significativo < 0,05. ^a Variable con distribución no normal, los valores representan la mediana y el rango de intercuartil (25% - 75%) y la comparación ha sido analizada con Test Wilcoxon pareado.

1.3. Análisis antropométrico y bioquímico de seguimiento

Después de terminado el estudio de intervención a los 6 meses, los individuos continuaron con su tratamiento y control en el Hospital Sant Joan de Déu, reforzando los cambios realizados. Se obtuvieron datos antropométricos y bioquímicos al año de terminado el estudio (Tabla 8).

De los 40 sujetos, 24 continuaron con el periodo de seguimiento de los cuales sólo 20, además de la evaluación antropométrica, realizaron la analítica indicada. Observamos que el valor del IMC D.E. se mantuvo estable. En relación al perfil lipídico, los valores del colesterol total, colesterol-LDL y triglicéridos disminuyeron. La glicemia y la insulina en ayunas continuaron el aumento, pero el valor de HbA1c se mantuvo.

| Tabla 8. Caracterización de los individuos a largo plazo | | | | | | | |
|---|---------------------|-----------------|-------------------------------------|-----------------|----------------------|-----------------|------------------|
| | Basal | | Post 6 meses de intervención | | Post 18 meses | | *p valor |
| Número de individuos | n=24 | | | | | | |
| IMC (kg/m ²) | 26,9 ^a | (25,8 - 27,9) | 25,3 ^b | (24,2 - 26,4) | 26,9 ^a | (25,7 - 28,3) | 0,002 |
| IMC (D.E) | 3,4 | (3,1 - 3,6) | 2,8 | (2,6 - 2,9) | 2,8 | (2,6 - 3,0) | <0,001 |
| TA sistólica (mmHg) | 112 | (109 - 116) | 110 | (105- 114) | 109 | (105 - 113) | 0,2471 |
| TA Diastólica (mmHg) | 69 | (67 - 72) | 69 | (67 - 71) | 70 | (67 - 72) | 0,7519 |
| Número de individuos | n=20 | | | | | | |
| Glicemia (mg/dl) | 84,3 ^a | (80,7- 87,8) | 87,6 ^{ab} | (84,45 - 90,6) | 91,3 ^{bc} | (88,2 - 94,4) | 0,0026 |
| Insulina (mU/L) | 12,6 ^a | (9,7 - 15,6) | 11,9 ^a | (9,4 - 14,6) | 17,5 ^b | (12,5 - 22,6) | 0,0142 |
| HOMA-IR | 2,7 ^a | (2,0 - 3,3) | 2,6 ^a | (2,4 - 3,34) | 4,0 ^b | (2,8 - 5,2) | 0,0074 |
| HbA1c (%) | 5,4 ^a | (5,3 - 5,4) | 5,25 ^b | (5,2 - 5,4) | 5,2 ^b | (5,2 - 5,3) | <0,001 |
| Colesterol Total (mg/dl) | 164,4 | (154,7 - 174,1) | 175,7 | (160,7 - 189,5) | 163,5 | (151,9 - 174,9) | 0,0695 |
| Colesterol-LDL (mg/dl) | 105,6 ^{ab} | (95,9 - 115,4) | 114,6 ^a | (102,3 - 126,9) | 101,4 ^b | (91,7 - 110,9) | 0,0461 |
| Colesterol-HDL (mg/dl) | 44,4 | (39,5 - 49,3) | 43,9 | (39,9 - 47,8) | 46,5 | (41,3 - 51,6) | <0,001 |
| Triglicéridos (mg/dl) ⁺ | 65,5 | (56,3 - 92,8) | 70 | (57,5 - 88,5) | 58,5 | (47,8 - 78,8) | 0,1102 |
| TSH (mU/L) ⁺ | 2,3 | (1,9 - 3,7) | 2,9 | (2,2 - 3,9) | 3,6 | (1,4 - 5,8) | 0,6085 |
| T4libre (pmol/L) | 14,8 ^a | (14,2 - 15,4) | 14,2 ^b | (13,6 - 14,8) | 12,8 ^c | (11,9 - 13,6) | <0,001 |
| ALT (UI/L) | 19,9 | (17,9 - 21,9) | 20,8 | (17,7 - 22,45) | 21,2 | (17,1 - 25,2) | 0,6026 |
| AST (UI/L) | 21,3 | (19,6 - 23,1) | 21,2 | (19,2 - 23,1) | 20,9 | (18,8 - 22,9) | 0,9409 |
| Creatinina (mg/dl) | 0,58 | (0,55 - 0,60) | 0,59 | (0,56 - 0,61) | 0,59 | (0,57 - 0,62) | 0,4119 |

Los valores representan la media y el 95% del intervalo de confianza. + Variable con distribución no normal, los valores representan la mediana y el rango de intercuartil (25% - 75%). *, Test ANOVA para muestras repetidas, valor p significativo < 0,05. Las letras diferentes representan la diferencia entre los grupos.

2. Análisis de los efectos en el metaboloma del plasma inducidos por una intervención en el estilo de vida.

Para el análisis del plasma, de las 38 muestras hubo 3 individuos que presentaron la proteína C reactiva ultra sensible alterada ($PCR > 50 \mu\text{g/ml}$). Por lo tanto, consideramos 35 muestras pareadas para el análisis metabolómico del plasma.

Las muestras de plasma se analizaron mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, tal y como se ha descrito en la metodología.

Mediante esta técnica de metabolómica no dirigida, se identificaron un total de 2581 picos en el espectro. Para analizar estos picos, aplicamos el análisis no supervisado de componentes principales, pudiendo así consolidarlos en 8 factores los cuales explicaban el 58% del total de la varianza. En la Fig. 9 podemos observar el “score plot” de los 2 primeros componentes que acumulan el 26,1% de la varianza.

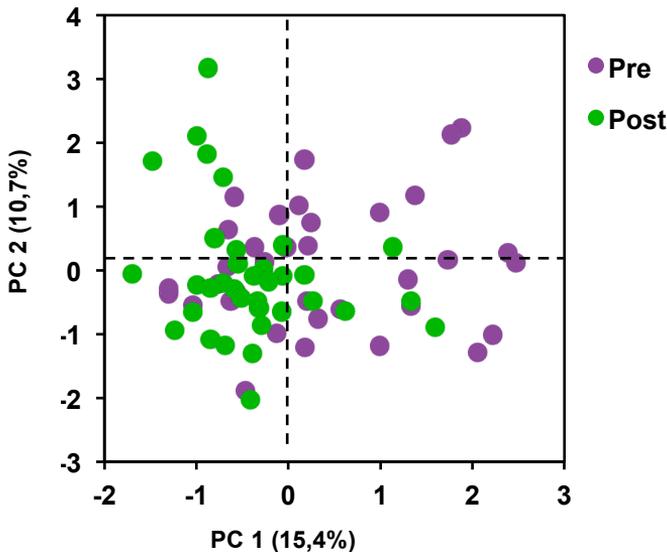


FIG. 9: “Score plot” de los componentes principales 1 y 2. Los círculos morados y verdes representan los valores al inicio y a los 6 meses de la intervención, respectivamente.

Al obtener los 8 componentes principales, realizamos una comparación pareada entre cada uno de los valores iniciales y los valores a los 6 meses, observando que el componente principal 1 (PC1) cambiaba significativamente, incluso después de ajustar por comparaciones múltiples ($p=0,008$; Fig. 10).

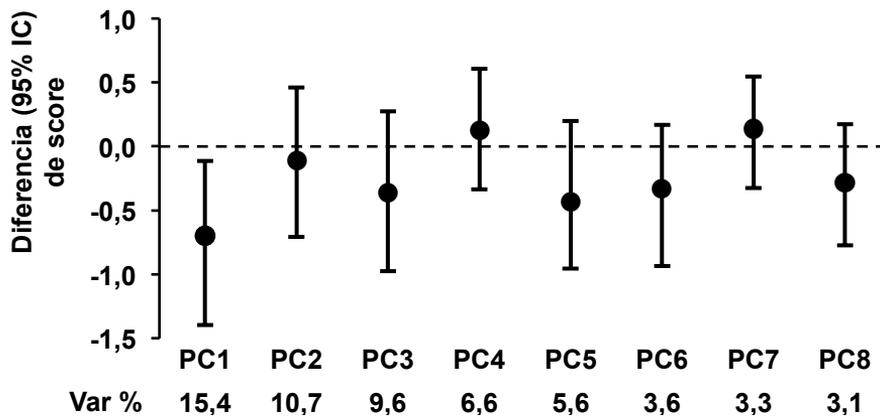


FIG. 10: Diferencias entre los valores basales y después de 6 meses de intervención, de los 8 componentes. Se representa el 95% ICs corregido por Bonferroni para comparaciones múltiples. Se utilizó Test Wilcoxon pareado para la significación.

El PC1 estaba mayoritariamente caracterizado y compuesto por una combinación de metabolitos como esfingomielinas, ceramidas y especies de glicoesfingolípidos y en menor medida de moléculas como fostatilcolinas, fosfatidiletanolaminas, diacilgliceroles y triglicéridos. Mediante el “*pathway enrichment analysis*” se comprobó la relación entre el PC1 y el metabolismo de esfingolípidos. En la Tabla 9 podemos observar que existe una amplia diferencia entre el valor q de la primera vía metabólica identificada (metabolismo de esfingolípidos) y las siguientes. A partir de esto, se validaron un alto número de metabolitos mediante espectrometría de masas, identificando diferentes especies de esfingomielinas, ceramidas, monoglicosilceremidas (glucosil o galactosilceremida),

RESULTADOS

diglicosilceremida (galabiosil o lactosilceramida) y sulfatidas (3-O sulfogalactosilceramida). Todos disminuyeron sus niveles con la intervención (Fig. 11).

| Tabla 9. "Pathway Enrichment Analysis" | | |
|--|----------|-----------------|
| | p-valor | FDR q-valor |
| Metabolismo de Esfingolípidos | 5,34E-13 | 2,19E-11 |
| Vía de señalización de Neurotropina | 1,21E-04 | 2,47E-03 |
| Leishmaniasis | 1,81E-04 | 2,47E-03 |
| Vía de señalización de Adipoquinas | 2,52E-04 | 2,58E-03 |
| Metabolismo de Glicerofosfolípidos | 5,17E-04 | 4,24E-03 |

Los metabolitos que contribuyen mayoritariamente en este PC1, fueron utilizados para realizar este análisis a través de la base de datos KEGG. Se muestran las 5 primeras vías, ordenadas por su FDR q valor.

Asociación con parámetros fisiológicos y nutricionales

Luego de haber analizado el metaboloma del plasma, nos propusimos relacionar estos metabolitos pertenecientes al metabolismo de esfingolípidos con parámetros fisiológicos y con los cambios encontrados una vez finalizado el programa de intervención.

La disminución de los niveles de ceramidas, esfingomielinas y sulfatidas inducidos por la intervención no se asoció con el cambio en el IMC D.E. o HOMA-IR (Tabla 10). En cambio, sí se encontró una asociación positiva con la mejora en HbA1c, a mayor disminución de las ceramidas lípidos mayor disminución en el porcentaje de la HbA1c. Esta asociación se mantuvo incluso al ajustar por edad, género y media basal del IMC D.E. No hubo ninguna otra asociación significativa con parámetros fisiológicos.

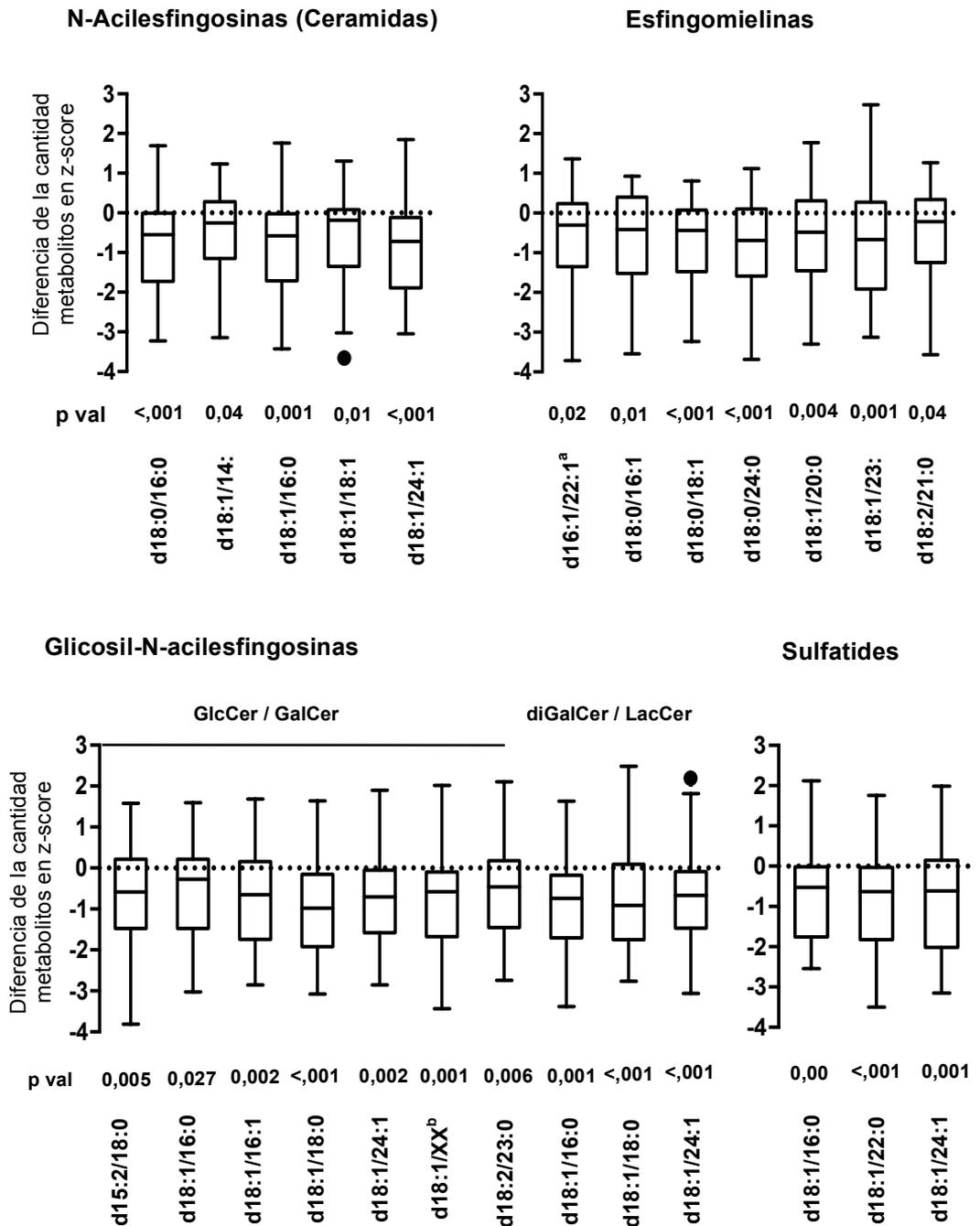


FIG. 11: Representación de la diferencia entre sus valores basales y a los 6 meses de los metabolitos validados que se encuentran mayoritariamente en el PC1 expresados en z-score (percentil 75 – percentil 25).^a Estructuras alternativas: d18:1/20:1 ó d18:2/20:0;^b no han sido resueltas mediante espectrometría de masa. Se utilizó prueba de Wilcoxon pareado para determinar la significación, considerando p < 0,05.

| Tabla 10. Correlación entre los cambios en los niveles de metabolitos esfingolípídicos con parámetros antropométricos y fisiológicos inducidos por la intervención. | | | | | | |
|--|----------|-------|---------|-------|-------------|--------------|
| Metabolitos | IMC-D.E. | | HOMA-IR | | HbA1c | |
| | r | p val | r | p val | r | p val |
| N-Acilesfingosinas (Ceramidas) | | | | | | |
| d18:0/16:0 | -0,09 | 0,617 | 0,15 | 0,418 | 0,24 | 0,200 |
| d18:1/14:0 | -0,17 | 0,359 | 0,21 | 0,242 | 0,12 | 0,503 |
| d18:1/16:0 | -0,09 | 0,635 | 0,16 | 0,377 | 0,27 | 0,139 |
| d18:1/18:1 | -0,09 | 0,621 | 0,20 | 0,283 | 0,03 | 0,856 |
| d18:1/24:1 | -0,01 | 0,962 | 0,06 | 0,745 | 0,41 | 0,022 |
| Esfingomielinas | | | | | | |
| d16:1/22:1 ^a | -0,08 | 0,673 | 0,17 | 0,362 | 0,03 | 0,887 |
| d18:0/16:1 | -0,08 | 0,671 | 0,14 | 0,453 | 0,16 | 0,390 |
| d18:0/18:1 | 0,05 | 0,804 | 0,22 | 0,226 | 0,19 | 0,309 |
| d18:0/24:0 | -0,19 | 0,300 | 0,08 | 0,677 | 0,07 | 0,717 |
| d18:1/20:0 | -0,04 | 0,809 | 0,12 | 0,690 | 0,25 | 0,174 |
| d18:1/23:0 | -0,04 | 0,808 | 0,05 | 0,773 | 0,40 | 0,027 |
| d18:2/21:0 | -0,10 | 0,586 | 0,16 | 0,370 | 0,08 | 0,667 |
| GlcCer / GalCer | | | | | | |
| d15:2/18:0 | -0,02 | 0,901 | 0,15 | 0,423 | 0,25 | 0,168 |
| d18:1/16:0 | 0,01 | 0,944 | 0,13 | 0,493 | 0,29 | 0,113 |
| d18:1/18:0 | 0,08 | 0,662 | 0,17 | 0,344 | 0,36 | 0,046 |
| d18:1/24:1 | 0,01 | 0,936 | 0,11 | 0,551 | 0,43 | 0,016 |
| d18:1/16:1 | -0,06 | 0,744 | 0,07 | 0,713 | 0,20 | 0,277 |
| d18:1/XX ^b | -0,13 | 0,462 | -0,03 | 0,883 | 0,42 | 0,020 |
| d18:2/23:0 | 0,02 | 0,921 | 0,14 | 0,447 | 0,23 | 0,207 |
| diGalCer / LacCer | | | | | | |
| d18:1/16:0 | 0,04 | 0,810 | 0,17 | 0,355 | 0,29 | 0,114 |
| d18:1/18:0 | 0,05 | 0,794 | 0,11 | 0,539 | 0,38 | 0,036 |
| d18:1/24:1 | 0,01 | 0,952 | 0,01 | 0,970 | 0,54 | 0,002 |
| Sulfatidas | | | | | | |
| d18:1/16:0 | -0,11 | 0,545 | 0,09 | 0,608 | 0,29 | 0,115 |
| d18:1/22:0 | 0,01 | 0,946 | 0,16 | 0,395 | 0,26 | 0,153 |
| d18:1/24:1 | -0,01 | 0,973 | 0,10 | 0,577 | 0,41 | 0,024 |

Correlación de Spearman entre el cambio de los metabolitos incluidos, con el cambio a los 6 meses de intervención de: IMC-D.E., HOMA-IR, y HbA1c; ajustado por edad, género y la media basal del IMC-D.E.. GlcCer, glucosilceramida; GalCer, galactosilceramida; diGalCer, galabiosilceramida; LacCer, lactosilceramida. ^aEstructuras alternativas d18:1/20:1 o d18:2/20:0, no resueltas por espectrometría de masas. ^bCadena Acil no resuelta por espectrometría de masas. P valor significativo p < 0,05.

En relación a la valoración nutricional no encontramos ninguna correlación del cambio del PC1 con el cambio de las variables analizadas de la nutrición (Tabla 11). Sí observamos una tendencia ($p= 0,069$) con la disminución de la ingesta de grasas a los 6 meses.

| Cambios de variables nutricionales | r | p val |
|------------------------------------|-------|-------|
| Calorías | 0,21 | 0,267 |
| Ingesta de proteínas | -0,05 | 0,794 |
| Ingesta de carbohidratos | 0,10 | 0,608 |
| Ingesta de azúcar refinados | 0,25 | 0,182 |
| Ingesta de fibra | 0,13 | 0,512 |
| Ingesta de grasas | 0,34 | 0,069 |

Correlación de Spearman entre el cambio del PC1 y el cambio a los 6 meses de intervención de las variables nutricionales; ajustado por edad, género y la media basal del IMC D.E. P valor significativo $p < 0,05$

2. Análisis de los efectos en el metaboloma de la orina inducidos por una intervención en el estilo de vida.

Para el análisis de orina de los 40 individuos excluimos los 3 individuos con la PCR ultrasensible alterada y 3 que no entregaron la muestra de orina a los 6 meses de la intervención, quedándonos con 34 muestras pareadas para analizar.

Para obtener el perfil metabolómico de las muestras de orina, se analizaron a través de RMN, como está descrito en la metodología. Se identificaron 32 metabolitos. En la Fig 12 se muestra la identificación de metabolitos en una muestra de orina mediante RMN.

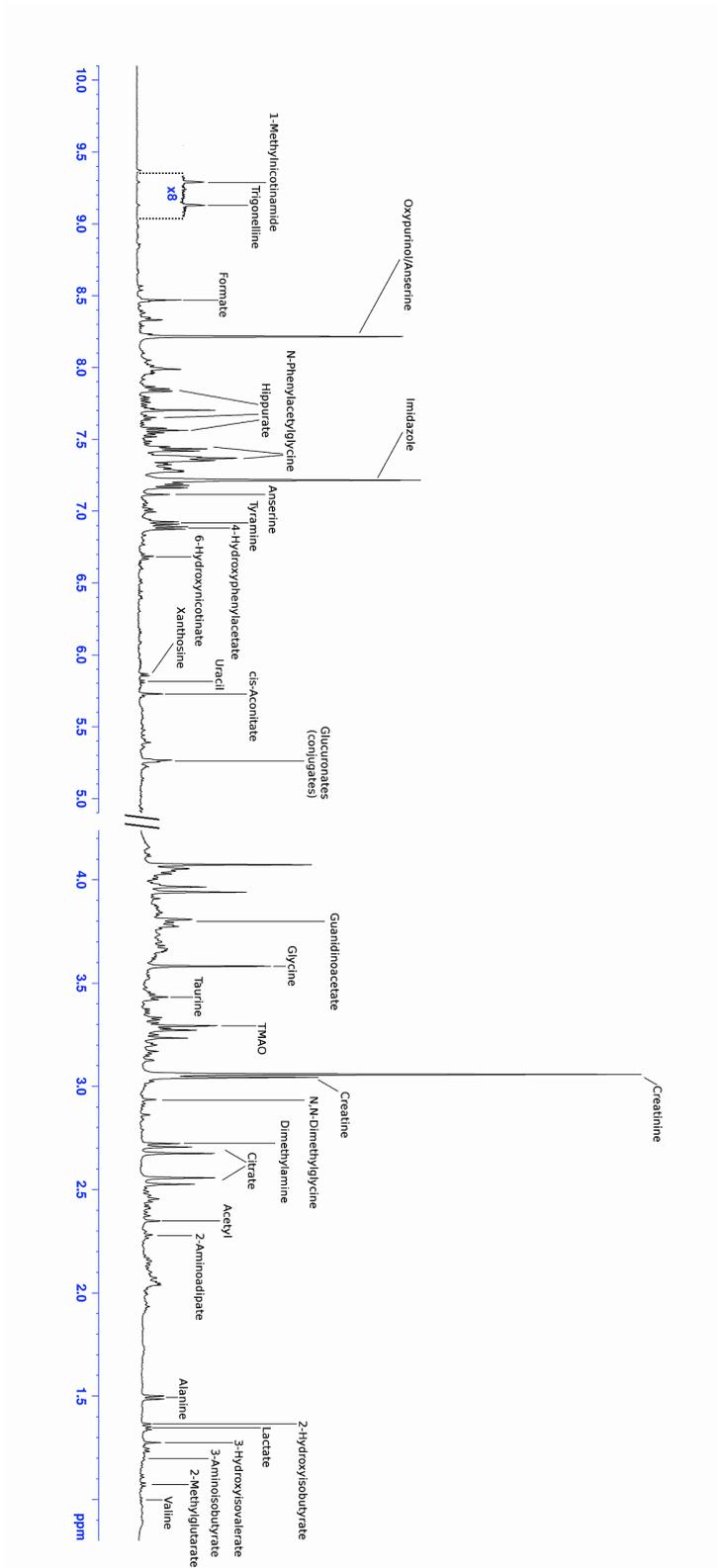


FIG. 12: Caracterización de una muestra de orina por RMN.

Al obtener esta lista se analizó el cambio que tuvieron estos metabolitos posterior a la intervención, obteniendo un primer acercamiento a las modificaciones significativas. Pudimos observar que de los metabolitos identificados la trimetilamina N-oxidada (TMAO), la dimetilglicina, la xantosina, el 3 hidroxisovalerato cambiaban significativamente a los 6 meses (Tabla 12). Sin embargo, ninguno de los metabolitos resultó ser significativamente diferente al aplicar la corrección de Bonferroni para ajustar por comparaciones múltiples. Por ello, aplicamos el *Significance Analysis of Microarray/Metabolites (SAM)*, un algoritmo especialmente diseñado para la identificación de biomarcadores, que calcula el *False Discovery Rate* (valor q) para ajustar por comparaciones múltiples.

Se comprobó esta diferencia mediante SAM para muestras pareadas (Tabla 13), y obtuvimos que el TMAO fue el único metabolito con un q valor $< 0,05$ (Fig. 13). La dimetilglicina, el 3-hidroxisovalerato, no cumplieron el criterio de corte según el valor FDR del cambio y la xantosina no apareció en esta lista como potencial biomarcador.

RESULTADOS

Tabla 12. Comparación de metabolitos identificados en orina.

| | Basal | | Post 6 meses de intervención | | p valor* |
|--------------------------|-------|---------------|------------------------------|---------------|---------------|
| Creatina | 7,40 | (7,05-7,73) | 7,27 | (6,89 - 7,62) | 0,4972 |
| Hippurato | 6,41 | (5,93 - 6,89) | 6,35 | (5,93 - 6,76) | 0,7949 |
| Trigonellina | 3,19 | (2,90 - 3,47) | 3,08 | (2,81 - 3,34) | 0,5591 |
| Formato | 3,08 | (2,89 - 3,26) | 3,04 | (2,84 - 3,22) | 0,7679 |
| TMAO | 8,47 | (7,95 - 8,98) | 7,82 | (7,44 - 8,18) | 0,0364 |
| Taurina | 6,43 | (6,19 - 6,67) | 6,31 | (6,06 - 6,55) | 0,2373 |
| Dimetilglicina | 4,25 | (3,98 - 4,51) | 3,90 | (3,55 - 4,24) | 0,0357 |
| Lactato + Treonina | 4,38 | (4,17 - 4,58) | 4,28 | (4,05 - 4,49) | 0,4145 |
| Alanina | 5,19 | (5,00 - 5,37) | 5,08 | (4,86 - 5,28) | 0,2856 |
| 2-Hidroxi-isobutirato | 3,84 | (3,69 - 3,97) | 3,92 | (3,78 - 4,05) | 0,1492 |
| Citrato | 7,35 | (7,11 - 7,58) | 7,41 | (7,20 - 7,61) | 0,5638 |
| 2-Aminoadipato | 5,81 | (5,57 - 6,04) | 5,86 | (5,61 - 6,11) | 0,6039 |
| Dimetilamina | 6,60 | (6,39 - 6,80) | 6,39 | (6,20 - 6,56) | 0,0662 |
| Glicine 2H | 6,48 | (6,23 - 6,73) | 6,44 | (6,15 - 6,71) | 0,6151 |
| 1-Metilnicotinamida | 1,17 | (0,94 - 1,38) | 1,07 | (0,84 - 1,30) | 0,4721 |
| Xantosina | 1,69 | (1,59 - 1,77) | 1,80 | (1,71 - 1,88) | 0,0086 |
| Oxipurinol | 5,41 | (5,18 - 5,63) | 5,26 | (4,97 - 5,53) | 0,3162 |
| Ansarino | 3,87 | (3,76 - 3,98) | 3,84 | (3,73 - 3,94) | 0,6126 |
| N-Fenilacetilglicina | 7,21 | (6,96 - 7,45) | 7,32 | (7,07 - 7,57) | 0,3141 |
| Imidazole | 7,46 | (7,25 - 7,66) | 7,57 | (7,36 - 7,77) | 0,3357 |
| Tiramina | 3,68 | (3,50 - 3,85) | 3,62 | (3,46 - 3,77) | 0,3335 |
| 4-Hidroxifenilacetato | 2,85 | (2,63 - 3,07) | 2,87 | (2,61 - 3,12) | 0,8449 |
| 6-Hidroxinicotinato | 2,93 | (2,77 - 3,08) | 2,87 | (2,70 - 3,02) | 0,5582 |
| Uracil | 0,51 | (0,26 - 0,75) | 0,72 | (0,50 - 0,93) | 0,1301 |
| cis-Aconitato | 3,14 | (3,03 - 3,23) | 3,23 | (3,12 - 3,32) | 0,1161 |
| Glucoronatos (conjugado) | 3,63 | (3,50 - 3,75) | 3,61 | (3,50 - 3,71) | 0,7943 |
| Guanidoacetato | 7,91 | (7,65 - 8,16) | 7,88 | (7,63 - 8,11) | 0,8305 |
| 2-Metilglutarato | 4,06 | (3,79 - 4,31) | 4,03 | (3,66 - 4,39) | 0,9225 |
| 3-Aminoisobutirato | 4,56 | (4,19 - 4,92) | 4,53 | (4,15 - 4,89) | 0,8586 |
| Acetil | 5,19 | (4,87 - 5,51) | 5,28 | (4,86 - 5,69) | 0,6314 |
| 3-Hidroxi-isovalerato | 4,23 | (4,03 - 4,43) | 4,03 | (3,85 - 4,21) | 0,0126 |
| Valina | 2,92 | (2,79 - 3,04) | 2,81 | (2,68 - 2,92) | 0,1553 |

Los valores representan la media y el 95% del intervalo de confianza. Las concentraciones de cada metabolito fueron corregidas por la concentración de creatinina, amplificado por 1000 y transformado a logaritmo en base 2. *, Test T-Student pareado con un valor p significativo < 0,05.

| Tabla 13. Análisis de significancia para microarrays/metabolitos (SAM) | | | | |
|---|----------------|------------|----------|----------------|
| Metabolitos | d valor | D.E | p | q valor |
| TMAO | -1.09 | 0.30 | 0.004 | 0.026 |
| Dimetilglicina | -0.76 | 0.16 | 0.027 | 0.094 |
| 3-Hidroxi-isovalerato | -0.53 | 0.08 | 0.091 | 0.160 |
| Dimetilamina | -0.51 | 0.11 | 0.101 | 0.160 |
| Oxipurinol | -0.35 | 0.15 | 0.233 | 0.160 |
| Taurina | -0.31 | 0.10 | 0.279 | 0.160 |
| Valina | -0.30 | 0.08 | 0.291 | 0.160 |
| 1-Metilnicotinamida | -0.28 | 0.13 | 0.331 | 0.160 |
| Alanina | -0.27 | 0.10 | 0.332 | 0.160 |
| Creatina | -0.26 | 0.19 | 0.349 | 0.160 |
| Lactato/Treonina | -0.24 | 0.12 | 0.391 | 0.160 |
| Trigonellina | -0.23 | 0.18 | 0.414 | 0.160 |
| Tiramina | -0.15 | 0.06 | 0.595 | 0.188 |
| 6-Hidroxinicotinato | -0.15 | 0.10 | 0.600 | 0.188 |
| Glicina | -0.12 | 0.09 | 0.667 | 0.188 |

SAM para muestras pareadas. Los metabolitos descritos en la tabla son los que obtuvieron un FDR $q < 0,2$. Valor q significativo $< 0,05$.

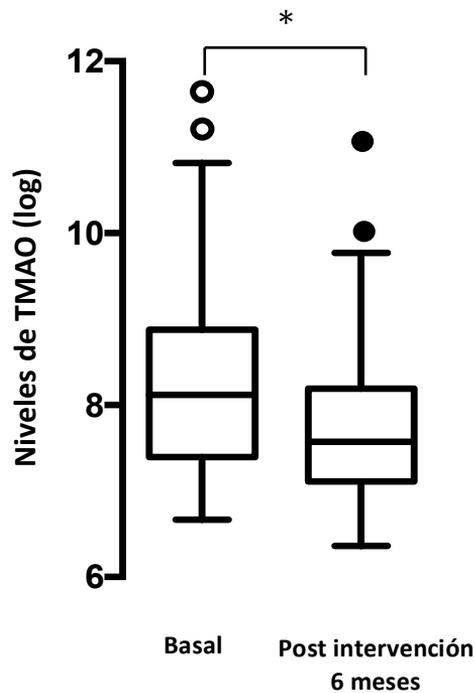


FIG. 13: Diagrama de caja representando los niveles de TMAO medidos en orina mediante RMN de las muestras pre y post intervención de 6 meses (n=34). En el eje Y se muestran los valores de TMAO transformados a logaritmo. Los extremos de los diagramas representan el percentil 75 y 25, respectivamente. Los bigotes representan la dispersión completa de los datos, excluyendo los puntos extremos (altos o bajos que la mediana $\pm 1,5$ veces la distancia del intercuartil), indicados con puntos en blanco (basal) y en negro (post 6 meses). *: FDR q-val <0,05.

Correlación entre el cambio de TMAO con el cambio en los parámetros nutricionales.

Según lo demostrado en la bibliografía, el contenido de TMAO principalmente está relacionado con la colina dietaria y las moléculas generadas a partir de ésta por la microbiota intestinal (99). Es por ello que intentamos relacionar el cambio en esta molécula con parámetros alimentarios.

Después de analizar nuestros datos no hubo correlación entre el cambio de TMAO con el cambio del IMC D.E., ni tampoco con otros parámetros fisiológicos. Al realizar el análisis de la alimentación de los individuos mediante los registros de alimentación, no detectamos diferencia en la ingesta de colina a los 6 meses y tampoco una correlación de la disminución del TMAO con el cambio en la ingesta de esta sustancia. Sin embargo, al hacer el análisis de cada uno de los nutrientes encontramos una asociación inversa con la ingesta de fibra. A pesar que no hubo un aumento significativo de la ingesta de fibra a los 6 meses (Tabla 7), el cambio sí se correlacionó con la disminución del contenido de TMAO, incluso al ser ajustado por edad y género (Tabla 14).

| Tabla 14. Correlación del cambio de TMAO con el cambio de variables antropométricas y nutricionales | | | | | |
|---|----|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Cambio de las variables a los 6 meses | n | No Ajustado | | Ajustado | |
| | | r | p val | r | p val |
| IMC D.E. | 34 | 0.09 | 0.589 | 0.14 | 0.452 |
| Ingesta calórica | 30 | -0.18 | 0.369 | -0.05 | 0.794 |
| Ingesta de proteínas | 30 | -0.33 | 0.077 | -0.04 | 0.853 |
| Ingesta de carbohidratos | 30 | 0.09 | 0.664 | 0.19 | 0.342 |
| Ingesta de grasas | 30 | -0.17 | 0.379 | -0.07 | 0.721 |
| Ingesta de fibra | 30 | -0.41 | 0.028 | -0.38 | 0.047 |
| Ingesta de colina | 30 | -0.08 | 0.678 | -0.01 | 0.634 |

Correlación de Spearman entre el cambio del TMAO y el cambio a los 6 meses de intervención de las variables antropométricas y nutricionales; ajustado por edad y género. P valor significativo $p < 0,05$

DISCUSIÓN

1. Efectos en hábitos alimentarios y en la composición nutricional inducidos por una intervención en el estilo de vida

La promoción de estilos de vida saludables y la prevención de obesidad en edades tempranas suscita un estado de salud adecuado aumentando la probabilidad de reducir el riesgo de padecer enfermedades en el futuro. Nos hemos propuesto identificar cambios nutricionales, fisiológicos y metabólicos asociados a una intervención en el estilo de vida en niños prepúberales con obesidad, para conseguir mejorar el tratamiento actual.

Uno de los criterios de inclusión fue que los individuos estuvieran en prepubertad, dado los grandes cambios fisiológicos en el metabolismo que sufre el organismo durante la etapa puberal. Por un lado se produce una alteración en el metabolismo de la glucosa, aumentando la insulino resistencia debido a la disminución de la sensibilidad de los principales órganos a esta hormona; por otro lado, se produce una alteración en el metabolismo de las grasas, en que se ve alterada su homeostasis (100,101). Durante la pubertad, los individuos prepúberes se transforman en adultos capaces de reproducirse y ocurren cambios biológicos como la secreción de factores neurológicos y hormonas los cuales modulan el crecimiento somático, la maduración ósea, el desarrollo de glándulas sexuales, la secreción endocrina, exocrina y a su vez se produce un aumento de peso y cambios en la composición corporal. Al describir la obesidad como un exceso en la acumulación de grasa corporal, con un aumento secundario de estrógenos, leptina y una inflamación leve, es posible que esta condición afecte el desarrollo y crecimiento de los niños, acelerando la iniciación de la pubertad, alterando los parámetros hormonales y provocando un desajuste desarrollando enfermedades relacionadas con la obesidad antes de tiempo (102). Por lo tanto la pubertad sería un gran factor de confusión a la hora de interpretar los resultados. Además, se ha descrito que individuos obesos metabólicamente sanos, eran

DISCUSIÓN

mayoritariamente prepuberales comparados con individuos obesos metabólicamente no sanos. De hecho, al iniciar la pubertad el riesgo de volverse un individuo metabólicamente no sano aumentaba al doble (101). Es por esta razón que un individuo prepuberal puede ser más eficaz al momento de incorporar cambios debido a que son metabólicamente más estables y pueden responder mejor al tratamiento reduciendo riesgo futuro de enfermedad.

La intervención en el estilo de vida fue diseñada y estructurada de manera sencilla, respaldada por las recomendaciones mundiales y basada fundamentalmente en la educación de los niños y sus familias para introducir pequeños cambios, tanto en la alimentación como en la actividad física. Los cambios se refirieron principalmente a cumplir una dieta variada que cubriera las calorías suficientes para cada niño, restringiendo la ingesta de azúcares añadidos y de grasas saturadas y aumentando el consumo de fibra, ya sea por ingesta de alimentos con alto contenido de esta sustancia, como también aumentando las raciones diarias de frutas y verduras.

1.1 Análisis nutricional

1.1.1 Ingesta calórica

Para este grupo de edad la recomendación de calorías estaría determinada alrededor de 1600 a 1800 calorías (75,103), dependiendo del grado de actividad física que tenga el niño. Al analizar la ingesta calórica de los individuos de nuestro estudio a los 6 meses de tratamiento, ésta disminuyó significativamente de 1760 calorías a 1580 calorías ($p= 0,005$), cumpliendo con las recomendaciones. Esto fue dado principalmente por la reducción de la ingesta de carbohidratos, específicamente azúcares refinado y de grasas totales. Es complicado calcular la ingesta calórica ideal para individuos con obesidades tan altas, debido al peso elevado y al crecimiento acelerado. Es por esto que, en la práctica clínica, primero

se recomienda corregir errores en el estilo de vida como los hábitos no saludables, mejorar la calidad de los alimentos y aumentar el ejercicio. Si esto no da resultado se procede a disminuir en un 30% el aporte calórico habitual (104). El aporte calórico debe ser calculado en función de la edad cronológica, no del peso, sin interferir en el crecimiento de talla.

1.1.2 Aporte de macronutrientes

Carbohidratos: Al centrarnos en las recomendaciones referente al porcentaje que debe cubrir cada macronutriente en el aporte total de calorías (73,78), para los carbohidratos el valor de referencia que está definido es del 45 al 55% de las calorías totales, máximo 60% en algunos casos especiales. Según nuestros datos los individuos cubrieron el mínimo recomendado, un 45% tanto al inicio como al final de la intervención. Sabemos que un exceso de carbohidratos puede contribuir al incremento del peso, pero un consumo mínimo de este macro nutriente es fundamental para proporcionar energía, sobretodo en estas edades en el que el desarrollo juega un papel importante.

Azúcar libre: Con nuestra intervención hemos logrado disminuir en un 2% la ingesta de azúcar libres. Las recomendaciones referentes a este nutriente, se han ido modificando en los últimos años como consecuencia de la alta evidencia que existe en relación a la obesidad y comorbilidades (105). Se sabe lo perjudicial que es para el organismo la ingesta de azúcares por sobre el 10% de las calorías totales, debido a que se relaciona con la ganancia de peso no saludable y también porque se promueve un tipo de dieta alta en energía resultando un balance positivo de las calorías consumidas (106). Actualmente, la OMS, la FAO y Guías alimentarias para americanos 2015 – 2020, recomiendan un consumo menor al 10% de las calorías totales, y la Asociación Americana del Corazón propone disminuir el consumo a menos del 5% de las calorías diarias en caso de riesgo cardiovascular. Por tanto, en nuestros individuos la recomendación que

deberíamos considerar sería esta última a pesar de que con la intervención hayamos logrado disminuir el porcentaje de ingesta de un 8% a un 6%. La reducción de esta variable también se vio reflejada en el test KidMed, principalmente en la disminución de las preguntas sobre la ingesta de golosinas diarias y en menor medida por el consumo de bollerías.

Proteínas: Si bien la cantidad en gramos de este macronutriente no cambia, debido a la reducción de la ingesta calórica dada por la reducción de la ingesta de carbohidratos y de grasas, el porcentaje promedio calculado está por sobre la recomendación (entre un 10% y un 15% del aporte total de calorías) cubriendo un 17% al inicio del tratamiento y un 19% al término a pesar de las indicaciones dietarias entregadas para su disminución. El problema de esto es que se ha asociado la alta ingesta proteica con mayor ganancia de peso y por lo tanto un fracaso en el tratamiento (107–109).

Grasas: La ingesta de grasas en nuestro grupo de intervención disminuyó significativamente la cantidad ingerida en gramos, siendo uno de los responsables de la disminución calórica a los 6 meses, pero proporcionalmente la reducción no fue significativa. A pesar de esto, a los 6 meses hemos podido cumplir con la recomendación máxima (35%) referente al porcentaje de la molécula calórica que al inicio del tratamiento estaba sobrepasada.

A pesar de la tendencia de que los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados hayan disminuido su valor en gramos ($p= 0,09$ y $p= 0,07$ respectivamente), se cumple muy bien con los porcentajes recomendados (mayor al 10%) (106). El consumo de ácidos grasos insaturados diariamente se ha asociado con proporcionar un efecto protector. En algunos estudios, como por ejemplo PREDIMED, se comprobó que la suplementación o aumento del consumo de alimentos con alto contenido de estos tipos de grasas insaturadas puede reducir el riesgo relativo en un 30% aproximadamente en personas con alto riesgo

cardiovascular (110). Referente a la ingesta de ácidos grasos saturados, con la intervención hemos logrado disminuir significativamente la ingesta en gramos, pero se obtuvo sólo una tendencia referente al porcentaje de aporte a la molécula calórica ($p= 0,1$). Es muy alentador haber disminuido este tipo de ácido graso, llegando casi a cumplir con la recomendación ($<10\%$) (106), ya que la reducción de la ingesta de grasas saturadas está relacionada con una mejora en los biomarcadores relacionados con la inflamación y con la disminución del riesgo cardiovascular (111,112).

1.1.3 Aporte de fibra.

El consumo de fibra no cambia significativamente a los 6 meses de intervención. Si bien la cantidad recomendada de fibra no está realmente bien establecida, se recomienda que sea al menos 25 gramos diarios partir de frutas, verduras y alimentos ricos en fibra como granos, legumbres o cereales integrales (73,106). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (113) propone para este grupo de edad, una ingesta mínima de 16 gramos por día, por tanto comparando nuestros datos con estas referencias, se cumplió con el mínimo de las recomendaciones. Al analizar el test Kidmed una de las preguntas que hace referencia a la ingesta de fibra, “consume más de una verduras al día”, cambió su porcentaje de adherencia significativamente a los 6 meses de tratamiento. El consumo de fibra se asocia igualmente con la reducción de factores asociados al riesgo metabólico y cardiovascular, observando que una mayor ingesta de esta sustancia disminuiría estos riesgos (114–116).

1.1.4 Adherencia a la dieta mediterránea

En relación a la adherencia a la dieta mediterránea, medida a través del test Kidmed (117), aumentó desde un 38% a un 63% la clasificación de adherencia óptima, siendo un porcentaje muy alto comparado con otros estudios realizados

en poblaciones similares españolas, un 48,9% y un 28,4% respectivamente (118,119). Al desglosar el test, fue muy interesante observar que las preguntas que más cambiaron se relacionaban con nuestros principales objetivos de cambio indicados en las pautas de alimentación: 1) aumentar el consumo de verduras; 2) utilizar siempre aceite de oliva extra virgen; 3) incorporar frutos secos mínimo 3 días a la semana y 4) disminuir el consumo de bollería y golosinas. También aumentaron 2 puntos negativos de la encuesta, que a pesar de no ser significativos, son de preocupación y necesario de modificar, éstos fueron: Acudir al menos 1 vez por semana a un centro de “*fast food*”; y no desayunar en casa antes de ir al colegio. En este segundo punto, los niños referían que desayunaban en el colegio o en el primer descanso de la mañana.

1.1.5 Actividad física y horas de pantalla

Las indicaciones alimentarias se complementaron con la sugerencia del aumento de horas diarias destinadas a actividades que requieran de más movimiento traducido en un mayor gasto energético, fomentando el juego, las salidas al parque y la actividad física programada. Si bien las horas destinadas a la actividad física extraescolar aumentaron, no alcanzó a ser significativo. Es fundamental considerar este apartado como parte de las indicaciones para un cambio en el estilo de vida, sobre todo en individuos con alto riesgo metabólico y cardiovascular ya que se considera como un potente protector para la salud (120,121).

Al analizar las horas de pantalla, tampoco tuvimos una disminución significativa. A pesar de esto, fue muy interesante observar la diferencia a los 6 meses, sobretudo en la reducción de la categoría de > de 4 horas frente a la pantalla los fines de semana. Sabemos que la actividad física, integrada en el día a día en los niños es un protector para el riesgo de enfermedad metabólica y cardiovascular (122,123), pero también se ha visto que la disminución de las horas frente a la

televisión, videojuegos o tecnología móvil está asociada a una reducción del riesgo de obesidad infantil (124).

1.1.6 Análisis antropométrico y bioquímico

Como consecuencia de estos cambios en la alimentación observamos la reducción de peso después de los 6 meses de intervención en el estilo de vida de estos individuos. Obtuvimos un descenso de 0,45 D.E. del IMC. Se ha descrito que, en una población infantil con obesidad, al menos se debe reducir 0,25 D.E. para mejorar la salud metabólica de los individuos y obtener sus beneficios (125,126). Si el cambio es mayor o cercano a 0,5 D.E del IMC, el efecto es el doble (127). Este valor de cambio se obtuvo nuevamente después de 12 meses de seguimiento (n=24), incluso un descenso mayor comparándolo con nuestros resultados a los 6 meses, una disminución de 0,56 D.E respecto al inicio (18 meses antes).

Con respecto a los cambios metabólicos obtenidos a partir de las analíticas, nos llamó mucho la atención el incremento de la glicemia en ayunas, del colesterol total, colesterol-LDL y de los triglicéridos. A pesar de esto, los valores de estas variables siguen estando dentro del rango de normalidad descrita para esta edad (128). Comparando nuestros datos con otros estudios de similares características, nos dimos cuenta que el perfil lipídico tampoco cambiaba de manera consistente después de las intervenciones en el estilo de vida realizadas (129,130). Además de esto, si los comparamos con los valores para diagnosticar síndrome metabólico (42), a pesar que por la edad no se pueden utilizar estos criterios, nuestro grupo está muy lejos del límite superior. En relación al perfil tiroideo, sí hubo un leve incremento de la hormona T4 libre a los 6 meses, pero el valor de TSH se mantuvo normal. Si bien la alteración de estos parámetros están relacionados con el exceso de peso, el análisis global para nosotros fue que los valores se mantuvieron estables (131)

Muy importante destacar que a pesar de haber disminuido el IMC D.E. nuestro grupo de individuos sigue siendo muy obeso (IMC D.E. > a 3), y postulamos que someter al cuerpo a cambios producto de una intervención, puede estar aumentando el estrés metabólico viéndose reflejado en la alteración del colesterol y triglicéridos. Finalmente, en la última medición analítica que obtuvimos en el seguimiento al año de terminada la intervención, se observó una normalización del perfil lipídico y el mantenimiento del porcentaje de HbA1c. Por tanto, después de analizar los datos en conjunto y a largo plazo, los resultados nos pueden sugerir que siguen siendo individuos metabólicamente saludables.

2. Efecto de la intervención en el estilo de vida en el metaboloma del plasma.

Hemos caracterizado el metaboloma del plasma obteniendo cambios más allá de la bioquímica utilizada en la práctica común. Además, el haber identificado metabolitos de forma no dirigida (*untargeted*) y analizarlos sin interponer ningún condicionante (mediante el análisis de componentes principales) le da una mayor potencia al estudio. Mediante este análisis *untargeted* hemos identificado firmas metabólicas relacionadas con el metabolismo de esfingolípidos, las cuales se asociaron al cambio inducido por la intervención realizada al estilo de vida de los individuos prepuberales con obesidad.

Las moléculas esfingolípídicas, dentro de las cuales se consideran las ceramidas, esfingomielina y esfingolípidos complejos, son sustancias lipídicas derivadas de la modificación básica de la estructura de un esfingolípido, conformado por 18 carbonos más un grupo amino y un alcohol. Están presentes principalmente en las membranas celulares y proporcionan metabolitos que regulan la función celular (132). Otras especies de esta familia son las esfingosinas, de las cuales también se forman las ceramidas (después de acilación), se encuentran en baja concentración pero no dejan de ser muy importantes, ya que son esenciales para el dinamismo

de la membrana y las vías de señalización en la célula.

Los esfingolípidos protegen contra factores externos y también cumplen funciones que son cruciales en la señalización molecular en una amplia gama de procesos biológicos, incluidos la apoptosis, proliferación, inflamación, autofagia y diferenciación (133). Todos estos compuestos normalmente se encuentran en el organismo, pero pueden volverse tóxicos cuando se acumulan en cantidades excesivas por una biosíntesis exagerada, cuando exhiben características cualitativas distorsionadas o cuando su localización en la célula no es la correcta. Los dos mecanismos reconocidos como efectos tóxicos de estas sustancias en las células son el estrés mitocondrial y del retículo endoplasmático con la siguiente apoptosis (134). El segundo efecto es la perturbación de la homeostasis de glicerofosfolípidos y la señalización asociada a ello. Por tanto, es de gran importancia controlar los niveles y su regulación, manteniendo un equilibrio entre ellas, además de la localización de la mayoría de los esfingolípidos.

La obesidad y la insulino resistencia han sido consistentemente asociadas con alteraciones del metabolismo de esfingolípidos y con el incremento de los niveles de ceramidas circulantes en humanos (135–137). En niños y adolescentes, se ha identificado con metabolómica dirigida, una asociación entre la relación de esfingomielinas/fosfatidilcolina con la obesidad (rango de edad de 6 a 15 años) comparado con controles normopeso (89), sugiriendo una alteración del metabolismo de esfingolípidos. Modelos de experimentación animal han demostrado que el incremento de los niveles de esfingolípidos contribuye al desarrollo de obesidad y de desórdenes metabólicos relacionados, incluyendo la insulino resistencia y la enfermedad cardiovascular (138,139). Se ha observado que las depleciones genéticas dirigidas o la inhibición de síntesis de ceramidas, glucoesfingolípidos o esfingomielinas farmacológicamente en modelos de ratones, mejora significativamente la tolerancia a la glucosa, la sensibilidad a la insulina y la

ateroesclerosis (140–142). En adultos se ha asociado positivamente los niveles de ceramidas basales con incidentes cardiovasculares, existiendo 2,8 veces más riesgo de eventos cardiovasculares en grupos con mayor concentración plasmática de ceramidas (143).

Por tanto, se ha sugerido en la investigación considerar el metabolismo de esfingolípidos como objetivo en estrategias terapéuticas. Con estos antecedentes, nuestros resultados proponen que la disminución de ceramidas circulantes en niños prepuberales puede ser un importante mecanismo para reducir el riesgo futuro de enfermedad metabólica o cardiovascular. En este contexto, la disminución de muchas de las especies esfingolípídicas circulantes identificadas producto de la intervención se asociaron con la mejora de los niveles de HbA1c, sugiriendo que los niveles de ceramidas pueden tener un efecto a largo plazo en el control glicémico. Se requieren nuevos estudios para determinar si la modificación del metabolismo de esfingolípidos o los niveles de ceramidas durante la infancia pueden ser beneficiosos para reducir el riesgo metabólico durante la adolescencia y la etapa adulta.

Varios estudios de intervención dirigidos a la reducción del peso corporal han demostrado el impacto que tiene esta disminución en el metabolismo de esfingolípidos. Por ejemplo, en adolescentes se observó una disminución de los niveles circulantes de esfingolípidos (144) y en adultos una disminución en los niveles de ceramidas después de una cirugía bariátrica (145). Sin embargo, nuestros datos no se asociaron al cambio del IMC (D.E.). Sí se ha observado en adultos que, después de una intervención en la dieta con el objetivo principal de reducir el riesgo de diabetes mellitus tipo 2 o enfermedades cardiovascular, también se ven disminuidos los niveles de esfingolípidos sin modificar el peso corporal. Por ejemplo, se asoció a una dieta alta en contenido de grasas saturadas niveles aumentados de ceramidas, comparado con dietas altas en grasas

insaturadas sin cambiar el peso corporal (146,147). Además, estos datos respaldan la tendencia de nuestro análisis al asociar el cambio del PC 1 con el cambio en la ingesta de grasas ($p= 0,069$). También se ha propuesto que una alimentación basada en los principios de la dieta Mediterránea como incorporar aceites de oliva virgen extra y frutos secos, es decir ácidos grasos mono y poliinsaturados, puede mitigar los potenciales efectos deletéreos de concentraciones elevadas de ceramidas plasmática en las enfermedades cardiovasculares (143)

En la fig.14 podemos entender la participación de las características de la dieta y la obesidad en el metabolismo de esfingolípidos (132). El incremento de la ingesta de grasas además de la inactividad, provocan un aumento del peso corporal con el cual mayor riesgo de desarrollar insulino resistencia. Esta condición aumenta la lipólisis (disminuyendo la lipogénesis) incrementando los niveles circulantes de ácidos grasos libres, y por consecuencia los niveles de ceramidas, esfingomielinas, y glucosilceramidas lo que, mantenido en el tiempo, provoca una disfunción en el metabolismo, principalmente en el desajuste mitocondrial, aumentando el estrés oxidativo y la inflamación.

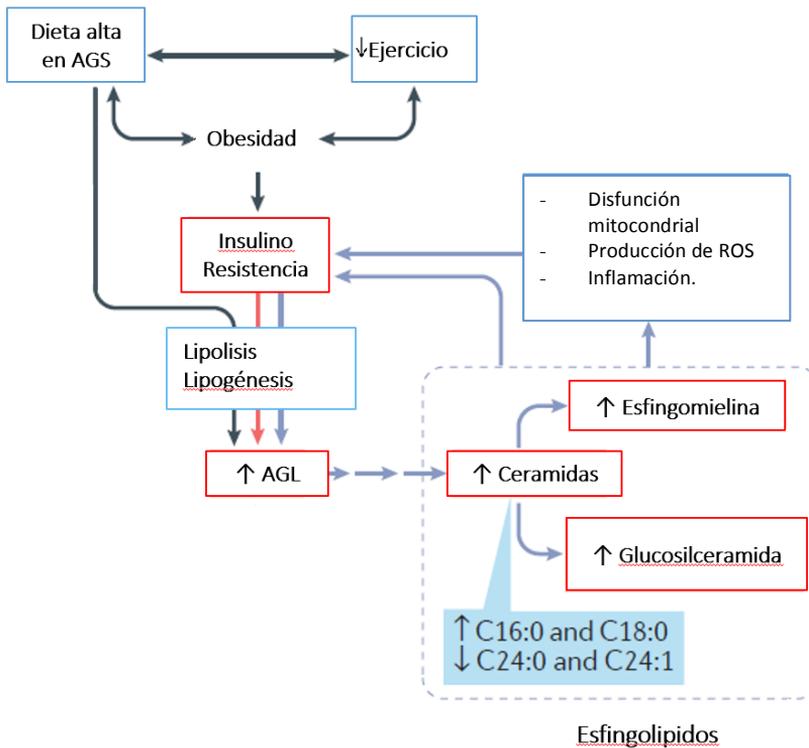


FIG. 14: Representación del flujo de la ingesta de ácidos grasos saturados (AGS) y el efecto en el metabolismo de esfingolípidos (127).

Por lo tanto, nuestros datos sugieren que la disminución de los niveles de ceramidas, esfingomielinas y sulfatidas estaría más relacionada con los efectos de la dieta, independiente de la disminución del peso y del IMC-D.E.

Actualmente existe una alta asociación de metabolitos pertenecientes a las vías metabólicas de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) y acilcarnitinas con la obesidad y la insulino resistencia, tanto en niños como en adultos comparándolos con individuos normopeso (83,86,148), pero nuestros datos y resultados no se asociaron a estos metabolitos. Podemos explicar estos resultados en base a que la asociación de aminoácidos de cadena ramificada con obesidad

han sido sólo identificados en pacientes con insulino resistencia, no siendo nuestro caso.

3. Efecto de la intervención en el estilo de vida en el metaboloma de la orina.

El análisis de orina es una herramienta bien utilizada en otras patologías para evaluar, por ejemplo, el control que tiene un paciente de su patología o la efectividad de algún tratamiento. Con el objetivo de nuestro estudio, pudimos utilizar esta muestra biológica como una herramienta efectiva para identificar cambios moleculares después de una intervención en el estilo de vida.

Pudimos observar que el TMAO disminuía su concentración significativamente después de la intervención y este cambio se asoció inversamente al cambio en la ingesta de fibra. El TMAO ha sido identificado de manera consistente como un biomarcador de aterosclerosis y de enfermedad cardiovascular en adultos (149,150) y el microbioma intestinal juega un papel muy importante en la producción y regulación de esta sustancia.

La microbiota intestinal ha surgido recientemente como un determinante en el desarrollo de obesidad y enfermedades metabólicas (151–153). Es uno de los órganos que actúa directamente con la dieta y su metabolización, con una importante participación de las comunidades bacterianas presentes. Se ha demostrado que la microbiota afecta la fisiología de huésped y es esencial para la homeostasis y desarrollo del sistema inmune. Se ha demostrado de manera consistente que una intervención en la dieta durante 6 semanas es suficiente para alterar la estructura de la microbiota en sujetos con obesidad, incrementando la diversidad y cantidad de bacterias en el intestino (154).

Para entender el proceso de producción de TMAO (Fig. 15) (155), comenzaremos desde la ingesta de alimentos. Alimentos ricos en colesterol y grasas saturadas

DISCUSIÓN

normalmente tienen un alto contenido de colina, fosfatilcolina y carnitina (150,156), sustancias que utiliza la microbiota como fuente de energía, produciendo trimetilamina (TMA). Este producto es incorporado a la circulación vía vena porta y oxidado por enzimas hepáticas FMO1 y FMO3 formando el TMAO. El TMAO entra en la circulación central y es excretado vía renal. Se ha descrito como precursor de aterogénesis y una de las principales causas de esto es que altera el metabolismo del colesterol y promueve la formación de células espumosas a partir de macrófagos (81,157,158).

Se ha observado que inhibiendo la síntesis de TMA intestinal, disminuyen los niveles circulantes de TMAO traduciéndose en una mejora del perfil aterosclerótico en ratones (159). Como la aterosclerosis es un proceso progresivo, acumulativo y uno de los principales factores en la enfermedad cardiovascular, la disminución de los niveles de TMAO sería de gran importancia para disminuir el riesgo cardiovascular a largo plazo. Pero también existen estudios recientemente que no apoyan esta idea, han verificado que el TMAO no se asocia con medidas ateroscleróticas (como calcificación de las arterias o engrosamiento de la íntima arterial) por lo que no se relacionaría con una aceleración en el riesgo de esta condición (160).

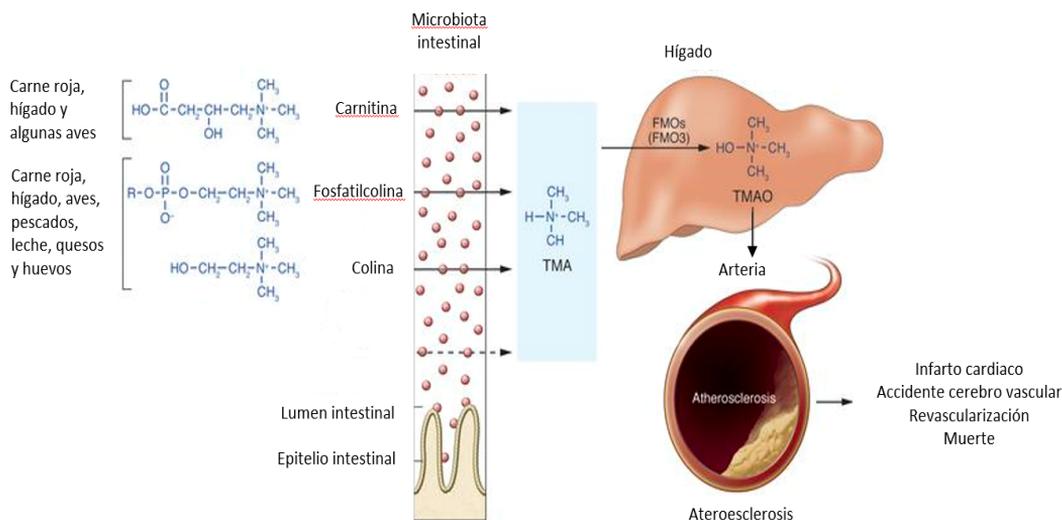


FIG. 15: Proceso de formación de TMAO mediante la ingesta de alimentos ricos en colina, fofatilcolina y L-carnitina, y su relación con el efecto aterosclerótico. (149)

En relación al cambio que observamos de la concentración de TMAO y su asociación inversa con el cambio en la ingesta de fibra, podemos respaldar estos resultados con un estudio reciente en el cual se describió lo siguiente: después de 30 días de intervención con una dieta rica en carbohidratos no digeribles, se modificó la composición de la microbiota intestinal en niños y adolescentes con presentaban obesidad, este efecto condujo a disminuir la concentración de TMAO en orina y se obtuvo una reducción del peso corporal; esto fue luego demostrado por los autores mediante la transferencia de la microbiota a ratones libres de microorganismos, observando el mismo efecto, asegurando que eran las bacterias intestinales las que contribuían de manera significativa a este cambio. En nuestros resultados, no existió ninguna diferencia en la ingesta de colina entre el inicio y el final de la intervención, pero no podemos descartar que otros componentes dietarios (l-carnitina, fosfatilcolina) no medidos en este estudio contribuyan a la disminución de TMAO. Por lo tanto, una posible hipótesis para explicar la

disminución de TMAO es la modulación de la microbiota intestinal por parte de la fibra de la dieta.

Igualmente, nuestros datos sugieren que a través de este camino se puede reducir el riesgo cardiovascular que conlleva la obesidad. Se necesitan más estudios que respalden estos resultados, sobretodo en población prepuberal, ya que podría ser una estrategia terapéutica en el tratamiento de la obesidad infantil.

3. Discusión general:

Una limitación importante de nuestro estudio es un tamaño muestral relativamente modesto. Algunos de los individuos reclutados se vieron afectados por presentar signos de pubertad a los 6 meses de la intervención teniendo que excluirlos del estudio. Sin embargo, el diseño pareado del estudio incrementa la potencia estadística del mismo.

Otra limitación es el registro de la alimentación de los individuos. Este reporte fue realizado por los padres durante 4 días, pero a pesar de que es un método que proporciona una información bien estimada y recomendada (161) pueden existir ausencia de datos, ya que no siempre los padres están a cargo de la alimentación de sus hijos pudiendo sub o sobre-valorar la ingesta de los alimentos.

Por otro lado, el hecho de que el proyecto se haya realizado exclusivamente en individuos prepuberales, le da un gran potencial al estudio ya que estos niños responden muy diferente a los cambios metabólicos y evitamos factores confundentes de relacionados con la pubertad.

Las intervenciones en niños y niñas con obesidad deben ser a temprana edad para evitar que el desajuste fisiológico propio de la pubertad, interfiera y afecte en los objetivos propuestos. Se debe incidir en la importancia de que un niño debe

alimentarse de forma variada, independiente del exceso de peso que presente, y se deben cubrir las necesidades mínimas en relación a las calorías y macronutrientes. Es fundamental la educación en alimentación saludable tanto a los niños como a las familias.

Después de haber realizado este proyecto y de haber analizado los resultados obtenidos, existen varios puntos que destacar para aplicarlos en la práctica clínica y reforzar el protocolo de intervención que se está llevando a cabo:

- Debido a que los carbohidratos estaban en el límite inferior de las recomendaciones, se debe reforzar el aporte de este macronutriente principalmente por la necesidad que existe de energía a esta edad. Esta debe ser proporcionada por cereales integrales, de bajo índice glicémico y complementado con una correcta técnica culinaria.

- El reducir el aporte de azúcar libre debe ser uno de los objetivos principales en el tratamiento dietético de estos niños, proponiéndonos reducir el consumo a menos del 5% del total de calorías y dar alternativas que puedan reemplazar este tipo de alimentos.

- Vigilar el aporte proteico y calcular la ingesta suficiente para cada individuo de acuerdo a sus necesidades y al gasto energético que tenga. La asociación que existe actualmente del exceso de este macronutriente con la obesidad no se puede pasar por alto. Se debe educar a la población en la importancia de cumplir con estas recomendaciones y no ingerir un exceso de proteínas.

- La ingesta de grasas, principalmente de grasas saturadas, es uno de los puntos fuertes en el cual hay que trabajar con la población, sin dejar de lado la importancia del consumo de ácidos grasos insaturados (moninsaturados y poliinsaturados). Nuestros datos muestran una tendencia en la correlación entre

la ingesta de lípidos y los niveles de esfingolípidos, apoyando la importancia de disminuir o mantener el consumo de grasas en los valores recomendados.

- Otro punto a incidir es incrementar el consumo de fibra, ya que la intervención actual no consigue aumentar su ingesta. El aporte de fibra, es fundamental para la salud. La modificación que puede existir a partir de esta sustancia de la microflora intestinal, sobre todo en la población obesa infantil, puede ser una gran herramienta para la práctica clínica. Se debe inculcar desde pequeños la importancia del consumo de alimentos ricos en fibra, principalmente dado por cereales integrales, frutas y verduras. En relación a este punto, estamos realizando un estudio analizando los cambios en la microbiota intestinal inducidos por la intervención y su posible asociación con el consumo de fibra.

En cuanto a la actividad física se debería incidir mucho en este punto, ya que no hemos conseguido incrementar el tiempo destinado al ejercicio en esta población. La actividad no es un complemento de un tratamiento sino un pilar fundamental en ello. Con un entrenamiento adecuado y referido a las circunstancias de cada individuo aseguramos la mejora su condición de salud. Además, se debe reforzar la disminución de las horas de pantalla, que indirectamente nos mide el nivel de sedentarismo de la población. Para poder evaluar en más detalle el sedentarismo y el ejercicio físico, estamos incorporando el uso de dispositivos que miden la actividad diaria en forma de pasos y minutos activos (acelerómetros).

Con todo esto, estamos trabajando en un nuevo programa de abordaje de la obesidad infantil en el cual además de considerar los puntos anteriores hemos apostado por involucrar de manera más importante al grupo familiar más cercano de los individuos en tratamiento para potenciar los cambios propuestos.

Para finalizar, una última reflexión para subrayar la importancia de la educación en hábitos de alimentación y de actividad física incluidos en un estilo de vida saludable, deben ser transmitidos a los niños sobretodo a temprana edad para mejorar su condición de salud y disminuir el riesgo de obesidad y enfermedad metabólica en edad adulta.

CONCLUSIONES

1. 1. La intervención dirigida al cambio de hábitos resultó efectiva, observando diferencias en la alimentación a los 6 meses; hubo una reducción en la ingesta calórica principalmente dada por la reducción del consumo de carbohidratos, azúcares refinados y de grasas, sobretodo saturadas.
2. A nivel cualitativo, la intervención aumentó la adherencia a la dieta mediterránea.
3. La intervención en el estilo de vida mejoró parámetros antropométricos, incluyendo el IMC (D.E.) y la circunferencia de cintura, manteniendo el efecto hasta 12 meses post-intervención.
4. Los cambios inducidos por la intervención en el estilo de vida disminuyeron los niveles de HbA1c, mantenido hasta los 12 meses post-intervención.
5. La intervención en el estilo de vida indujo una signatura relacionada con el metabolismo de esfingolípidos en individuos pre-puberales con obesidad, independientemente de la disminución del índice de masa corporal.
6. La intervención en el estilo de vida disminuyó los niveles circulantes de ceramidas, esfingomielinas, glicosfingosinas y sulfatidas.
7. La disminución de los niveles circulantes de los metabolitos relacionados con el metabolismo de esfingolípidos se relacionaron con la mejora de los niveles de HbA1c a los 6 meses.
8. La intervención en el estilo de vida indujo a una disminución en los niveles de TMAO en orina.
9. La disminución de los niveles de TMAO en orina correlacionó de manera inversa con la ingesta de fibra.

BIBLIOGRAFÍA

1. OMS | Datos y estadísticas. WHO. <http://www.who.int/research/es/>
2. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: A systematic analysis. *Lancet Lond Engl*. 2014 Aug 30;384(9945):766–81.
3. Obesity and inequities. Guidance for addressing inequities in overweight and obesity (2014). <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/obesity/publications/2014/obesity-and-inequities.-guidance-for-addressing-inequities-in-overweight-and-obesity-2014>.
4. Instituto Nacional de Estadística, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. España. Encuesta Nacional de Salud 2011 – 2012. <http://www.ine.es/prensa/np770.pdf>
5. Fernández JR, Redden DT, Pietrobelli A, Allison DB. Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-American, and Mexican-American children and adolescents. *J Pediatr*. 2004 Oct;145(4):439–44.
6. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2006 May;23(5):469–80.
7. Timothy G Lohman AFR, Reynaldo Martorell. Anthropometric Standardisation Reference Manual. Champaign, IL: Human Kinetics Books, ©1988. 1988.
8. WHO :: Global Database on Body Mass Index http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html
9. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an

endocrine organ. Arch Med Sci AMS. 2013 Apr 20;9(2):191–200.

10. Costa JV, Duarte JS. [Adipose tissue and adipokines]. Acta Med Port. 2006 Jun;19(3):251–6.

11. Saely CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. Gerontology. 2012;58(1):15–23.

12. Rosenwald M, Wolfrum C. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. Adipocyte. 2014 Jan 1;3(1):4.

13. Esteve Ràfols M. Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. Endocrinol Nutr. :100–12.

14. Reinehr T, Stoffel-Wagner B, Roth CL, Andler W. High-sensitive C-reactive protein, tumor necrosis factor α , and cardiovascular risk factors before and after weight loss in obese children. Metab - Clin Exp. 2005 Sep 1;54(9):1155–61.

15. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. Circulation. 1983 May;67(5):968–77.

16. Gregg EW, Cheng YJ, Cadwell BL, Imperatore G, Williams DE, Flegal KM, et al. Secular Trends in Cardiovascular Disease Risk Factors According to Body Mass Index in US Adults. JAMA. 2005 Apr 20;293(15):1868–74.

17. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, et al. Prevalence of Obesity, Diabetes, and Obesity-Related Health Risk Factors, 2001. JAMA. 2003 Jan 1;289(1):76–9.

18. Blumenthal JA, Babyak MA, Hinderliter A, Watkins LL, Craighead L, Lin P-H, et al. Effects of the DASH Diet Alone and in Combination With Exercise and Weight Loss on Blood Pressure and Cardiovascular Biomarkers in Men and Women With High Blood Pressure: The ENCORE Study. Arch Intern Med. 2010 Jan

25;170(2):126–35.

19. OMS | Datos y cifras sobre obesidad infantil. WHO. <http://www.who.int/end-childhood-obesity/facts/es/>

20. Estudio Aladino. Estudio de la Prevalencia de la obesidad infantil: Estudio ALADINO (Alimentación, Actividad física, Desarrollo infantil y Obesidad). Rev Pediatr Aten Primaria. 2011;13:493–5.

21. Universidad COmplutense de Madrid (Grupo de Investigación UCMVALORNUT (920030), Departamento Nutrición, UCM) A. Estudio ALADINO: Estudio de Vigilancia del Crecimiento, Alimentación, Actividad Física y Desarrollo Infantil y Obesidad en España. 2015. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición; 2016.

22. Valdés Pizarro J, Royo-Bordonada MA. Prevalence of childhood obesity in Spain: National Health Survey 2006-2007. Nutr Hosp. 2012 Feb;27(1):154–60.

23. Wang YC, McPherson K, Marsh T, Gortmaker SL, Brown M. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. The Lancet. Aug 27;378(9793):815–25.

24. Estudios Españoles de Crecimiento 2010 | Asociación Española de Pediatría. <http://www.aeped.es/noticias/estudios-espanoles-crecimiento-2010>

25. Gráficas y Tablas; Fundación Faustino Orbegozo Eizaguirre.. Fundación Faustino Orbegozo. <http://www.fundacionorbegozo.com/el-instituto-de-investigacion-del-crecimiento-y-desarrollo/graficas-y-tablas/>

26. WHO | The WHO Child Growth Standards. WHO. Available from: <http://www.who.int/childgrowth/en/>

27. WHO | Growth reference data for 5-19 years. WHO. <http://www.who.int/growthref/en/>

BIBLIOGRAFÍA

28. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ*. 2000 May 6;320(7244):1240.
29. The NS, Suchindran C, North KE, Popkin BM, Gordon-Larsen P. Association of adolescent obesity with risk of severe obesity in adulthood. *JAMA*. 2010 Nov 10;304(18):2042–7.
30. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP, Tracy RE, Wattigney WA. Association between Multiple Cardiovascular Risk Factors and Atherosclerosis in Children and Young Adults. *N Engl J Med*. 1998;338(23):1650–6.
31. Freedman DS, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. The Relation of Overweight to Cardiovascular Risk Factors Among Children and Adolescents: The Bogalusa Heart Study. *Pediatrics*. 1999 Jun 1;103(6):1175–82.
32. Juonala M, Magnussen CG, Berenson GS, Venn A, Burns TL, Sabin MA, et al. Childhood Adiposity, Adult Adiposity, and Cardiovascular Risk Factors. *N Engl J Med*. 2011 Nov 17;365(20):1876–85.
33. Lauer RM, Clarke WR, Burns TL. Obesity in childhood: the Muscatine Study. *Zhonghua Minguo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi J Zhonghua Minguo Xiao Er Ke Yi Xue Hui*. 1997 Dec;38(6):432–7.
34. Venn AJ, Thomson RJ, Schmidt MD, Cleland VJ, Curry BA, Gennat HC, et al. Overweight and obesity from childhood to adulthood: a follow-up of participants in the 1985 Australian Schools Health and Fitness Survey. *Med J Aust*. 2007;186(9). <https://www.mja.com.au/journal/2007/186/9/overweight-and-obesity-childhood-adulthood-follow-participants-1985-australian>
35. Juonala M, Viikari JSA, Hutri-Kähönen N, Pietikäinen M, Jokinen E, Taittonen L, et al. The 21-year follow-up of the Cardiovascular Risk in Young Finns Study: risk factor levels, secular trends and east-west difference. *J Intern Med*.

2004 Apr;255(4):457–68.

36. Maffeis C, Corciulo N, Livieri C, Rabbone I, Trifirò G, Falorni A, et al. Waist circumference as a predictor of cardiovascular and metabolic risk factors in obese girls. *Eur J Clin Nutr*. 2003 Apr;57(4):566–72.

37. Messiah SE, Arheart KL, Natale RA, Hlaing WM, Lipshultz SE, Miller TL. BMI, waist circumference, and selected cardiovascular disease risk factors among preschool-age children. *Obes Silver Spring Md*. 2012 Sep;20(9):1942–9.

38. Shashaj B, Bedogni G, Graziani MP, Tozzi AE, DiCorpo ML, Morano D, et al. Origin of cardiovascular risk in overweight preschool children: a cohort study of cardiometabolic risk factors at the onset of obesity. *JAMA Pediatr*. 2014 Oct;168(10):917–24.

39. Hochberg Z, Feil R, Constancia M, Fraga M, Junien C, Carel J-C, et al. Child Health, Developmental Plasticity, and Epigenetic Programming. *Endocr Rev*. 2010 Oct 22;32(2):159–224.

40. Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW, et al. Obesity and the Metabolic Syndrome in Children and Adolescents. *N Engl J Med*. 2004;350(23):2362–74.

41. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002 Dec 17;106(25):3143–421.

42. Zimmet P, Alberti KGM, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, et al. The metabolic syndrome in children and adolescents – an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes*. 2007 Oct 1;8(5):299–306.

43. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HAW. 10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*.

BIBLIOGRAFÍA

2008;359(15):1577–89.

44. TODAY Study Group. A Clinical Trial to Maintain Glycemic Control in Youth with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2012;366(24):2247–56.

45. Dumuid D, Olds T, Lewis LK, Martin-Fernández JA, Katzmarzyk PT, Barreira T, et al. Health-Related Quality of Life and Lifestyle Behavior Clusters in School-Aged Children from 12 Countries. *J Pediatr* <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022347616315438>

46. Hunsberger M. Early feeding practices and family structure: associations with overweight in children. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2014 /core/journals/proceedings-of-the-nutrition-society/article/div-classtitleearly-feeding-practices-and-family-structure-associations-with-overweight-in-children/div/64794B4FAC4F04D92CE685667E44F240

47. Grummer-Strawn LM, Scanlon KS, Fein SB. Infant Feeding and Feeding Transitions During the First Year of Life. *Pediatrics*. 2008 Oct 1;122(Supplement 2):S36–42.

48. Patrick H, Nicklas TA. A review of family and social determinants of children's eating patterns and diet quality. *J Am Coll Nutr*. 2005 Apr;24(2):83–92.

49. Raynor H, Walleghen ELV, Osterholt KM, Hart CN, Jelalian E, Wing RR, et al. The Relationship Between Child and Parent Food Hedonics and Parent and Child Food Group Intake in Overweight/Obese Children. *J Am Diet Assoc*. 2011 Mar;111(3):425.

50. Yeung EH, Sundaram R, Ghassabian A, Xie Y, Louis GB. Parental Obesity and Early Childhood Development. *Pediatrics*. 2017 Feb 1;139(2):e20161459.

51. Moreno LA, Rodríguez G. Dietary risk factors for development of childhood obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007 May;10(3):336–41.

52. McCullough MB, Guilkey H, Stark L. Cookie or fruit? Relative reinforcing value of snack foods among preschoolers with overweight/obesity compared to healthy weight. *Appetite*. 2017 Apr 1;111:187–94.
53. Hill JO, Wyatt HR, Reed GW, Peters JC. Obesity and the Environment: Where Do We Go from Here? *Science*. 2003 Feb 7;299(5608):853–5.
54. Moreno LA, Rodríguez G, Fleta J, Bueno-Lozano M, Lázaro A, Bueno G. Trends of Dietary Habits in Adolescents. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2010 Jan 29;50(2):106–12.
55. Alsharairi NA, Somerset SM. Skipping breakfast in early childhood and its associations with maternal and child BMI: a study of 2-5-year-old Australian children. *Eur J Clin Nutr*. 2016 Apr;70(4):450–5.
56. Lobstein T, Baur L, Uauy R. Obesity in children and young people: a crisis in public health. *Obes Rev*. 2004;5:4–85.
57. Miguel-Berges ML, Santaliestra-Pasias AM, Mouratidou T, Androutsos O, de Craemer M, Pinket A-S, et al. Associations between food and beverage consumption and different types of sedentary behaviours in European preschoolers: the ToyBox-study. *Eur J Nutr*. 2016 Jun 16;
58. Beccuti G, Pannain S. Sleep and obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011 Jul;14(4):402–12.
59. Anujoo K, Stronks K, Snijder MB, Jean-Louis G, Rutters F, van den Born B-J, et al. Relationship between short sleep duration and cardiovascular risk factors in a multi-ethnic cohort – the helius study. *Sleep Med*. 2015 Dec;16(12):1482–8.
60. Sayin FK, Buyukinan M. Sleep Duration and Media Time Have a Major Impact on Insulin Resistance and Metabolic Risk Factors in Obese Children and Adolescents. *Child Obes* 2016 Mar 15
<http://online.liebertpub.com/sire.ub.edu/doi/abs/10.1089/chi.2015.0126>

61. Richardson L, Paulis WD, van Middelkoop M, Koes BW. An overview of national clinical guidelines for the management of childhood obesity in primary care. *Prev Med.* 2013 Nov;57(5):448–55.
62. Styne DM, Arslanian SA, Connor EL, Farooqi IS, Murad MH, Silverstein JH, et al. Pediatric Obesity—Assessment, Treatment, and Prevention: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017 Mar 1;102(3):709–57.
63. Oude Luttikhuis H, Baur L, Jansen H, Shrewsbury VA, O’Malley C, Stolk RP, et al. Interventions for treating obesity in children. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews.* John Wiley & Sons, Ltd; 1996 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD001872.pub2/abstract>
64. Ho M, Garnett SP, Baur LA, Burrows T, Stewart L, Neve M, et al. Impact of dietary and exercise interventions on weight change and metabolic outcomes in obese children and adolescents: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *JAMA Pediatr.* 2013 Aug 1;167(8):759–68.
65. Costa Dias Pitangueira J, Rodrigues Silva L, Ribas de Farias Costa P. The effectiveness of intervention programs in the prevention and control of obesity in infants: a systematic review. *Nutr Hosp.* 2015;31(n04):1455–64.
66. Kruk JJ, Kortekaas F, Lucas C, Jager-Wittenaar H. Obesity: a systematic review on parental involvement in long-term European childhood weight control interventions with a nutritional focus. *Obes Rev.* 2013 Sep;14(9):745–60.
67. Morgan PJ, Collins CE, Plotnikoff RC, Callister R, Burrows T, Fletcher R, et al. The ‘Healthy Dads, Healthy Kids’ community randomized controlled trial: a community-based healthy lifestyle program for fathers and their children. *Prev Med.* 2014 Apr;61:90–9.
68. Apovian CM, Aronne LJ, Bessesen DH, McDonnell ME, Murad MH, Pagotto

U, et al. Pharmacological Management of Obesity: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Jan 15;100(2):342–62.

69. Kakkar AK, Dahiya N. Drug treatment of obesity: Current status and future prospects. *Eur J Intern Med*. 2015 Mar 1;26(2):89–94.

70. McDonagh MS, Selph S, Ozpinar A, Foley C. Systematic review of the benefits and risks of metformin in treating obesity in children aged 18 years and younger. *JAMA Pediatr*. 2014 Feb;168(2):178–84.

71. Pratt JSA, Lenders CM, Dionne EA, Hoppin AG, Hsu GLK, Inge TH, et al. Best Practice Updates for Pediatric/Adolescent Weight Loss Surgery. *Obesity*. 2009 May 1;17(5):901–10.

72. Kiess W, Reich A, Müller G, Galler A, Kapellen T, Raile K, et al. Obesity in childhood and adolescence: clinical diagnosis and management. *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM*. 2001;14 Suppl 6:1431–40.

73. Gidding SS, Dennison BA, Birch LL, Daniels SR, Gilman MW, Lichtenstein AH, et al. Dietary Recommendations for Children and Adolescents A Guide for Practitioners: Consensus Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2005 Sep 27;112(13):2061–75.

74. Eckel RH, Jakicic JM, Ard JD, Hubbard VS, Jesus JM de, Lee I-M, et al. 2013 AHA/ACC Guideline on Lifestyle Management to Reduce Cardiovascular Risk. *Circulation*. 2013 Jan 1;01.cir.0000437740.48606.d1.

75. 2015-2020 Dietary Guidelines - health.gov
<https://health.gov/dietaryguidelines/2015/guidelines/>

76. Holman DM, White MC. Dietary behaviors related to cancer prevention among pre-adolescents and adolescents: the gap between recommendations and reality. *Nutr J*. 2011 Jun 1;10:60.

77. Dietary reference values and dietary guidelines | European Food Safety Authority <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/dietary-reference-values-and-dietary-guidelines>
78. Food-based dietary guidelines in the WHO European Region <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/disease-prevention/nutrition/publications/technical-documents/dietary-recommendations-and-nutritional-requirements/food-based-dietary-guidelines-in-the-who-european-region>
79. Food-based dietary guidelines - Spain Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/nutrition/educacion-nutricional/food-dietary-guidelines/regions/spain/es/>
80. WHO | Sugars intake for adults and children. WHO. http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sugars_intake/en/
81. Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med*. 2011 print April;17(4):448–53.
82. Catalán Ú, Rodríguez M-Á, Ras M-R, Maciá A, Mallof R, Vinaixa M, et al. Biomarkers of food intake and metabolite differences between plasma and red blood cell matrices; a human metabolomic profile approach. *Mol Biosyst*. 2013 May 7;9(6):1411–22.
83. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, et al. A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metab*. 2009 April;9(4):311–26.
84. Geidenstam N, Spégel P, Mulder H, Filipsson K, Ridderstråle M, Danielsson APH. Metabolite profile deviations in an oral glucose tolerance test—a

comparison between lean and obese individuals. *Obesity*. 2014 Nov 1;22(11):2388–95.

85. Morris C, O'Grada C, Ryan M, Roche HM, Gibney MJ, Gibney ER, et al. The relationship between BMI and metabolomic profiles: a focus on amino acids. *Proc Nutr Soc*. 2012 Nov;71(4):634–8.

86. Perng W, Gillman MW, Fleisch AF, Michalek RD, Watkins SM, Isganaitis E, et al. Metabolomic profiles and childhood obesity. *Obes Silver Spring Md*. 2014 Dec;22(12):2570–8.

87. Reinehr T, Wolters B, Knop C, Lass N, Hellmuth C, Harder U, et al. Changes in the serum metabolite profile in obese children with weight loss. *Eur J Nutr*. 2015 Mar;54(2):173–81.

88. Kelishadi R, Hashemipour M, Sheikh-Heidar A, Ghatreh-Samani S. Changes in serum lipid profile of obese or overweight children and adolescents following a lifestyle modification course. *ARYA Atheroscler*. 2012;8(3):143–8.

89. Wahl S, Yu Z, Kleber M, Singmann P, Holzapfel C, He Y, et al. Childhood obesity is associated with changes in the serum metabolite profile. *Obes Facts*. 2012;5(5):660–70.

90. Bain JR, Stevens RD, Wenner BR, Ilkayeva O, Muoio DM, Newgard CB. Metabolomics Applied to Diabetes Research Moving From Information to Knowledge. *Diabetes*. 2009 Nov 1;58(11):2429–43.

91. WHO | Application tool <http://www.who.int/growthref/tools/en/>

92. Slaughter MH, Lohman RA, Boileau RA, Horswill CA, Stillman RJ, Vanloan MD, et al. Skinfold Equations for Estimation of Body Fatness in Children and Youth. *Human Biology*, Vol 60, n.5 709-723; 1988.

93. Ortega RM, López-Sobaler AM, Andrés P, Requejo AM, Aparicio A,

BIBLIOGRAFÍA

Molinero LM. Programa DIAL para valoración de dietas y cálculos de alimentación.. Departamento de Nutrición (UCM) y Alce Ingeniería, S.L. Madrid, España.; Available from: <http://www.alceingenieria.net/nutricion/descarga.htm>.

94. Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Anal Chem*. 2006 Feb 1;78(3):779–87.

95. Vinaixa M, Samino S, Saez I, Duran J, Guinovart JJ, Yanes O. A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data. *Metabolites*. 2012 Oct 18;2(4):775–95.

96. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, et al. HMDB 3.0—The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan 1;41(D1):D801–7.

97. López-Ibáñez J, Pazos F, Chagoyen M. MBROLE 2.0—functional enrichment of chemical compounds. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jul 8;44(W1):W201–4.

98. Xia J, Sinelnikov IV, Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jul 1;43(W1):W251–7.

99. Smallwood T, Allayee H, Bennett BJ. Choline Metabolites: Gene by Diet Interactions. *Curr Opin Lipidol*. 2016 Feb;27(1):33.

100. Guzzaloni G, Grugni G, Mazzilli G, Moro D, Morabito F. Comparison between [beta]-cell function and insulin resistance indexes in prepubertal and pubertal obese children. *Metabolism*. 2002 Agosto;51(8):1011–6.

101. Reinehr T, Wolters B, Knop C, Lass N, Holl RW. Strong Effect of Pubertal Status on Metabolic Health in Obese Children: A Longitudinal Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Jan 1;100(1):301–8.

102. Solorzano CMB, McCartney CR. Obesity and the pubertal transition in girls and boys. *Reproduction*. 2010 Sep 1;140(3):399–410.
103. FAO/WHO/UNU. Human energy requirements. 2004 <http://www.fao.org/docrep/007/y5686e/y5686e00.HTM>
104. Obesidad Infantil. Recomendaciones del Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría. Parte II. Diagnóstico. Comorbilidades. Tratamiento | Asociación Española de Pediatría <http://www.aeped.es/comite-nutricion/documentos/obesidad-infantil-recomendaciones-comite-nutricion-asociacion-espanola-pediatria-0>
105. Johnson RK, Appel LJ, Brands M, Howard BV, Lefevre M, Lustig RH, et al. Dietary Sugars Intake and Cardiovascular Health. *Circulation*. 2009 Sep 15;120(11):1011–20.
106. Nishida C, Uauy R, Kumanyika S, Shetty P. The Joint WHO/FAO Expert Consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications . *Public Health Nutrition*. 2004.
107. Del Mar Bibiloni M, Tur JA, Morandi A, Tommasi M, Tomasselli F, Maffei C. Protein Intake as a Risk Factor of Overweight/Obesity in 8- to 12-Year-Old Children. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Dec;94(52):e2408.
108. Pimpin L, Jebb S, Johnson L, Wardle J, Ambrosini GL. Dietary protein intake is associated with body mass index and weight up to 5 y of age in a prospective cohort of twins. *Am J Clin Nutr*. 2015 Dec 30;ajcn118612.
109. Escribano J, Luque V, Ferre N, Mendez-Riera G, Koletzko B, Grote V, et al. Effect of protein intake and weight gain velocity on body fat mass at 6 months of age: The EU Childhood Obesity Programme. *Int J Obes*. 2012 Apr;36(4):548–53.
110. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas M-I, Corella D, Arós F, et al. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *N Engl J*

Med. 2013;368(14):1279–90.

111. Masquio DCL, de Piano A, Campos RMS, Sanches PL, Carnier J, Corgosinho FC, et al. Reduction in saturated fat intake improves cardiovascular risks in obese adolescents during interdisciplinary therapy. *Int J Clin Pract.* 2015 May 1;69(5):560–70.

112. Mikkilä V, Räsänen L, Raitakari OT, Pietinen P, Viikari J. Longitudinal changes in diet from childhood into adulthood with respect to risk of cardiovascular diseases: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Eur J Clin Nutr.* 2004 Jul;58(7):1038–45.

113. EFSA - Scientific Opinion of the NDA Panel: Dietary fibre related health claims <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1735.htm>

114. Miller SJ, Batra AK, Shearrer GE, House BT, Cook LT, Pont SJ, et al. Dietary fibre linked to decreased inflammation in overweight minority youth. *Pediatr Obes.* 2016 Feb;11(1):33–9.

115. Damsgaard CT, Biltoft-Jensen A, Tetens I, Michaelsen KF, Lind MV, Astrup A, et al. Whole-Grain Intake, Reflected by Dietary Records and Biomarkers, Is Inversely Associated with Circulating Insulin and Other Cardiometabolic Markers in 8- to 11-Year-Old Children. *J Nutr.* 2017 May 1;147(5):816–24.

116. Shinozaki K, Okuda M, Sasaki S, Kunitsugu I, Shigeta M. Dietary Fiber Consumption Decreases the Risks of Overweight and Hypercholesterolemia in Japanese Children. *Ann Nutr Metab.* 2015;67(1):58–64.

117. Serra-Majem L, Ribas L, Ngo J, Ortega RM, García A, Pérez-Rodrigo C, et al. Food, youth and the Mediterranean diet in Spain. Development of KIDMED, Mediterranean Diet Quality Index in children and adolescents. *Public Health Nutr.* 2004;7(07):931–5.

118. Mariscal-Arcas M, Rivas A, Velasco J, Ortega M, Caballero AM, Olea-

Serrano F. Evaluation of the Mediterranean Diet Quality Index (KIDMED) in children and adolescents in Southern Spain. *Public Health Nutr.* 2009;12(09):1408–12.

119. del Mar Bibiloni M, Pons A, Tur JA. Compliance with the Mediterranean Diet Quality Index (KIDMED) among Balearic Islands' Adolescents and Its Association with Socioeconomic, Anthropometric and Lifestyle Factors. *Ann Nutr Metab.* 2015 Nov 21;68(1):42–50.

120. McGovern L, Johnson JN, Paulo R, Hettinger A, Singhal V, Kamath C, et al. Treatment of Pediatric Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Dec 1;93(12):4600–5.

121. Benson AC, Torode ME, Singh MAF. Muscular strength and cardiorespiratory fitness is associated with higher insulin sensitivity in children and adolescents. *Int J Pediatr Obes IJPO Off J Int Assoc Study Obes.* 2006;1(4):222–31.

122. Davis CL, Pollock NK, Waller JL, et al. Exercise dose and diabetes risk in overweight and obese children: A randomized controlled trial. *JAMA.* 2012 Sep 19;308(11):1103–12.

123. Ruiz JR, Ortega FB, Warnberg J, Sjöström M. Associations of low-grade inflammation with physical activity, fitness and fatness in prepubertal children; the European Youth Heart Study. *Int J Obes.* 2007 Jul 24;31(10):1545–51.

124. Crespo CJ SE. Television watching, energy intake, and obesity in us children: Results from the third national health and nutrition examination survey, 1988-1994. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2001 Mar 1;155(3):360–5.

125. Reinehr T, Andler W. Changes in the atherogenic risk factor profile according to degree of weight loss. *Arch Dis Child.* 2004 May;89(5):419–22.

126. Reinehr T, Lass N, Toschke C, Rothermel J, Lanzinger S, Holl RW. Which

Amount of BMI-SDS Reduction Is Necessary to Improve Cardiovascular Risk Factors in Overweight Children? *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Aug 1;101(8):3171–9.

127. Ford AL, Hunt LP, Cooper A, Shield JPH. What reduction in BMI SDS is required in obese adolescents to improve body composition and cardiometabolic health? *Arch Dis Child.* 2010 Apr;95(4):256–61.

128. Protocolos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición | Asociación Española de Pediatría <http://www.aeped.es/documentos/protocolos-gastroenterologia-hepatologia-y-nutricion>

129. Pedrosa C, Oliveira BMPM, Albuquerque I, Simões-Pereira C, Vaz-de-Almeida MD, Correia F. Markers of metabolic syndrome in obese children before and after 1-year lifestyle intervention program. *Eur J Nutr.* 2011 Sep 1;50(6):391–400.

130. Blüher S, Petroff D, Wagner A, Warich K, Gausche R, Klemm T, et al. The one year exercise and lifestyle intervention program KLAKS: Effects on anthropometric parameters, cardiometabolic risk factors and glycemic control in childhood obesity. *Metabolism.* 2014 Mar;63(3):422–30.

131. Ebe D'adamo, Leonibus C de, Giannini C, Corazzini V, Alessandra de Remigis, Chiarelli F, et al. Thyroid dysfunction in obese pre-pubertal children: Oxidative stress as a potential pathogenetic mechanism. *Free Radic Res.* 2012 Mar 1;46(3):303–9.

132. Meikle PJ, Summers SA. Sphingolipids and phospholipids in insulin resistance and related metabolic disorders. *Nat Rev Endocrinol.* 2017 Feb;13(2):79–91.

133. Ng ML, Wadham C, Sukocheva OA. The role of sphingolipid signalling in diabetes-associated pathologies (Review). *Int J Mol Med.* 2017 Feb 1;39(2):243–

52.

134. Rodríguez-Cuenca S, Pellegrinelli V, Campbell M, Oresic M, Vidal-Puig A. Sphingolipids and glycerophospholipids – The ‘ying and yang’ of lipotoxicity in metabolic diseases. *Prog Lipid Res.* 2017 Apr;66:14–29.

135. Bergman BC, Brozinick JT, Strauss A, Bacon S, Kerege A, Bui HH, et al. Serum sphingolipids: relationships to insulin sensitivity and changes with exercise in humans. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2015 Aug 15;309(4):E398.

136. Haus JM, Kashyap SR, Kasumov T, Zhang R, Kelly KR, DeFronzo RA, et al. Plasma Ceramides Are Elevated in Obese Subjects With Type 2 Diabetes and Correlate With the Severity of Insulin Resistance. *Diabetes.* 2009 Feb;58(2):337–43.

137. Plasma ceramides are elevated in female children and adolescents with type 2 diabetes : *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* [Internet]. 2013 [cited 2017 May 29]. Available from: <https://www-degruyter-com.sire.ub.edu/view/j/jpem.2013.26.issue-9-10/jpem-2012-0407/jpem-2012-0407.xml>

138. Zhang Q-J, Holland WL, Wilson L, Tanner JM, Kearns D, Cahoon JM, et al. Ceramide Mediates Vascular Dysfunction in Diet-Induced Obesity by PP2A-Mediated Dephosphorylation of the eNOS-Akt Complex. *Diabetes.* 2012 Jul 1;61(7):1848–59.

139. Camerer E, Regard JB, Cornelissen I, Srinivasan Y, Duong DN, Palmer D, et al. Sphingosine-1-phosphate in the plasma compartment regulates basal and inflammation-induced vascular leak in mice. *J Clin Invest.* 2009 Jul 1;119(7):1871.

140. Ussher JR, Koves TR, Cadete VJJ, Zhang L, Jaswal JS, Swyrd SJ, et al. Inhibition of De Novo Ceramide Synthesis Reverses Diet-Induced Insulin Resistance and Enhances Whole-Body Oxygen Consumption. *Diabetes.* 2010 Oct

BIBLIOGRAFÍA

1;59(10):2453–64.

141. Chatterjee S, Bedja D, Mishra S, Amuzie C, Avolio A, Kass DA, et al. Inhibition of Glycosphingolipid Synthesis Ameliorates Atherosclerosis and Arterial Stiffness in Apolipoprotein E^{-/-} Mice and Rabbits Fed a High-Fat and -Cholesterol Diet. *Circulation*. 2014 Jun 10;129(23):2403–13.

142. Chaurasia B, Kaddai VA, Lancaster GI, Henstridge DC, Sriram S, Galam DLA, et al. Adipocyte Ceramides Regulate Subcutaneous Adipose Browning, Inflammation, and Metabolism. *Cell Metab*. 2016 Dec 13;24(6):820–34.

143. Wang DD, Toledo E, Hruby A, Rosner BA, Willett WC, Sun Q, et al. Plasma Ceramides, Mediterranean Diet, and Incident Cardiovascular Disease in the PREDIMED Trial (Prevención con Dieta Mediterránea). *Circulation*. 2017 May 23;135(21):2028–40.

144. Oberbach A, Bergen M von, Blüher S, Lehmann S, Till H. Combined Serum Proteomic and Metabonomic Profiling After Laparoscopic Sleeve Gastrectomy in Children and Adolescents. *J Laparoendosc Adv Surg Tech*. 2011 Sep 29;22(2):184–8.

145. Huang H, Kasumov T, Gatmaitan P, Heneghan HM, Kashyap SR, Schauer PR, et al. Gastric bypass surgery reduces plasma ceramide subspecies and improves insulin sensitivity in severely obese patients. *Obes Silver Spring Md*. 2011 Nov;19(11):2235–40.

146. Kien CL, Bunn JY, Poynter ME, Stevens R, Bain J, Ikayeva O, et al. A Lipidomics Analysis of the Relationship Between Dietary Fatty Acid Composition and Insulin Sensitivity in Young Adults. *Diabetes*. 2013 Apr;62(4):1054.

147. Lankinen M, Schwab U, Kolehmainen M, Paananen J, Nygren H, Seppänen-Laakso T, et al. A Healthy Nordic Diet Alters the Plasma Lipidomic Profile in Adults with Features of Metabolic Syndrome in a Multicenter Randomized Dietary

Intervention. *J Nutr.* 2016 Apr 1;146(4):662–72.

148. Lerin C, Goldfine AB, Boes T, Liu M, Kasif S, Dreyfuss JM, et al. Defects in muscle branched-chain amino acid oxidation contribute to impaired lipid metabolism. *Mol Metab.* 2016 Oct;5(10):926–36.

149. Bennett BJ, Vallim TQ de A, Wang Z, Shih DM, Meng Y, Gregory J, et al. Trimethylamine-N-Oxide, a Metabolite Associated with Atherosclerosis, Exhibits Complex Genetic and Dietary Regulation. *Cell Metab.* 2013 Aug 1;17(1):49–60.

150. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, DuGar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature.* 2011 Apr 7;472(7341):57–63.

151. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science.* 2013 Sep 6;341(6150):1241214.

152. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006 Dec 21;444(7122):1022–3.

153. Million M, Lagier J-C, Yahav D, Paul M. Gut bacterial microbiota and obesity. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(4):305–13.

154. Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Prifti E, Pons N, Le Chatelier E, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature.* 2013 Aug 29;500(7464):585–8.

155. Tang WHW, Hazen SL. The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 2014 Oct 1;124(10):4204–11.

156. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of l-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med.* 2013 May;19(5):576–85.

BIBLIOGRAFÍA

157. Loscalzo J. Gut Microbiota, the Genome, and Diet in Atherogenesis. *N Engl J Med*. 2013 Apr 25;368(17):1647–9.
158. Tang WHW, Hazen SL. Microbiome, trimethylamine N-oxide, and cardiometabolic disease. *Transl Res*. 2017 Jan;179:108–15.
159. Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, Levison BS, Zhu W, Org E, et al. Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell*. 2015 Dec 17;163(7):1585–95.
160. Meyer KA, Benton TZ, Bennett BJ, Jacobs DR, Lloyd-Jones DM, Gross MD, et al. Microbiota-Dependent Metabolite Trimethylamine N-Oxide and Coronary Artery Calcium in the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study (CARDIA). *J Am Heart Assoc*. 2016 Oct 1;5(10):e003970.
161. Burrows TL, Martin RJ, Collins CE. A Systematic Review of the Validity of Dietary Assessment Methods in Children when Compared with the Method of Doubly Labeled Water. *J Am Diet Assoc*. 2010 Oct;110(10):1501–10.

ANEXOS

ANEXO 1.

MANUSCRITO EN REVISIÓN

Untargeted metabolomics identifies a plasma sphingolipid-related signature associated with lifestyle intervention in prepubertal children with obesity

María Jesús Leal-Witt^{1,2*}, Marta Ramon-Krauel^{1,2*}, Sara Samino^{3,4}, Marina Llobet^{1,2}, Daniel Cuadras⁵, Josep C. Jimenez-Chillaron^{1,2}, Oscar Yanes^{3,4}, and Carles Lerin^{1,2}

¹Endocrinology Department, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Barcelona 08950, Spain.

²Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Barcelona 08950, Spain.

³Metabolomics Platform, Department of Electronic Engineering (DEEEA), Universitat Rovira i Virgili, Tarragona 43003, Spain.

⁴Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Madrid 28029, Spain.

⁵Statistics Department, Sant Joan de Déu Research Foundation, Barcelona 08950, Spain.

*These authors contributed equally to this work.

Running title: Lifestyle and sphingolipids in prepubertal obesity.

Keywords: prepubertal obesity; lifestyle intervention; sphingolipids; ceramides; metabolomics

Funding: This work was supported by the Seventh Framework Programme Marie Curie FP7-PEOPLE-2011-CIG and the Spanish Government (Ministerio de Economía y Competitividad, RYC2010-06789) to CL.

Conflict of interest statement: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Corresponding author:

Carles Lerin

Endocrinology department, Institut de Recerca Sant Joan de Déu

c/Santa Rosa 39, 08950 Barcelona (Spain).

Phone: (+34) 936 009 761 / Fax: (+34) 936 009 771 / email: clerin@fsjd.org

Abstract

Objective: Early lifestyle intervention in children with obesity reduces future risk of obesity and metabolic disease during adulthood. Prepubertal children have a distinct metabolic profile than pubertal or adolescent subjects, responding differently to metabolic challenges. Thus, a deeper understanding of the pathophysiology of obesity in prepubertal children is needed to design more efficient therapeutic and preventive strategies. The aim of this study is to identify metabolic signatures associated with lifestyle intervention in a prepubertal population.

Methods: We report data from a study including 35 prepubertal children with obesity participating in the lifestyle intervention program implemented at the hospital. Clinical and anthropometric data as well as blood samples were collected at baseline and after the intervention. A liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)-based metabolomics approach was applied to obtain a comprehensive profiling of plasma samples, identifying 2581 distinct metabolite features. Principal component analysis (PCA) was performed to consolidate all features into 8 principal components (PCs), and a paired test applied to detect differences between time points.

Results: The intervention program significantly decreased mean (95% CI) BMI-SDS from 3.56 (3.29-3.84) to 3.11 (2.88-3.34) ($p < 0.001$). In the plasma metabolomic analysis, PC1 was the only component significantly altered by the intervention after adjusting for multiple comparisons (adjusted $p = 0.008$). A sphingolipid metabolism-related signature was the major contributor to PC1. Sphingolipid-related metabolites were all decreased by the intervention, and included multiple sphingomyelin, ceramide, glycosylsphingosine, and sulfatide species. The change in several sphingolipid metabolites after the intervention directly correlated to improvements in HbA1c levels.

Conclusions: Lifestyle intervention in prepubertal children with obesity induced a sphingolipid-related signature with lower circulating ceramide levels. Since increased ceramides are associated with higher risk for insulin resistance and cardiovascular disease, our data suggest that lowering ceramide levels might represent a mechanism by which lifestyle intervention decreases future metabolic risk in this young population.

Introduction

Despite vast efforts devoted to treatment and prevention, the worldwide prevalence of obesity has increased exponentially during the last decades.¹ Obesity and overweight lead to adverse effects on blood pressure, cholesterol, lipids, and insulin sensitivity, all of which are major risk factors for other metabolic disorders including type 2 diabetes and cardiovascular disease. Lifestyle intervention programs focusing on diet and exercise are currently the main strategy for prevention and treatment of these diseases. However, the implementation of these intervention programs at a population level has proven challenging.²⁻⁴

Obesity in children is of particular concern, as excessive weight gained during childhood can be tracked into later life.⁵⁻⁷ Notably, prepubertal children show a distinct metabolic profile than pubertal or adolescent subjects, and respond differently to metabolic challenges.^{8,9} Pubertal development physiologically decreases insulin sensitivity impacting a number of metabolic pathways, including proteolysis, lipid metabolism, and glucose homeostasis.⁸ Indeed, entering puberty is a main predictor of metabolic dysregulation in children with obesity.⁹ Thus, a deeper understanding of the pathophysiology of obesity specifically in prepubertal children is urgently needed in order to design more efficient therapeutic and preventive strategies.

The advent of metabolomic technologies during the last decade has provided very valuable tools to study metabolic diseases.¹⁰ Taking advantage of these tools, several studies have identified biomarkers associated with obesity, insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease risk in adult subjects, including branched-chain amino acids (leucine, isoleucine, and valine), phenylalanine, tyrosine, betaine, acylcarnitines, and lysophosphatidylcholines.¹¹⁻¹⁶ Fewer metabolomic studies have been performed in children. Untargeted metabolomic approaches to study prepubertal and pubertal mixed populations revealed a branched-chain amino acid metabolism pattern, an androgen hormone signature, and altered acylcarnitine levels present in subjects with obesity compared to normal weight controls.^{17,18} Other studies using targeted metabolomics identified alterations in plasma levels of several amino acids, lysophosphatidylcholines, and short- and medium-chain acylcarnitines in populations of prepubertal, pubertal, and adolescent subjects with obesity compared to lean controls.^{19,20} Some of these metabolic alterations, including glutamine, methionine, and lysophosphatidylcholines were reversed after weight-loss interventions, indicating a direct relationship to overweight or changes in lifestyle.^{21,22} Here, we report data from an observational longitudinal study exclusively in prepubertal children with obesity, in which we applied an untargeted metabolomic approach to obtain a comprehensive metabolomic profiling of plasma samples before and after a lifestyle intervention program.

Subjects and Methods

Study participants

This is an observational study of the effects of lifestyle intervention in a prepubertal children with obesity. The study was approved by the Hospital's Ethic Committee (Comité Ètic d'Investigació Clínica – CEIC). Pediatric patients with high-degree of obesity and non-responsive to primary care protocols for treatment are usually referred from the primary care centers to the Obesity Unit at the Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona (Spain). The routine therapeutic protocol applied at the Hospital is a family-based lifestyle intervention program. The study initially included 53 obese children attending the Obesity Unit at the Hospital, recruited between the months of January 2013 and December 2014. All parents signed an informed consent document. Inclusion criteria were children a) age from 7 to 10 year-old; b) with obesity, defined as BMI-SDS greater than two standard deviations for a given age and sex, using the World Health Organization (WHO) standards; c) prepubertal, defined as Tanner stage I breast development for girls and testicular volume less than 4 ml in boys. Exclusion criteria included any form of endogen obesity, major congenital or chronic disease, drug-induced obesity, use of drugs for weight loss, involvement in another weight-loss program, as well as subjects without a signed informed consent. Finally, subjects with pubertal signs at the 6-month visit were also excluded from the study.

Lifestyle intervention program

Subjects were recruited at the Obesity Unit by the pediatric endocrine physician. At the first visit, parents signed the informed consent and all relevant clinical and anthropometric data was obtained. Blood sampling and first interview with the nutritionist (with at least one of the parents present) was performed within the next 10 days (baseline time point). Personalized counseling was achieved with an individual interview. We used motivational interviewing primarily focused on

behavioral changes to improve lifestyle of all family members. Nutritional counseling followed the recommendations of the Department of Health of the autonomous government of Catalonia (Spain), based on the Mediterranean diet and in agreement with the WHO. Such diet consists in 55% of kcal from carbohydrates (less than 10% of sugars), 15% of kcal from protein, and 30% of kcal from lipids (less than 10% saturated fat). We used visual laminated support material, including food models and plates, to educate on portion size. We helped patients and families designing food menus emphasizing the importance of variety and quality, as well as the cooking method. Additionally, participants were encouraged to choose healthy nutrition options and to incorporate a minimum of 30 min of physical exercise per day into their lives. Subjects had follow-up interviews with the nutritionist 2 weeks and 3 months after the initial interview, to review changes made and set new goals. The 6-month visit, which included blood sampling, was scheduled with the pediatric endocrinologist who gave feedback to the family on clinical outcomes (6m time point). Finally, participants came to a follow-up visit 1 year after the end of the intervention program (18-month time point) when anthropometric data was collected.

Physiologic and biochemical analysis

All data and samples were obtained at baseline and after the intervention program (6-month time point). We measured weight (kg) and height (mt) with light clothing in a calibrated scale and rigid stadiometer. Body mass index (BMI) was calculated, and BMI-SDS for a given age and sex was obtained by using “Anthro Plus” software (WHO). Blood pressure was measure in the right arm using an automated system with the appropriate sleeve size for the arm diameter. Waist circumference was determined as middle point between the last rib and iliac crest. Blood samples were taken after 8 to 10 hours of overnight fast in tubes containing EDTA, and plasma was immediately separated, aliquoted, and stored at

-80°C until further use. Glucose, insulin, glycated hemoglobin (HbA1c), lipid profile (total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides), and liver enzymes (AST, ALT) were measured using standard protocols at the Hospital's clinical laboratory. Nutritional data was evaluated at baseline and 6-month time point by using the qualitative KidMed questionnaire that measures adherence to Mediterranean Diet.²³ The KidMed test is a 15-item scale scored as following: 0-3 points is considered poor adherence, 4-7 points medium adherence, and ≥ 8 points high adherence to Mediterranean diet.

Plasma metabolomic analysis

Plasma aliquots (25 μL) were thawed at 4°C and briefly vortex-mixed. Proteins were precipitated by the addition of 475 μL cold methanol/water (8:1 vol/vol) followed by 3 min of ultrasonication and 10 s of vortex-mixing. Samples were subsequently maintained on ice for 10 min. After centrifugation (10 min, 19,000 g, 4°C), 100 μL of supernatant were transferred to a LC autosampler vial. Samples were then injected into an UHPLC system (1290 Agilent) coupled to a quadrupole time of flight (QTOF) mass spectrometer (6550 Agilent Technologies) operated in positive electrospray ionization (ESI+) mode. Metabolites were separated using HILIC (ACQUITY UPLC BEH 1.7 μm , Waters) chromatography at a flow rate of 0.4 mL/min. The solvent system was A = 50 mM NH_4OAc in water, and B = ACN. The linear gradient elution started at 95% B (time 0–2 min) and finished at 55% B (6 min). The injection volume was 2 μL . ESI conditions were gas temperature, 225°C; drying gas, 13 L/min; nebulizer, 20 psig; fragmentor, 125 V; and skimmer, 65 V. The instrument was set to acquire over the m/z range 80–1200 with an acquisition rate of 4 spectra per second. Quality control samples (QC), consisting of pooled plasma samples from all patients, were injected before the first study sample, and then periodically after five study samples. Samples were randomized to reduce systematic error associated with instrumental drift. LC-MS (HILIC ESI+

mode) data were processed using the XCMS software (version 1.38.0) to detect and align features.²⁴ A feature is defined as a molecular entity with a unique m/z and a specific retention time. XCMS analysis of these data provided a matrix containing the retention time, m/z value, and integrated peak area of greater than 7400 features. Only the integrated areas of those metabolite features above 5,000 spectral counts in at least one of the groups were considered for quantification. The tab-separated text files containing LC-MS data were imported into Rstudio (version 3.0.2) where QC samples were used to filter analytical variation as previously described²⁵ From the resulting 2647 features, 66 showed below detectable level readings in at least one sample, and were eliminated from the analysis. The resulting matrix of 2581 features was used for multivariate statistical analysis, and selected features were identified using the HMDB²⁶ and Metlin database. Identified metabolites were then used as input in MBRole 2.0 (ref. 27) to perform pathway enrichment (KEGG pathways). To validate metabolic features, MS/MS was performed in targeted mode, with the instrument set to acquire over the m/z range 40–950, with a default iso width of 1.4 m/z . Collision energy was fixed at 20 V. Metabolites were identified conforming to Level 2, as specified by the Metabolomics Standards Initiative²⁸ (i.e., putatively annotated compound) since their accurate mass and experimental MS/MS spectra coincide with the expected fragmentation pattern of lipid families or by comparison with chemical standards from the METLIN database. All spectra data have been deposited at the EMBL-EBI MetaboLights database (<https://www.ebi.ac.uk/metabolights/>, accession number MTBLS423).

Statistical analysis

Unless otherwise stated, normally distributed variables are described by mean and standard deviation (SD), and non-normally distributed variables by median

and interquartile range (IQR). Data were compared between baseline and 6-month time point by two-tail paired t-test for normal distribution, or Wilcoxon matched pairs signed-rank test for non-normal distribution. Principal component analysis with minimum residuals as factoring method was performed on the log₂-transformed metabolomic matrix, assessed on each subject at baseline and 6-month time point. Eight factors, accounting for a cumulative variance of 58%, were extracted with the Varimax rotation method to produce interpretable components. Wilcoxon matched pairs signed-rank test was used to compare baseline and 6-month factor scores, and Bonferroni correction was applied to adjust for multiple comparisons. Metabolic features with loadings $> |0.75|$ were considered to significantly contribute to a given factor. To assess differences in individual metabolites between baseline and 6-month, concentrations were evaluated as z scores (centered at 0 and standardized) after log₂ transformation. Partial Spearman correlations adjusted for sex, age, and baseline BMI-SDS were used to measure the dependence between numerical variables. R 3.3.2 (2016, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) was used for all statistical calculations. P-values less than 0.05 were considered significant.

Results

Physiologic and biochemical effects of the lifestyle intervention program

Fifty-three subjects with obesity (BMI-SDS>2) were initially enrolled in the intervention program. Among participants, five voluntarily withdraw from the program, six showed pubertal status at the 6-month time point, and two presented altered OGTT performed by medical indication. Furthermore, three showed altered C-reactive protein levels suggesting concomitant infection and were therefore excluded from the metabolomics analysis and two refused to provide a blood sample at the post-intervention visit. Thus, we analyzed paired samples (baseline and 6-month) from 35 exclusively prepubertal subjects with obesity. Baseline and post-intervention anthropometric and biochemical characteristics of all subjects are reported in Table 1. Lifestyle intervention significantly decreased BMI-SDS by 0.45 units ($p<0.001$, Table 1), and reduced waist circumference by 1.8 cm ($p<0.001$, Table 1). Notably, improvements in BMI-SDS levels were maintained one year after the end of the intervention program (Table S1). Subjects showed a modest increase in fasting glucose, triglyceride, and cholesterol levels after the intervention, while insulin levels and HOMA-IR were not modified (Table 1). However, HbA1c levels were significantly lowered by lifestyle intervention ($p<0.001$, Table 1). To assess the impact of the intervention program on participants' diet, we performed a qualitative dietary study before and after the intervention by applying the KidMed test. The lifestyle intervention program increased the adherence to the Mediterranean diet, as shown by the increase in the number of subjects with a higher score after the intervention (Table S2).

Effects of lifestyle intervention on the plasma metabolome

We applied an unbiased approach using LC-MS to obtain a comprehensive metabolic profiling from fasting plasma samples at baseline and at the 6-month

time point. This untargeted metabolomics approach identified a total of 2581 distinct metabolite features. Peak intensity values, mass, and retention times for all features are included in Table S3. We applied unsupervised principal component analysis (PCA) to consolidate metabolite features into 8 factors, which explained 58% of total variance. Figure 1A shows the score plot of the first 2 components, accounting for 26.1% of cumulative variance. We then performed a paired analysis of the principal components between baseline and the 6-month time point, and observed a decrease in principal component 1 (PC1) after adjusting for multiple comparisons (adj. $p=0.008$, Figure 1B). None of the other components significantly differed among groups (Figure 1B). Metabolic features highly contributing to PC1 (those with loadings $> |0.75|$) are shown in Table S4. Notably, PC1 was mostly comprised of a combination of sphingomyelin, ceramide, and glycosphingolipid species, and to a lesser extent phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, diacylglycerol, and triacylglycerol molecules. Indeed, pathway enrichment analysis of the contributing features identified the sphingolipid metabolism pathway as the main contributor to this component (FDR $q=2.19E-11$, Table S5). Multiple metabolic features from PC1 were further identified using LC-MS/MS (Table S4). Validated metabolites from the sphingolipid metabolism pathway included a number of sphingomyelin, ceramide, monoglycosylceramide (glucosyl- or galactosylceramide), diglycosylceramide (galabiosyl- or lactosylceramide), and sulfatide (3-o-sulfogalactosylceramide) species. All these metabolites were significantly decreased after the intervention compared to baseline levels (Figures 2A-2D).

Associations between sphingolipid-related metabolites and physiological parameters

Sphingolipids have been consistently associated with obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes in human subjects.²⁹⁻³¹ Thus, we next analyzed whether

lifestyle intervention-induced differences in sphingolipid levels were associated with changes in physiological parameters, including BMI-SDS, HOMA-IR, and HbA1c. The decrease in sphingolipid levels induced by the intervention was not associated with changes from baseline to the 6-month time point in BMI-SDS or HOMA-IR (Table 2). Remarkably, the improvement in HbA1c levels from baseline to the 6-month time point was directly associated with the decrease in several sphingolipids, including sphingomyelin, ceramide, glycosphingolipid, and sulfatide species, even after adjusting for gender, age, and baseline BMI-SDS (Table 2).

Discussion

Prepubertal children are metabolically distinct than pubertal or adolescent subjects, with pubertal development physiologically decreasing insulin sensitivity⁸ and accelerating metabolic dysregulation in patients with obesity.⁹ Thus, early interventions in prepubertal individuals are crucial to decrease future risk of disease. Lifestyle interventions mainly based on a healthy diet and physical activity are the current strategy for childhood obesity treatment.³² However, such interventions in young children are complex, often achieving only a temporary and modest reduction in BMI. A decrease of 0.25 units in BMI-SDS is considered sufficient to improve metabolic health parameters in children and adolescents.³³ The prepubertal patients enrolled in our study had been non-responsive to primary care protocols for obesity prevention and treatment, and showed a high degree of obesity (baseline BMI-SDS of 3.56 units). The lifestyle intervention program implemented at the hospital resulted in a mean decrease of 0.45 units in BMI-SDS and of 1.8 cm in waist circumference. Importantly, the improvement in BMI-SDS was maintained up to one year after the end of the intervention. Despite this significant decrease in BMI-SDS, subjects still showed a markedly high level of obesity after the intervention (6-month BMI-SDS of 3.11 units), and we observed no improvements in HOMA-IR, triglyceride, or cholesterol levels. However, HbA1c levels showed a significant reduction after the intervention. HbA1c is a more stable biomarker of glucose homeostasis over time than fasting glucose or insulin levels, and therefore these data suggest that the intervention improved long-term glycemic control.

Our untargeted metabolic profiling identified a strong sphingolipid metabolism-related signature associated with lifestyle intervention in prepubertal children with obesity. Sphingolipids are basic constituents of the membrane lipid bilayer, and include sphingomyelins, ceramides, and glycosphingolipids.³⁴ Sphingolipids

protect against external factors, and also function as crucial signaling molecules in a wide array of biological processes, including apoptosis, proliferation, inflammation, autophagy, and differentiation. Notably, obesity and insulin resistance have been consistently associated with altered sphingolipid metabolism and increased circulating ceramide levels in humans.²⁹⁻³¹ In children and adolescents, targeted metabolomics identified altered sphingomyelin/phosphatidylcholine ratios associated with obesity (age range 6-15 year-old) compared to normal weight controls,¹⁹ suggesting impaired sphingolipid metabolism. Experimental animal models have demonstrated that increased sphingolipid levels contribute to the development of obesity and related metabolic disorders, including insulin resistance and cardiovascular disease.^{35, 36} Thus, modulating sphingolipid metabolism is being actively investigated as a target for therapeutic strategies. Indeed, targeted genetic deletions or pharmacological inhibition of ceramide, glycosphingolipid, or sphingomyelin synthesis in mouse models significantly improves glucose tolerance, insulin sensitivity, and atherosclerosis.³⁷⁻⁴¹ Therefore, our data suggest that decreasing circulating ceramides in prepubertal children might be an important mechanism to reduce future metabolic and cardiovascular risk. In this context, the decrease in multiple circulating sphingolipid species induced by the intervention was associated with improvements in HbA1c levels, suggesting that decreasing ceramide levels has a long-term effect on glycemic control. Further studies will be required to determine whether targeting sphingolipid metabolism or ceramide levels during early childhood improve HbA1c levels and can be beneficial to decrease future metabolic risk during adolescence and adulthood.

A number of weight-loss intervention studies in different populations have shown an impact of weight-loss interventions in sphingolipid metabolism. For instance, a study in adolescents showed a decrease in of sphingomyelin levels after laparoscopic sleeve gastrectomy surgery.⁴² In adult subjects, gastric bypass

surgery resulted in decreased ceramide levels correlating to the extent of weight loss⁴³ These studies suggest obesity-related alterations in sphingolipid metabolism. However, changes in sphingolipid metabolites were not associated with the decrease in BMI-SDS in our study with prepubertal children. On the other hand, dietary interventions aimed at decreasing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in adult subjects lowered plasma sphingolipid levels without modifying body weight.^{44, 45} Specifically, higher unsaturated fat content decreased ceramide levels compared to a saturated fat-rich diet in adult subjects.⁴⁴ Also, a healthy “Nordic diet”, characterize by higher fiber and unsaturated fat content was shown to modulate ceramide levels compared to a control diet.⁴⁵ Given that sphingolipid-related metabolite levels were not associated with the reduction in BMI-SDS in our cohort, these data suggest that dietary changes induced by the lifestyle intervention program contributed to the decrease in circulating sphingolipid levels independently of the effects on BMI-SDS.

Metabolites from the BCAA pathway and acylcarnitine species have been consistently associated with obesity and insulin resistance in both adult and children subjects compared to normal weight controls.^{11, 14, 17, 19, 46} Weight-loss interventions in adults, including gastric by-pass and lifestyle interventions, reversed these changes in BCAA and acylcarnitine levels.⁴⁷⁻⁴⁹ Notably, BCAA-related metabolites and acyl-carnitines were not identified as modified by lifestyle intervention in our study with prepubertal children. Disturbances in these metabolites have been also linked to insulin resistance in prepubertal children with obesity.⁴⁶ Furthermore, adjustment for clinical and biochemical measures attenuate the associations between BCAA levels and diabetes risk in adult subjects,¹³ suggesting that increased BCAA levels may be the consequence of a combination of different factors, including obesity, fasting glucose levels, and insulin resistance. Since participants in the present study did not show changes in

HOMA-IR, these data suggest that alterations in BCAA metabolism might be more linked to insulin sensitivity rather than to BMI itself, at least in a prepubertal population. Moreover, despite the notable reduction in BMI-SDS, participants in the present study still showed a high degree of obesity after the intervention. Thus, it seems rather plausible that BCAA and acyl-carnitine levels still reflect the obesity status.

Limitations of this study include the modest sample size. Subjects showing signs of puberty at baseline or the 6-month visit were excluded from the study, substantially decreasing the potential sample size. A main strength of this study, intimately linked to the limitation in sample size, is that participants are exclusively in a prepubertal stage, avoiding potential confounding factors related to entering puberty.⁹ Further strengths include the unbiased approach, both by the use of untargeted metabolomic techniques and unsupervised principal component analysis applied to identify metabolic signatures associated with lifestyle intervention.

In summary, our data indicate that lifestyle intervention induced a sphingolipid metabolism-related signature in prepubertal children with obesity. Since sphingolipid and ceramide levels are associated with risk for insulin resistance and cardiovascular disease, our data suggest that decreasing circulating ceramides in prepubertal children might be an important mechanism to reduce future metabolic and cardiovascular risk. Further studies are warranted to determine whether targeting sphingolipid metabolism can provide a valid strategy to decrease future obesity and metabolic disease risk in prepubertal children with obesity.

Acknowledgments

We are very thankful for the families and children that voluntarily participated in the study. We are indebted to the “Biobanc de l’Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació” integrated in the Spanish Biobank Network of ISCIII for sample processing and procurement. This work was supported by the Seventh Framework Programme Marie Curie FP7-PEOPLE-2011-CIG and the Spanish Government (Ministerio de Economía y Competitividad, RYC2010-06789) to CL.

Author contributions: MJL, JCJ, MR, and CL designed the study, analyzed the data, and wrote the manuscript; MJL, ML, and MR implemented the intervention and collected data; OY and SS performed the metabolomics analysis; DC performed the statistical analysis; all authors were involved in editing the paper and had final approval of the submitted version. MJL, MR, and CL had full access to the data in the study and final responsibility for the decision to submit for publication.

References

1. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2014; **384**(9945): 766-781.
2. Forster M, Veerman JL, Barendregt JJ, Vos T. Cost-effectiveness of diet and exercise interventions to reduce overweight and obesity. *Int J Obes (Lond)* 2011; **35**(8): 1071-1078.
3. Gluckman PD, Hanson M, Zimmet P, Forrester T. Losing the war against obesity: the need for a developmental perspective. *Sci Transl Med* 2011; **3**(93): 93cm19.
4. Kahn R, Davidson MB. The reality of type 2 diabetes prevention. *Diabetes Care* 2014; **37**(4): 943-949.
5. Singh AS, Mulder C, Twisk JW, van Mechelen W, Chinapaw MJ. Tracking of childhood overweight into adulthood: a systematic review of the literature. *Obes Rev* 2008; **9**(5): 474-488.
6. Juonala M, Magnussen CG, Berenson GS, Venn A, Burns TL, Sabin MA *et al.* Childhood adiposity, adult adiposity, and cardiovascular risk factors. *N Engl J Med* 2011; **365**(20): 1876-1885.
7. Cunningham SA, Kramer MR, Narayan KM. Incidence of childhood obesity in the United States. *N Engl J Med* 2014; **370**(5): 403-411.
8. Hannon TS, Janosky J, Arslanian SA. Longitudinal study of physiologic insulin resistance and metabolic changes of puberty. *Pediatr Res* 2006; **60**(6): 759-763.
9. Reinehr T, Wolters B, Knop C, Lass N, Holl RW. Strong effect of pubertal status on metabolic health in obese children: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; **100**(1): 301-308.
10. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; **13**(4): 263-269.
11. Lerin C, Goldfine AB, Boes T, Liu M, Kasif S, Dreyfuss JM *et al.* Defects in muscle branched-chain amino acid oxidation contribute to impaired lipid metabolism. *Mol Metab* 2016; **5**(10): 926-936.
12. Ejaz A, Martinez-Guino L, Goldfine AB, Ribas-Aulinas F, De Nigris V, Ribo S *et al.* Dietary Betaine Supplementation Increases Fgf21 Levels to Improve

- Glucose Homeostasis and Reduce Hepatic Lipid Accumulation in Mice. *Diabetes* 2016; **65**(4): 902-912.
13. Walford GA, Ma Y, Clish C, Florez JC, Wang TJ, Gerszten RE *et al.* Metabolite Profiles of Diabetes Incidence and Intervention Response in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes* 2016; **65**(5): 1424-1433.
 14. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF *et al.* A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab* 2009; **9**(4): 311-326.
 15. Huffman KM, Shah SH, Stevens RD, Bain JR, Muehlbauer M, Slentz CA *et al.* Relationships between circulating metabolic intermediates and insulin action in overweight to obese, inactive men and women. *Diabetes Care* 2009; **32**(9): 1678-1683.
 16. Fiehn O, Garvey WT, Newman JW, Lok KH, Hoppel CL, Adams SH. Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women. *PLoS One* 2010; **5**(12): e15234.
 17. Perng W, Gillman MW, Fleisch AF, Michalek RD, Watkins SM, Isganaitis E *et al.* Metabolomic profiles and childhood obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2014; **22**(12): 2570-2578.
 18. Butte NF, Liu Y, Zakeri IF, Mohny RP, Mehta N, Voruganti VS *et al.* Global metabolomic profiling targeting childhood obesity in the Hispanic population. *Am J Clin Nutr* 2015; **102**(2): 256-267.
 19. Wahl S, Yu Z, Kleber M, Singmann P, Holzapfel C, He Y *et al.* Childhood obesity is associated with changes in the serum metabolite profile. *Obes Facts* 2012; **5**(5): 660-670.
 20. Mihalik SJ, Michaliszyn SF, de las Heras J, Bacha F, Lee S, Chace DH *et al.* Metabolomic profiling of fatty acid and amino acid metabolism in youth with obesity and type 2 diabetes: evidence for enhanced mitochondrial oxidation. *Diabetes Care* 2012; **35**(3): 605-611.
 21. Reinehr T, Wolters B, Knop C, Lass N, Hellmuth C, Harder U *et al.* Changes in the serum metabolite profile in obese children with weight loss. *Eur J Nutr* 2015; **54**(2): 173-181.
 22. Hellmuth C, Kirchberg FF, Lass N, Harder U, Peissner W, Koletzko B *et al.* Tyrosine Is Associated with Insulin Resistance in Longitudinal Metabolomic Profiling of Obese Children. *J Diabetes Res* 2016; **2016**: 2108909.

23. Serra-Majem L, Ribas L, Ngo J, Ortega RM, García A, Pérez-Rodrigo C *et al.* Food, youth and the Mediterranean diet in Spain. Development of KIDMED, Mediterranean Diet Quality Index in children and adolescents. *Public Health Nutrition* 2004; **7**: 931-935.
24. Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem* 2006; **78**(3): 779-787.
25. Vinaixa M, Samino S, Saez I, Duran J, Guinovart JJ, Yanes O. A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data. *Metabolites* 2012; **2**(4): 775-795.
26. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y *et al.* HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**(Database issue): D801-807.
27. Lopez-Ibanez J, Pazos F, Chagoyen M. MBROLE 2.0-functional enrichment of chemical compounds. *Nucleic Acids Res* 2016; **44**(W1): W201-204.
28. Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA *et al.* Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* 2007; **3**(3): 211-221.
29. Bergman BC, Brozinick JT, Strauss A, Bacon S, Kerege A, Bui HH *et al.* Serum sphingolipids: relationships to insulin sensitivity and changes with exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015; **309**(4): E398-408.
30. Haus JM, Kashyap SR, Kasumov T, Zhang R, Kelly KR, DeFronzo RA *et al.* Plasma Ceramides Are Elevated in Obese Subjects With Type 2 Diabetes and Correlate With the Severity of Insulin Resistance. *Diabetes* 2009; **58**(2): 337-343.
31. Lopez X, Goldfine AB, Holland WL, Gordillo R, Scherer PE. Plasma ceramides are elevated in female children and adolescents with type 2 diabetes. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2013; **26**(9-10): 995.
32. Eloranta AM, Lindi V, Schwab U, Tompuri T, Kiiskinen S, Lakka HM *et al.* Dietary factors associated with overweight and body adiposity in Finnish children aged 6-8 years: the PANIC Study. *Int J Obes* 2012; **36**(7): 950-955.
33. Reinehr T, Lass N, Toschke C, Rothermel J, Lanzinger S, Holl RW. Which Amount of BMI-SDS Reduction Is Necessary to Improve Cardiovascular Risk Factors in Overweight Children? *J Clin Endocrinol Metab* 2016; **101**(8): 3171-3179.

34. Meikle PJ, Summers SA. Sphingolipids and phospholipids in insulin resistance and related metabolic disorders. *Nat Rev Endocrinol* 2017; **13**(2): 79-91.
35. Zhang QJ, Holland WL, Wilson L, Tanner JM, Kearns D, Cahoon JM *et al*. Ceramide mediates vascular dysfunction in diet-induced obesity by PP2A-mediated dephosphorylation of the eNOS-Akt complex. *Diabetes* 2012; **61**(7): 1848-1859.
36. Camerer E, Regard JB, Cornelissen I, Srinivasan Y, Duong DN, Palmer D *et al*. Sphingosine-1-phosphate in the plasma compartment regulates basal and inflammation-induced vascular leak in mice. *J Clin Invest* 2009; **119**(7): 1871-1879.
37. Ussher JR, Koves TR, Cadete VJ, Zhang L, Jaswal JS, Swyrd SJ *et al*. Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption. *Diabetes* 2010; **59**(10): 2453-2464.
38. Chatterjee S, Bedja D, Mishra S, Amuzie C, Avolio A, Kass DA *et al*. Inhibition of glycosphingolipid synthesis ameliorates atherosclerosis and arterial stiffness in apolipoprotein E^{-/-} mice and rabbits fed a high-fat and -cholesterol diet. *Circulation* 2014; **129**(23): 2403-2413.
39. Xia JY, Holland WL, Kusminski CM, Sun K, Sharma AX, Pearson MJ *et al*. Targeted Induction of Ceramide Degradation Leads to Improved Systemic Metabolism and Reduced Hepatic Steatosis. *Cell Metab* 2015; **22**(2): 266-278.
40. Chaurasia B, Kaddai VA, Lancaster GI, Henstridge DC, Sriram S, Galam DL *et al*. Adipocyte Ceramides Regulate Subcutaneous Adipose Browning, Inflammation, and Metabolism. *Cell Metab* 2016; **24**(6): 820-834.
41. Holland WL, Brozinick JT, Wang LP, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y *et al*. Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 2007; **5**(3): 167-179.
42. Oberbach A, von Bergen M, Bluher S, Lehmann S, Till H. Combined serum proteomic and metabonomic profiling after laparoscopic sleeve gastrectomy in children and adolescents. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2012; **22**(2): 184-188.
43. Huang H, Kasumov T, Gatmaitan P, Heneghan HM, Kashyap SR, Schauer PR *et al*. Gastric bypass surgery reduces plasma ceramide subspecies and improves insulin sensitivity in severely obese patients. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 2011; **19**: 2235-2240.

44. Kien CL, Bunn JY, Poynter ME, Stevens R, Bain J, Ikayeva O *et al.* A lipidomics analysis of the relationship between dietary fatty acid composition and insulin sensitivity in young adults. *Diabetes* 2013; **62**(4): 1054-1063.
45. Lankinen M, Schwab U, Kolehmainen M, Paananen J, Nygren H, Seppanen-Laakso T *et al.* A Healthy Nordic Diet Alters the Plasma Lipidomic Profile in Adults with Features of Metabolic Syndrome in a Multicenter Randomized Dietary Intervention. *J Nutr* 2016.
46. Mastrangelo A, Martos-Moreno GA, Garcia A, Barrios V, Ruperez FJ, Chowen JA *et al.* Insulin resistance in prepubertal obese children correlates with sex-dependent early onset metabolomic alterations. *Int J Obes (Lond)* 2016; **40**(10): 1494-1502.
47. Laferrere B, Reilly D, Arias S, Swerdlow N, Gorroochurn P, Bawa B *et al.* Differential metabolic impact of gastric bypass surgery versus dietary intervention in obese diabetic subjects despite identical weight loss. *Sci Transl Med* 2011; **3**(80): 80re82.
48. Glynn EL, Piner LW, Huffman KM, Slentz CA, Elliot-Penry L, AbouAssi H *et al.* Impact of combined resistance and aerobic exercise training on branched-chain amino acid turnover, glycine metabolism and insulin sensitivity in overweight humans. *Diabetologia* 2015; **58**(10): 2324-2335.
49. Shah SH, Crosslin DR, Haynes CS, Nelson S, Turer CB, Stevens RD *et al.* Branched-chain amino acid levels are associated with improvement in insulin resistance with weight loss. *Diabetologia* 2012; **55**(2): 321-330.

Figure 1

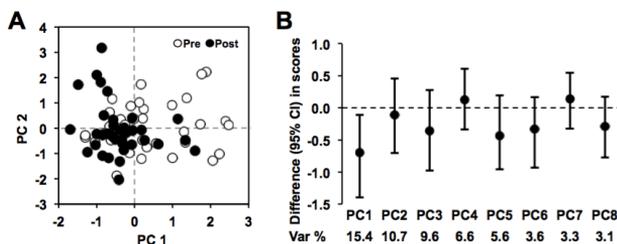


Figure 1. Principal component analysis identifies PC1 as decreased after lifestyle intervention. **A)** Score plot of principal components 1 and 2 accounting for 15.4% and 10.7% of total variance. White and black circles represent baseline and the 6-month time point data, respectively. **B)** Comparison of PC scores between baseline and 6 months. 95% CIs reflect Bonferroni's multiple comparison correction. Wilcoxon matched-pairs sign rank was applied to determine significance.

Figure 2

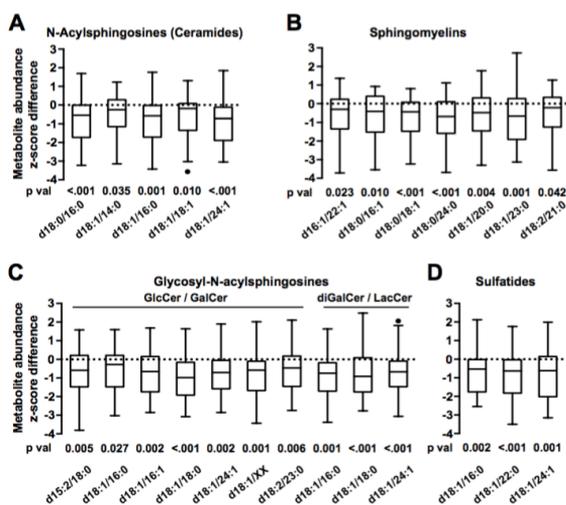


Figure 2. Lifestyle intervention decreases circulating sphingolipid levels.

Concentrations of validated sphingolipid-related metabolites contributing to PC1 were evaluated as z-scores. Differences between baseline and the 6-month time

point for **A**) N-acylsphingosines (ceramides), **B**) sphingomyelins, **C**) glycosyl-N-acylsphingosines, and **D**) sulfatides are reported in the box plots. Top and bottom of the box represent the 75th and 25th percentile, respectively. Whiskers represent the entire spread of the data points, excluding extreme points (higher or lower than the median \pm 1.5 times the interquartile range), which are indicated with circles. GlcCer, glucosylceramide; GalCer, galactosylceramide; diGalCer, galabiosylceramide; LacCer, lactosylceramide. Wilcoxon matched-pairs sign rank was applied to determine significance, and p values are reported. ^aAlternative structures d18:1/20:1 or d18:2/20:0, unresolved by MS/MS.

Table legends

Table 1. Demographic and metabolic characteristics of subjects before and after the intervention program.

| | Baseline | 6-month | p val |
|---------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Subjects | n = 35 | | |
| Sex (F/M) | 17/18 | | |
| Age (years) | 8.9 (8.6-9.3) | | |
| Weight (kg) | 54.8 (50.1-59.4) | 55.0 (50.4-59.7) | 0,627 |
| BMI-SDS | 3.56 (3.29-3.84) | 3.11 (2.88-3.34) | <0.001 |
| Waist circumference (cm) | 83.4 (80.3-86.6) | 81.7 (78.3-85.0) | 0,001 |
| Systolic Pressure (mmHg) | 112 (109-115) | 110 (107-113) | 0,332 |
| Diastolic Pressure (mmHg) | 70 (67-72) | 69 (67-71) | 0,552 |
| Fasting Glycemia (mg/dL) | 85 (82-88) | 89 (87-91) | 0,003 |
| Fasting Insulin (mU/L) | 13.2 (10.9-15.6) | 13.4 (11-15.7) | 0,838 |
| HOMA-IR | 2.80 (2.29-3.31) | 2.96 (2.42-3.5) | 0,657 |
| HbA1c (%) | 5.4 (5.3-5.4) | 5.2 (5.2-5.3) | <0.001 |
| Total Cholesterol (mg/dL) | 164 (155-174) | 178 (169-188) | <0.001 |
| LDL-Cholesterol (mg/dL) | 105 (96-114) | 114 (105-122) | 0,010 |
| HDL-Cholesterol (mg/dL) | 43 (40-47) | 45 (42-48) | 0,266 |
| TAG (mg/dL) ^a | 67 [60-95] | 80 [65-119] | 0,006 |
| ALT (UI/L) | 20.7 (18.4-23.1) | 20.9 (18.5-23.4) | 0,801 |
| AST (UI/L) | 22.1 (20.6-23.5) | 22.7 (20.9-24.5) | 0,358 |

Demographic and metabolic characteristics of subjects before and after the intervention program.

Subjects were 76% (n=26) caucasian, 12% (n=4) hispanic, 9% (n=3), north African 3% (n=1), and Asian 3% (n=1), roughly representing the distribution of the resident population of the Hospital's influence area. Normally distributed values are presented as mean (95% CI), and significance assessed by two-tail paired Student *t* test. ^aNon-normal distributed variables are presented as median [IQR], and significance assessed by Wilcoxon matched paired signed-rank test. Bold font indicates p value < 0.05.

Table 2. Correlations of intervention-induced changes in sphingolipid levels to physiologic measures.

| Metabolite | BMI-SDS | | HOMA-IR | | HbA1c | |
|---------------------------------------|---------|-------|---------|-------|-------------|--------------|
| | r | p val | r | p val | r | p val |
| N-Acylsphingosines (Ceramides) | | | | | | |
| d18:0/16:0 | -0,09 | 0,617 | 0,15 | 0,418 | 0,24 | 0,200 |
| d18:1/14:0 | -0,17 | 0,359 | 0,21 | 0,242 | 0,12 | 0,503 |
| d18:1/16:0 | -0,09 | 0,635 | 0,16 | 0,377 | 0,27 | 0,139 |
| d18:1/18:1 | -0,09 | 0,621 | 0,20 | 0,283 | 0,03 | 0,856 |
| d18:1/24:1 | -0,01 | 0,962 | 0,06 | 0,745 | 0,41 | 0,022 |
| Sphingomyelins | | | | | | |
| d16:1/22:1 ^a | -0,08 | 0,673 | 0,17 | 0,362 | 0,03 | 0,887 |
| d18:0/16:1 | -0,08 | 0,671 | 0,14 | 0,453 | 0,16 | 0,390 |
| d18:0/18:1 | 0,05 | 0,804 | 0,22 | 0,226 | 0,19 | 0,309 |
| d18:0/24:0 | -0,19 | 0,300 | 0,08 | 0,677 | 0,07 | 0,717 |
| d18:1/20:0 | -0,04 | 0,809 | 0,12 | 0,690 | 0,25 | 0,174 |
| d18:1/23:0 | -0,04 | 0,808 | 0,05 | 0,773 | 0,40 | 0,027 |
| d18:2/21:0 | -0,10 | 0,586 | 0,16 | 0,370 | 0,08 | 0,667 |
| GlcCer / GalCer | | | | | | |
| d15:2/18:0 | -0,02 | 0,901 | 0,15 | 0,423 | 0,25 | 0,168 |
| d18:1/16:0 | 0,01 | 0,944 | 0,13 | 0,493 | 0,29 | 0,113 |
| d18:1/18:0 | 0,08 | 0,662 | 0,17 | 0,344 | 0,36 | 0,046 |
| d18:1/24:1 | 0,01 | 0,936 | 0,11 | 0,551 | 0,43 | 0,016 |
| d18:1/16:1 | -0,06 | 0,744 | 0,07 | 0,713 | 0,20 | 0,277 |
| d18:1/XX ^b | -0,13 | 0,462 | -0,03 | 0,883 | 0,42 | 0,020 |
| d18:2/23:0 | 0,02 | 0,921 | 0,14 | 0,447 | 0,23 | 0,207 |
| diGalCer / LacCer | | | | | | |
| d18:1/16:0 | 0,04 | 0,810 | 0,17 | 0,355 | 0,29 | 0,114 |
| d18:1/18:0 | 0,05 | 0,794 | 0,11 | 0,539 | 0,38 | 0,036 |
| d18:1/24:1 | 0,01 | 0,952 | 0,01 | 0,970 | 0,54 | 0,002 |
| Sulfatides | | | | | | |
| d18:1/16:0 | -0,11 | 0,545 | 0,09 | 0,608 | 0,29 | 0,115 |
| d18:1/22:0 | 0,01 | 0,946 | 0,16 | 0,395 | 0,26 | 0,153 |
| d18:1/24:1 | -0,01 | 0,973 | 0,10 | 0,577 | 0,41 | 0,024 |

Correlations of intervention-induced changes in sphingolipid levels to physiologic measures.

Spearman correlations between baseline to 6-month changes in validated sphingolipid metabolites

ANEXO

to changes in BMI-SDS, HOMA-IR, and HbA1c. Correlations are adjusted for child sex, age, and baseline BMI-SDS. GlcCer, glucosylceramide; GalCer, galactosylceramide; diGalCer, galabiosylceramide; LacCer, lactosylceramide. ^aAlternative structures d18:1/20:1 or d18:2/20:0, unresolved by MS/MS. ^bAcyl chain unresolved by MS/MS. Bold font indicates $p < 0.05$.

2017

