



Universitat de Lleida

## Fisiopatologia molecular de l'obesitat prepuberal induïda per dieta hipercalòrica i la seva modulació per compostos probiòtics en un model preclínic porcí

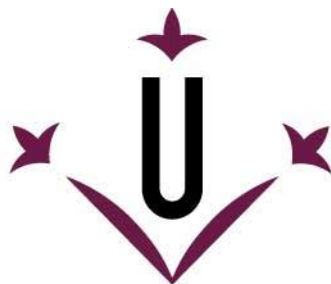
Rebeca Berdún Hernandez

<http://hdl.handle.net/10803/671866>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat de Lleida**

**TESI DOCTORAL**

**Fisiopatologia molecular de l'obesitat  
prepuberal induïda per dieta hipercalòrica i la  
seva modulació per compostos probiòtics en un  
model preclínic porcí**

Rebeca Berdún Hernandez

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de Lleida  
Programa de Doctorat en Salut

Director/a

Dra. Mariona Jové Font

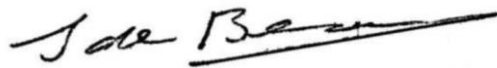
Dr. Manel Portero Otín

Lleida, Gener de 2020



*Aquesta tesi està dedicada a la meva família,  
per ser-hi sempre,  
als meus amics,  
aquells que formen la meva "segona família",  
i a tu, Alvaro,  
per ser, estar i sumar en tots els moments d'aquest camí.*

*"Em semblaria que la terra no hagués estat habitable  
si no hagués tingut a ningú a qui admirar"*

A handwritten signature in black ink, reading "Simone de Beauvoir". The signature is written in a cursive, flowing style with a long horizontal line extending from the end of the name.

*Simone de Beauvoir (1908-1986)*

*Jo us tinc a vosaltres.*



*Gràcies a totes les persones que  
directament o indirectament han fet  
possible aquesta tesi doctoral.*

*“La nostra recompensa es troba en l’esforç i no només en el resultat,  
un esforç total és una victòria completa”*

A handwritten signature in black ink, reading 'mk Gandhi'. The signature is written in a cursive, flowing style with a prominent 'm' and 'k' at the beginning.

*Mahatma Gandhi (1869-1948)*



## RESUM

---

Avui en dia, l'obesitat és considerada "l'epidèmia del segle XXI", tant pel seu increment constant en la prevalença com pel seu impacte en la mortalitat, morbiditat, qualitat de vida i cost sanitari. L'obesitat es caracteritza per un excés d'acumulació de greix corporal relacionat amb desequilibris en la ingesta calòrica i la despesa energètica bàsicament vinculat amb els canvis en l'estil de vida de la població caracteritzats per un consum de dietes hipercalòriques, riques en greixos i sucres juntament amb un estil de vida sedentari. Dades recents indiquen un increment alarmant de l'obesitat infantil amb major probabilitat de que l'obesitat que comença en la infància perduri per tota la vida. Per abordar aquest problema, les primeres línies de tractament són l'adequació de la ingesta calòrica i l'activitat física. No obstant això, aquestes recomanacions són difícils de seguir a llarg termini i la incorporació de diferents suplementes a la dieta podria ser una alternativa útil per al tractament d'aquesta patologia.

En aquest sentit, l'estratègia proposada en aquesta tesi, com a alternativa per reduir els riscos i minimitzar la gravetat i les complicacions associades a l'obesitat, és l'ús de probiòtics, basant-nos en la relació entre la microbiota intestinal i l'obesitat, per tal de manipular la composició de la microbiota a favor d'una microbiota específica i, d'aquesta manera, poder prevenir o millorar els efectes deleteris de l'obesitat. Per tant, aquesta tesi s'ha dissenyat amb l'objectiu de: i) avaluar, en primer lloc, quin és l'efecte d'una dieta hipercalòrica en un model animal prepuberal en mostres de plasma i d'escorça frontal, degut a la manca d'estudis de l'afectació de l'obesitat infantil en aquest teixit, i ii) estudiar l'efecte d'uns probiòtics com a possible intervenció nutricional utilitzant tècniques metabolòmiques.

Per assolir aquests objectius, s'ha escollit, entre els diferents models animals utilitzats per a l'estudi de l'obesitat, un model animal porcí, degut a les nombroses similituds amb els humans, al que, per una banda, se li ha induït obesitat amb una dieta hipercalòrica i, per altra banda, s'ha tractat amb els probiòtics dins d'un context de dieta hipercalòrica. Els resultats obtinguts mostren que el model porcí utilitzat és un bon model per a estudiar l'obesitat. A més, es demostra l'existència d'un perfil metabolòmic i lipidòmic específic tant en plasma com en cervell, així com canvis específics en el metaboloma i lipidoma després de la ingesta d'una dieta hipercalòrica on, la intervenció nutricional basada en probiòtics reverteix parcialment alguns dels canvis derivats de l'obesitat i genera una remodelació específica en els dos tipus de mostra estudiats. De forma general, es pot concloure que l'efecte induït per la dieta hipercalòrica en el metabolisme pot ser parcialment revertit gràcies a la utilització de probiòtics específics.





## RESUMEN

---

Hoy en día, la obesidad está considerada “la epidemia del siglo XXI”, tanto por su incremento constante en la prevalencia como por su impacto en la mortalidad, morbilidad, calidad de vida y coste sanitario. La obesidad se caracteriza por un exceso de acumulación de grasa corporal relacionada con desequilibrios en la ingesta calórica y el gasto energético básicamente vinculado con los cambios en el estilo de vida de la población caracterizados por un consumo de dietas hipercalóricas, ricas en grasas y azúcares junto con un estilo de vida sedentario. Datos recientes indican un incremento de la obesidad infantil con mayor probabilidad de que la obesidad que empieza en la infancia perdure para toda la vida. Para abordar este problema, las primeras líneas de tratamiento son la adecuación de la ingesta calórica y la actividad física. Sin embargo, estas recomendaciones son difíciles de aplicar a largo plazo y la incorporación de diferentes suplementos a la dieta podría ser una alternativa para el tratamiento de esta patología.

En este sentido, la estrategia propuesta en esta tesis, como alternativa para reducir los riesgos y minimizar la gravedad y las complicaciones asociadas a la obesidad, es el uso de probióticos, basándonos en la relación entre la microbiota intestinal y la obesidad, para manipular la composición de la microbiota a favor de una microbiota específica y, de este modo, poder prevenir o mejorar los efectos deletéreos de la obesidad. Por tanto, esta tesis se ha diseñado con el objetivo de: i) evaluar, en primer lugar, cual es el efecto de una dieta hipercalórica en un modelo animal prepuberal en muestras de plasma y de corteza frontal, debido a la falta de estudios de la afectación de la obesidad infantil en este tejido, y ii) estudiar el efecto de unos probióticos como posible intervención nutricional utilizando técnicas metabolómicas.

Para alcanzar estos objetivos, se ha escogido, entre los diferentes modelos animales utilizados para el estudio de la obesidad, un modelo animal porcino, debido a las numerosas similitudes con los humanos, al que, por un lado, se le ha inducido obesidad con una dieta hipercalórica y, por otro lado, se ha tratado con los probióticos dentro de un contexto de dieta hipercalórica. Los resultados obtenidos muestran que el modelo porcino utilizado es un buen modelo para estudiar la obesidad. Además, se muestra la existencia de un perfil metabolómico y lipidómico específico tanto en plasma como en cerebro, así como cambios específicos en el metaboloma y el lipidoma tras la ingesta de una dieta hipercalórica donde la intervención nutricional basada en probióticos revierte parcialmente algunos de los cambios derivados de la obesidad y genera una remodelación específica en los dos tipos de muestra estudiados. De forma general, se puede concluir que el efecto inducido por la dieta hipercalórica en el metabolismo puede ser parcialmente revertido gracias a la utilización de probióticos específicos.



## **ABSTRACT**

---

Nowadays, obesity is considered “the epidemic of the 21st century”, both for its constant increase in prevalence and for its impact on mortality, morbidity, quality of life and health cost. Obesity is characterized by an excess accumulation of body fat related to imbalances in caloric intake and energy expenditure basically linked to changes in the lifestyle population characterized by a consumption of hypercaloric diets, rich in fat and sugars along with a sedentary lifestyle. Recent data indicate an increase in childhood obesity with higher probability that the obesity that begins in childhood will last a lifetime. To address this problem, the first lines of treatment are the adequacy of caloric intake and physical activity. However, these recommendations are difficult to apply in a long term, and the incorporation of different supplements to the diet could be an alternative for the treatment of this pathology.

In this sense, the strategy proposed in this thesis, as an alternative to reduce risks and minimize the severity and complications associated with obesity, is the use of probiotics, given the relationship between the intestinal microbiota and obesity, to manipulate the composition of the microbiota in favor of a specific microbiota and, thus, be able to prevent or improve the deleterious effects of obesity. Therefore, this thesis has been designed with the objective of: i) evaluating the effect of the hypercaloric diet in a prepubertal animal model in plasma and frontal cortex samples, due the lack of the studies on the involvement of childhood obesity in this tissue and ii) study the effect of probiotics as a possible nutritional intervention using metabolomic techniques.

To achieve these objectives, a pig animal model has been used, among the different animal models used for the study of obesity, due to the numerous similarities with humans, which, on the one hand, has been induced obesity with a hypercaloric diet and, on the other hand, it has been treated with probiotics within a context of hypercaloric diet. The results obtained show that the pig model used is a good model to study obesity. In addition, it shows the existence of a specific metabolomic and lipidomic profile in both plasma and brain, as well as specific changes in the metabolome and lipidome after the ingestion of a hypercaloric diet where the probiotic-based nutritional intervention partially reverses some of the changes derived from obesity and generates a specific remodeling in both the metabolome and lipidome of the two types of samples studied. In general, it can be concluded that the effects induced by the hypercaloric diet on the metabolism can be partially reversed thanks to the use of specific probiotics.



# ÍNDEX



# ÍNDIX

---

RESUM.....	7
RESUMEN .....	9
ABSTRACT .....	11
ÍNDIX .....	15
ÍNDIX DE TAULES.....	18
ÍNDIX DE FIGURES .....	21
ABREVIACIONS .....	27
<b>1. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>33</b>
1.1. Obesitat.....	33
1.1.1 Epidemiologia.....	33
1.1.2 Diagnòstic clínic i mesura de la distribució de greix.....	34
1.1.3 Etiologia.....	36
1.1.4 Fisiopatologia .....	37
1.1.5 Comorbiditats derivades de l'obesitat infantil.....	39
1.1.6 Models animals per a l'estudi de l'obesitat .....	42
1.2. Metabolòmica.....	44
1.2.1 Passat, present i futur de la metabolòmica .....	45
1.2.2 Lipidòmica .....	57
1.3. Metabolòmica i lipidòmica en obesitat .....	71
1.4. Estrès oxidatiu i obesitat.....	75
1.4.1 La cadena de transport d'electrons com a principal productor de ROS .....	77
1.4.2 Productes d'oxidació .....	78
1.5. Intervencions nutricionals basades en probiòtics.....	82
1.5.1 Microbiota intestinal.....	83
1.5.2 Paper potencial de la microbiota en el desenvolupament de l'obesitat.....	84
1.5.3 Probiòtics .....	85
<b>2. HIPÒTESI I OBJECTIUS .....</b>	<b>93</b>
2.1. Hipòtesi de partida.....	93
2.2. Objectius .....	94
<b>3. MATERIALS I MÈTODES.....</b>	<b>97</b>
3.1. Animals i disseny experimental .....	97
3.2. Dietes .....	97
3.3. Població i obtenció de les mostres humanes.....	98
3.4. Exploració de tomografia computeritzada i anàlisi d'imatges .....	99
3.5. Determinació dels paràmetres bioquímics .....	99



3.6.	Processament previ de la mostra.....	100
3.6.1	Homogeneització de la mostra .....	100
3.6.2	Quantificació de proteïnes .....	100
3.7.	Anàlisi metabòlic.....	100
3.7.1	Anàlisi metabòlic no dirigit .....	100
3.7.2	Anàlisi metabòlic dirigit .....	102
3.8.	Anàlisi lipídomic .....	106
3.8.1	Anàlisi lipídomic no dirigit .....	106
3.8.2	Anàlisi lipídomic dirigit .....	108
3.9.	Anàlisi composicional dels àcids grassos .....	118
3.9.1	Preparació de la mostra .....	118
3.9.2	Sistema cromatogràfic .....	118
3.9.3	Condicions cromatogràfiques .....	118
3.9.4	Quantificació dels analits .....	119
3.9.5	Índexs calculats .....	119
3.9.6	Anàlisi de dades.....	120
3.10.	Quantificació de marcadors de modificació oxidativa .....	120
3.10.1	Preparació de la mostra .....	120
3.10.2	Sistema cromatogràfic .....	121
3.10.3	Condicions cromatogràfiques .....	121
3.10.4	Quantificació dels analits .....	121
3.10.5	Control de qualitat intern.....	122
3.10.6	Anàlisi de dades.....	122
3.11.	Immunodetecció per Western Blot.....	122
3.11.1	Preparació de la mostra .....	122
3.11.2	Electroforesi .....	122
3.11.3	Electrotransferència .....	123
3.11.4	Bloqueig de la membrana .....	123
3.11.5	Immunodetecció .....	123
3.11.6	Revelat i anàlisi de dades .....	124
3.11.7	Anàlisi de dades.....	124
<b>4.</b>	<b>RESULTATS.....</b>	<b>127</b>
4.1.	Estudi dels efectes de l'obesitat induïda per dieta en el perfil metabòlic i lipídomic plasmàtic: caracterització d'un model experimental porcí en època prepuberal .....	127
4.1.1	Característiques morfològiques i bioquímiques del model d'obesitat prepuberal.....	127
4.1.2	Influència de la dieta sobre el perfil metabòlic i lipídomic plasmàtic en el model porcí d'obesitat prepuberal .....	128

4.2.	Estudi dels efectes de l'obesitat induïda per dieta en el perfil metabolòmic i lipídomic en el CNS del model animal d'obesitat .....	146
4.2.1	Influència de la dieta sobre el perfil metabolòmic i lipídomic en escorça frontal en el model porcí d'obesitat prepuberal .....	146
4.3.	Estudi dels efectes d'una intervenció nutricional basada en probiòtics en el perfil metabolòmic i lipídomic plasmàtic del model animal d'obesitat .....	166
4.3.1	Influència dels probiòtics en les característiques morfològiques i bioquímiques del model porcí d'obesitat prepuberal .....	166
4.3.2	Influència dels probiòtics sobre el perfil metabolòmic i lipídomic plasmàtic i en escorça frontal en el model porcí d'obesitat prepuberal .....	167
4.4.	Anàlisi de correlació .....	202
<b>5.</b>	<b>DISCUSSIÓ .....</b>	<b>209</b>
5.1.	Efectes de la ingesta d'una dieta hipercalòrica i de dos probiòtics en variables morfològiques i bioquímiques clàssiques en l'estudi de l'obesitat .....	210
5.2.	Efecte de la ingesta d'una dieta hipercalòrica i de dos probiòtics en molècules rellevants en l'obesitat .....	212
5.3.	Efecte de la ingesta d'una dieta hipercalòrica i de dos probiòtics en el perfil d'aminoàcids .....	214
5.4.	Efecte de la dieta hipercalòrica i de dos probiòtics sobre el perfil metabolòmic i lipídomic en un model d'obesitat infantil .....	216
5.5.	Efecte de la dieta hipercalòrica i de dos probiòtics sobre mediadors lipídics inflamatoris en un model d'obesitat infantil .....	223
5.6.	Efecte de la dieta hipercalòrica i de dos probiòtics sobre la vulnerabilitat a l'estrès oxidatiu i el dany oxidatiu proteic en un model d'obesitat infantil .....	226
5.7.	Limitacions del treball d'investigació .....	231
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>235</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>239</b>

## ÍNDEX DE TAULES

---

Taula 1. Classificació del sobrepès i l'obesitat en adults basada en l'augment del risc per a la salut.....	35
Taula 2. Classificació de la mesura de la circumferència de la cintura segons el sexe i el risc de patir complicacions metabòliques.....	36
Taula 3. Criteris pel diagnòstic de la síndrome metabòlica segons NCEP i IDF en adults.....	41
Taula 4. Criteris pel diagnòstic de la síndrome metabòlica en nens i adolescents segons IDF .....	42
Taula 5. Comparació de les dues principals tecnologies utilitzades per l'anàlisi metabolòmic .....	46
Taula 6. Principals mediadors lipídics derivats de l'AA, del EPA i del DHA.....	60
Taula 7. Composició de les dietes experimentals.....	98
Taula 8. Composició nutricional de les dietes .....	98
Taula 9. Característiques clíniques de la cohort utilitzada per a l'aplicabilitat translacional.....	99
Taula 10. Nomenclatura dels metabòlits identificats mitjançant LC/MS .....	105
Taula 11. Condicions LC-MS/MS dels metabòlits quantificats pel Mètode A i B en les mostres de plasma i escorça frontal .....	105
Taula 12. Estàndards interns representatius de classe i estàndards interns afegits a les mostres en l'anàlisi lipídomic .....	107
Taula 13. Nomenclatura dels mediadors lipídics quantificats mitjançant LC/MS .....	114
Taula 14. Condicions LC-MS/MS dels mediadors lipídics quantificats pel Mètode A i B en les mostres de plasma i escorça frontal.....	111
Taula 15. Èsters metílics identificats mitjançant GC-FID .....	119
Taula 16. Índex calculats a partir de la composició d'àcids grassos .....	119
Taula 17. Activitat estimada de les elongases i desaturases calculades a partir dels ratios entre els àcids grassos .....	120
Taula 18. Estàndards deuterats afegits a les mostres .....	121
Taula 19. Ions (m/z) dels analits mesurats mitjançant GC/MS.....	121
Taula 20. Condicions experimentals detallades dels anticossos primaris de les diferents subunitats del complex I utilitzats en la tècnica de immunotransferència .....	124
Taula 21. Condicions experimentals i referència dels anticossos secundaris utilitzats.....	124
Taula 22. Característiques morfològiques i consum de calories del grup dieta control (T1) i del grup amb dieta hipercalòrica (T2).....	128
Taula 23. Característiques bioquímiques del grup dieta control (T1) i del grup dieta hipercalòrica (T2)	128
Taula 24. Concentracions ( $\mu\text{M}$ ) dels aminoàcids quantificats en plasma del grup control (T1) respecte al grup amb dieta hipercalòrica (T2).....	131
Taula 25. Identitat de les espècies lipídiques plasmàtiques diferencials en femelles porc prepuberals en ionització positiva .....	134

Taula 26. Concentracions (ng/mL) de les oxilipines derivades dels diferents PUFA en plasma del grup control (T1) respecte al grup amb dieta hipercalòrica (T2) classificades segons quin és el seu precursor.....	140
Taula 27. Composició lipídica del plasma de femelles porc prepuberals del grup control (T1) respecte al grup amb dieta hipercalòrica (T2).....	143
Taula 28. Índexs derivats de la composició en àcids grassos en plasma de femelles porc prepuberals del grup control (T1) respecte al grup amb dieta hipercalòrica (T2) .....	143
Taula 29. Estimació de l'activitat desaturasa en plasma de femelles porc prepuberals del grup control (T1) respecte al grup amb dieta hipercalòrica (T2) .....	145
Taula 30. Estimació de l'activitat elongasa en plasma de femelles porc prepuberals del grup control (T1) respecte al grup amb dieta hipercalòrica (T2) .....	145
Taula 31. Marcadors de dany oxidatiu proteic en plasma de femelles porc prepuberals del grup control (T1) respecte al grup amb dieta hipercalòrica (T2).....	146
Taula 32. Concentracions (µM) dels aminoàcids quantificats en escorça frontal del grup control (T1) respecte al grup dieta hipercalòrica (T2) .....	148
Taula 33. Identitat dels metabòlits i lípids trobats en escorça frontal en femelles porc prepuberals en ionització positiva .....	154
Taula 34. Identitat dels metabòlits i lípids trobats en escorça frontal en femelles porc prepuberals en ionització negativa .....	154
Taula 35. Concentracions (ng/mL) de les oxilipines derivades dels diferents PUFA en escorça frontal del grup control (T1) respecte al grup dieta hipercalòrica (T2) .....	157
Taula 36. Ratios entre les concentracions de les oxilipines quantificades en les mostres d'escorça frontal i plasma del grup control .....	159
Taula 37. Composició lipídica en escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup control (T1) respecte al grup dieta hipercalòrica (T2) .....	160
Taula 38. Índex derivats de la composició en àcids grassos en l'escorça frontal del grup control (T1) respecte al grup dieta hipercalòrica (T2) .....	161
Taula 39. Estimació de l'activitat desaturasa en escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup control (T1) respecte al grup dieta hipercalòrica (T2) .....	161
Taula 40. Estimació de l'activitat elongasa en escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup control (T1) respecte al grup dieta hipercalòrica (T2).....	162
Taula 41. Marcadors de dany oxidatiu en escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup control (T1) respecte al grup dieta hipercalòrica (T2).....	162
Taula 42. Característiques morfològiques i consum de calories del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).....	167
Taula 43. Característiques bioquímiques del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup dieta probiòtic més omega-3 (T4).....	167

Taula 44. Concentracions ( $\mu\text{M}$ ) dels aminoàcids quantificats en plasma del grup dieta hipercalòrica (T2), grup dieta probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4) .....	170
Taula 45. Concentracions ( $\mu\text{M}$ ) dels aminoàcids quantificats en escorça frontal del grup dieta hipercalòrica (T2), grup dieta probiòtic (T3) i grup dieta probiòtic més omega-3 (T4) .....	170
Taula 46. Identitat de les espècies lipídiques plasmàtiques en femelles de porc prepuberals en ionització positiva després de la suplementació amb probiotics .....	173
Taula 47. Concentracions (ng/mL) de les oxilipines derivades dels diferents PUFA en plasma de femelles porc prepuberals del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4) .....	178
Taula 48. Composició lipídica del plasma de femelles porc prepuberals del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).....	181
Taula 49. Índexs derivats de la composició en àcids grassos en plasma de femelles porc prepuberals del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4) .....	182
Taula 50. Estimació de l'activitat desaturasa en plasma de femelles porc prepuberals del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).....	182
Taula 51. Estimació de l'activitat elongasa en plasma de femelles porc prepuberals del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).....	182
Taula 52. Marcadors de dany oxidatiu en plasma de femelles porc prepuberals del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4) .....	183
Taula 53. Identitat dels metabòlits i de les espècies lipídiques d'escorça frontal en femelles de porc prepuberals en ionització positiva després de la suplementació amb probiotics .....	189
Taula 54. Identitat dels metabòlits i de les espècies lipídiques d'escorça frontal en femelles de porc prepuberals en ionització negativa després de la suplementació amb probiotics .....	191
Taula 55. Concentracions (ng/mL) de les oxilipines derivades dels diferents PUFA en escorça frontal del grup dieta hipercalòrica (T2), grup dieta probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4) .....	194
Taula 56. Composició lipídica de l'escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4) .....	197
Taula 57. Índexs derivats de la composició en àcids grassos en escorça frontal de porc del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).....	197
Taula 58. Estimació de l'activitat desaturasa en escorça frontal de femelles porc prepuberal del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).....	198
Taula 59. Estimació de l'activitat elongasa en escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).....	198
Taula 60. Marcadors de dany oxidatiu en escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).....	199

## ÍNDIX DE FIGURES

---

Figura 1. Evolució de la prevalença de l'obesitat .....	34
Figura 2. Homeòstasis energètica .....	38
Figura 3. Desequilibri energètic generat per un excés de greix en la dieta.....	39
Figura 4. Complicacions de l'obesitat infantil.....	40
Figura 5. Components d'un espectròmetre de masses .....	47
Figura 6. Esquema de ionització per electroesprai en mode positiu.....	48
Figura 7. Diagrama de l'analitzador de massa TOF .....	49
Figura 8. Diagrama de l'analitzador de massa Q .....	50
Figura 9. Flux de treball en una anàlisi de metabolòmica dirigida i no dirigida basat en LC/MS .....	52
Figura 10. Flux de treball en la caracterització de metabòlits en la anàlisi de metabolòmica no dirigida .56	
Figura 11. Biosíntesi d'àcids grassos de cadena llarga en mamífers .....	59
Figura 12. Formació dels mediadors lipídics a partir de l'AA, LA i del DGLA .....	63
Figura 13. Formació dels mediadors lipídics a partir de l'ALA, de l'EPA i del DHA .....	64
Figura 14. Estructura bàsica dels glicerolípid.....	65
Figura 15. Estructura bàsica dels glicerofosfolípids (o fosfolípids).....	66
Figura 16. Exemple d'estructura bàsica d'un plasmalogen de PE .....	67
Figura 17. Estructura bàsica dels esfingolípid .....	68
Figura 18. Estructura molecular d'alguns lípids esterol .....	70
Figura 19. Estructura molecular d'alguns lípids prenol .....	70
Figura 20. Cadena de transport d'electrons i la seva relació amb la producció de ROS .....	77
Figura 21. Estructura química d'alguns lípids oxidats .....	79
Figura 22. Estructura química dels productes d'oxidació del colesterol .....	80
Figura 23. Estructura química dels compostos que es formen com a producte de l'oxidació dels aminoàcids presents en les proteïnes.....	81
Figura 24. A) Reacció de Maillard; B) Estructura química dels productes intermediaris; C) Estructura química d'un producte final de glicooxidació .....	81
Figura 25. La dieta hipercalòrica indueix més acumulació de teixit adipós .....	127
Figura 26. L'obesitat induïda per dieta s'associa a canvis plasmàtics en els nivells de TMAO i colina del model porcí d'obesitat prepuberal .....	129
Figura 27. L'obesitat s'associa a canvis en la concentració circulant de determinats metabòlits que formen el metabolisme de la metionina, incloent-hi el cicle de la metionina i la via de transsulfuració del model porcí d'obesitat prepuberal .....	129
Figura 28. La concentració d'HCys mostra una relació significativa amb els nivells de colesterol total plasmàtic.....	130
Figura 29. La concentració d'HCys plasmàtica mostra una relació significativa amb variables relacionades amb la dieta i el teixit adipós .....	130

Figura 30. Anàlisi d'agrupació jeràrquica on es pot veure l'abundància dels lípids en el plasma del model porcí d'obesitat prepuberal .....	132
Figura 31. L'anàlisi multivariant revela diferències entre el perfil lipídic del plasma del model porcí d'obesitat prepuberal .....	133
Figura 32. Variables relacionades amb la dieta i el teixit adipós amb lípids circulants específics .....	136
Figura 33. Els nivells de colesterol LDL plasmàtic estan correlacionats amb lípids plasmàtics específics	136
Figura 34. Els nivells d'insulina i HOMA-IR s'associen a lípids plasmàtics específics.....	137
Figura 35. Validació dels biomarcadors proposats en una cohort d'individus obesos.....	137
Figura 36. Correlació positiva entre un lípid específic i l'índex HOMA-IR en humans i porcs .....	138
Figura 37. L'anàlisi multivariant no supervisat revela un perfil d'oxilipines característic del plasma del model porcí d'obesitat prepuberal .....	139
Figura 38. L'estadística multivariant supervisada indica que la concentració d'oxilipines en plasma és capaç de discriminar els animals que han ingerit una dieta hipercalòrica .....	139
Figura 39. Prova de validació creuada (A) i test de permutació (B) del model PLS-DA generat amb el perfil d'oxilipines en plasma entre el grup control i el grup amb dieta hipercalòrica.....	140
Figura 40. L'obesitat induïda per dieta s'associa a canvis en els nivells de TMAO en l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal .....	147
Figura 41. L'obesitat s'associa a canvis en la concentració de determinats metabòlits que formen el metabolisme de la metionina, incloent-hi el cicle de la metionina i la via de transsulfuració en l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal .....	147
Figura 42. L'estadística multivariant no supervisada determina un perfil metabolòmic específic, en canvi el factor "dieta" no és el que més preval en la diferenciació del lipidoma de l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal .....	149
Figura 43. L'estadística multivariant supervisada determina un perfil metabolòmic i lipídomic específic de l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal .....	153
Figura 44. Diferències metabolòmiques en escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal.....	151
Figura 45. Diferències en les espècies lipídiques en escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal .....	152
Figura 46. Representació gràfica de les vies metabòliques més alterades en escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal .....	155
Figura 47. L'anàlisi multivariant no supervisat revela un perfil d'oxilipines característic en escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal .....	156
Figura 48. L'estadística multivariant supervisada indica que la concentració d'oxilipines en escorça frontal no és capaç de discriminar els animals que han ingerit una dieta hipercalòrica .....	156
Figura 49. La concentració de MDAL mostra una relació significativa amb el pes final i amb variables relacionades amb el teixit adipós .....	163
Figura 50. La correlació entre dos marcadors típics de peroxidació lipídica no esdevé significativa.....	163

Figura 51. L'obesitat induïda per dieta provoca un augment en el contingut d'algunes subunitats del complex I en l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal .....	164
Figura 52. L'obesitat induïda per dieta provoca un augment en el contingut del complex II en l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal .....	164
Figura 53. L'obesitat no provoca canvis en el complex III en l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal .....	165
Figura 54. L'obesitat no produeix canvis en el contingut del complex VI en l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal .....	165
Figura 55. L'obesitat no mostra canvis en la concentració dels metabòlits que formen el cicle de l'àcid tricarboxílic en l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal.....	166
Figura 56. L'efecte del probiòtic i omega-3 en obesitat produeix un augment dels nivells de TMAO en plasma .....	168
Figura 57. La suplementació amb probiòtics no mostra canvis en la concentració plasmàtica dels diferents metabòlits que formen el metabolisme de la metionina en canvi, si que produeix canvis en la concentració tissular d'alguns metabòlits .....	169
Figura 58. Anàlisi d'agrupació jeràrquica on es pot veure la influència dels probiòtics en l'abundància dels lípids en el plasma del model porcí d'obesitat prepuberal.....	172
Figura 59. L'anàlisi multivariant revela diferències entre el perfil lipídomic del plasma dels animals que han ingerit probiòtics en la seva dieta .....	172
Figura 60. Anàlisi d'agrupació jeràrquica on es pot veure la influència que tenen els probiòtics en l'abundància de les oxilipines quantificades en el plasma del model porcí d'obesitat prepuberal	177
Figura 61. L'anàlisi multivariant revela diferències en el perfil d'oxilipines plasmàtiques dels animals que han ingerit probiòtic més omega-3 en la seva dieta.....	177
Figura 62. L'estadística multivariant no supervisada determina un perfil metabòmic específic, en canvi l'efecte dels probiòtics no és el que més preval en la diferenciació del lipidoma de l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal .....	184
Figura 63. L'estadística multivariant determina un perfil metabòmic i lipídomic específic en l'escorça frontal d'aquests animals.....	188
Figura 64. Diferències metabòmiques en escorça frontal dels animals obesos després de la suplementació amb probiòtics .....	185
Figura 65. Diferències lipídòmiques en escorça frontal dels animals obesos després de la suplementació amb probiòtics .....	186
Figura 66. Representació gràfica de les vies metabòliques més alterades en escorça frontal després de la ingesta dels probiòtics .....	192
Figura 67. L'anàlisi multivariant no supervisat no revela un efecte dels probiòtics en perfil d'oxilipines en escorça frontal diferencial entre els tres d'estudi .....	193
Figura 68. L'estadística multivariant supervisada indica que l'efecte probiòtic en el perfil d'oxilipines en escorça frontal no és capaç de discriminar els tres grups d'estudi .....	193



Figura 69. La suplementació amb probiòtic i amb probiòtic més omega-3 modula la lesió oxidativa a nivell lipídic.....	199
Figura 70. La suplementació amb probiòtic provoca una disminució en el contingut del complex I.....	200
Figura 71. La suplementació amb probiòtic no indueix canvis en el contingut del complex II .....	200
Figura 72. La suplementació amb probiòtic no indueix canvis en el contingut del complex III .....	201
Figura 73. La suplementació amb probiòtic no indueix canvis en el contingut del complex IV .....	201
Figura 74. La suplementació amb probiòtic i omega-3 indueix canvis en la concentració dels metabòlits que formen el cicle del TCA .....	202
Figura 75. Diagrama de cordes de les variables relacionades amb l'obesitat i els nivells d'oxilipines i àcids grassos quantificats en les mostres de plasma i d'escorça frontal del grup control i del grup dieta hipercalòrica .....	204
Figura 76. Diagrama de cordes de les variables relacionades amb l'obesitat i els nivells d'oxilipines i àcids grassos quantificats en les mostres de plasma i d'escorça frontal del grup probiòtic i del grup probiòtic més omega-3 .....	205
Figura 77. Correlacions entre lípids específics en plasma i en escorça frontal amb variables relacionades amb l'obesitat en el diferents grups d'estudi .....	206
Figura 78. Resum dels canvis plasmàtics observats induïts per la dieta hipercalòrica.....	224

# **ABREVIACIONES**



## ABREVIACIONS

---

<b>8-oxodA</b>	8-oxo-7,8-dihidrodeoxiadenosina
<b>8-oxodG</b>	8-oxo-7,8-dihidrodeoxiguanosina
<b>AA</b>	Àcid araquidònic; de l'anglès, <i>Arachidonic acid</i>
<b>ACL</b>	Longitud mitjana de la cadena; de l'anglès, <i>Average Chain Length</i>
<b>ADN</b>	Àcid desoxiribonucleic
<b>ADP</b>	Adenina difosfat
<b>AGE</b>	Productes finals de glicació avançada; de l'anglès, <i>Advanced Glycation End-products</i>
<b>AI</b>	Índex antiinflamatori; de l'anglès, <i>Anti-inflammatory Index</i>
<b>ALA</b>	Àcid $\alpha$ -linolènic; de l'anglès, <i><math>\alpha</math>-Linolenic acid</i>
<b>ALE</b>	Productes finals de lipoxidació avançada; de l'anglès, <i>Advanced Lipoxidation End-products</i>
<b>AMPk</b>	Adenosina monofosfat quinasa
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfat
<b>BCAA</b>	Aminoàcids de cadena ramificada; de l'anglès, <i>Branched-Chain Amino Acids</i>
<b>BHMT</b>	Betaïna-homocisteïna metiltransferasa
<b>BHT</b>	2,6-di-tert-butil-4-metilfenol
<b>BMI</b>	Índex de massa corporal; de l'anglès, <i>Body Mass Index</i>
<b>BSA</b>	Albúmina sèrica bovina; de l'anglès, <i>Bovine Serum Albumin</i>
<b>CE</b>	Cel·la de col·lisió; de l'anglès, <i>Collision energy</i>
<b>CholE</b>	Èster de colesterol; de l'anglès, <i>Cholesterol Ester</i>
<b>CEL</b>	N <sup>ε</sup> -carboxietil-lisina
<b>Cer</b>	Ceramida
<b>CL</b>	Cardiolipina
<b>CLA</b>	Àcid linoleic conjugat; de l'anglès, <i>Conjugated Linolenic Acid</i>
<b>CMC</b>	S-(carboximetil)-cisteïna
<b>CML</b>	N <sup>ε</sup> -(carboximetil)-lisina
<b>CNS</b>	Sistema nerviós central; de l'anglès, <i>Central Nervous System</i>
<b>COX</b>	Ciclooxygenasa
<b>CVD</b>	Malalties cardiovasculars; de l'anglès, <i>Cardiovascular Diseases</i>
<b>CYP450</b>	Citocrom P450
<b>DBI</b>	Índex de dobles enllaços; de l'anglès, <i>Double Bond Index</i>
<b>DG</b>	Diacilglicèrds
<b>DGLA</b>	Àcid dihomogamma-linolènic; de l'anglès, <i>Dihomo-<math>\gamma</math>-linolenic acid</i>
<b>DHA</b>	Àcid docosahexaènic; de l'anglès, <i>Docosahexanoic acid</i>
<b>DTPAC</b>	Àcid dietilenetriaminopentaacètic; de l'anglès, <i>Dethyl-triamine-penta acetic acid</i>
<b>DTT</b>	Ditriotreitol
<b>EDA</b>	Àcid eicosadiènic; de l'anglès, <i>Eicosadienoic acid</i>

<b>EDTA</b>	Àcid etilendiamintetraacètic; de l'anglès, <i>Ethylenediamine-tetraacetic acid</i>
<b>EPA</b>	Àcid eicosapentaenoic; de l'anglès, <i>Eicosapentaenoic acid</i>
<b>ESI</b>	Ionització per electroesprai; de l'anglès, <i>Electrospray Ionization</i>
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Flavin adenine dinucleòtid reduït
<b>FAME</b>	Èster metílic d'àcid gras; de l'anglès, <i>Fatty Acid Methyl Ester</i>
<b>FC</b>	Magnitud de canvi; de l'anglès, <i>Fold Change value</i>
<b>FFA</b>	Àcids grassos lliures; de l'anglès, <i>Free Fatty Acids</i>
<b>FID</b>	Detecció per ionització amb flama; de l'anglès, <i>Flame-Ionization Detection</i>
<b>GC</b>	Cromatografia de gasos; de l'anglès, <i>Gas Chromatography</i>
<b>GLA</b>	Àcid $\gamma$ -linolenic; de l'anglès, <i><math>\gamma</math>-linolenic acid</i>
<b>HAVA</b>	Àcid aminovalèric; de l'anglès, <i>Aminovaleric acid</i>
<b>HCys</b>	Homocisteïna
<b>HDL</b>	Lipoproteïnes d'alta densitat; de l'anglès, <i>High-Density Lipoprotein</i>
<b>HNE</b>	Hidroxinonenal
<b>HOMA-IR</b>	Model homeostàtic per avaluar la resistència a la insulina; l'anglès, <i>Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance</i>
<b>IDF</b>	Federació Internacional de Diabetes; de l'anglès, <i>International Diabetes Federation</i>
<b>IRTA</b>	Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària
<b>LA</b>	Àcid linoleic; de l'anglès, <i>Linoleic acid</i>
<b>LC</b>	Cromatografia líquida; de l'anglès, <i>Liquid Chromatography</i>
<b>LOX</b>	Lipoxigenasa
<b>LDL</b>	Lipoproteïna de baixa densitat; de l'anglès, <i>Low-Density Lipoprotein</i>
<b>LPS</b>	Lipopolisacàrid
<b>LysoGP</b>	Lisoglicerofosfolípid
<b>MALDI</b>	Ionització/desorció làser assistida per matriu; de l'anglès, <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
<b>MDA</b>	Malondialdehid
<b>MDAL</b>	N-malondialdehid-lisina
<b>MFE</b>	Extractor de funcions moleculars; de l'anglès, <i>Molecular Feature Extractor</i>
<b>MG</b>	Monoacilglicèrid
<b>MGL</b>	Monoacilglicerol lipasa
<b>MOPS</b>	De l'anglès, <i>3-(N-morpholino) propanesulfonic acid</i>
<b>MRM</b>	Monitoratge de reacció múltiple; de l'anglès, <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
<b>MS</b>	Espectrometria de masses; de l'anglès, <i>Mass Spectrometry</i>
<b>MS/MS</b>	Espectrometria de masses en tàndem
<b>MTBE</b>	Metil tert-butil èter
<b>MUFA</b>	Àcids grassos monoinsaturats; de l'anglès, <i>Monounsaturated Fatty Acids</i>
<b>m/z</b>	Relació massa/càrrega
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat

<b>NCEP</b>	Programa Nacional d'Educació sobre el Colesterol; de l'anglès, <i>National Cholesterol Education Programme</i>
<b>NMR</b>	Ressonància magnètica nuclear; de l'anglès, <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
<b>PA</b>	Àcid fosfatídic; de l'anglès, <i>Phosphatidic acid</i>
<b>PC</b>	Fosfatidilcolina; de l'anglès, <i>Phosphatidylcholine</i>
<b>PCA</b>	Anàlisi de components principals; de l'anglès, <i>Principal Component Analysis</i>
<b>PE</b>	Fosfatidiletanolamina; de l'anglès, <i>Phosphatidylethanolamine</i>
<b>PEMT</b>	Fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa; de l'anglès, <i>Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase</i>
<b>PG</b>	Fosfatidilglicerol; de l'anglès, <i>Phosphatidylglycerol</i>
<b>PI</b>	Fosfatidilinositol; de l'anglès, <i>Phosphatidylinositol</i>
<b>PI<sub>n</sub></b>	Índex de peroxidabilitat lipídica; de l'anglès, <i>Peroxidizability Index</i>
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
<b>PLS-DA</b>	Anàlisi de mínims quadrats; de l'anglès, <i>Partial Least Square Discriminant Analysis</i>
<b>PS</b>	Fosfatidilserina; de l'anglès, <i>Phosphatidylserine</i>
<b>PUFA</b>	Àcids grassos poliinsaturats; de l'anglès, <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>
<b>PUFA n3</b>	Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n3
<b>PUFA n6</b>	Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n6
<b>QQQ</b>	Triple quadrupol; de l'anglès, <i>Triple Quadrupole</i>
<b>QTOF</b>	Analitzador temps de vol combinat amb un quadrupol; de l'anglès, <i>Quadrupole Time-of Flight</i>
<b>ROS</b>	Espècies reactives d'oxigen; de l'anglès, <i>Reactive Oxygen Species</i>
<b>RT</b>	Temps de retenció; de l'anglès, <i>Retention Time</i>
<b>SAAA</b>	Semialdehid aminoadípica
<b>SAG</b>	Semialdehid glutàmic
<b>SAH</b>	S-adenosilhomocisteïna
<b>SAM</b>	S-adenosilmetionina
<b>SCFA</b>	Àcids grassos de cadena curta; de l'anglès, <i>Short Chain Fatty Acids</i>
<b>SFA</b>	Àcids grassos saturats; de l'anglès, <i>Saturated Fatty Acids</i>
<b>SM</b>	Esfingomielina; de l'anglès, <i>Sphingomyelin</i>
<b>SOD</b>	Superòxid dismutasa
<b>SPE</b>	Extracció en fase sòlida; de l'anglès, <i>Solid Phase Extraction</i>
<b>Sph1P</b>	Esfingosina-1-fosfat; de l'anglès, <i>Sphingosine-1-phosphate</i>
<b>T2DM</b>	Diabetis mellitus tipus 2; de l'anglès, <i>Type 2 Diabetes Mellitus</i>
<b>TC</b>	Tomografia computeritzada
<b>TCA</b>	Cicle de l'àcid tricarbòxilic; de l'anglès, <i>Tricarboxylic Acid Cycle</i>
<b>TG</b>	Triacilglicèrid
<b>TMA</b>	Trimetilamina
<b>TMAO</b>	Trimetilamina oxidada

<b>UFA</b>	Àcids grassos insaturats; de l'anglès, <i>Unsaturated Fatty Acids</i>
<b>UPLC</b>	Cromatografia líquida d'ultra alta resolució; de l'anglès, <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
<b>UQ</b>	Ubiquinona
<b>UQH2</b>	Ubiquinol
<b>VIP</b>	De l'anglès, <i>Variable Importance in the Projection</i>
<b>VLDL</b>	Lipoproteïna de molt baixa densitat; de l'anglès, <i>Very Low-Density Lipoprotein</i>
<b>WC</b>	Circumferència de la cintura; de l'anglès, <i>Waist Circumference</i>
<b>WHO</b>	Organització Mundial de la Salut; de l'anglès, <i>World Health Organization</i>

# INTRODUCCIÓ





# 1. INTRODUCCIÓ

---

## 1.1. Obesitat

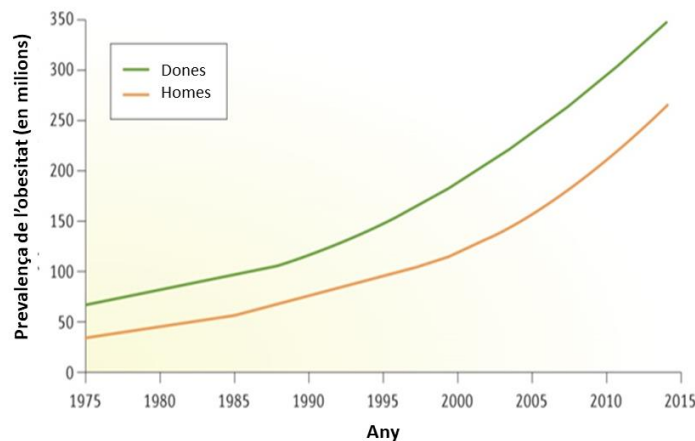
L'obesitat i el sobrepès estan caracteritzats per un excés d'acumulació de greix corporal relacionat amb desequilibris en la ingesta calòrica i la despesa energètica (*WHO/Obesity and overweight; <https://www.who.int>*). Segons aquest punt de vista, l'obesitat pot ser el resultat d'una baixa activitat física (un estil de vida sedentari) juntament amb un consum calòric per sobre de les necessitats de l'individu (*González-Muniesa et al. 2017*). L'obesitat es caracteritza principalment per un excés d'adipositat que no només es manifesta augmentant el pes, sinó que també pot expressar-se metabòlicament augmentant el risc de patir altres malalties, incloent-hi les malalties cardiovasculars (CVD; de l'anglès, *Cardiovascular Diseases*), la diabetis mellitus tipus 2 (T2DM; de l'anglès, *Type 2 Diabetes Mellitus*), hipertensió, dislipèmia, certs càncers i altres condicions patològiques que, en conseqüència, donarien lloc a un augment en la morbiditat i/o incapacitats cròniques i la mortalitat (*Hruby and Hu 2015; Williams et al. 2015; Goday et al. 2015; Chooi et al. 2019*).

### 1.1.1 Epidemiologia

L'obesitat és una pandèmia, essent un dels majors reptes de la salut pública del segle XXI. La seva prevalença augmenta, triplicant els seus valors des dels anys vuitanta, tant en països desenvolupats com en països que es troben en desenvolupament (*WHO/Obesity and overweight; <https://www.who.int>*). Segons l'Organització Mundial de la Salut (WHO; de l'anglès, *World Health Organization*) s'estima que aproximadament dos mil milions d'adults de més de divuit anys presenten sobrepès, dels quals més de 650 milions són obesos. De forma global, un 39% de la població total pateix sobrepès, on més del 13% són obesos (11% homes i 15% dones). En la **Figura 1** es mostra l'evolució de la prevalença de l'obesitat on es pot observar que els valors s'han triplicat des de l'any 1975. Segons les últimes estimacions realitzades per la WHO, a Europa, el sobrepès afecta entre el 30 i el 70% segons el país i l'obesitat entre el 10 i el 30% de la població adulta (*WHO/Obesity and overweight; <https://www.who.int>*).

En aquest sentit, les dades d'obesitat infantil indiquen un increment similar arreu del món afectant tant a països desenvolupats com països en desenvolupament. És difícil poder calcular de forma correcta la prevalença de l'obesitat infantil, ja que no hi ha, de moment, una definició acceptada internacionalment (*Zhao and Grant 2011*). Tot i això, la WHO declara que durant l'any 2016 aproximadament 41 milions de nens menors de cinc anys tenien sobrepès i més de 340 milions de nenes i nens entre cinc i dinou anys tenien sobrepès o obesitat. Si aquesta tendència

continua, la prevalença de sobrepès o obesi tat per a les nenes i nens menors de cinc anys serà de 70 milions l'any 2025 (*WHO/Obesity and overweight; https://www.who.int*). D'altra banda, l'obesi tat infantil també representa un predictor significatiu de patir obesi tat en l'edat adulta on es considera que, el 70% dels casos actuals de nenes i nens i adolescents obesos, en edat adulta, tindran obesi tat mòrbida i, per regla general, presentaran comorbiditats associades com ara la T2DM i les CVD donant lloc a problemes socio-sanitaris greus (*Kumar and Kelly 2017*).



**Figura 1. Evolució de la prevalença de l'obesi tat.** Des de 1975, la prevalença global de l'obesi tat gairebé s'ha triplicat, sent més alta en dones que en homes. Figura adaptada de *González-Muniesa et al. 2017*.

En conseqüència, la WHO ha anat advertint de la importància que té abordar el problema de l'obesi tat i, per tant, el tractament de l'obesi tat s'ha convertit en una de les prioritats de la sanitat pública, ja que només en la Unió Europea hi ha aproximadament 2,8 milions de morts anuals a conseqüència de les comorbiditats relacionades amb el sobrepès i l'obesi tat (*EU Action Plan on Childhood; https://www.who.int*). Les estimacions del cost que pot produir el tractament de les malalties cròniques derivades del sobrepès i l'obesi tat podrien arribar a ser tan grans que els sistemes de salut pública no podrien arribar a abordar-les (*WHO/Obesity and overweight; https://www.who.int*). Segons la WHO, el tractament de les patologies dels adults amb sobrepès i obesi tat representen el 6% dels costos generals en salut en els països europeus (*WHO/Obesity and overweight; https://www.who.int*).

Per tot això, la WHO considera l'obesi tat com "l'epidèmia del segle XXI", tant pel seu increment constant en la prevalença com pel seu impacte en la mortalitat, morbiditat, la qualitat de vida i el cost sanitari.

### 1.1.2 Diagnòstic clínic i mesura de la distribució de greix

La manera més comuna de diagnosticar el sobrepès i l'obesi tat és mitjançant l'índex de massa corporal (BMI; de l'anglès, *Body Mass Index*). Aquest índex es calcula amb una fórmula que inclou el pes i l'altura de l'individu ( $\text{pes}/\text{alçada}^2$ ) on es considera sobrepès a partir d'un BMI  $\geq 25$

kg/m<sup>2</sup>, obesitat a partir d'un BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> i obesitat greu aquella amb un BMI  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup> (**Taula 1**). Aquesta classificació es basa en l'associació entre el BMI i l'augment de risc per la salut (*Rivera 2008*) i s'aplica només a persones adultes, ja que la correlació entre el pes i el greix es troba molt relacionada.

**Taula 1.** Classificació del sobrepès i l'obesitat en adults basada en l'augment del risc per a la salut. Taula adaptada de WHO/Obesity and overweight (<https://www.who.int>).

Classificació	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Riscos de salut associats
Baix pes	<18,5	Baix (però augmenta el risc de tenir altres problemes clínics)
Normal	18,5-24,9	Mitjana
Sobrepès	$\geq 25$	
Pre-obès	25,0-29,9	Augmentat
Obesitat classe I	30,0-34,9	Augment moderat
Obesitat classe II	35,0-39,9	Augmentat severament
Obesitat classe III	$\geq 40$	Molt augmentat

**BMI:** Index de massa corporal (de l'anglès, *Body mass index*).

En canvi, en la població infantil no s'hauria de fer servir aquests paràmetres, ja que el percentatge de greix respecte a l'alçada no permet saber la distribució del greix durant les etapes de creixement. Per tant, per poder diagnosticar l'obesitat infantil s'han de fer servir altres barems que tenen en compte l'edat, el sexe i l'ètnia (*Gómez-Barrado et al. 2012*). Els experts recomanen en la pràctica clínica diària utilitzar taules de població local. En el cas de Catalunya, les dades utilitzades en els Centres d'Atenció Primària, i per tant, les més utilitzades pel diagnòstic de sobrepès i obesitat, són les de la Fundació Orbegozo (*Sobradillo et al 2004*). Aquestes taules van ser creades a partir d'un estudi de creixement iniciat l'any 1978 en el País Basc on es van prendre les mesures de 300 nens i 300 nenes acabats de néixer entre els anys 1978 i 1980. A més, també es va realitzar un estudi transversal, independent al comentat anteriorment, en l'any 2000 de nens i nenes (54% nenes) en edats compreses entre zero i divuit anys. A partir d'aquí, es van considerar els diferents indicadors: i) gràfiques de distància (longitud/talla, pes, pes-longitud), ii) gràfiques de BMI i, iii) gràfiques de velocitat de creixement. Amb aquestes dades en conjunt es determina el sobrepès a partir del percentil 85 i obesitat a partir del percentil 95. Tot i això, existeixen dades internacionals creades per la WHO per aquells països que no tenen gràfiques pròpies (*WHO/The WHO Child Growth Standards 2016; https://www.who.int*) o també, poden utilitzar les de *International Obesity Task Force (Cole et al. 2000)*.

La principal limitació de l'ús del BMI és que no diferencia entre el pes de greix i el pes de múscul i, per tant, això ens podria portar a una classificació incorrecta en persones molt musculades amb sobrepès. Per aquest motiu, també s'utilitzen altres maneres de mesurar el grau d'obesitat com és la mesura de la circumferència de la cintura (WC; de l'anglès, *Waist Circumference*). El

WC és capaç de proporcionar una estimació del greix intra-abdominal que està més fortament associat amb els riscos per a la salut que el greix emmagatzemat en altres regions (**Taula 2**) (*Iwao et al. 2001; Janssen et al. 2002*).

**Taula 2.** Classificació de la mesura de la circumferència de la cintura segons el sexe i el risc de patir complicacions metabòliques. Taula adaptada de *WHO Obesity and overweight* (<https://www.who.int>).

Classificació	WC (cm)	Risc de complicacions metabòliques
Home	≥94	Augmentat
	≥102	Augmentat severament
Dona	≥80	Augmentat
	≥88	Augmentat severament

WC: Circumferència de la cintura (de l'anglès, *Waist circumference*).

La mesura del BMI i el WC són les tècniques més recomanables i clínicament factibles a l'hora de mesurar la proporció de grassa corporal, ja que són les més accessibles, fàcils i reproduïbles. Cal recordar que aquesta també pot ser mesurada mitjançant altres tècniques com la hidrodensimetria, la tomografia assistida per ordinador, l'absorciometria de raig X de doble energia o la ressonància magnètica. Tanmateix, aquestes tècniques no són comunament utilitzades en la pràctica diària per la realització d'un diagnòstic rutinari de l'obesitat, ja que requereixen equips molt específics i especialitzats (*Lee and Gallagher 2008*).

### 1.1.3 Etiologia

El pes corporal està regulat per nombrosos mecanismes fisiològics (*Jéquier and Tappy 1999*) que ens permeten mantenir l'equilibri entre la ingesta calòrica i la despesa energètica. Aquests sistemes reguladors, en condicions normals, són extraordinàriament precisos, però qualsevol factor que produeixi un desequilibri en l'augment de la ingesta calòrica o en la disminució de la despesa energètica, fins i tot en petites quantitats, causarà obesitat a llarg termini (*González-Muniesa et al. 2017*).

Els factors que poden produir aquest desequilibri són factors genètics, de comportament, ambientals, fisiològics, socials i culturals alterant l'homeòstasi energètica donant lloc a una deposició excessiva de greixos. La contribució de cadascun d'aquests factors s'ha estudiat àmpliament i, encara que els gens juguen un paper important en la regulació del pes corporal promovent la predisposició individual, els factors de comportament i de medi ambient, com ara un estil de vida sedentari combinat amb un excés d'energia promogut per una sobrealimentació, són els principals responsables de l'augment dramàtic de l'obesitat durant les últimes dècades (*Hruby and Hu 2015*). Des de fa uns anys cap aquí, s'han realitzat diverses campanyes per tal de conscienciar a la població de la importància de menjar bé i de fer esport però, vist que l'obesitat continua creixent de forma exponencial, la conscienciació no ha estat suficient.

A part d'aquests factors clàssics, investigacions recents mostren que la microbiota intestinal podria estar involucrada en l'obesitat, ja que s'han descrit alteracions en la seva composició en animals i humans obesos en comparació amb subjectes prims (Davis 2016; Tinahones 2017; Castaner et al. 2018).

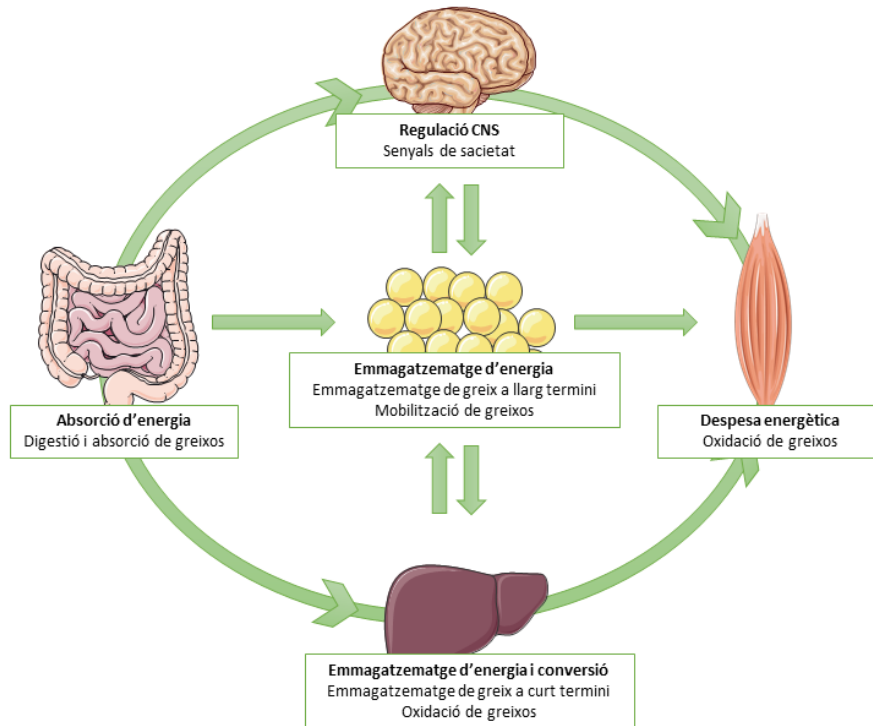
#### 1.1.4 Fisiopatologia

L'homeòstasi energètica és l'equilibri entre la ingesta i la despesa energètica. Quan la ingesta supera la despesa, aquesta energia s'emmagatzema dins del teixit adipós blanc en forma de triacilglicèrids (TG) mentre que, quan la despesa supera la ingesta, s'utilitza aquesta energia emmagatzemada per abastir totes les necessitats del nostre organisme. Aquest procés és complex i per tant, es troba molt regulat gràcies a diferents sistemes de senyalització, tant centrals com perifèrics (Schwartz et al. 2000).

Els teixits i òrgans clau en aquest procés són el teixit adipós i el tracte gastrointestinal juntament amb els òrgans digestius associats, com el fetge i el pàncrees. El greix de la dieta s'absorbeix a través del tracte gastrointestinal en forma de quilomicrons circulants i lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL; de l'anglès, *Very Low-Density Lipoprotein*), on part d'aquest es metabolitza per tal de poder proporcionar energia i la resta es conserva en el teixit adipós i el fetge (Wang et al. 2013). Com a conseqüència de l'emmagatzematge d'energia, el teixit adipós allibera diverses adipocines (citocines secretades pel teixit adipós), com ara la leptina, que regulen l'homeòstasi energètica mitjançant la senyalització al cervell i als teixits perifèrics (Singla 2010). L'acumulació de greix en el teixit adipós s'aconsegueix mitjançant la síntesi *de novo* d'àcids grassos així com per l'absorció de greixos, mentre que, alhora, es realitza la seva mobilització durant la lipòlisi per proporcionar energia als teixits oxidatius, com el múscul esquelètic i el cor. A més, el fetge, a part del paper com a emmagatzemador d'energia a curt termini, també és un lloc important per a la conversió d'energia (Shi and Burn 2004). A més, la insulina és secretada pel pàncrees com a resposta a menjars i nutrients que circulen per actuar com un senyal perifèric al cervell i poder controlar la ingesta energètica i mediar la captació de la glucosa en els teixits sensibles (Figura 2).

L'acumulació de greix durant el desenvolupament de l'obesitat es caracteritza per una hiperplàsia (augment del nombre) i hipertròfia (augment de mida) dels adipòcits associada a un augment d'angiogènesi, infiltració de macròfags, producció de components de la matriu extracel·lular, activació de cèl·lules endotelials i alliberament de diversos mediadors inflamatoris (De Ferranti and Mozaffarian 2008). La desregulació de les funcions de les adipocines pro i antiinflamatòries juntament amb la seva producció en les persones obesas condueixen a un

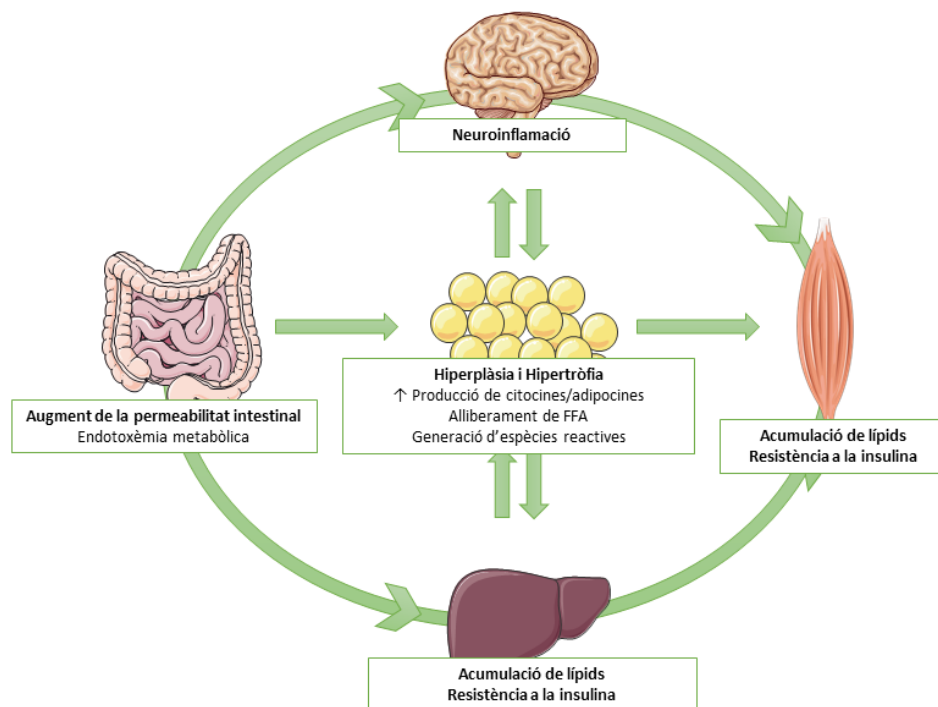
estat d'inflamació crònica de baix grau (Weisberg et al. 2003; Harford et al. 2011). A més, aquestes adipocines també indueixen la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS; de l'anglès; *Reactive Oxygen Species*) generant un procés conegut com a estrès oxidatiu (Fernández-Sánchez et al. 2011).



**Figura 2. Homeòstasi energètica.** El teixit adipós, que és el lloc principal d'emmagatzematge d'energia, respon als senyals metabòlics tant centrals com perifèrics regulant l'emmagatzematge i la mobilització dels lípids. El greix de la dieta s'absorbeix a través de la via gastrointestinal on part es metabolitza per aportar energia i la resta entra al fetge i al teixit adipós per emmagatzemar-se. Quan ja hi ha suficient energia, el teixit adipós segrega diverses adipocines que serveixen com a molècules senyalitzadores al cervell i als teixits perifèrics. Després de la lipòlisi, els àcids grassos del teixit adipós són transportats per la sang assegurant el subministrament d'energia als teixits oxidatius, com el múscul esquelètic i el cor. **CNS:** Sistema nerviós central (de l'anglès, *Central nervous system*). Figura adaptada de Shi et al. 2004.

Adicionalment, l'obesitat també afavoreix l'acumulació de macròfags en el teixit adipós blanc (Weisberg et al. 2003) que contribueixen a generar inflamació. Aquest estat inflamatori induïx lipòlisi i alliberament d'àcids grassos lliures (FFA; de l'anglès, *Free Fatty Acids*) que s'acumulen a diferents teixits, incloent-hi el teixit adipós, el fetge, el múscul esquelètic, el cor i les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques (De Ferranti and Mozaffarian 2008). Com a conseqüència, hi ha una acumulació de greix ectòpic i un estat proinflamatori que acaba resultant en resistència a la insulina (Lackey and Olefsky 2016). L'obesitat també induïx la producció de citocines proinflamatòries hepàtiques, que contribuiran a l'aparició de la resistència a la insulina i promouran l'esteatosi hepàtica (Berlenga et al. 2014, 2016). A més, en pacients obesos, l'acumulació de lípids i macròfags proinflamatoris en el múscul esquelètic inhibeix la senyalització a la insulina (Wei et al. 2008). Adicionalment a la infiltració de macròfags ja esmentada, l'obesitat també és capaç d'induir la secreció de la citocina proinflamatòria interleucina  $1\beta$  i a la disminució de la secreció

d'insulina en el pàncrees (*Gregor and Hotamisligil 2011*). En el sistema digestiu, l'obesitat fa que disminueixin el nombre d'eosinòfils i cèl·lules limfoides innates a l'intestí, augmentant la permeabilitat de l'intestí que, d'aquesta manera, permet l'entrada en circulació de molècules tòxiques de lipopolisacàrids (LPS) provocant endotoxèmia metabòlica (*Frazier et al. 2011; Shen et al. 2013*) (**Figura 3**). El sistema nerviós central (CNS; de l'anglès, *Central Nervous System*) també es veu greument afectat durant l'obesitat. L'augment de les adipocines circulants provoca un augment de la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica deixant l'entrada lliure als FFA lipotòxics, a citocines proinflamatòries, a cèl·lules immunitàries, entre altres, generant neuroinflamació que pot acabar promovent un procés neurodegeneratiu (*Niccolai et al. 2019*).



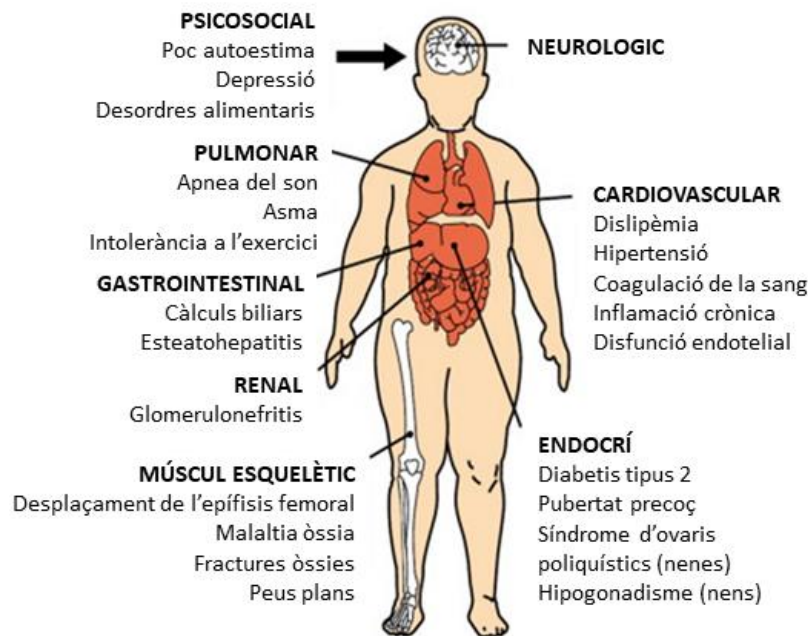
**Figura 3. Desequilibri energètic generat per un excés de greix en la dieta.** L'acumulació de greix produeix hiperplàsia i hipertròfia en el teixit adipós que genera l'alliberament de citocines/adipocines juntament amb l'alliberament d'altres mediadors inflamatoris que condueixen a un estat d'inflamació crònica de baix grau i a la generació de ROS. Aquest estat inflamatori indueix lipòlisi i alliberament de FFA que s'acumulen en diferents teixits, com el fetge i el múscul generant resistència a la insulina. En el sistema digestiu, l'obesitat genera endotoxèmia metabòlica (presència de LPS en el torrent sanguini). En relació amb el CNS, la inflamació crònica pot acabar promovent un procés neurodegeneratiu. **CNS:** Sistema nerviós central (de l'anglès, *Central nervous system*); **FFA:** Àcids grassos lliures (de l'anglès, *Free fatty acids*). Figura adaptada de *Shi et al. 2004*.

### 1.1.5 Comorbiditats derivades de l'obesitat infantil

El conjunt de tots els fenòmens descrits anteriorment donen com a resultat l'aparició de múltiples comorbiditats, ja que l'obesitat no deixa de ser una malaltia multisistèmica amb conseqüències potencialment devastadores (*Ebbeling et al. 2002*). Tot i els problemes que pot suposar tenir sobrepès o ser obès en l'edat adulta, l'obesitat infantil té un gran impacte en la qualitat de vida dels nens i nenes, ja que no només els afecta a la salut física sinó que també s'associa a problemes emocionals juntament amb canvis endocrins (*Ebbeling et al. 2002*).



D'aquesta manera, l'obesitat infantil és el precedent per a l'aparició d'un grup de condicions com la glucèmia, la hipertensió, la resistència a la insulina o la dislipèmia. El conjunt d'aquestes anormalitats es defineix com a síndrome metabòlica (*Friend et al. 2013*), un estat associat amb una major incidència de patir malalties com les CVD i l'aterosclerosi (*Strong et al. 1999*), caracteritzada per l'alteració del perfil lipídic a causa de la inflamació crònica, o la T2DM provocant danys tant a nivell macrovascular com microvascular, entre altres (*Ebbeling et al. 2002*). A més, els FFA circulants que es generen degut a les alteracions del teixit adipós tenen un paper lipotòxic tant en els teixits perifèrics com en els nerviosos, sent els responsables de l'aparició de malalties neurològiques. En detall, els FFA poden dirigir-se cap al CNS que, juntament amb l'estat inflamatori crònic de baix grau, donen lloc al deteriorament cognitiu, altres malalties del CNS i neuropaties perifèriques (*Niccolai et al. 2019*).



**Figura 4. Complicacions de l'obesitat infantil.** L'obesitat infantil és una malaltia multisistèmica amb conseqüències potencialment devastadores. Figura adaptada de *Ebbeling, Pawlak, and Ludwig 2002*.

L'obesitat infantil no només augmenta el risc de patir CVD (*Strong et al. 1999; McGill et al. 2000a, b*), T2DM (*Ludwig and Ebbeling 2001*) o comorbiditats neurològiques (*Balcer et al. 1999; Niccolai et al. 2019*), sinó que també s'associa amb comorbiditats que afecten a tots els sistemes del cos. Entre aquestes es troben les complicacions pulmonars caracteritzades per trastorns a l'hora de dormir com l'apnea del son o l'asma, limitant el nen davant l'activitat física i produint encara més un augment de pes (*Redline et al. 1999; Figueroa-Muñoz et al. 2001; Warensjö et al. 2006b*) o complicacions a nivell hepàtic, com per exemple la malaltia de fetge gras no alcohòlic que podria variar entre esteatosi simple fins a esteatohepatitis progressiva o cirrosi (*Friesen and Roberts 1989; Strauss et al. 2000*). A més, l'obesitat està relacionada amb complicacions en

el sistema endocrí contribuint a una pubertat precoç en nenes i un creixement accelerat amb major risc de desenvolupar la síndrome d'ovaris poliquístics o hipogonadisme en nens (Kaplowitz et al. 2001; Lewy et al. 2001; Grossmann 2018) i complicacions en el sistema múscul esquelètic provocant deteriorament de la mobilitat, augmentant la prevalença de fractures i dolors en les articulacions (Dowling et al. 2001; Goulding et al. 2001) (**Figura 4**).

### 1.1.5.1 Síndrome metabòlica

Tal com s'ha comentat anteriorment, l'obesitat és un precedent per a l'aparició de la síndrome metabòlica caracteritzada per un conjunt de condicions com la presència d'intolerància a la glucosa, dislipèmia, hipertensió i resistència a la insulina on la prevalença en la infància és del 3,3%, superior en nens amb sobrepès (11,9%) i en nens obesos (29,2%) (Friend et al. 2013).

Els criteris de diagnòstic en adults han estat definits per diferents organitzacions, entre elles la WHO, el Grup Europeu per l'Estudi de la Resistència a la Insulina, pel Programa Nacional d'Educació sobre el Colesterol (NCEP; de l'anglès, *National Cholesterol Education Programme*), per la Federació Internacional de Diabetis (IDF; de l'anglès, *International Diabetes Federation*) o per l'Associació Americana d'Endocrinòlegs Clínics. Tot i això, els criteris més acceptats per determinar el diagnòstic de la síndrome metabòlica en adults són els adaptats pel NCEP i per la IDF (**Taula 3**). Dins d'aquests criteris es troben els valors de WC, nivells elevats de TG en sang, nivells baixos de lipoproteïnes d'alta densitat (HDL; de l'anglès, *High-Density Lipoprotein*), altes concentracions de glucosa en sang en dejú i tenir la pressió arterial alta (Han and Lean 2016).

**Taula 3.** Criteris pel diagnòstic de la síndrome metabòlica segons NCEP i IDF en adults. Taula adaptada de Han and Lean 2016.

Factor de risc	Nivells segons NCEP (3 o més factors)	Nivells segons IDF (Obesitat abdominal més 2 factors)
Obesitat abdominal (WC) (cm)		
Home	≥ 102	≥ 94
Dona	≥ 88	≥ 80
Triglicèrids (mg/dL)	≥ 150	≥ 150
Colesterol HDL (mg/dL)		
Home	< 40	< 40
Dona	< 50	< 50
Glucosa en dejú (mg/dL)	≥ 110	≥ 100
Pressió arterial (mm Hg)		
Diastòlica	≥ 85	≥ 85
Sistòlica	≥ 130	≥ 130

**WC:** Circumferència de cintura (de l'anglès, *Waist circumference*); **HDL:** Lipoproteïnes d'alta densitat (de l'anglès, *High-density lipoprotein*); **NCEP:** Programa Nacional d'Educació sobre el Colesterol (de l'anglès, *National cholesterol education Programme*); **IDF:** Federació Internacional de Diabetis (de l'anglès, *International diabetes federation*).

En la població infantil i adolescent, la síndrome metabòlica encara no està ben definida del tot. Tot i això, la proposta més acceptada és el criteri formulat per la IDF (**Taula 4**).

**Taula 4.** Criteris pel diagnòstic de la síndrome metabòlica en nens i adolescents segons IDF. Taula adaptada de IDF (*IDF consensus definition of metabolic syndrome in children and adolescent*; <https://www.idf.org>).

Factor de risc	6 a menys de 10 anys	10 anys a menys de 16 anys
Obesitat abdominal (WC)	≥ percentil 90	≥ percentil 90
Triglicèrids (mg/dL)	No hi ha dades per aquesta població	≥ 100
Colesterol HDL (mg/dL)	No hi ha dades per aquesta població	< 40
Glucosa en dejú (mg/dL)	No hi ha dades per aquesta població	≥ 100
Pressió arterial (mm Hg)	No hi ha dades per aquesta població	
Diastòlica		≥ 85
Sistòlica		≥ 130

WC: Circumferència de cintura (de l'anglès, *Waist circumference*); HDL: Lipoproteïnes d'alta densitat (de l'anglès, *High-density lipoprotein*).

No obstant això, l'obesitat no sempre condueix necessàriament a patir totes aquestes comorbilitats. S'ha identificat un grup d'individus obesos que semblen estar protegits contra les alteracions metabòliques associades a l'obesitat (*Sims 2001; Karelis et al. 2004, 2005*). Aquests es consideren "persones obesas metabòlicament sanes". Tot i tenir un greix corporal excessiu, presenten un perfil metabòlic favorable caracteritzat per una alta sensibilitat a la insulina i un perfil lipídic i inflamatori favorable (*Dvorak et al. 1999; Karelis et al. 2005*). Per aquest motiu, l'obesitat es podria considerar un trastorn heterogeni amb un perfil de risc variable.

### 1.1.6 Models animals per a l'estudi de l'obesitat

L'obesitat és una condició que, majoritàriament, ve condicionada per factors externs. Per això, molts dels models animals utilitzats per estudiar-la són models sans als quals se'ls indueix obesitat mitjançant l'augment del contingut calòric total a la dieta. Aquest augment es pot dur a terme mitjançant l'addició de diferents components calòrics com greixos, sacarosa, fructosa, colesterol o hidrats de carboni (*Aydin et al. 2014*). Els models de rosegadors han sigut àmpliament utilitzats principalment degut a la seva proximitat evolutiva als humans, pel seu genoma ben caracteritzat, perquè són relativament econòmics de mantenir i perquè es reproduïxen ràpidament per tal de poder observar múltiples generacions a la vegada (*Karimi 2012*). Tot i això, els resultats dels models murins d'obesitat sovint no s'han pogut extrapolar als humans a causa de les diferències fisiopatològiques. Per exemple, els rosegadors podrien presentar obesitat gràcies a un aport elevat de calories, especialment mitjançant l'anomenada dieta occidental o dieta Western, però requereixen una manipulació transgènica en els receptors de lipoproteïnes per tal de generar perfils de risc cardiometabòlic associats a l'obesitat (*Pasławski et al. 2011*). Donada aquesta diferència, es necessiten models animals alternatius per estudiar l'obesitat humana on els resultats de la investigació siguin més translacionals. En aquesta línia, altres mamífers com els primats o els porcs són de gran interès, ja que el seu genoma també es troba seqüenciat i, filogenèticament, es troben més propers als humans, especialment en el metabolisme energètic i l'obesitat (*Pant et al. 2015*). De fet, el model porcí

s'ha convertit en un animal experimental no primat rellevant per a l'extrapolació dels resultats als humans degut a nombroses similituds respecte a l'anatomia, el desenvolupament, la nutrició i la fisiologia (Houpt et al. 1979). A més, tenen el metabolisme de les lipoproteïnes més semblant als humans i, les dietes no saludables són capaces d'induir canvis en el perfil lipídic associat a risc cardiometabòlic, reproduint molts dels canvis presents en humans (Royo et al. 2000). A més a més, a diferència dels ratolins, exhibeixen quasi totes les característiques fisiopatològiques relacionades amb l'obesitat en un període relativament curt de temps, com la deposició de greix excessiva, la diabetis, aterosclerosi, hipertensió, entre altres (Houpt et al. 1979; Vodička et al. 2005; Spurlock and Gabler 2008; Pant et al. 2015; Chalvon-Demersay et al. 2017). Tot i això, els estudis en porcs tenen una limitació important, ja que la majoria estan realitzats en femelles i, per tant, en molts casos no se sap si el sexe podria actuar com una variable biològica en aquest model. El motiu de la utilització de femelles quan s'utilitza el porc com a model animal experimental és per temes d'estabulació, ja que els mascles tenen un caràcter molt més dominant (Smith and Swindle 2006).

El porc com a model animal d'obesitat humana no només s'ha utilitzat per a l'estudi de les comorbiditats descrites anteriorment, sinó que també s'ha utilitzat per estudiar com afecta l'obesitat en el cervell (Val-Laillet et al. 2011) gràcies a la semblança del seu cervell amb el dels humans (Sauleau et al. 2009). L'estudi de Val-Laillet et al. (Val-Laillet et al. 2011) demostra que l'obesitat induïda per dieta en porcs ve acompanyada de modificacions en l'activitat cerebral basal que probablement són un tret adquirit i específic de la malaltia. Realitzant una cerca bibliogràfica exhaustiva no s'ha trobat cap més article relacionat amb l'obesitat i modificacions en el metabolisme cerebral en un context d'obesitat infantil. Per aquest motiu, donada la semblança entre el porc com a model animal d'obesitat humana i la falta d'estudis dels canvis cerebrals produïts per l'obesitat durant l'obesitat infantil, es creu que podria ser interessant l'estudi dels canvis metabòlics que es produeixen en un cervell en creixement durant la ingesta de dietes no saludables.

En aquest context, la biologia de sistemes, concretament les anomenades ciències "òmiques", poden ser de gran interès i ens poden ajudar en l'estudi de l'obesitat, ja que ens permeten estudiar tot el genoma, proteoma o metaboloma en lloc de només estudiar un sol gen, una proteïna o un sol metabòlit. Per aquesta raó, les ciències "òmiques" s'apliquen en investigacions translacionals permetent tant el diagnòstic en fases subclíniques, així com el seguiment i la resposta a un tractament, al marge de possibilitar el desenvolupament de noves aproximacions terapèutiques.

## 1.2. Metabolòmica

La biologia de sistemes és una branca de la biologia que acull les anomenades ciències “òmiques” com la genòmica, la transcriptòmica, la proteòmica, la metabolòmica, la lipidòmica, l’epigenòmica i moltes altres que, integrades, permeten aconseguir una imatge més àmplia del comportament dels components moleculars d’una cèl·lula, teixit i/o organisme (Weckwerth 2003; Cortassa et al. 2015). Per tant, la biologia de sistemes esdevé un nou camp interdisciplinari que es centra en les interaccions complexes dels sistemes biològics mitjançant la combinació de totes les dades obtingudes dels diferents enfocaments “òmics”.

La metabolòmica és una de les ciències “òmiques” més recents i es va definir per primera vegada durant els anys 90 com la ciència que estudia el conjunt de productes finals o subproductes de les diferents vies metabòliques, denominats metabòlits, presents en els organismes vius (Nicholson et al. 1999). A continuació, i per a una millor comprensió, es revisaran els termes metabòlit, metaboloma i signatura metabòlica.

Els **metabòlits** són molècules amb un baix pes molecular (per consens inferior a 3000 Da) que es transformen químicament durant el metabolisme i inclouen aminoàcids, lípids, àcids orgànics, nucleòtids i altres substàncies intermediàries en el metabolisme cel·lular amb propietats fisicoquímiques molt diferents. Per tant, ens proporcionen una lectura funcional de l’estat cel·lular (Lu et al. 2008; Patti et al. 2012; Kordalewska and Markuszewski 2015). El **metaboloma** es defineix com el conjunt de tots els metabòlits tant endògens com exògens d’una cèl·lula, teixit o organisme que han estat resultat de l’activitat enzimàtica o de l’exposició ambiental (entre les quals trobem la dieta). Tots aquests metabòlits són importants pel creixement, manteniment o per la funció normal en un estat fisiològic específic (Harrigan and Goodacre 2003). Per tant, la importància de la metabolòmica rau en el fet que permet una avaluació global d’un estat cel·lular en un entorn immediat, tenint en compte la regulació genètica, la cinètica enzimàtica i els canvis en les reaccions metabòliques (Spratlin et al. 2009). En comparació amb els gens o les proteïnes, els metabòlits es troben més propers als canvis del fenotip i, conseqüentment, en la funció, ja que són el resultat de tots aquests processos juntament amb la interacció amb l’ambient (Goodacre et al. 2004; Spratlin et al. 2009). La **signatura metabòlica** consisteix en una empremta química formada pel conjunt de metabòlits que es troben en una mostra biològica, sigui un teixit, un biofluid o un cultiu cel·lular, que permet associar-ho a un procés fisiològic o patològic i és una eina molt útil per la cerca i descobriment de nous biomarcadors. Aquests poden permetre tant el diagnòstic de fases subclíniques com el seguiment i la resposta a un tractament per tal de poder disminuir la morbiditat i la mortalitat d’una certa patologia.

### 1.2.1 Passat, present i futur de la metabolòmica

El naixement del camp metabolòmic i el seu estat actual és el fruit de dècades d'investigació en diferents àmbits com la física, la química i la biologia.

#### 1.2.1.1 Una mica d'història

Gràcies als avenços tecnològics i computacionals que han propiciat la creació del camp de la metabolòmica com a nova forma d'estudiar i comprendre la bioquímica clàssica, s'ha pogut passar de determinar les primeres molècules orgàniques com l'àcid làctic o l'àcid cítric fins a les 114.166 entrades que hi ha avui en dia en la base de dades més important del metaboloma humà (*Lavoisier 1789; Wishart et al. 2007*). L'any 1842, Justus von Liebig va publicar per primera vegada diferents equacions metabòliques que descriuen processos fisiològics sense cap altra eina que el seu coneixement en química orgànica (*Gregory et al. 2011*). L'any 1940, es va produir un creixement exponencial en la investigació de la bioquímica gràcies a l'ús d'isòtops radioactius. En aquell moment, Martin i Synge van desenvolupar diferents mètodes cromatogràfics com la cromatografia de gasos (GC; de l'anglès, *Gas Chromatography*) (*Martin and Synge 1941*). Aquest descobriment va fer possible esbrinar les vies biosintètiques on participen pràcticament totes les classes de molècules biològiques. En tot això, la tecnologia va anar evolucionant i amb ella l'aparició del camp de l'espectrometria amb l'aparició de dues tècniques necessàries per tal de comprendre el camp metabolòmic tal com el coneixem avui en dia. Per una banda, l'aparició de la ressonància magnètica nuclear (NMR; de l'anglès, *Nuclear Magnetic Resonance*) gràcies a Rabi, el qual va obtenir el Premi Nobel de Física l'any 1944 i, d'altra banda, l'espectrometria de masses (MS; de l'anglès, *Mass Spectrometry*) per Hans Dehmelt i Wolfgang Paul guanyadors del Premi Nobel de Física pel desenvolupament de la tècnica de trampa de ions (*Boesch 2004; Griffiths 2008*). Uns anys més tard i per primera vegada, Vanlear i Mclafferty (*Vanlear and Mclafferty 1969*) van unir un cromatògraf de gasos a un espectròmetre de masses i van introduir per primera vegada la dissociació de les molècules per col·lisió. L'any 1967 van combinar també la cromatografia líquida (LC; de l'anglès, *Liquid Chromatography*) a MS (*Arpino et al. 1974*). Posteriorment es va descobrir la ionització per electroesprai (ESI; de l'anglès, *Electrospray Ionization*) gràcies a John Bennet Fenn (*Fenn et al. 1989*) que va permetre, en l'any 1994, el primer estudi metabolòmic no dirigit (*Lerner et al. 1994*).

Gràcies a tots aquests avenços, avui en dia ens trobem en la nova era de la metabolòmica que ens permetrà estudiar nous aspectes del metabolisme i detalls desconeguts de la regulació cel·lular en diferents estats fisiològics (*Yanes 2015*).

### 1.2.1.2 Eines per a la realització d'estudis metabòlics

La metabòmica té com a objectiu detectar, quantificar i resoldre l'estructura i la funció dels metabòlits, que es caracteritzen per una gran diversitat fisico-química com ara l'àmplia gamma de polaritats, pesos moleculars, grups funcionals, estabilitat i reactivitat química. Avui en dia hi ha una àmplia varietat de plataformes tot i que, les principals plataformes per l'anàlisi metabòlica són MS i NMR, les característiques de les quals es resumeixen en la **Taula 5**. Tanmateix, hi ha altres eines analítiques disponibles que també permeten la mesura de metabòlits, com ara l'espectroscòpia visible a ultraviolats o la ionització per flama (FID; de l'anglès, *Flame-ionization Detection*).

La NMR és una tècnica d'anàlisi espectroscòpic que permet realitzar anàlisis qualitius i quantitatius sense destruir la mostra. Es tracta d'una tècnica molt reproducible que permet la detecció de metabòlits presents en concentracions relativament altes ( $>1 \mu\text{M}$ ) (*Keun and Athersuch 2011; Emwas et al. 2019*). Les principals limitacions d'aquesta tècnica respecte a les tècniques basades en MS són una menor sensibilitat i el fet que requereix un major volum de mostra. La tècnica MS permet separar els ions i mesurar, amb una elevada precisió, la relació massa/càrrega ( $m/z$ ), l'abundància dels ions presents en la barreja i permet la detecció de metabòlits amb concentracions de  $<10$  a  $100 \text{ nM}$  (*Emwas et al. 2019*), permetent l'anàlisi de les mostres tant de forma qualitativa com quantitativa. Aquest fet s'optimitza quan s'acobla a una separació cromatogràfica prèvia (*Dettmer et al. 2007; Kordalewska and Markuszewski 2015*). A més, també ofereix informació estructural detallada necessària per a la caracterització de nous metabòlits.

**Taula 5.** Comparació de les dues principals tecnologies utilitzades per l'anàlisi metabòlic. Taula adaptada de *Nagrath et al. 2011*.

Característiques	NMR	MS
Sensitivitat	Mitjana	Alta
Preparació de la mostra	Fàcil. No destrueix la mostra	Es necessiten tècniques de separació cromatogràfica per augmentar la identificació del pic
Limitacions	No s'utilitza en l'estudi clínic, ja que per utilitzar l'equip es necessita una formació especial i no té un alt rendiment per a l'anàlisi de metabòlits	No s'utilitza en l'estudi clínic, ja que necessita una formació especial i té un cost elevat
Reproductibilitat	Alta	Baixa per biofluids
Resolució	Alta	Alta
Quantificació	Fàcil	Difícil
Rendiment	Baix	Alt

**NMR:** Ressonància magnètica nuclear (de l'anglès, *Nuclear magnetic resonance*); **MS:** Espectrometria de masses (de l'anglès, *Mass spectrometry*).

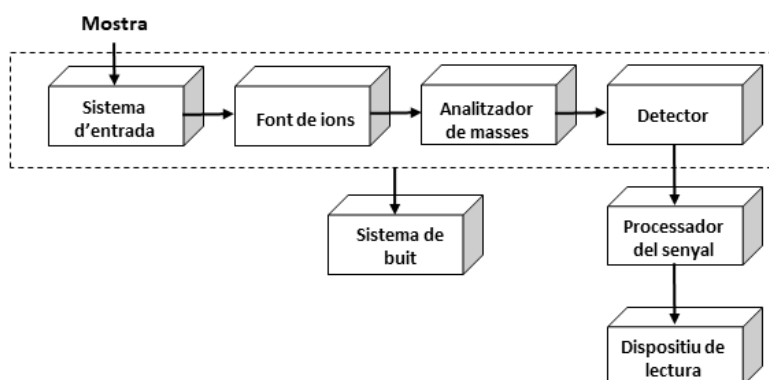
Tot i que la MS és una tècnica per la identificació de compostos purs, la complexitat dels espectres de masses dificulta molt l'anàlisi. Per això, per l'anàlisi de mostres complexes s'utilitza l'acoblament d'aquesta tècnica amb tècniques de separació prèvies com la cromatografia o l'electroforesi, que permet l'estudi de compostos purs o de barreges de diferent naturalesa, des

de compostos volàtils de baix pes molecular fins a macromolècules naturals i polímers (Kordalewska and Markuszewski 2015).

La cromatografia és un mètode que s'utilitza per separar, identificar i quantificar els compostos presents en mostres líquides o gasoses (per mostres sòlides es necessita una etapa de dissolució o extracció). En cromatografia, els soluts d'interès se separen segons quina és la seva velocitat de desplaçament quan són arrossegades per la fase mòbil a través d'un sistema cromatogràfic que conté una fase estacionària (sòlid o líquid). La mostra és dissolta en la fase mòbil i es fa passar a través de la fase estacionària (immiscibles entre elles). És important escollir bé quines seran les dues fases per tal que els components de la mostra es distribueixin de forma diferent entre les dues. Aquells que tenen més afinitat per la fase estacionària quedaran fortament retinguts i es mouran lentament amb el flux de la fase mòbil; en canvi, si els components de la mostra tenen més afinitat per la fase mòbil, es retindran dèbilment en la fase estacionària i sortiran del sistema cromatogràfic més ràpidament (Coskun 2016).

Entre les tècniques cromatogràfiques hi ha diverses opcions com la GC, l'electroforesi capil·lar o la LC. Els avantatges de la utilització de GC és que té una alta reproductibilitat i una alta sensibilitat analítica tot i que, només es pot aplicar a compostos que siguin volàtils i estables tèrmicament (Moco et al. 2007). Els avantatges d'utilitzar l'electroforesi capil·lar és que es consumeix molt poca quantitat de mostra però només es pot aplicar a compostos que tenen una càrrega polar, tot i això és una tècnica reproducible i robusta. Per últim, la LC té una bona reproductibilitat, alta sensibilitat, i a més, té moltes variants cromatogràfiques que permeten augmentar molt el ventall dels metabòlits que es poden estudiar (Hagen et al. 2010).

Per explicar com es detecten els analits d'interès s'explicarà la MS de forma més detallada, ja que és la que s'ha utilitzat en aquesta tesi, començant pels principals components que formen un espectròmetre de masses (Figura 5).

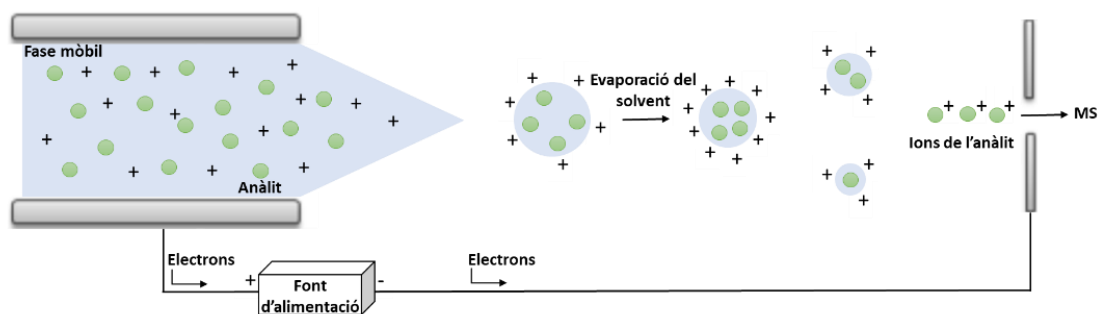


**Figura 5. Components d'un espectròmetre de masses.** Un espectròmetre de masses bàsicament està format per tres components principals: la font de ions, l'analitzador i el detector.



L'objectiu del **sistema d'entrada** és introduir una petita quantitat de mostra dins l'espectròmetre de masses. Normalment el sistema d'entrada conté un medi que permet la volatilització de les mostres sòlides o líquides. La **font de ions** converteix els components de la mostra en ions gràcies al bombardeig amb electrons, molècules o fotons (*Glish and Vachet 2003*). Alternativament, això també es pot aconseguir mitjançant energia tèrmica o elèctrica. En molts casos, la font de ionització i el sistema d'entrada es troben combinats en un únic component. Si s'utilitzen fonts de fase gas, la mostra és volatilitzada i després ionitzada en canvi, si s'utilitzen fonts de desorció, l'energia es transmet directament a la fase sòlida o líquida, produint-se la ionització i la transferència dels ions a l'estat gasós.

Hi ha diferents tipus de fonts, entre elles i les més utilitzades en l'espectrometria de masses són l'ESI i la font de ionització/desorció làser assistida per matriu (MALDI; de l'anglès, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*). Els avantatges de l'ESI és que té un alt rang de compostos ionitzables, el mètode de ionització és suau, molt poc destructiu, que permet l'observació de les molècules intactes amb una o múltiples càrregues i, per últim, que és fàcilment adaptable a LC i a altres analitzadors de masses. El problema de la utilització d'aquesta font és la formació de múltiples adductes. En canvi, la font MALDI també té una ionització suau amb poca o cap fragmentació però, l'afecta molt la matriu (un problema per a compostos menors de 700 Da) i, a més, hi ha la possibilitat de fotodegradació (*Siuzdak 2004*). En la **Figura 6** es pot observar un esquema de la font ESI que és la que s'ha utilitzat per a la realització de part del treball experimental present en aquesta tesi.

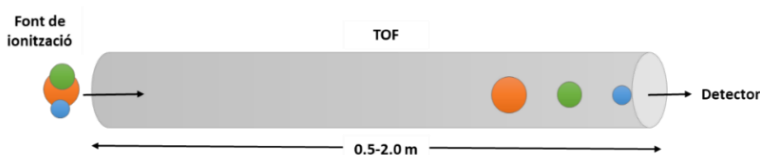


**Figura 6.** Esquema de ionització per electroesprai en mode positiu. Sota alta tensió, el con de Taylor emet un raig de gotetes de líquid. El dissolvent de les gotetes s'evapora progressivament deixant-les cada cop més carregades. Quan la càrrega supera el límit de Rayleigh, la gota es dissocia, deixant un flux de ions carregats (en aquest cas, positivament). **MS:** Espectrometria de masses (de l'anglès, *Mass spectrometry*). Figura adaptada de *Banerjee and Mazumdar 2012*.

Els processos de ionització molecular poden donar lloc a diferents ions carregats positivament o negativament. Per exemple, es poden observar adductes protonats per molècules positivament carregades o, per contra, en les molècules carregades negativament, adductes desprotonats. Avui en dia, la ionització més utilitzada és en positiu, ja que gran varietat de molècules poden acceptar de forma fàcil un protó mentre que, la ionització negativa s'utilitza per molècules que

tenen grups funcionals que perden fàcilment un protó (per exemple, els àcids carboxílics). Tot i que la majoria de molècules poden ser ionitzades en mode positiu, a vegades és necessari la utilització del mode negatiu per poder dur a terme un estudi més satisfactori (Siuzdak 2004). En tot això, també hi ha metabòlits que difícilment s'ionitzen (com la glucosa).

Els ions es transfereixen a l'**analitzador de masses** i són accelerats i separats segons la seva  $m/z$ . També hi ha diverses opcions a l'hora d'escollir un analitzador de masses. Tots els instruments tenen avantatges i desavantatges i, per tant, s'ha d'escollir bé l'equip que es vol utilitzar segons quin sigui l'experiment metabolòmic que es vol realitzar. Per a la realització d'aquesta tesi s'han fet servir dos tipus d'analitzador diferents que són l'analitzador temps de vol (TOF; de l'anglès, *Time of Flight*) combinat amb un quadrupol (Q) i el triple quadrupol (QQQ) però, n'hi ha d'altres. El TOF separa els ions en funció de la seva velocitat. Tots els ions amb la mateixa càrrega obtenen la mateixa energia cinètica després de l'acceleració per tant, els ions amb una  $m/z$  inferior tindran velocitats superiors en comparació amb ions amb una  $m/z$  més elevada. Després de que els ions s'accelerïn, es desplacen a una distància fixa, normalment entre 0,5 i 2 metres abans de colpejar el detector. D'aquesta manera i mitjançant la mesura del temps que tarda a arribar el ió al detector, es podrà determinar quina és la seva  $m/z$  (**Figura 7**) (Glish and Vachet 2003).



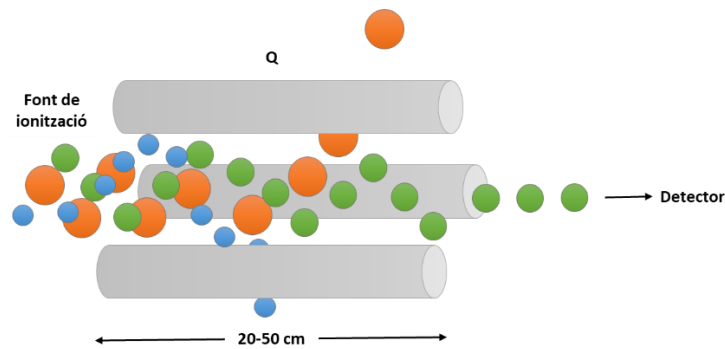
**Figura 7.** Diagrama de l'analitzador de massa TOF. L'anàlisi en el TOF s'aconsegueix perquè els ions de diferents valors de  $m/z$  tenen velocitats diferents i per tant arriben al detector en diferents moments. **TOF:** Analitzador temps de vol (de l'anglès, *Time of Flight*). Figura adaptada de Glish and Vachet 2003.

D'altra banda, el Q només deixa passar aquells ions amb una determinada  $m/z$  fins al detector mentre que els altres ions tindran trajectòries inestables. Això permet seleccionar un ió amb una  $m/z$  particular o permet buscar un rang de valors  $m/z$  variant contínuament el voltatge aplicat. D'aquesta manera el Q permet l'arribada de ions de diferents  $m/z$  de forma seqüencial al detector. El QQQ està format per tres quadrupols. El primer quadrupol actua com a filtre de massa, el segon quadrupol actua com a cel·la de col·lisió (CE; de l'anglès, *Collision Energy*) que serveix per fragmentar els ions de l'ió primari seleccionat en el primer Q. Per últim, aquests fragments passen al tercer Q on es poden filtrar o escanejar donant informació sobre les intensitats dels fragments o poder deduir l'estructura de l'ió original (**Figura 8**).

Finalment, el nombre de ions per a cada  $m/z$  és mesurat en el detector que converteix el feix de ions en un senyal elèctric que pot ser processat o emmagatzemat. El detector més utilitzat és el multiplicador d'electrons. El feix de ions incideix sobre un càtode, arrencant els electrons.

Després, una sèrie de dínodes col·locats a potencials cada vegada més alts amplifiquen el corrent d'electrons.

Per últim, l'**emmagatzematge** i **processament de dades** permet emmagatzemar i processar els espectres de masses obtinguts en un ordinador. És molt freqüent la construcció de biblioteques d'espectres de masses per dur a terme la identificació de qualsevol compost per comparació, tenint en compte les característiques cromatogràfiques i d'espectrometria.



**Figura 8. Diagrama de l'anàlitzador de massa Q.** El voltatge aplicat a través de les quatre barres de metall permet als ions d'una determinada  $m/z$  mantenir trajectòries estables des de la font de ions al detector, mentre que els ions amb valors de  $m/z$  diferents no poden mantenir trajectòries estables. **Q:** Quadrupol. Figura adaptada de *Glish and Vachet 2003*.

Com es pot apreciar, la diversitat de fonts cromatogràfiques, de ionització i d'anàlitzadors de masses es tradueix a una gran varietat de possibilitats fent que l'elecció de la plataforma adequada sigui crucial a l'hora de dissenyar un bon experiment de metabolòmica, tenint en compte de què no hi ha una "tècnica universal" és a dir, de rangs universals, sensibilitats diverses i no específiques.

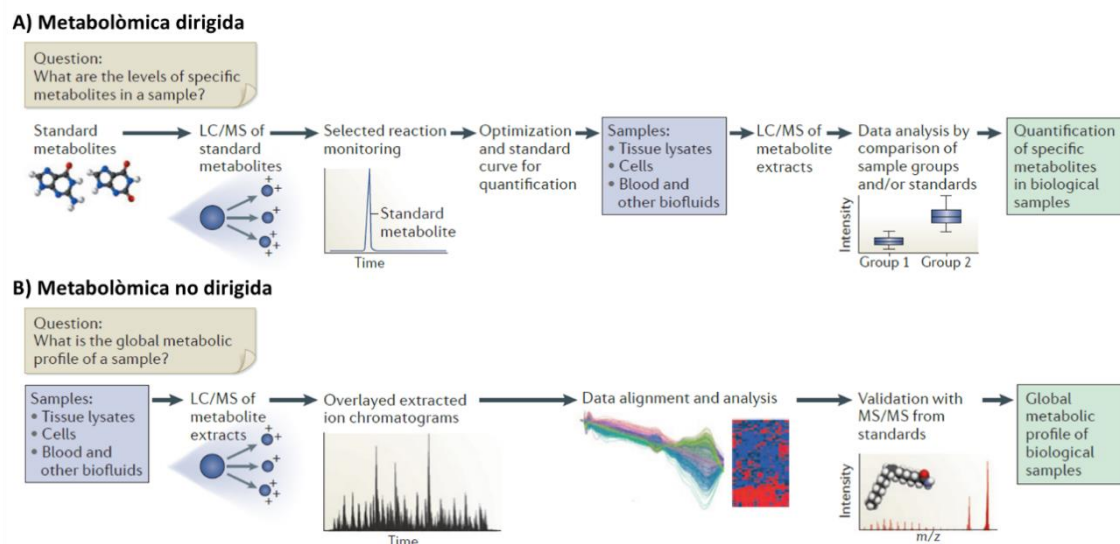
### 1.2.1.3 Tipus d'estudis metabolòmics

Típicament, la metabolòmica emprava dos enfocaments analítics diferents: i) aproximació dirigida, que se centra en la quantificació de les variacions en un nombre de metabòlits definits prèviament (per exemple, aminoàcids i els seus derivats) en base a una millor comprensió del seu paper biològic; i ii) aproximació no dirigida, destinada a una anàlisi exhaustiu o global que podria donar lloc a la identificació i caracterització d'una gran varietat de metabòlits que poden agrupar-se en patrons recognoscibles (*Park et al. 2014*). Aquests dos mètodes difereixen en molts aspectes, com per exemple en la complexitat dels procediments de preparació de la mostra, la precisió experimental, el rang de metabòlits, el nivell de quantificació (relatiu vs. absolut), entre altres (*Rangel-Huerta and Gil 2016*). Totes aquestes característiques fan que els investigadors estableixin objectius específics per a cada tipus d'enfocament, com ara generar una hipòtesi o provar una hipòtesi desenvolupada prèviament (*Putri et al. 2013*).

La **metabolòmica dirigida** consisteix en mesurar una llista específica de metabòlits que pertanyen a una o més vies metabòliques anteriorment definides. Aquesta aproximació es troba condicionada per una pregunta bioquímica específica o per una hipòtesi de partida que motiva a l'investigador a estudiar una via concreta i a mesurar uns metabòlits diana (**Figura 9A**) (*Spratlin et al. 2009*). Aquest enfocament pot ser eficaç per a estudis farmacocinètics, així com per mesurar la influència terapèutica o les modificacions sobre una via metabòlica definida anteriorment (*Patti et al. 2012*). Tot i que el terme "metabolòmica" és recent, hi ha infinitat d'estudis dirigits sobre metabòlits que es remunten al principi de les investigacions científiques (*Dalgliesh et al. 1966; Dirren et al. 1975; Eknayan 1999*). Per aquest motiu, hi ha una gran quantitat de literatura que investiga protocols òptims per a la preparació i per la realització d'anàlisis específics de metabòlits (*Want et al. 2006; Astarita et al. 2009; Yanes et al. 2011*). Sens dubte, els enfocaments dirigits han tingut un paper important en el desenvolupament de la metabolòmica. En particular, s'ha avançat en l'ús de la MS del QQQ que, avui en dia, disposa de mètodes rutinaris per analitzar la majoria dels metabòlits que formen el metabolisme del carboni, així com d'aminoàcids i nucleòtids. Aquests desenvolupaments proporcionen un mètode altament sensible i robust que permet mesurar un nombre significatiu de metabòlits biològicament importants amb un rendiment relativament alt. Addicionalment, els mètodes basats en QQQ són quantitativament fiables i per tant, ofereixen l'oportunitat de quantificar metabòlits de baixa concentració que són difícils de detectar utilitzant mètodes amb menys sensibilitat, com ara NMR (*Patti et al. 2012*).

La **metabolòmica no dirigida** té com a objectiu mesurar tants metabòlits com sigui possible sense tenir necessàriament cap hipòtesi de partida. Aquesta aproximació és molt útil per analitzar les diferències existents entre diferents grups d'estudi però per dur-ho a terme de forma exitosa, és necessari dissenyar l'experiment acuradament. El nombre de mostres que s'analitzaran, la matriu d'aquestes, el processament que es durà a terme, el mètode cromatogràfic que s'utilitzarà i la plataforma d'anàlisi són algunes de les qüestions que s'han de tenir en compte abans per tal d'obtenir una hipòtesi futura i poder descobrir nous biomarcadors o signatures metabòliques associades a un procés fisiològic concret o a una patologia (**Figura 9B**) (*Griffin and Kauppinen 2007; Patti et al. 2012; Dunn et al. 2013*). Tot i que la metabolòmica no dirigida es pot realitzar mitjançant diferents plataformes, la cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses (LC/MS; de l'anglès, *Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*) permet la detecció d'un gran nombre de metabòlits i, per tant, és la tècnica més utilitzada. Amb la utilització d'aquesta tècnica poden ser detectats milers de característiques moleculars dins de mostres biològiques (*Jonsson et al. 2005; Nordström et al. 2008; Barton et*

al. 2008). Cada característica molecular correspon a un ió detectat amb una  $m/z$  i un temps de retenció (RT; de l'anglès, *Retention Time*), tot i que alguns metabòlits poden presentar més d'una  $m/z$  si hi ha diferents adductes. En contrast amb els resultats obtinguts en l'enfocament dirigit, en aquest cas les dades obtingudes són extremadament complexes i és necessari la utilització d'eines sofisticades d'anàlisi de dades. A més, en els experiments LC/MS poden haver-hi desviacions en el RT de mostra a mostra, transferència de compostos entre mostres (en anglès, *carry over*), fluctuacions de la temperatura i del pH de la fase mòbil, així com d'altres variacions. Tot i això, aquests reptes s'han pogut abordar gràcies a aplicacions quimiomètriques i bioinformàtiques (Katajamaa and Orešič 2005; Smith et al. 2006). Avui en dia encara hi ha un gran nombre de metabòlits sense ser caracteritzats pel que fa a la seva estructura i funció i, a més, molts d'aquests metabòlits no caracteritzats canvien en funció dels estats fisiològics (Baker 2011).



**Figura 9. Flux de treball en una anàlisi de metabolòmica dirigida i no dirigida basat en LC/MS. A)** Flux de treball en una anàlisi de metabolòmica dirigida. En primer lloc s'utilitzen estàndards comercials per definir els paràmetres tant a nivell cromatogràfic com d'espectrometria de masses perquè, posteriorment, puguin ser detectats en mostres biològiques. A més, també es generen les corbes patró per poder realitzar la seva posterior quantificació. Una vegada els mètodes estan establerts mitjançant els metabòlits estàndards, els metabòlits s'extreuen dels teixits, biofluids o cultius cel·lulars i s'analitzen. Per últim, l'anàlisi de dades permet comparar els nivells d'aquells metabòlits que han estat optimitzats amb anterioritat en els diferents grups d'estudi. **B)** Flux de treball d'una anàlisi de metabolòmica no dirigida. En primer lloc els metabòlits són aïllats de les mostres biològiques i posteriorment són analitzats per LC/MS. Després de l'adquisició de dades, els resultats es processen mitjançant programes bioinformàtics per tal de poder identificar els pics que canvien entre els grups de mostres mesurats. Els valors de  $m/z$  dels pics d'interès es busquen en bases de dades per poder obtenir possibles identifikacions. A continuació, es confirmen les possibles identifikacions comparant les dades d'espectrometria de masses en tàndem (MS/MS) i les dades de RT amb les dels compostos estàndard. El flux de treball en un estudi no dirigit té un abast global i proporciona dades relacionades amb el metabolisme cel·lular complet. **LC/MS:** Cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses (de l'anglès, *Liquid chromatography coupled to mass spectrometry*); **MS/MS:** Espectrometria de masses en tàndem. Figura adaptada de Patti et al. 2012.

#### 1.2.1.4 Parts de l'anàlisi metabòlic

Les anàlisis basades en MS es poden dividir en tres parts: i) adquisició i la preparació de la mostra, ii) separació i la detecció de metabòlits i iii) obtenció i anàlisi de dades. En el cas de l'anàlisi metabòlic no dirigit s'hi afegeix un pas més que és la identificació de metabòlits.

##### 1.2.1.4.1 Preparació de la mostra i adquisició de dades

El primer pas en una anàlisi metabòlic és aïllar els metabòlits de les mostres biològiques (teixit, biofluid o cultiu cel·lular). És molt important tenir en compte que els nivells de certs metabòlits poden veure's afectats per factors individuals com l'edat, el sexe, la dieta, el nivell d'activitat física, entre altres. Dins de la preparació de la mostra, el primer pas és homogeneïtzar la mostra i fer precipitar les proteïnes, ja que aquestes interfereixen en l'anàlisi LC/MS (*Villas-Bôas et al. 2005; Want et al. 2006; Yanes et al. 2011*). Si utilitzem un sistema de LC/MS, abans que la mostra entri dins del sistema MS, els metabòlits aïllats se separen utilitzant columnes cromatogràfiques i fases mòbils.

A causa de la diversitat química i estructural de les mostres biològiques, la preparació de la mostra no és una tasca fàcil, ja que poden contenir des de metabòlits polars, com aminoàcids i nucleòtids, a molècules no polars, com esteroides i lípids de membrana. Per tal d'augmentar el nombre de compostos detectats, s'utilitzen mètodes complexos per a l'extracció i la separació de metabòlits (*Patti 2011*). És important tenir en compte que cap mètode d'extracció és universal i que no s'aconseguirà mai, utilitzant un sol solvent, l'extracció de tots els metabòlits presents en la mostra. Per exemple, l'ús de dissolvents orgànics augmenta l'extracció de compostos hidrofòbics mentre que, l'ús de dissolvents aquosos millora l'extracció de compostos hidròfils. De la mateixa manera, la utilització d'una fase estacionària hidrofòbica durant la separació cromatogràfica, permet millorar la separació dels metabòlits hidrofòbics mentre que, la utilització de fases estacionàries hidrofíliques separa els compostos hidrofílics de forma més eficaç (*Patti et al. 2012*).

La majoria de dades, en metabòmica dirigida, es recullen mitjançant un QQQ mentre que, en una anàlisi no dirigit, els analitzadors de masses més utilitzats són el QTOF o l'Orbitrap (*Patti et al. 2012*). Les dades es poden recollir mitjançant el mode MS1 (només es mesura la  $m/z$  del metabòlit intacte, d'adductes o de fragments) o es pot fragmentar mitjançant MS/MS per obtenir els patrons de fragmentació d'un metabòlit específic. Cal recordar que, tenint en compte les característiques de ionització, no tots els metabòlits presenten la mateixa capacitat de

detecció, com per exemple, els glúcids, que poden detectar-se més difícilment que altres molècules més polaritzables (*Patti et al. 2012*).

#### **1.2.1.4.2 Obtenció i anàlisi de dades**

L'objectiu principal de l'anàlisi de dades és poder comparar els perfils metabolòmics per tal de trobar canvis significatius entre els diferents grups experimentals. Per dur a terme això és necessari la utilització de tècniques bioinformàtiques i d'anàlisis d'estadística (*Goodacre et al. 2004*).

L'anàlisi de dades és diferent segons si es tracta d'una aproximació dirigida o d'una no dirigida. El primer que s'obté són les dades dels cromatogrames en brut que, per una banda, en la anàlisi dirigida, es quantificaran els metabòlits normalitzant els resultats amb un estàndard intern, extern o senyal total optimitzat en cada experiment (*Mullin 2010*). D'altra banda, en l'anàlisi no dirigit, les dades obtingudes són molt més complexes. Degut a aquesta complexitat es necessita un programari específic capaç de detectar i alinear els pics, filtrar possibles contaminants, artefactes, ions de fons i, a més, tenir en compte possibles adductes de la molècula d'interès. Una vegada s'obté això, el següent pas és la cerca de metabòlits amb canvis significatius entre els diferents grups que, s'identificaran mitjançant bases de dades públiques o privades (*Moco et al. 2007; Mahieu and Patti 2017*). Per últim, l'anàlisi estadístic es pot abordar mitjançant eines clàssiques d'estadística univariant però també metodologia multivariant. Dins de l'estadística multivariant trobem mètodes no supervisats i mètodes supervisats.

Els mètodes no supervisats serveixen per cercar patrons similars dins d'un mateix conjunt de mostres. L'anàlisi de components principals (PCA; de l'anglès, *Principal Component Analysis*) és el mètode més utilitzat per a la identificació i la representació de la variabilitat entre les mostres. El PCA permet identificar quins són els metabòlits que contribueixen més en les diferències observades en les mostres estudiades i, divideix les dades en diferents parts o components, que es poden representar en eixos dimensionals (2D o 3D). Aquests components van acompanyats d'un percentatge que significa la variabilitat explicada per aquest component principal (*Putri et al. 2013*). Un altre mètode multivariant no supervisat molt utilitzat en metabolòmica és l'anàlisi d'agrupació jeràrquica. En aquesta anàlisi es busca agrupar les mostres tractant d'aconseguir la màxima homogeneïtat en cada grup i la major diferència entre els grups. Aquí, és important escollir bé les funcions de distància (Pearson o Euclídea) i l'algoritme d'agrupament (mitjana entre grups, mètode del Centroide o mètode Wards), ja que la utilització de diferents algoritmes pot donar resultats diferents en un mateix conjunt de mostres.

En els mètodes supervisats s'aplica un algoritme que analitzarà cada mostra tenint en compte el grup experimental al qual pertany. Dins d'aquest grup, l'anàlisi multivariant més utilitzat és l'anàlisi de mínims quadrats (PLS-DA; de l'anglès, *Partial Least Square Discriminant Analysis*). Aquesta anàlisi pot realitzar tant la classificació com la selecció de funcions i, mitjançant un mètode de validació, és capaç d'escollir el nombre òptim de components. El mètode PLS-DA s'adapta a les dades i, per tant, cal validar-lo per tal de veure si la separació que hi ha és estadísticament significativa o es deguda a sorolls aleatoris. Això s'aconsegueix mitjançant proves de permutació (*Pérez-Enciso and Tenenhaus 2003*). Un altre mètode utilitzat és el de boscos aleatoris (en anglès, *Random Forest*), una tècnica estadística basada en crear arbres de classificació de forma aleatòria basada en l'algoritme CART (de l'anglès, *Classification and Regression Trees*) (*Breiman 2001*).

Aquests només són alguns dels mètodes emprats per a l'anàlisi bioestadístic però, la seva descripció detallada passa els objectius d'aquesta tesi. Tot i això, una revisió recent enumera almenys 30 programes bioinformàtics diferents per a l'anàlisi bioestadístic (*Spicer et al. 2017*).

#### **1.2.1.4.3 Identificació de metabòlits**

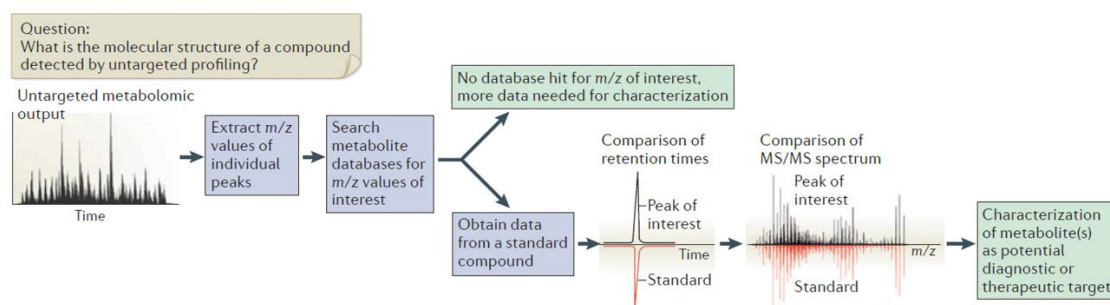
Per determinar la identitat d'una molècula d'interès, es busca primer la massa exacta en diferents bases de dades com la base de dades *Human Metabolome Database* (*Human Metabolome Database*; <http://www.hmdb.ca>) o la base de dades anomenada Metlin (*METLIN*; <http://www.metlin.scripps.edu>). Aquestes bases de dades només proporcionen una possible identificació dels metabòlits i, falta confirmar-la comparant els valors de RT i de fragmentació mitjançant els espectres MS/MS obtinguts en la mostra amb els estàndards comercials (**Figura 10**). Actualment, les dades MS/MS s'obtenen a partir d'experiments addicionals i, la comparació amb els patrons de fragmentació MS/MS, es realitza o manualment o amb programaris especialitzats (per exemple, el LipidBlast o el LipidMatch). A més, tot i que les bases de dades han crescut considerablement durant els últims anys, encara hi ha molts dels metabòlits detectats en les mostres biològiques que no es poden identificar. Per tant, actualment, és impossible identificar tots els metabòlits detectats mitjançant LC/MS per a la majoria de mostres analitzades.

#### **1.2.1.5 Perspectives futures: integració de les ciències "òmiques"**

La metabolòmica és un camp científic en constant desenvolupament i, per aquesta raó, cada vegada hi ha més publicacions científiques que presenten el desenvolupament de noves instrumentacions, metodologies o aplicacions (*Nielsen 2006*). Aquests fets fan que es necessiti



definir unes bases de dades adequades, per tal de poder comparar les dades de diferents experiments. A més, l'estandarització de mètodes analítics i la preparació de mostres també facilitaria aquesta tasca i permetria la comparació d'experiments realitzats entre diferents laboratoris. En la metabolòmica no dirigida, un pas molt important és la identificació de metabòlits i, per aquest motiu, apareix la necessitat de desenvolupar biblioteques actualitzades d'espectres de masses de les diferents plataformes que hi ha disponibles avui en dia (*Dias and Koal 2016*). En la metabolòmica dirigida és important centrar-se en desenvolupar bases de dades que continguin el major nombre de concentracions de metabòlits en diferents condicions, siguin fisiològiques o fisiopatològiques, i més, si es volen integrar de manera significativa amb les dades d'altres enfocaments "òmics".



**Figura 10. Flux de treball en la caracterització de metabòlits en la anàlisi de metabolòmica no dirigida.** En l'estudi metabolòmic no dirigit basat en LC/MS, la caracterització dels metabòlits es realitza mitjançant les dades precises de massa exacta, RT i dades de fragmentació mitjançant MS/MS. En primer lloc, es busquen els valors de massa exacta en bases de dades. Un cop ja es tenen les possibles identifikacions dels metabòlits es compara el RT i les dades de MS/MS d'un compost estàndard amb el de la mostra biològica. Les dades dels estàndards poden estar disponibles en bases de dades com *Human Metabolome Database* (Human Metabolome Database; <http://www.hmdb.ca>) o *Metlin* (METLIN; <http://www.metlin.scripps.edu>). Figura de *Patti et al 2012*.

Avui en dia, les ciències "òmiques" permeten analitzar molècules en diferents nivells cel·lulars, obtenint gran quantitat de dades. Tot i això, per tal de poder caracteritzar la complexitat dels sistemes biològics és necessari la utilització de més d'un enfocament "òmic". La genòmica, la transcriptòmica, la proteòmica, la metabolòmica, la lipidòmica, l'epigenòmica, la fluxòmica, la glicòmica són les principals ciències "òmiques" que permeten explicar una imatge més àmplia del comportament d'una cèl·lula (*Weckwerth 2003; Cortassa et al. 2015*). Per tant, la biologia de sistemes sorgeix com un camp interdisciplinari que pretén explicar les diferents interaccions dels sistemes biològics mitjançant la combinació de totes les dades obtingudes de les diferents ciències "òmiques". No obstant això, la seva integració comporta reptes bioinformàtics importants (*Kitano 2002*). En aquest sentit, només estem començant a dibuixar la imatge completa dels complexos processos cel·lulars que tenen lloc dins l'organisme però, tot i això caldrà més enfocaments integradors per tal de resoldre aquesta xarxa molecular tan complexa. El millor està per arribar.

### 1.2.2 Lipidòmica

Dins de la metabolòmica trobem una sub-disciplina que només se centra en l'estudi de les espècies lipídiques anomenada lipidòmica i es dedica a la caracterització detallada dels metabòlits lipídics, les seves interaccions i la seva influència en els sistemes biològics (*Wenk 2005*). La lipidòmica es pot dividir en diversos subgrups com ara l'estudi de les espècies lipídiques que formen la membrana o la caracterització estructural i la quantificació d'espècies de lípids bioactius de baixa concentració (*Serhan et al. 2006*). És ben conegut que el metabolisme lipídic alterat juga un paper important davant de moltes patologies com l'obesitat, les CVD, la resistència a la insulina i la T2DM i, per aquesta raó, els estudis sobre lipidòmica han trobat el seu lloc dins dels enfocaments "òmics" sent una peça clau en l'avaluació d'un sistema o procés biològic (*Wenk 2005*). Per tot això, cada vegada hi ha més estudis sobre lipidòmica que han comportat el desenvolupament d'instrumentació analítica cada vegada més robusta, ràpida i senzilla per tal de poder donar cabuda a la seva ràpida expansió (*Merrill et al. 2013*). A diferència de la metabolòmica, la lipidòmica comporta un coneixement estructural rellevant, ja que molts lípids tenen un paper important en les membranes cel·lulars. Per tant, no només des d'una perspectiva metabòlica, sinó també des d'una vessant biofísica, la lipidòmica presenta unes connotacions molt diferents de la metabolòmica (*Storck et al. 2018*).

#### 1.2.2.1 Definició de lípid i classificació

El concepte "lípid" s'ha aplicat, tradicionalment, a totes aquelles molècules que eren insolubles en aigua i solubles en dissolvents orgànics (*Cammack 2007*). Avui en dia, tot i que no existeix una definició acceptada, el consorci de LIPID MAPS defineix els lípids com petites molècules hidrofòbiques o amfòfiliques (part hidrofòbica i hidrofílica) que, juntament amb les proteïnes i els hidrats de carboni, constitueixen els principals components estructurals de les cèl·lules (*LIPID MAPS Lipidomics Gateway; <https://www.lipidmaps.org>*). Els lípids presenten una gran diversitat estructural definida per la longitud de la cadena o per les transformacions bioquímiques, així com oxidacions, reduccions, substitucions, transformacions, modificació dels residus de sucre o modificacions d'altres grups funcionals (*Fahy et al. 2011*). Tot i que no se sap de forma concreta quantes espècies lipídiques hi ha avui en dia, es calcula que el perfil de lípids cel·lulars comprèn més de 1.000 espècies, tanmateix el nombre d'espècies de lípids potencials es pot estimar a unes 200.000 (*Van Meer 2005; Yetukuri et al. 2008*).

Pel que fa a la classificació, algunes aproximacions només classifiquen els lípids en "simples" o "complexos" segons quins són els productes que donen després de la seva hidròlisi. Per exemple, els acilglicerols es classificarien com a lípids simples perquè el producte de la seva

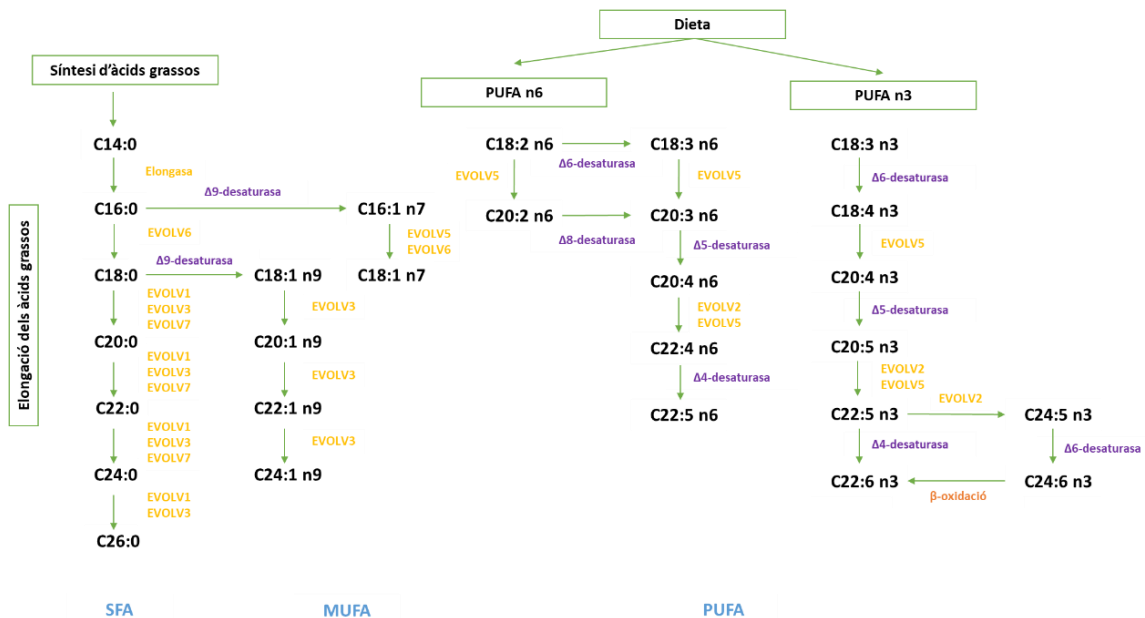
hidròlisi és un àcid gras i un glicerol. En canvi, un lípid complex generaria tres o més productes com els glicerofosfolípids que, resultat de la seva hidròlisi, s'obté un àcid gras, un glicerol i un grup fosfat (*Fahy et al. 2011*). Tot i això, l'any 2005, el Comitè Internacional de Classificació i Nomenclatura de Lípids, segons la iniciativa del consorci LIPID MAPS, va desenvolupar un sistema de classificació de lípids basant-se en principis químics i bioquímics ben definits que divideixen els lípids en vuit categories: acils grassos, glicerolípid, glicerofosfolípids, esfingolípid, sacarolípid i policètid (derivats de la condensació de subunitats cetoacil), esterols i els lípids prenol (derivats de la condensació de subunitats isoprè) (*LIPID MAPS Lipidomics Gateway; <https://www.lipidmaps.org>*).

#### **1.2.2.1.1 Acils grassos**

Dins de la categoria d'acils grassos es troben els àcids grassos juntament amb altres lípids derivats metabòlicament o similars estructuralment com ara els eicosanoids, docosanoids, alcohols, hidrocarburs, aldehids, èsters, amines i molts d'altres. La característica principal d'aquest grup és que són lípids simples i tots tenen, en la seva estructura, sèries repetides de grups metilens. Els àcids grassos formen part d'una gran varietat de lípids més complexos i confereixen varietat a la seva estructura individual dins de les classes i subclasses. Són essencials per la vida, ja que són un component estructural important de les membranes i s'utilitzen com a font d'energia. A més, també juguen un paper important en el manteniment de la funció neurològica normal (*Guillou et al. 2010*). Així, el manteniment de les característiques dels lípids com pot ser la longitud i el patró de saturació i dessaturació dels àcids grassos és essencial per dur a terme la seva funció i, la interrupció d'aquests processos pot tenir conseqüències potencialment devastadores. Tant els àcids grassos sintetitzats en el citosol com els derivats de la dieta poden ser sotmesos a processos d'elongació (permetent incrementar en unitats de 2 àtoms de carboni la cadena de l'àcid gras) i dessaturació (permetent afegir dobles enllaços en posicions específiques de la cadena) (*Guillou et al. 2010*).

Hi ha diferents tipus d'àcids grassos segons quin és el grau d'insaturació: àcids grassos saturats (SFA; de l'anglès, *Saturated Fatty Acids*), quan no contenen cap insaturació, o àcids grassos insaturats (UFA; de l'anglès, *Unsaturated Fatty Acids*), quan contenen una o més insaturacions. Dins dels UFA diferenciem entre els que contenen un sol doble enllaç anomenats àcids grassos monoinsaturats (MUFA; de l'anglès, *Monounsaturated Fatty Acids*) o els que en tenen més d'un, àcids grassos poliinsaturats (PUFA; de l'anglès, *Polyunsaturated Fatty Acids*). També, dins dels PUFA hi ha dos tipus d'insaturacions, els de la sèrie n6 (omega-6) i els de la sèrie n3 (omega-3) segons on es troba localitzat el primer doble enllaç del carboni contant des de l'extrem metil de

la cadena. Específicament, els SFA de cadena llarga i els MUFA de les sèries n7 i n9 es poden sintetitzar a partir de l'àcid palmític (C16:0). En canvi, en l'humà, els PUFA de cadena llarga de la sèrie n3 i n6 només es poden sintetitzar a partir de precursors essencials obtinguts en la dieta, com són l'àcid  $\alpha$ -linolènic (ALA) (C18:3 n3) i l'àcid linoleic (LA) (C18:2 n6) (Naudí *et al.* 2011) (Figura 11).



**Figura 11. Biosíntesi d'àcids grassos de cadena llarga en mamífers.** Els àcids grassos saturats de cadena llarga (>12 carbonis) i els àcids grassos insaturats de la sèrie n7 i n9 es poden sintetitzar a partir de l'àcid palmític (C16:0). Els àcids grassos de cadena llarga de la sèrie n6 i n3 únicament es poden sintetitzar a partir de precursors obtinguts en la dieta. Els enzims necessaris per a aquest procés són: i) desaturases; són els enzims encarregats de treure dos àtoms d'hidrogen de l'àcid gras, creant així un doble enllaç en una posició específica. Concretament, la desaturasa  $\Delta 9$  actua en la síntesi d'àcids grassos monoinsaturats i les desaturases  $\Delta 6$  i  $\Delta 5$  en la formació d'àcids grassos poliinsaturats i, ii) elongases; són els enzims específics encarregats d'afegir 2 àtoms de carboni a la cadena d'àcid gras. **SFA:** Àcids grassos saturats (de l'anglès, *Saturated fatty acids*); **MUFA:** Àcids grassos monoinsaturats (de l'anglès, *Monounsaturated fatty acids*); **PUFA:** Àcids grassos poliinsaturats (de l'anglès, *Polyunsaturated fatty acids*). Figura adaptada de Moghadasian and Shahidi 2017 i Guillou *et al.* 2010.

El destí dels PUFA incorporats a partir de la dieta és, preferentment, la incorporació en les membranes cel·lulars en lloc d'oxidar-se per a la producció d'energia (Hulbert *et al.* 2014). La composició de la membrana cel·lular condiciona el paper fisiològic i funcional on la majoria d'aquestes funcions són degudes a la seva fluïdesa, condicionada totalment per la composició d'àcids grassos. Depenent de l'estructura química d'aquests, ocupen més o menys espai dins de la bicapa. Així, els MUFA es disposen d'una manera molt més compacta amb molt poc moviment, mentre que els PUFA ocupen molt més espai i són més mòbils i, d'aquesta manera, augmenten la fluïdesa de la membrana. Per tant, la ingesta dietètica dels PUFA essencials suposa una repercussió funcional important. Genèricament, com més fluïdesa hi ha en la membrana, més permeabilitat i per tant, hi haurà millor transport transmembrana (Kremmyda *et al.* 2011). Ara bé, també existeix més risc de peroxidació lipídica (Hulbert *et al.* 2007; Ferrer *et al.* 2017).

Per altra banda, aquestes espècies lipídiques també poden actuar com a segons missatgers desencadenant cascades de senyalització, ja que poden interactuar amb hormones o altres senyals extracel·lulars (*Kremmyda et al. 2011*). Els PUFA són alliberats de la membrana cel·lular per l'acció de les fosfolipases per tal que puguin ser transformats a àcids grassos de cadena més llarga, amb més insaturacions o bé, per ser transformats a mediadors lipídics. Els mediadors lipídics poden ser derivats dels PUFA n3 o dels PUFA n6 i, es troben relacionats amb processos inflamatoris on els derivats de la sèrie n6 solen ser proinflamatoris i els derivats de la sèrie n3 antiinflamatoris (**Figura 12** i **Figura 13**). Per restringir la producció excessiva de mediadors lipídics, el nivell dels PUFA lliures es mantenen gràcies als glicerofosfolípids que es troben units a la membrana per l'acció de l'aciltransferasa i transacilasa (*Tourdot et al. 2014*).

Les propietats cardioprotectores, antiinflamatòries i hipotrigliceridèmiques dels PUFA de cadena llarga de la sèrie n3 han fet que aquests compostos hagin estat estudiats com a potencials molècules terapèutiques per al tractament i la prevenció de les comorbiditats derivades de l'obesitat (*Albracht-Schulte et al. 2018*).

Les famílies dels mediadors lipídics es classifiquen segons el grau d'oxidació i el seu grup funcional. Cada família conté diferents isòmers que es diferencien per un nombre o una lletra que indica la posició del grup funcional (*Massey and Nicolaou 2013*). En la **Taula 6** es mostren les principals famílies dels mediadors lipídics derivats de l'àcid araquidònic (AA) (C20:4n6), de l'àcid eicosapentaenoic (EPA) (C22:5n3) i de l'àcid docosahexaenoic (DHA) (C22:6n3).

**Taula 6.** Principals mediadors lipídics derivats de l'AA, del EPA i del DHA. Taula adaptada de *Dasilva and Medina 2019*.

Família	Derivats de AA	Derivats del EPA	Derivats del DHA	Exemple d'estructura
Monohidroxids	3HETE, 5HETE, 8HETE, 9HETE, 11HETE, 12HETE, 15HETE, 18HETE, 19HETE, 20HETE	5HEPE, 8HEPE, 9HEPE, 11HEPE, 12HEPE, 15HEPE, 18HEPE	4HDoHE, 7HDoHE, 8HDoHE, 10HDoHE, 11HDoHE, 13HDoHE, 14HDoHE, 16HDoHE, 17HDoHE, 20HDoHE	
Dihidroxids	5,6DiHET, 8,9DiHET, 11,12DiHET, 14,15DiHET	5,6DiHETE, 5,12DiHETE, 5,15DiHETE, 8,15DiHETE, 14,15DiHETE, 17,18DiHETE	10,11DiHDPA, 14,21DiHDPA, 19,20DiHDPA	
Hidroperòxids	5HpETE, 8HpETE, 9HpETE, 11HpETE, 12HpETE, 15HpETE, 19HpETE, 20HpETE	5HpEPE, 8HpEPE, 9HpEPE, 11HpEPE, 12HpEPE, 15HpEPE, 18HpEPE	4HpDoHE, 7HpDoHE, 8HpDoHE, 10HpDoHE, 11HpDoHE, 13HpDoHE, 14HpDoHE, 16HpDoHE, 17HpDoHE, 20HpDoHE	
Epòxids	5,6EET, 8,9EET, 11,12EET, 14,15EET	8,9EEQ, 11,12EEQ, 14,15EEQ, 17,18EEQ	7,8EDP, 10,11EDP, 13,14EDP, 16,17EDP, 19,20EDP	
Leucotriens	LTA4, LTB4, LTC4, LTD4, LTE4	LTA5, LTB5, LTC5, LTD5, LTE5		

Família	Derivats de AA	Derivats del EPA	Derivats del DHA	Exemple d'estructura
Tromboxans	TXA2, TXB2	TXA3, TXB3		
Prostaglandines	PGA2, PGB2, PGJ2, PGD2, PGE2, PGI2, PGH2, PGF2α, PGG2	PGA3, PGB3, PGD3, PGE3, PGI3, PGH3, PGF3α		
Ceto-prostaglandines	15k-PGE2, 15K-PGF2α, 6k-PGF1α			
Isoprostans	8isoPGJ2, 8isoPGA2, 8isoPGE2, 8isoPGD2, 8isoPGF2α, 5isoPGF2α, 12isoPGF2α, 15isoPGF2α	8isoPGF3α, 5isoPGF3α, 11isoPGF3α, 12isoPGF3α, 15isoPGF3α, 18isoPGF3α		
Lipoxines	LXA4, LXB4	LXA5		
Ceto-derivats	5oxoETE, 8oxoETE, 9oxoETE, 11oxoETE, 12oxoETE, 15oxoETE, 19oxoETE, 20oxoETE			
Resolvines		RvE1, RvE3, RvE2	RvD1, RvD2, RvD3, RvD4	
Protectines			PD1	
Maresins			MaR2 (13,14DiHDDPA), 7-MaR1	

AA: Àcid araquidònic; EPA: Àcid eicosapentaenoic; DHA: Àcid docosahexaenoic.

Les prostaglandines, els tromboxans i els isoprostans derivats de l'AA s'han associat amb hipercolesterolèmia, cirrosi hepàtica, reperfusió miocardiàica, T2DM, obesitat, aterosclerosi, càncer i CVD (*Dasilva and Medina 2019*). El que tenen en comú totes aquestes condicions és que es troben relacionades amb etapes d'inflamació crònica. Aquests mediadors lipídics poden interaccionar amb receptors específics com els receptors acoblats a proteïna G de la membrana (*Hirai et al. 2001*) i activar la via del complex AMPc que augmenta l'expressió de citocines inflamatòries (*Aronoff et al. 2006*) i disminuint la capacitat dels leucòcits per fagocitar-les (*Aronoff et al. 2004*). Aplicant tècniques lipídiques són relativament fàcils de detectar en biofluids i per tant, es consideren bons biomarcadors d'inflamació (*Morrow and Roberts 1996*).

De la mateixa manera, els leucotriens de l'AA són substàncies proinflamatòries que poden causar o contribuir al desenvolupament de l'asma, la malaltia d'Alzheimer, l'artritis, la psoriasi, la diabetis, les CVD i el càncer, entre d'altres (*Peters-Golden and Henderson 2007*). S'uneixen a receptors específics del complex de proteïna G que regula la vasoconstricció, la producció d'òxid de nitrogen (*Talvani et al. 2002*) o l'activació de la nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (NADPH) (*Ballinger et al. 2008*) i també lidera l'activitat del receptor nuclear PPARα (*Krey et al. 1997*).

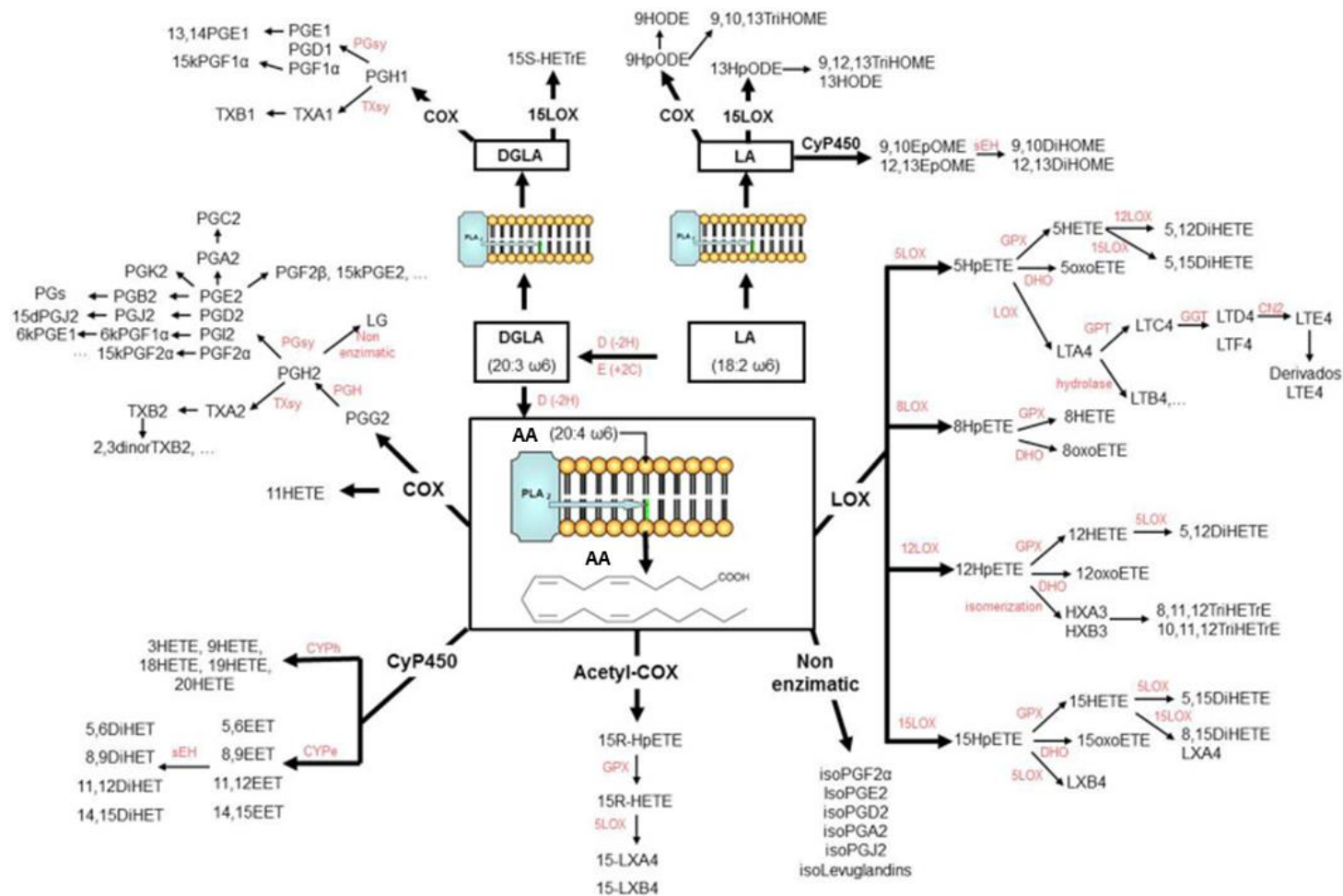
Els ceto-derivats de l'AA encara estan poc estudiats però es creu que activen la senyalització cel·lular com la via PI3-AKT o el factor TNF $\alpha$ , produint citocines o inactivant la síntesi de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) per tal de promoure la síntesi d'altres mediadors lipídics proinflamatoris (O'Flaherty et al. 1996; Hosoi et al. 2005).

No obstant això, no tots els mediadors lipídics derivats dels PUFA n6 són proinflamatoris. Les lipoxines de l'AA són clau en la resolució de la inflamació degut a la competència pels mateixos enzims que sintetitzen els leucotriens (Serhan et al. 2006) i la inhibició de la NADPH oxidasa (Levy et al. 1997), així com l'efecte d'interleuquines (József et al. 2002), factors nuclears com el TNF $\alpha$  (Pouliot and Serhan 1999) o la molècula d'adhesió ICAM-1 en les cèl·lules (Decker et al. 2009).

Els lípids hidroxilats i els hidroperòxids s'han descrit com missatgers secundaris i poden estar involucrats en la regulació funcional del sistema cardiovascular, l'aterosclerosi, en lesions corneals, depressió o càncer (Dasilva and Medina 2019). En referència als derivats de l'EPA i DHA, cal indicar que són menys inflamatoris que els derivats de l'AA a causa de la seva alta capacitat per inhibir la formació de substàncies proinflamatòries (Vang and Ziboh 2005).

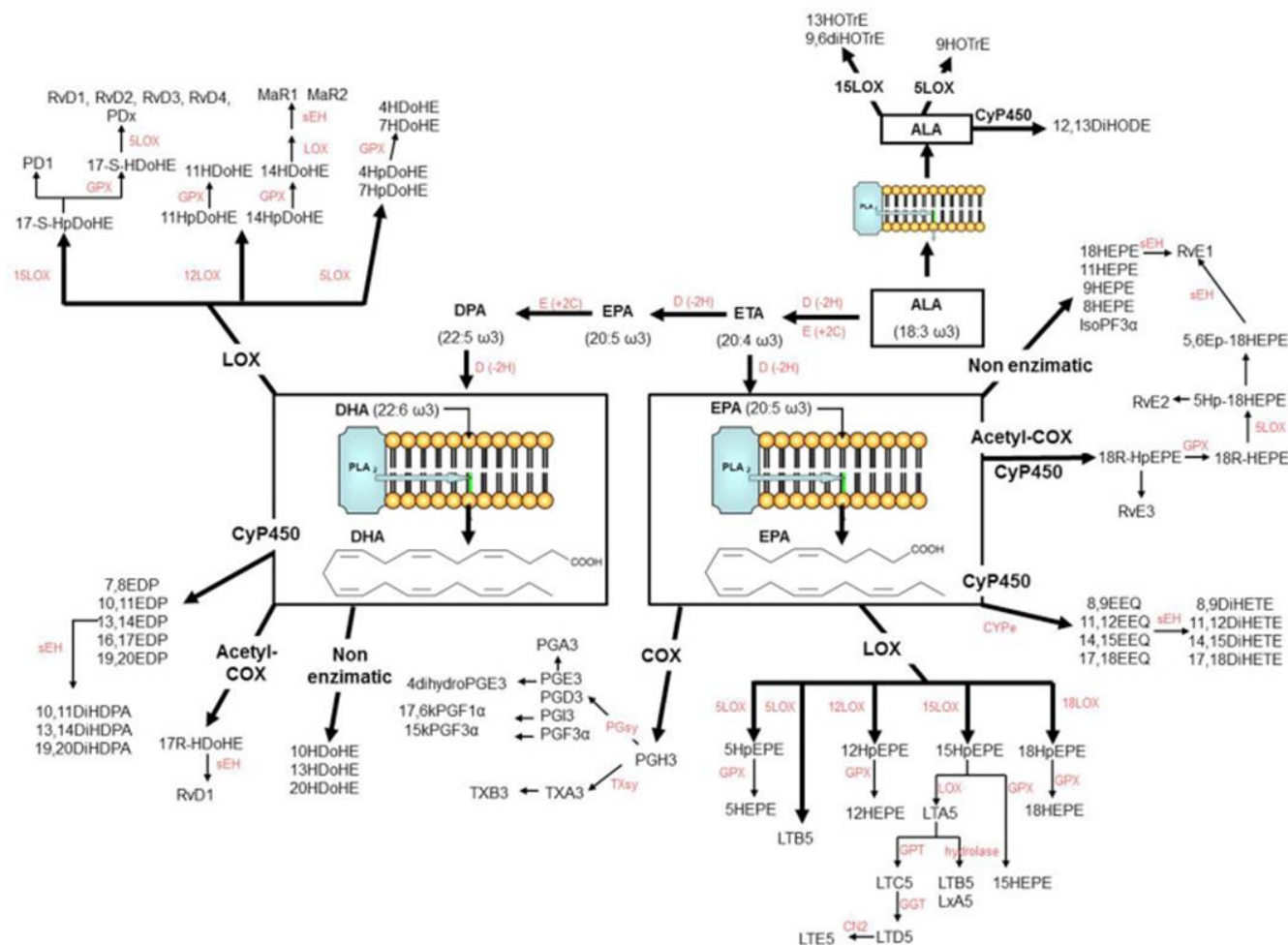
Els epòxids de l'AA, EPA i DHA es metabolitzen a lípids dihidroxilats per l'acció de diferents enzims. Els epòxids són considerats substàncies antiinflamatòries mentre que, els dihidroxilats al contrari, són lípids proinflamatoris. La funció dels epòxids consisteix en disminuir la producció de citocines proinflamatòries i disminuir les molècules d'adhesió com ICAM-1 i VCAM-1 (Node et al. 1999).

Finalment, els mediadors pro-resolució (capaços de resoldre la inflamació) es sintetitzen a partir dels PUFA n3 a resolvines, protectines i maresins i dels PUFA n6 a lipoxines (Masoodi et al. 2008). Inhibeixen o milloren la senyalització cel·lular utilitzant receptors acoblats a proteïna G per tal de poder activar la resposta antiinflamatòria i immune mitjançant la inhibició de la via NF $\kappa$ B, l'estimulació de TNF $\alpha$ , la inhibició de la síntesi de leucotriens o mitjançant la inactivació dels macròfags (Sun et al. 2007). Recentment han estat efectius en tractaments antiinflamatoris en malalties com les CVD, artritis, colitis, asma, càncer i en malalties neurodegeneratives (Dasilva and Medina 2019).



**Figura 12. Formació dels mediadors lipídics a partir de l'AA, LA i del DGLA.** Els PUFA són alliberats a la membrana mitjançant la fosfolipasa A<sub>2</sub> oxidant-se generant gran quantitat de mediadors lipídics derivats d'oxidació enzimàtica mitjançant COX, LOX i CYP450 o mitjançant oxidació no enzimàtica. **AA:** Àcid araquidònic; **LA:** Àcid linoleic; **DGLA:** Àcid dihomo-γ-linolènic; **COX:** Ciclooxygenasa; **LOX:** Lipoxigenasa; **CYP450:** Citocrom P450; **PLA<sub>2</sub>:** Fosfolipasa A<sub>2</sub>; **CYPb:** Citocrom hidrolasa; **CYPe:** Citocrom epoxigenasa; **D:** Desaturases; **E:** Elongases; **PGsy:** Sintasa de prostaglandina; **TXsy:** Sintasa de tromboxà; **GPX:** Glutatió peroxidasa; **GPT:** Glutatió transferasa; **DHO:** Deshidrogenases; **sEH:** Epoxi hidrolasa soluble; **GGT:** γ-glutamil transferasa; **CN2:** Dipeptidasa; **PGH:** Hidroperoxidasa. Figura de Dasilva and Medina 2019.



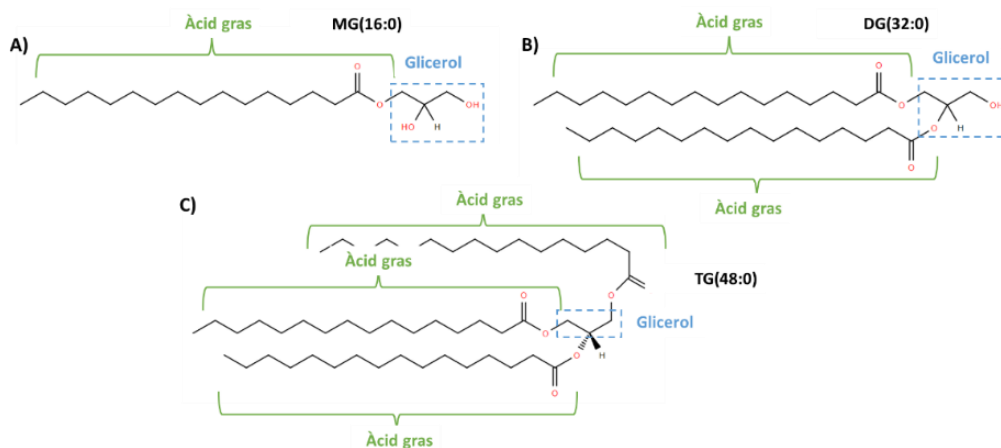


**Figura 13. Formació dels mediadors lipídics a partir de l'ALA, de l'EPA i del DHA.** Els PUFA són alliberats a la membrana mitjançant la fosfolipasa A<sub>2</sub> oxidant-se generant gran quantitat de mediadors lipídics derivats d'oxidació enzimàtica mitjançant COX, LOX i CYP450 o mitjançant oxidació no enzimàtica. **ALA:** Àcid α-linolènic; **EPA:** Àcid eicosapentaènic; **DHA:** Àcid docosahexaènic; **COX:** Ciclooxygenasa; **LOX:** Lipoxigenasa; **CYP450:** Citocrom P450; **PLA<sub>2</sub>:** Fosfolipasa A<sub>2</sub>; **CyPh:** Citocrom hidrolasa; **CYPe:** Citocrom epoxigenasa; **D:** Desaturases; **E:** Elongases; **PGsy:** Sintasa de prostaglandina; **TXsy:** Sintasa de tromboxà; **GPX:** Glutatió peroxidasa; **GPT:** Glutatió transferasa; **DHO:** Deshidrogenases; **sEH:** Epoxi hidrolasa soluble; **GGT:** γ-glutamil transferasa; **CN2:** Dipeptidasa; **PGH:** Hidroperoxidasa. Figura de *Dasilva and Medina 2019*.

### 1.2.2.1.2 Glicerolípid

La categoria de glicerolípid engloba els èsters d'àcids grassos de glicerol o acilglicerols que es caracteritzen per tenir cadenes hidrocarbonades unides a glicerol. Dins d'aquest grup es troben, entre altres, els monoacilglicèrids (MG), els diacilglicèrids (DG) i els TG que estan formats per un, dos o tres àcids grassos units en els grups hidroxil del glicerol (**Figura 14**).

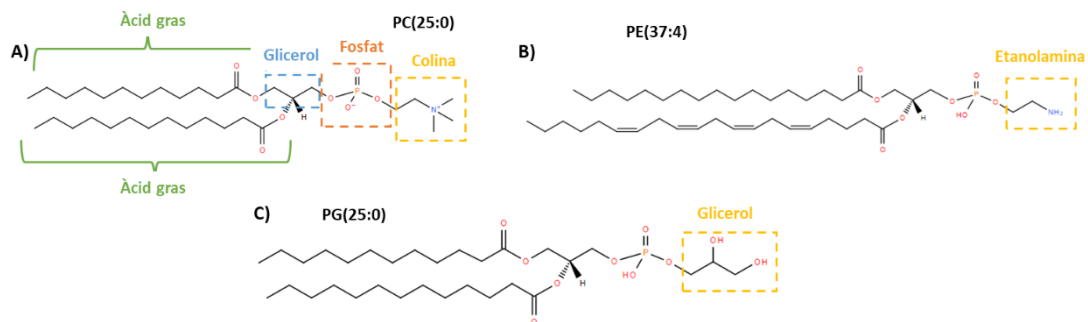
Pel que fa a les funcions biològiques, els MG són bàsicament molècules senyalitzadores però també tenen funcions importants en l'estimulació de la secreció d'insulina i en la regulació de la despesa energètica (*Shi and Cheng 2009; Hansen et al. 2012; Poursharifi et al. 2017*). Els DG són components minoritaris en les membranes cel·lulars dels mamífers tot i que tenen funcions especialitzades en ella com a missatgers secundaris (*Eichmann and Lass 2015*). Poden unir proteïnes i modular la seva activitat mitjançant el domini C1, com per exemple la família de diacilglicerol quinasa, la proteïna C quinasa i la proteïna que allibera guanina, permetent als DG participar en funcions com ara en la regulació de la proliferació cel·lular, la remodelació citoesquelètica, la diferenciació, la resposta immune i la migració cel·lular, entre altres (*Farese et al. 1991; Harden and Sondek 2006; Farooqui and Horrocks 2007; Goto et al. 2008; Fukami et al. 2010*). Els TG tenen un paper important en el metabolisme com a fonts d'energia i com a transportadors dels greixos ingerits en la dieta. L'energia que utilitza l'organisme depèn bàsicament dels TG i de la longitud de les cadenes dels àcids grassos que els constitueixen mitjançant la  $\beta$ -oxidació. A més d'actuar com a principal magatzem d'energia per als mamífers, els TG també tenen funcions com a reserva de lípid bioactius (eicosanoids o vitamines solubles) que proporcionen components estructurals, incloent-hi el colesterol i el retinol i, també s'utilitzen en la síntesi i en la reparació de les membranes (*Lipoprotein Metabolism and the Treatment of Lipid Disorders | Clinical Gate; <https://clinicalgate.com>*).



**Figura 14. Estructura bàsica dels glicerolípid.** Molècula de glicerol a la que se li uneixen àcids grassos en el grup hidroxil. A) Monoacilglicèrid; B) Diacilglicèrid; C) Triacilglicèrid

### 1.2.2.1.3 Glicerofosfolípids

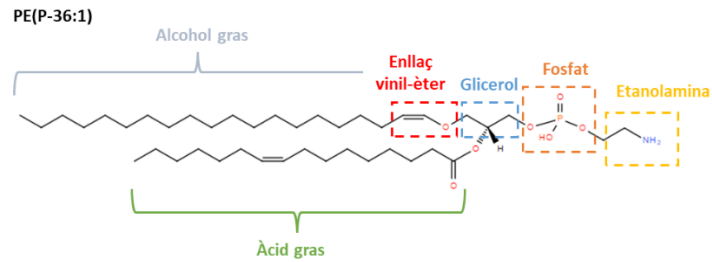
La categoria de glicerofosfolípids o fosfolípids engloba totes les espècies que contenen un grup fosfat en el grup hidroxil del tercer carboni del glicerol. En els altres carbonis es troben un o dos àcids grassos enllaçats amb èter o èster. Quan només presenten un àcid gras en la seva estructura, s'anomenen lisoglicerofosfolípids (LysoGP). En canvi, quan presenten més d'un àcid gras hi ha set classes determinades pel grup polar i són: àcid fosfatídic (PA), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE) i cardiolipines (CL) (**Figura 15**).



**Figura 15.** Estructura bàsica dels glicerofosfolípids (o fosfolípids). Molècula de glicerol a la que se li uneixen dos àcids grassos i un grup fosfat. El grup fosfat s'uneix mitjançant un enllaç fosfodièster a altres molècules, com ara una colina, etanolamina o un glicerol. **A)** Fosfatidilcolina; **B)** Fosfatidiletanolamina; **C)** Fosfatidilglicerol.

Els glicerofosfolípids és un dels grups més importants de lípids, ja que és un grup clau de molts components cel·lulars i intervenen en el metabolisme i en la senyalització. Són els principals components lipídics de les membranes i, gràcies a la gran diversitat estructural que presenten, confereixen una gran varietat de propietats físiques i químiques que influiran en moltes de les seves propietats, com la permeabilitat, la fluïdesa, la curvatura, la presència de bases lipídiques i la regulació de les interaccions lípid-proteïna (*Berg et al. 2002; Dowhan 2017*).

Dins dels glicerofosfolípids també trobem els plasmalògens que són una classe de glicerofosfolípids de membrana que contenen un alcohol gras amb un enllaç vinil-èter (**Figura 16**). A més del paper dins la membrana lipídica, els plasmalògens poden actuar com antioxidants no enzimàtics (*Liu et al. 2019*), ja que s'oxiden fàcilment quan s'exposen a radicals lliures (*Broniec et al. 2011*), evitant l'oxidació dels PUFA i altres lípids més vulnerables. A més, els plasmalògens eviten la propagació de la peroxidació lipídica (*Sindelar et al. 1999*) i la seva deficiència fa que les cèl·lules siguin molt més vulnerables a l'estrès oxidatiu (*Broniec et al. 2011; Luoma et al. 2015*).



**Figura 16. Exemple d'estructura bàsica d'un plasmalogen de PE.** Molècula de glicerol a la que se li uneix un alcohol gras unit amb un enllaç vinil-èter, un àcid gras i un grup fosfat. El grup fosfat s'uneix mitjançant un enllaç fosfodièster a altres molècules, com ara una colina, etanolamina o un glicerol.

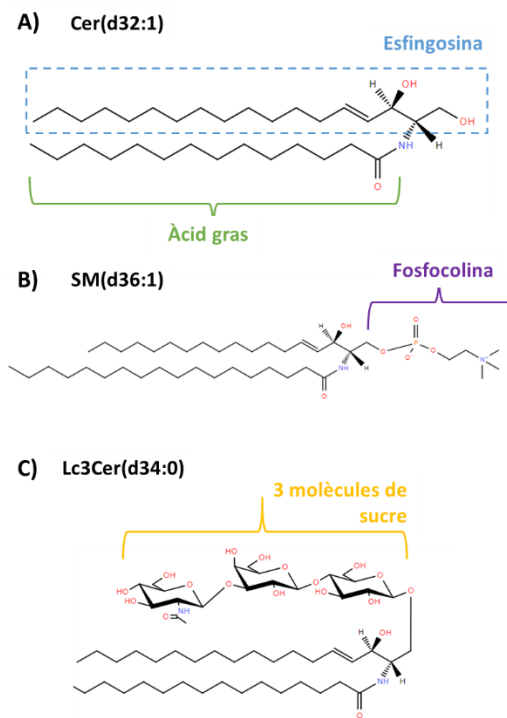
#### 1.2.2.1.4 Esfingolípid

Els esfingolípid són una espècie de lípid molt complexos que contenen una base esfingoide unida a un àcid gras i un grup variable, presentant una part hidrofòbica i una hidrofílica sintetitzats a partir de la serina i el palmitoil-coA, però també poden utilitzar l'alanina o glicina i l'esteàric o el mirístic (*Hannun and Obeid 2018*). Dins d'aquesta categoria es poden trobar, entre altres, esfingosines (com ara l'esfingosina-1-fosfat), esfingosines unides a un àcid gras lligat a amida (com les ceramides o les dihidroceramines), els esfingolípid conjugats amb glicerofosfolípid (esfingomielines) i els glicoesfingolípid. Aquest darrer grup està format per esfingolípid units a un o més hidrats de carboni per un enllaç glicosídic (hexasilceramides, gangliòsids o sulfatides que contenen un grup fosfat) (*Fahy et al. 2005*) (**Figura 17**). Els àcid grassos que formen els esfingolípid són diferents dels que formen els glicerofosfolípid, ja que en aquest cas les cadenes hidrocarbonades són molt més llargues, entre 26 i 36 carbonis, en comparació amb els glicerofosfolípid que estan formats per cadenes de fins a 26 carbonis (*Sandhoff 2010*). Les funcions principals dels esfingolípid són com a senyalitzadors i com a lípid estructurals de les membranes i les lipoproteïnes (*Hannun and Obeid 2018*). Entre aquests esfingolípid destaquem:

L'esfingosina-1-fosfat (Sph1P) és una molècula missatgera que pot funcionar tant dins com fora de la cèl·lula. Extracel·lularment pot actuar com a lligand de diferents receptors que actuen en vies de senyalització importants per al creixement de nous vasos sanguinis, en la maduració vascular, en el desenvolupament cardíac i immunitat i, per al moviment de cèl·lules dirigides (*Pyne and Pyne 2017*). Intracel·lularment regulen la mobilització del calci i el creixement cel·lular en resposta a una gran varietat d'estímuls i també tenen un paper crucial en la supervivència cel·lular, la migració i la inflamació (*Hla 2004*).

Les ceramides (Cer) participen en la senyalització cel·lular mitjançant la mediació de moltes respostes a estrès cel·lular, regulant l'autofàgia, la senescència cel·lular, la diferenciació, la transformació i la proliferació cel·lular (*Venable et al. 1995; Young et al. 2013; Castro et al.*

2014). Són components menors de les membranes lipídiques i influeixen en la permeabilitat de les membranes (Merrill and Sandhoff 2002). Dins de les Cer es troben les dihidroceramides que presenten dues cadenes d'àcids grassos saturats i, per aquesta raó, les funcions biològiques que realitzen difereixen de les que realitzen les Cer. Les hidroceramides tenen un paper en l'autofàgia, la hipòxia i la proliferació cel·lular. A més, participen en la regulació de la producció de ROS en els mitocondris (Siddique et al. 2015).



**Figura 17. Estructura bàsica dels esfingolípid.** Molècula formada per un esquelet de ceramida (grup esfingosina i un àcid gras) unit a un alcohol primari. **A)** Ceramida; **B)** Esfingomielina; **C)** Lactosilceramida.

L'esfingomielina (SM) està formada per una ceramida conjugada a una fosfocolina i, és l'esfingolípid més abundant en les membranes de les cèl·lules animal. Aparentment, l'estructura de les SM és molt semblant a la de PC però, per exemple, el grau d'insaturació de cada lípid és diferent i aquest fet els hi proporciona propietats diferents (Merrill and Sandhoff 2002). Les SM i el colesterol tenen gran afinitat i, se situen junts en les membranes lipídiques de les membranes cel·lulars on, les SM sembla que controlen la distribució del colesterol en la superfície de les lipoproteïnes (Milhas et al. 2010). Altres de les funcions que s'atribueixen a aquesta classe de lípids són la biosíntesi d'eicosanoids i d'altres esfingolípid, participen en la regulació de la internalització de molècules a través de la membrana plasmàtica i, com a esfingolípid més abundant, té un paper important en el muntatge i en la dinàmica de la cromatina, a més de ser un component integral de la matriu nuclear (Lucki and Sewer 2008; Slotte 2013).

Dins del grup de glicoesfingolípidis hi ha les glucosilceramides, Cer unides a una glucosa, les galactosilceramides o gangliòsids, units a una galactosa i, les lactosilceramides, unides a una lactosa. A més, també hi ha glicoesfingolípidis formats per una molècula de lactosa i a una molècula de glucosa o galactosa. Els gangliòsids estan formats per diversos sucres i tenen almenys un residu carregat, l'àcid siàlic. Són lípids essencials per la funció cerebral pel que fa al creixement neuronal, la migració, la maduració, la integritat dels axons i la mielina, la neuritogènesi, la sinaptogènesi i la mielinització (McJarrow *et al.* 2009; Aureli *et al.* 2014; Naito-Matsui *et al.* 2017). Finalment, els sulfats també són glicoesfingolípidis àcids i tenen un grup èster sulfat unit al fragment carbohidrat.

#### 1.2.2.1.5 Lípids esterol

El colesterol és el membre més abundant d'aquesta categoria en els mamífers (Gurr *et al.* 2002) i, segons LIPID MAPS (LIPID MAPS Lipidomics Gateway; <https://www.lipidmaps.org>), els lípids d'aquest grup no només es classifiquen segons la seva estructura, sinó que s'agrupen segons quina és la seva funció biològica. Dins d'aquest grup es troben els èsters de colesterol (CholE), les hormones esteroides, la vitamina D, els àcids biliars i els alcohols biliars. En la **Figura 18** hi ha representades algunes fórmules estructurals d'algunes espècies d'esterols.

El colesterol té dos papers principals en les cèl·lules, com a component estructural de les membranes plasmàtiques i com a precursor d'altres espècies lipídiques. El seu catabolisme genera diverses espècies importants, com ara els èsters de colesterol o els oxisterols. Les hormones esteroides se sintetitzen a partir del colesterol i oxisterol i segons el seu rol biològic es classifiquen en esteroides sexuals, corticoides i neurosteroides. Els neurosteroides, també coneguts com a esteroides neuroactius, són capaços de modificar activitats neuronals (Martín-García *et al.* 2007). Les funcions d'aquestes hormones són diverses i essencials en la fisiologia o la fisiopatologia, ja que són reguladors clau en l'homeòstasi, el metabolisme de la glucosa, el sistema reproductor, en el CNS i en el sistema immune, entre altres (Nakagawa and Sonobe 2016). La vitamina D i els seus derivats també són derivats del catabolisme del colesterol i són essencials en la regulació del calci i del fòsfor, entre moltes altres funcions (Nakagawa and Sonobe 2016). Dins dels àcids biliars hi ha els àcids biliars primaris, sintetitzats en el fetge i, els àcids biliars secundaris que es generen per l'acció de la flora bacteriana intestinal. Es poden conjugar amb taurina, glicina, sulfat o àcid glucurònic en els peroxisomes (Hofmann and Hagey 2014). La seva funció principal és ajudar a la digestió i absorció dels lípids dietaris als intestins durant la digestió. També tenen un paper important en l'homeòstasi del colesterol i, poden

regular la biosíntesi dels TG en el fetge i la producció de VLDL, cosa que comporta la disminució dels nivells de TG plasmàtics (Watanabe *et al.* 2004).

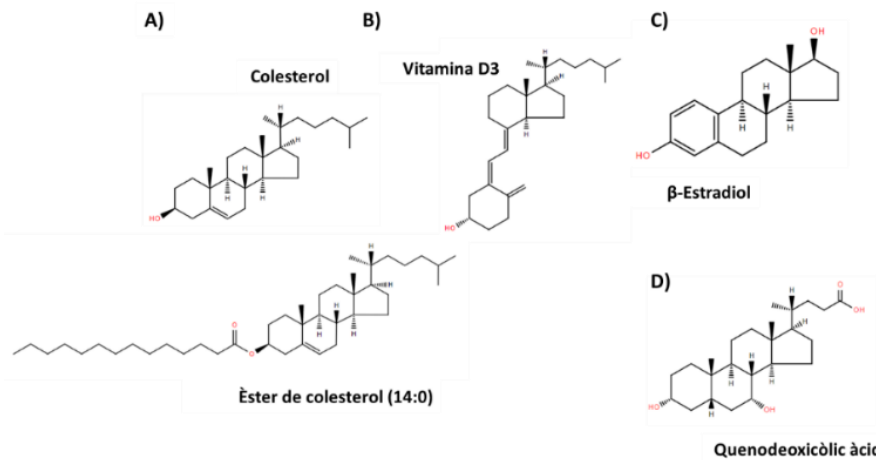


Figura 18. Estructura molecular d'alguns lípids esterol. A) Esterol; B) Secosteroid; C) Esteroide; D) Àcid biliar.

### 1.2.2.1.6 Lípids prenol

Els lípids prenol són sintetitzats a partir de precursors de cinc unitats de carboni isopentenil difosfat i difosfat dimetilalil que es produeixen principalment a través de l'àcid mevalònic. Els isoprenoids simples (alcohols lineals, difosfats, etc.) es formen per l'addició successiva de cinc unitats de carboni, i es classifiquen segons el nombre d'unitats terpens. Les unitats que tenen més de 40 àtoms de carboni s'anomenen politerpens. Els carotenoids, metabòlits vegetals ingerits en la dieta, són isoprenoids importants que funcionen com antioxidants i són precursors de la vitamina A. Un altre dels grups són les quinones i hidroquinones. La vitamina E i la vitamina K, així com les ubiquinones, són exemples d'aquesta classe (Figura 19).

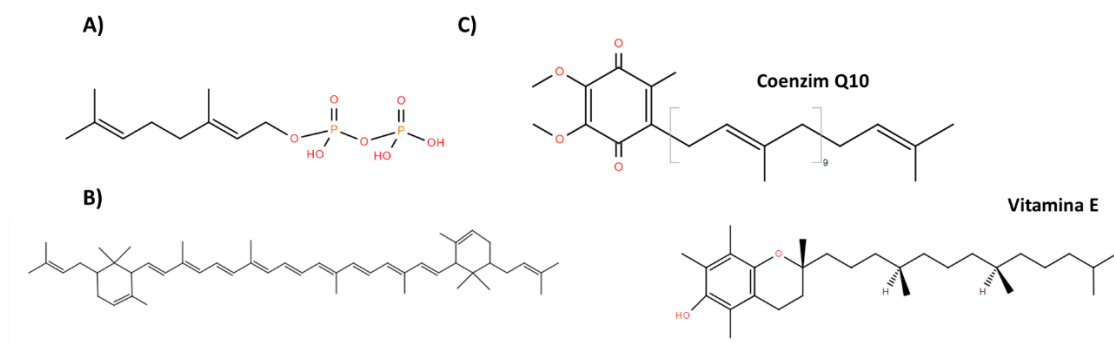


Figura 19. Estructura molecular d'alguns lípids prenol. A) Isoprenoide C10; B) Politerpè; C) Ubiquinones.

Les ubiquinones, més conegudes com a Coenzim Q (CoQ), són lípids actius redox que es troben presents en la majoria d'òrgans de les cèl·lules eucariotes i, poden existir en tres formes diferents en termes d'oxidació. La seva forma oxidada s'anomena ubiquinona (UQ), la parcialment reduïda, radical ubisemiquinona, i la forma reduïda, ubiquinol (UQH2) (Stefely and Pagliarini 2017). Gràcies a la seva capacitat de tenir les tres formes, és essencial per dur a terme

la transferència d'electrons en el mitocondri per a la producció d'adenosina trifosfat (ATP). Breument, la seva funció consisteix a transferir els electrons del complex I i complex II de la cadena de transport d'electrons cap al complex III, generant d'aquesta manera, protons a l'espai intermembrana que utilitzarà l'ATP sintasa (o complex V) per generar ATP (*Turunen et al. 2004*). En aquest pas la UQ passa a UQH<sub>2</sub>. La forma reduïda generada és un antioxidant endogen que evita la peroxidació dels lípids de les membranes i de les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL; de l'anglès, *Low-density lipoprotein*). Així, l'UQ també protegeix la membrana mitocondrial i l'àcid desoxiribonucleic (ADN) contra danys oxidatius (*Frei et al. 1990*) i, és un acceptor d'electrons per a l'oxidació d'àcids grassos (*Watmough and Frerman 2010*).

### 1.3. Metabolòmica i lipidòmica en obesitat

Una de les aplicacions de la metabolòmica pot ser avaluar els canvis en els metabòlits deguts al sobrepès i l'obesitat a nivell cel·lular, a nivell de teixit (teixit adipós, múscul esquelètic o fetge, entre altres), i a nivell de líquid corporal com el plasma o l'orina. A més, aquesta eina analítica també permet determinar les signatures metabòliques entre individus obesos metabòlicament no saludables en comparació amb individus metabòlicament sans (*Badoud et al. 2015*) permetent als investigadors identificar aquells subjectes amb major risc de patir malalties metabòliques, facilitant així l'administració d'un tractament adequat.

Durant l'última dècada, nombrosos articles han abordat canvis metabòlics associats amb l'obesitat en humans i models animals (*Kim and Park 2010; Kim et al. 2010; Fiehn et al. 2010; Oberbach et al. 2011; Adams 2011; Wahl et al. 2012; He et al. 2012; Mihalik et al. 2012; Morris et al. 2012; Du et al. 2013; Calvani et al. 2014; Villarreal-Pérez et al. 2014; Moore et al. 2014; Gogna et al. 2015; Hivert et al. 2015; Abu Bakar et al. 2015; Zhao et al. 2016; Rauschert et al. 2016; Tulipani et al. 2016; Newgard 2017; Rauschert et al. 2017*). Recentment, s'ha descrit, en una revisió sistemàtica, una signatura metabòlica de l'obesitat per tal de comprendre algunes de les alteracions relacionades amb aquesta patologia. En aquesta revisió, s'han agrupat els metabòlits en esteroides sexuals, aminoàcids i metabolisme proteic, acilcarnitines, lípids, carbohidrats i altres molècules rellevants (*Rangel-Huerta et al. 2019*). A continuació s'han descrit alguns dels canvis que tenen lloc en aquesta revisió.

Un dels principals grups de metabòlits que es troben desregulats durant el procés de l'obesitat són els aminoàcids, particularment els aminoàcids de cadena ramificada (leucina, isoleucina i valina) (BCAA; de l'anglès, *Branched-Chain Amino Acids*) i els aminoàcids aromàtics (fenilalanina, tirosina i triptòfan). Respecte als aminoàcids aromàtics s'han descrit concentracions més



elevades de fenilalanina en subjectes obesos (Kim et al. 2010; Butte et al. 2015). A més, els nivells de tirosina, producte del metabolisme de la fenilalanina, s'associen a un augment del contingut de greix hepàtic (Haufe et al. 2016), i els seus nivells (així com els nivells d'alanina) a la predicció de pèrdua de pes després d'intervencions nutricionals (Stroeve et al. 2016) i activitat física (Zheng et al. 2016b; Geidenstam et al. 2017). Addicionalment, la tirosina contribueix significativament al perfil definit en nens obesos i podria servir com a possible predictor de resistència a la insulina en aquesta població (Butte et al. 2015). En individus obesos també s'han detectat majors concentracions de triptòfan i els seus metabòlits (quinurenina i àcid quinurènic) i aquests correlacionen positivament amb el BMI (Zhao et al. 2016; Ho et al. 2016; Yu et al. 2018). Els nivells més alts d'aquests compostos podrien reflectir l'activació immune o la inflamació sistèmica de baix grau degut a un augment de l'activitat de l'enzim indoleamine 2,3-dioxigenasa (Zhao et al. 2016; Dadvar et al. 2018). L'activitat d'aquest enzim s'ha relacionat amb la propagació de l'obesitat reduint la producció de serotonina i causant, d'aquesta manera, alteracions en l'estat d'ànim, depressió i sacietat alterada, el que condueix a una major absorció de calories i obesitat (Brandacher et al. 2007). Per contra, s'han detectat nivells reduïts de glicina en mostres d'orina, plasma i múscul esquelètic en subjectes obesos i aquests correlacionen de manera inversa amb el BMI (Newgard et al. 2009; Butte et al. 2015). En relació als BCAA, ja fa algunes dècades que es van observar associacions entre concentracions sèriques elevades i obesitat, resistència a la insulina i altres complicacions (Felig et al. 1969; Newgard et al. 2009). De fet, molts estudis han descrit nivells sanguinis alts de BCAA tant en nens obesos (Butte et al. 2015) com en adults i correlacions positives entre marcadors antropomètrics i massa de greix (Newgard et al. 2009; Kim et al. 2010; Jia et al. 2014; Foerster et al. 2015). Per contra, la disminució dels nivells d'aquests aminoàcids s'han associat a la pèrdua de pes en subjectes obesos, després de la pèrdua de pes a través d'intervencions nutricionals o després de realitzar activitat física (Kim et al. 2013; Zheng et al. 2016b; Geidenstam et al. 2017; Hernández-Alonso et al. 2019; Mills et al. 2019). L'augment o la disminució, durant la pèrdua de pes, dels BCAA, reflecteix l'estat de descomposició de les proteïnes, que és una conseqüència de la resistència a la insulina, el que apunta a complicacions metabòliques.

Respecte als lípids, és important remarcar el paper que tenen com a molècules de senyalització, substrats metabòlics i components de la membrana cel·lular (Yang et al. 2018). Dins d'aquesta revisió, s'informa de diferents estudis relacionats amb canvis en els àcids grassos, com els PUFA o els SFA, i també de lípids molt més complexes com els glicerofosfolípids o els esfingolípids. En relació als àcids grassos, Houttu et al. (Houttu et al. 2018) va identificar una firma de lípids en dones obeses embarassades caracteritzada per canvis en els nivells dels PUFA on, després d'una

intervenció en l'estil de vida, van reduir els PUFA n6 i totals. Sorprenentment, un estudi de la placenta de dones obesas, va revelar també un perfil lipídic característic, que podria tenir conseqüències pel fetus i provocar el desenvolupament de malalties metabòliques durant tota la seva vida postnatal (*Fattuoni et al. 2018*). Els SFA també es troben alterats durant l'obesitat augmentant la seva concentració (*Kien et al. 2013*) però, s'ha vist que disminueixen després d'intervencions nutricionals per tal de disminuir el pes corporal (*Perez-Cornago et al. 2014*). Respecte als lípids més complexos, s'han descrit troballes relacionades amb els LysoGP o amb les SM, entre altres. Pel que fa als LysoGP, alguns autors han descrit nivells disminuïts d'aquests (*Barber et al. 2012; Cirulli et al. 2019*), mentre que altres suggereixen una correlació positiva entre els nivells plasmàtics d'aquests lípids i l'obesitat (*Rauschert et al. 2016*). Concretament, s'han identificat concentracions més altes de LysoPC (18:0) en mostres d'orina d'adolescents obesos (*Cho et al. 2017*) i en mostres de plasma d'adults amb sobrepès i obesitat (*Kim et al. 2010*) que, curiosament, disminueixen després d'una intervenció nutricional. També es va detectar un fenomen semblant amb el lípid LysoPC (14:0) (*Kim et al. 2013*). Per contra, la LysoPC (18:1) i la LysoPC (18:2), detectades en nens i adults obesos (*Kim et al. 2010; Wahl et al. 2012*), correlacionen negativament amb els valors de BMI. En relació a les PC, s'han detectat diferències en els nivells de la PC (34:4), PC (38:5), PC (38:6), PC (38:7), PC (40:6), PC (38:3) i PC (40:4) però no totes en la mateixa direcció de canvi. Dins dels esfingolípid trobem la SM (16:0) i la SM (22:1), la Cer (16:0) i la Cer (18:0) que varien segons el BMI de l'individu (*Turpin-Nolan et al. 2019; Raichur et al. 2019*) o el gangliòsid GM3 que també s'ha relacionat amb els canvis fisiopatològics associats a l'obesitat (*Lipina and Hundal 2015*). Però, no només aquests lípids complexos pateixen canvis durant la patologia de l'obesitat, sinó que s'han descrit canvis en la majoria dels glicerofosfolípids (*Wang et al. 2019b*).

En general, encara queda per investigar en profunditat el paper que tenen aquestes espècies lipídiques en humans. Tot i això, aquestes troballes són consistents i podrien explicar, almenys parcialment, la fisiopatologia de l'obesitat i els hàbits alimentaris. Per exemple, una major ingesta de greixos saturats amb una proporció més baixa de PUFA/SFA i nivells de carbohidrats més baixos en persones amb sobrepès o obesitat que en subjectes prims podrien explicar, parcialment, els nivells més alts de LysoPC (18:0) (*Kim et al. 2010, 2014*). La hipòtesi de que la composició dels àcids grassos dels LysoGP sèrics reflexa parcialment la ingesta dietètica dels àcids grassos ja ha sigut recolzada (*Hodge et al. 2007*).

Altres molècules descrites en aquesta revisió tenen papers controvertits respecte al seu paper en l'obesitat. Un d'aquests metabòlits és el nucleòsid adenosina. Tot i que l'evidència ha suggerit

una possible correlació entre els nivells d'aquest nucleòsid i l'obesitat, la suplementació amb polifenols en adults amb sobrepès o obesitat disminueix els nivells d'adenosina en plasma (Kim et al. 2017). Per contra, un programa d'activitat física augmenta les concentracions d'adenosina urinària en preadolescents amb sobrepès (Meucci et al. 2018). El 2-cetoglutarat, també conegut com  $\alpha$ -cetoglutarat o 2-oxoglutarat, és un metabòlit intermediari clau en el cicle de l'àcid tricarbòxic (TCA; de l'anglès, *Tricarboxylic Acid Cycle*). L'administració d'aquest metabòlit podria afectar el pes corporal i la immunitat intestinal innata a l'influir en la microbiota intestinal (Chen et al. 2017). A més, s'ha associat amb la inducció d'hipertrofia del múscul esquelètic i la inhibició de la degradació de proteïnes (Newgard et al. 2009). En l'orina, els nivells de serotonina s'han observat més baixos en joves obesos que en subjectes amb un pes normal (Cho et al. 2017). En el CNS, la serotonina està implicada amb la gana i la posterior ingesta de nutrients (Tecott 2007), regulat principalment per processos que tenen lloc en l'hipocamp (Yabut et al. 2019). Una altra molècula que pot jugar un paper en l'obesitat és la trimetilamina oxidada (TMAO), que és un metabòlit derivat de l'activitat microbiana (Barrea et al. 2018; Leal-Witt et al. 2018; Zheng et al. 2016) i ja s'està utilitzant com a biomarcador d'obesitat (Barrea et al. 2018) i de CVD (Bennett et al. 2013; Trøseid et al. 2015). La trimetilamina (TMA), precursor del TMAO i formada a partir de la carnitina i la colina ingerides en la dieta, augmenta després de la ingesta de carns vermelles, ous i productes làctics (nutrients comuns d'una dieta occidental o dieta Western) (Barrea et al. 2018) i disminueix en condicions de pèrdua de pes (Almanza-Aguilera et al. 2018). De manera similar, s'ha descrit la disminució del TMAO en orina en nens obesos prepuberals després d'un canvi en l'estil de vida (Leal-Witt et al. 2018). A més, la presència de TMAO disminueix l'expressió de dos enzims claus, CYP7A1 i CYP27A1, essencials per la biosíntesi d'àcids biliars i afecta als seus transportadors en el fetge, el que disminueix el flux de colesterol invers (Koeth et al. 2013). Finalment, l'última molècula rellevant descrita en obesitat que s'esmentarà és l'homocisteïna (HCys). L'HCys és un aminoàcid que conté un grup sulfidril derivat de la desmetilació de la metionina ingerida en la dieta. Hi ha dues vies en el metabolisme de la HCys: la remetilació i la transsulfuració. L'obesitat s'associa a un augment dels nivells d'HCys en adults (Jacques et al. 2001; Tungtrongchitr et al. 2003). Alguns estudis en nens i adolescents han observat una associació positiva entre els nivells d'aquest aminoàcid i el BMI (Osganian et al. 1999; Shen et al. 2002) i la insulina (Gallistl et al. 2000). A més, la hiperhomocisteïnemia també s'ha identificat com un factor de risc independent de CVD on molts estudis han demostrat que està relacionada amb el dany endotelial (Cao et al. 2015), l'aterosclerosi (McCully 2016) i la trombosi venosa (Den Heijer et al. 1998).

## 1.4. Estrès oxidatiu i obesitat

A més d'aquests canvis metabòlics descrits anteriorment, l'obesitat també s'ha relacionat amb l'estrès oxidatiu. Aquest procés s'origina quan hi ha un desequilibri entre la producció de ROS i la defensa antioxidant, a favor de la producció de ROS (*Harwell 2007*). L'estrès oxidatiu pot conduir a la modificació estructural de molècules com lípids, proteïnes, carbohidrats i àcids nucleics, modificant la seva funció i produint danys irreparables (*Sies 1997*). Per tant, un equilibri entre els compostos oxidants i antioxidants és essencial pel bon funcionament dels òrgans i teixits.

Dins de les ROS s'engloba gran varietat de molècules i radicals lliures (espècies reactives d'oxigen radicalàries i no radicalàries) que es generen fisiològicament com a productes del metabolisme de l'oxigen. Les espècies radicalàries (molècules que tenen un electró desaparellat), com el radical superòxid ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) o el radical peroxi ( $\cdot OOH$ ), són espècies molt més reactives en comparació amb les espècies no radicalàries que són molècules que no presenten cap electró desaparellat, com el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) (*Boots et al. 2008*). Tot i això, són formes electrònicament excitades, que generen un alt contingut energètic amb més capacitat reactiva en comparació amb altres molècules (*Halliwell 2006*).

Els organismes eucariotes (o els éssers vius) tenen un sistema antioxidant per tal de frenar els efectes deleteris de les ROS i controlar el dany produït per aquestes. De manera general, un antioxidant és qualsevol substància o acció que evita el dany oxidatiu i poden ser tant endògens com exògens. Dins dels endògens hi ha antioxidants enzimàtics com la superòxid dismutasa (SOD), la catalasa, el glutatió peroxidasa o el glutatió reductasa i, els antioxidants no enzimàtics, com el glutatió i l'àcid úric. Els antioxidants exògens provenen de la dieta, com l'àcid ascòrbic, el tocoferol o els polifenols (*Andresen H et al. 2006*).

Durant el procés de l'obesitat s'han descrit nivells augmentats de diferents marcadors d'estrès oxidatiu què, a més, correlacionen positivament amb el BMI i el percentatge de greix corporal (*Pihl et al. 2006*). Per contra, s'han observat nivells més baixos de marcadors de defensa antioxidant (*Chrysohoou et al. 2007; Codoñer-Franch et al. 2010*). Aquests fets no només tenen lloc en adults sinó que s'han descrit nivells elevats d'estrès oxidatiu en l'obesitat infantil (*Codoñer-Franch et al. 2010; Castaner et al. 2018*). Específicament, s'ha descrit un augment de radicals peroxi (*Atabek et al. 2004*), nivells augmentats de malondiadehid (MDA) (*Lima et al. 2004; Codoñer-Franch et al. 2010*), producte secundari de peroxidació lipídica, i concentracions

més elevades de productes avançats d'oxidació de proteïnes (*Atabek et al. 2006; Codoñer-Franch et al. 2010*).

Entre els òrgans afectats per l'estrès oxidatiu, a més dels més implicats en les complicacions metabòliques, com el fetge i el múscul esquelètic, també hi destaca el sistema nerviós. Diferents estudis realitzats en rosegadors, com la rata i el ratolí, descriuen més producció de ROS en el cervell (còrtex prefrontal i hipocamp) d'aquests animals després d'induir l'obesitat per mitjà d'una dieta alta en greixos (*Freeman et al. 2013; Ma et al. 2014*).

Entre els diferents mecanismes proposats per tal de poder explicar la sobreproducció de ROS i l'augment d'estrès oxidatiu durant l'obesitat trobem els següents:

- i) L'augment d'estrès oxidatiu associat a l'obesitat pot ser degut a la presència d'un excés de teixit adipós, ja que els adipòcits s'han identificat com una font per a la formació de citocines proinflamatòries que a la vegada, són potents estimuladors cap a la producció d'oxigen reactiu. Per tant, un augment de la concentració de les citocines podria ser la responsable de l'augment d'estrès oxidatiu observat en persones obeses (*Fonseca-Alaniz et al. 2007*). El teixit adipós també té capacitat secretora d'angiotensina II, que estimula l'activitat oxidasa de la NADPH. La NADPH oxidasa compren la major ruta de producció de ROS en els adipòcits (*Morrow 2003*).
- ii) L'oxidació mitocondrial i peroxisomal dels àcids grassos és capaç de produir radicals lliures en el fetge i, per tant, estrès oxidatiu, cosa que podria provocar alteracions en l'ADN mitocondrial, causant anomalies estructurals i esgotament de l'ATP. Tot i això, també és possible que aquestes anomalies mitocondrials siguin condició persistent que permeti la sobreproducció de ROS (*Duvnjak et al. 2007*).
- iii) L'obesitat augmenta la càrrega mecànica i el metabolisme del miocardi i, per tant, s'incrementa el consum d'oxigen. Una conseqüència negativa de l'augment en el consum d'oxigen és la producció de radical superòxid, radical hidroxil i del peròxid d'hidrogen i, per descomptat, la pèrdua d'electrons produïts en la cadena de transport d'electrons donant lloc a la formació de més radical superòxid (*Khan et al. 2006*).
- iv) El consum de dietes riques en greixos pot alterar el metabolisme de l'oxigen. Els dipòsits grassos són vulnerables a patir reaccions d'oxidació. Si la producció d'aquestes ROS excedeix la capacitat antioxidant de la cèl·lula, es genera estrès oxidatiu i produeix la peroxidació dels lípids (*Khan et al. 2006*).

- v) Les mitocòndries proporcionen energia requerida per quasi tots els processos cel·lulars que finalment permeten la realització de totes les funcions fisiològiques. A més, tenen un paper central en la mort cel·lular. La disfunció mitocondrial s'ha implicat en una gran varietat de malalties que van des de malalties neurodegeneratives fins a la diabetis i l'envelliment. L'obesitat produeix trastorns que afecten el metabolisme mitocondrial, fet que afavoreix la generació de ROS i el desenvolupament d'estrès oxidatiu (Monteiro and Azevedo 2010).

#### 1.4.1 La cadena de transport d'electrons com a principal productor de ROS

La mitocòndria és la principal font de ROS degut a l'existència de la cadena de transport d'electrons situada en la membrana interna d'aquest orgànul. La mitocòndria s'encarrega d'aportar l'energia necessària a la cèl·lula en forma de molècula d'ATP gràcies al gradient elèctric que es genera en la cadena de transport d'electrons (Loschen et al. 1974; Boveris and Cadenas 1975). La cadena de transport d'electrons està formada per 4 super-complexes multiproteics units a la membrana mitocondrial interna, formats alhora per diferents subunitats, que transporten els electrons des dels portadors reduïts (NADH pel complex NADH deshidrogenasa o complex I, o el FADH<sub>2</sub> pel complex succinat deshidrogenasa o complex II) fins a l'acceptor final que és l'oxigen i es forma l'aigua. Els portadors d'aquests electrons reduïts, el NADH i el FADH<sub>2</sub> provenen del cicle del TCA, que a la vegada provenen de l'oxidació de la glucosa o de la β-oxidació dels àcids grassos, respectivament. Durant la transferència d'electrons, els complexos I, III i IV bombegen protons cap a l'espai intermembranal augmentant la diferència de pH. Aquesta diferència provoca que el complex ATP sintasa o complex V pugui afegir una molècula de fosfat a l'adenina difosfat (ADP) i formar energia en forma d'ATP.

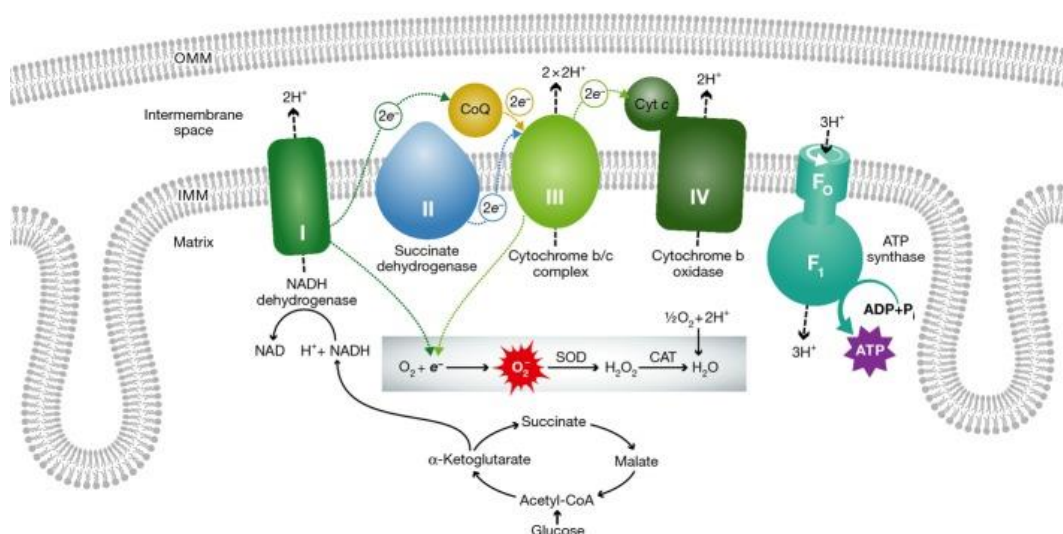


Figura 20. Cadena de transport d'electrons i la seva relació amb la producció de ROS. Els electrons es transfereixen entre els complexos que formen la cadena de transport d'electrons promovent el transport de protons (H<sup>+</sup>) des de la matriu intermembrana. El flux de protons a través de l'ATP sintasa (complex V) converteix el ADP en ATP. Normalment l'O<sub>2</sub> és el receptor final d'electrons (e<sup>-</sup>) del complex IV. La fuga d'electrons del complex I i III de les mitocòndries pot produir reactius tòxics com l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> o el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. IMM: Membrana mitocondrial interna. Figura de Dorn 2015.

Aquest procés no és 100% eficient i per tant, hi ha fuga d'electrons que reaccionaran amb l'oxigen i formaran l'ió superòxid. Després, aquest ió és dismutat ràpidament formant peròxid d'hidrogen per acció del SOD (**Figura 20**).

### **1.4.2 Productes d'oxidació**

Tot i les defenses que té la cèl·lula per combatre els efectes nocius de l'estrès oxidatiu, aquestes no són suficients i es produeix lesió oxidativa a les macromolècules, com les proteïnes, lípids, ADN o carbohidrats.

#### **1.4.2.1 Oxidació de lípids**

Els fosfolípids, el colesterol, els èsters de colesterol i els TG són les principals espècies lipídiques que es troben en els mamífers (*Niki 2008*). La susceptibilitat dels fosfolípids de les membranes lipídiques a les alteracions oxidatives pot ser deguda a les propietats fisicoquímiques de la bicapa lipídica i la reactivitat química dels àcids grassos que formen la membrana. La primera propietat està relacionada amb el fet que l'oxigen i els radicals lliures són més solubles en la bicapa lipídica que en la solució aquosa. Per tant, l'oxigen pot tendir a concentrar-se. La segona propietat està relacionada amb el fet que els residus de PUFA dels fosfolípids són extremadament sensibles a l'oxidació que augmenta exponencialment en funció del nombre d'enllaços dobles per molècula d'àcid gras (*Pamplona 2011*). Tot i això, no tots els lípids s'oxiden per l'acció de radicals lliures, també poden oxidarse mitjançant enzims específics.

##### **1.4.2.1.1 Oxidació mediada per ROS**

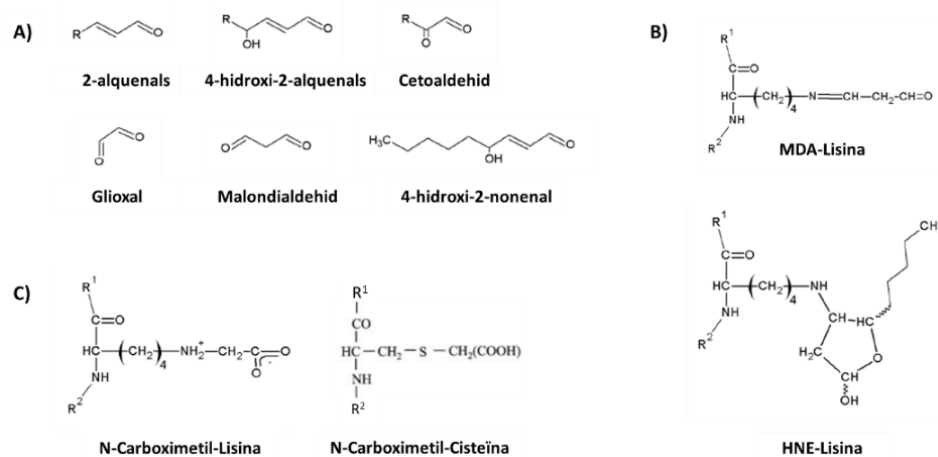
El grau d'insaturació dels PUFA és el que els fa més susceptibles davant l'estrès oxidatiu pel fet que els àtoms d'hidrogen dels grups funcionals (CH<sub>2</sub>) que es troben units als dobles enllaços, són especialment susceptibles a unir-se a les ROS. La pèrdua d'aquest hidrogen converteix els PUFA en un nou radical lliure, el qual pot tornar a reaccionar amb una altra molècula d'oxigen i desencadenar una reacció en cadena coneguda amb el nom de peroxidació lipídica (*Venarucci et al. 1999*). Aquesta reacció es divideix en tres etapes: iniciació, propagació i terminació.

La fase d'iniciació comença quan un radical lliure ataca un PUFA dels fosfolípids de la membrana. Es tracta d'una reacció de reducció on el radical lliure arranca un àtom d'hidrogen d'un grup metilè (-CH<sub>2</sub>-) del lípid insaturat i dona lloc a un radical d'àcid gras. Aquest radical reacciona ràpidament amb l'oxigen produint un radical peroxi. A partir d'aquí s'inicia la fase de propagació, ja que el radical peroxi té la capacitat de reaccionar amb un altre lípid insaturat i continuar amb la reacció arrancant-li un àtom d'hidrogen i formant un nou radical peroxi més un hidroperòxid. D'aquesta manera sempre hi haurà un radical peroxi per continuar la cadena fins a arribar a

destruir tota la membrana. L'última fase, la fase de terminació, es dona quan dos radicals peroxi reaccionen entre ells i es forma una espècie no radicalària. Per tant, el grau d'insaturació dels àcids grassos no només influeix en la fluïdesa i en la capacitat de la membrana, sinó que a més, també es relaciona amb la facilitat d'oxidació enfront radicals lliures. Per tant, a més nombre de dobles enllaços, més fàcil serà la peroxidació lipídica (*Spiteller 2001; Boots et al. 2008*).

Els hidroperòxids lipídics són els lípids que s'han format després de la peroxidació lipídica i poden progressar cap a estadis finals irreversibles que donaran lloc a la fragmentació dels PUFA i a la generació de compostos intermediaris reactius com els alcans, alquens, hidroxialquens, glioxal, MDA i hidroxinonenal (HNE), entre altres. Aquests intermediaris tenen una vida molt més llarga (minuts) i com que no tenen càrrega poden migrar amb facilitat entre les membranes. Aquestes característiques fan que aquests compostos siguin molt més perillosos que els radicals lliures, ja que tenen efecte lesiu tant dins com fora de la membrana. Per tant, podran reaccionar amb grups nucleòfils de proteïnes i ADN provocant modificacions químiques (*Pamplona and Costantini 2011; Naudí et al. 2013a*).

La modificació dels aminoàcids, concretament amb els aminoàcids cisteïna, lisina, arginina i histidina de les proteïnes degudes als productes formats durant la peroxidació lipídica s'anomenen productes finals de lipoxidació avançada (ALE; de l'anglès, *Advanced Lipoxidation End-products*) com per exemple el MDA-lisina (MDAL), HNE-lisina, N<sup>ε</sup>-(carboximetil)-lisina (CML) i S-(carboximetil)-cisteïna (CMC), entre altres (*Hulbert et al. 2007*). Els dos últims compostos també poden provenir de la modificació proteica per productes de glicoxidació (**Figura 21**).



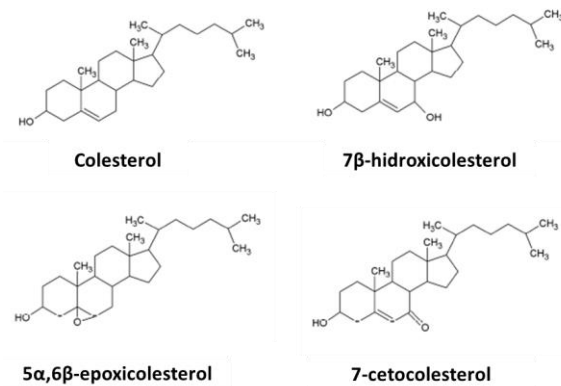
**Figura 21.** Estructura química d'alguns lípids oxidats. **A)** Estructura química dels productes intermediaris; **B)** Estructura química dels productes finals; **C)** Estructura química de productes finals de lipo- i glicoxidació

#### 1.4.2.1.2 Oxidació enzimàtica

Els lípids no només poden ser oxidats mitjançant l'acció dels radicals lliures sinó que també es poden oxidar mitjançant l'acció enzimàtica. Els principals enzims encarregats de dur a terme



aquesta funció són LOX, COX i el CYP450. Trobem derivats d'oxidació enzimàtica de l'AA, de l'EPA o del DHA entre altres, comunament anomenats oxilipines, així com productes d'oxidació del colesterol com són els oxisterols (**Figura 22**).



**Figura 22.** Estructura química dels productes d'oxidació del colesterol. Molècules derivades del colesterol per l'acció enzimàtica.

Un dels marcadors descrits en clínica per tal de mesurar el grau de peroxidació lipídica és el 8-isoprostà F2α, producte d'oxidació enzimàtica de l'AA a partir de l'enzim COX (*Codoñer-Franch et al. 2011*). Respecte als oxisterols comentar que tenen un paper important en el transport de colesterol i, també s'utilitzen com a biomarcadors d'estrès oxidatiu (*Yoshida and Niki 2006; Niki 2008*).

### 1.4.2.2 Oxidació de proteïnes

Com ja s'ha vist en l'apartat anterior, determinats residus de les proteïnes també poden ser modificats mitjançant l'acció dels radicals lliures o per intermediaris de segona generació.

#### 1.4.2.2.1 Modificació de proteïnes per ROS

Els aminoàcids presents en les proteïnes poden ser oxidats per ROS. L'oxidació de les cadenes laterals de la lisina, arginina, prolina i treonina poden donar lloc a la formació de derivats carbonils, l'oxidació d'histidina dóna lloc a la formació de la 2-oxo-histidina mentre que, quan s'oxida la metionina forma la metionina sulfòxid.

Entre els principals productes que es formen hi trobem els aldehids: el semialdehid glutàmic (SAG) com a producte de l'oxidació dels aminoàcids arginina i prolina i el semialdehid aminoadípica (SAAA) producte de l'oxidació de la lisina (**Figura 23**). Aquests productes carbonils són uns bons biomarcadors d'estrès oxidatiu perquè representen entre un 55 i un 100% del valor total de carbonils (*Requena 2001*). A conseqüència d'aquestes modificacions, les proteïnes poden perdre la seva funció. La majoria d'aquestes són irreversibles i és necessària l'acció de sistemes de reparació en alguns casos o el seu recanvi.

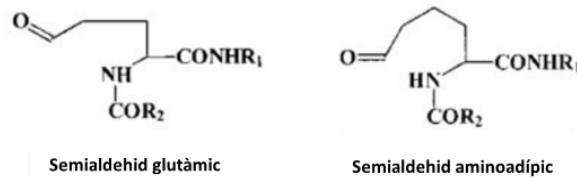


Figura 23. Estructura química dels compostos que es formen com a producte de l'oxidació dels aminoàcids presents en les proteïnes. Figura adaptada de Requena et al. 2001.

#### 1.4.2.2.2 Modificació de proteïnes per intermediaris de segona generació

La reacció de Maillard és la reacció no enzimàtica que té lloc entre els sucres reductors i molècules que tenen un grup amino. Aquesta reacció dona lloc a la formació de la base de Schiff i al producte d'Amadori. Aquests s'oxiden fàcilment i es fragmenten donant com a resultat una sèrie d'intermediaris reactius de cadena curta com el glioxal i el metilglioxal (Naudí et al. 2013b). Aquests compostos poden reaccionar amb els residus dels aminoàcids lisina i arginina de les proteïnes i formar els productes finals de glicació avançada (AGE; de l'anglès, *Advanced Glycation End-products*) (Thorpe and Baynes 1996). Entre els AGEs més descrits i caracteritzats hi ha la CML i la N<sup>ε</sup>-carboxietil-lisina (CEL) formats a partir del glioxal i metilglioxal, respectivament (Cantero et al. 2007) (Figura 24).

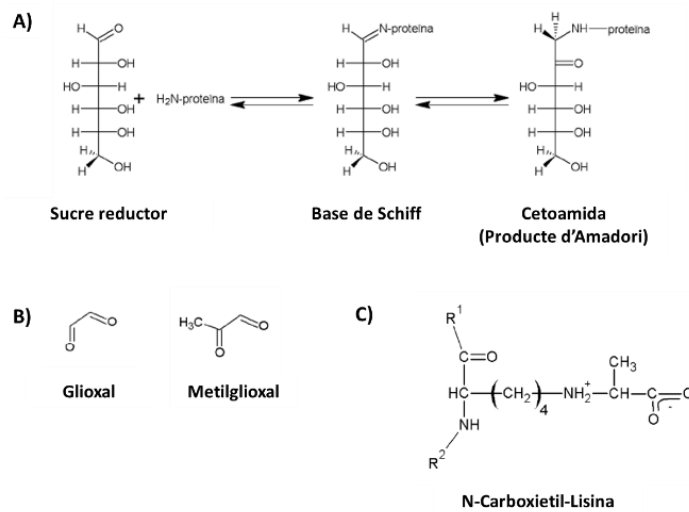


Figura 24. A) Reacció de Maillard; B) Estructura química dels productes intermediaris; C) Estructura química d'un producte final de glicooxidació.

El terme producte de glicooxidació es va utilitzar inicialment per descriure els productes que eren derivats d'una glicació i oxidació. Les molècules com les CML i CMC, es poden formar tant per l'oxidació dels glúcids com dels lípids. Per tant, podem parlar d'un producte mixt de glico- i lipooxidació tot i que, si se sap amb seguretat quin és el seu origen es pot dir si es tracta d'un producte AGE o bé ALE. Les principals conseqüències derivades d'aquestes modificacions són la pèrdua de funció i la integritat estructural de les biomolècules modificades que induiran conseqüències funcionals com la disfunció cel·lular i lesió tissular.

L'estudi de biomarcadors d'oxidació proteica *in vivo* és important per tal de saber quin és l'efecte de l'estrès oxidatiu sobre les proteïnes i també perquè reflecteix l'estadi últim de diferents vies d'oxidació com la lipooxidació i la glicooxidació.

#### **1.4.2.3 Oxidació de molècules d'ADN**

Quan l'estrès oxidatiu afecta l'ADN pot tenir conseqüències devastadores, ja que poden aparèixer mutacions amb pèrdua o alteració irreversible de la informació genètica. El radical hidroxil reacciona amb les purines donant lloc a 8-oxo-7,8-dihidrodeoxiguanosina (8-oxodG) o a 8-oxo-7,8-dihidrodeoxiadenosina (8-oxodA) (Ma *et al.* 2016). El marcador més utilitzat per a la determinació d'oxidació en ADN és la 8-oxodG perquè es troba en més abundància en comparació amb la 8-oxodA. El radical hidroxil també pot reaccionar amb les pirimidines i generar altres compostos (Woods *et al.* 2019). Les espècies reactives intermediàries de l'àcid nítric també poden reaccionar amb les molècules d'ADN, generant la 8-nitro-2-deoxiguanosina. Per altra banda, la reacció de l'hipoclorit amb l'ADN produeix 5-cloro-deoxicitidina.

A hores d'ara, tot i que l'obesitat pot comportar un increment de la producció de ROS i de les modificacions oxidatives, es desconeix com l'obesitat infantil pot afectar a aquests marcadors en teixits com el cervell, clàssicament poc estudiats.

### **1.5. Intervencions nutricionals basades en probiòtics**

És important abordar el problema de l'obesitat, tant en nens com en adults, pel seu impacte en la mortalitat, morbiditat, qualitat de vida i cost sanitari. Una de les estratègies per intentar reduir el risc de patir malalties derivades de l'obesitat és modificant l'estil de vida actual, que inclou els hàbits alimentaris i l'activitat física. Algunes de les dietes que s'han proposat per la pèrdua de pes i la millora dels efectes deleteris de l'obesitat es basen en la restricció de la mida de les porcions juntament amb una restricció calòrica (per exemple, la dieta *Weight Watchers*) (Lowe 1999). La restricció calòrica és una de les intervencions més utilitzades per a la gestió del sobrepès i l'obesitat i consisteix en reduir la ingesta de calories (Jaime *et al.* 2015). Un altre tipus de dieta és la que minimitza la ingesta de carbohidrats augmentant la ingesta proteica i greixos (per exemple, la dieta *Atkins*) (Atkins 2000; Oh and Uppaluri 2019). Aquests tipus de dietes (baixes en carbohidrats) indueixen una ràpida pèrdua de pes però, no es poden mantenir a llarg termini, ja que s'han relacionat amb cetosi, efecte en els lípids i problemes en la funció renal. Moltes altres modulen l'equilibri de macronutrients i la càrrega glucèmica (per exemple, la dieta *Zone*) i altres restringeixen els greixos com la dieta *Ornish* (Dansinger *et al.* 2005). A més a més, en el context de l'obesitat infantil també hi ha diferents recomanacions dietètiques com a

tractament per l'obesitat, com per exemple, fomentar la ingesta de més de cinc porcions de fruita i verdura al dia, disminuir la ingesta d'aliments rics en calories, com greixos saturats, refrigeris salats i aliments amb un alt índex glucèmic, minimitzar la ingesta de begudes que continguin sucres, minimitzar menjar fora de casa o el menjar ràpid, esmorzar diàriament o evitar saltar-se alguna menjada (*Kumar and Kelly 2017*). Tot i això, quan no s'aconsegueix una pèrdua de pes òptim seguint aquests tipus de recomanacions, es poden seguir altres estratègies com les dietes basades en la ingesta de carbohidrats modificats, que inclouen les dietes de baix índex glucèmic i les dietes baixes en carbohidrats, o la restricció de la mida de les porcions. No obstant, tot i demostrar-se que són efectives pel control del pes en nens amb obesitat (*Sondike et al. 2003; Ebbeling et al. 2003*), l'adherència a aquest tipus de dieta pot ser baixa i els nens poden ser incapaços de seguir aquest tipus de règim a llarg termini (*Kirk et al. 2012*).

Per tant, tot i que el tractament és molt simple, la taxa d'èxit a llarg termini és baixa, ja que els canvis en l'estil de vida són molt difícils i a més, les persones o els nens que comencen a perdre pes creuen que aquest canvi és permanent i tornen als seus hàbits inicials, donant com a resultat un augment més gran de pes que el que tenien al principi (*Abete et al. 2011; Kirk et al. 2012*). Per aquest motiu, es necessiten estratègies alternatives per tal de reduir els riscos i minimitzar la gravetat i complicacions associades a l'obesitat. Una d'aquestes estratègies que podria ser útil és la incorporació de diferents suplementos alimentaris com a mesura compensatòria en un context de dieta hipercalòrica per tal de reduir l'increment de l'obesitat caracteritzada per aquest tipus d'ingesta alimentaria. L'objectiu dels suplementos alimentaris és canviar el perfil metabòlic cap a una direcció més sana. En aquest sentit, ja s'ha demostrat que és possible modular, a través dels suplementos, el procés de l'obesitat i l'aparició de malalties derivades d'aquesta (*Ard et al. 2016*).

Entre els suplementos que potencialment podrien contribuir a millorar l'obesitat infantil hi trobem els probiòtics, ja que, durant l'última dècada, s'ha identificat la microbiota intestinal com un factor potencialment important en la fisiopatologia tant de l'obesitat com dels trastorns metabòlics relacionats (*Muscogiuri et al. 2019*).

### **1.5.1 Microbiota intestinal**

La microbiota humana està formada per milions de microorganismes que es troben en l'intestí i comprenen una biomassa d'aproximadament 2 kg. Després del naixement, cada individu té una microbiota única que es troba influenciada per diferents factors com la genètica, el tipus de part, la lactància, l'edat, l'ús d'antibiòtics i la dieta. Aquests microorganismes són molt importants en el manteniment de l'homeòstasi del cos, ja que participen en moltes funcions com el procés

digestiu, la síntesi de vitamines, la protecció contra microorganismes patògens, la producció d'àcids grassos i la modulació del sistema immunològic (Al-Assal *et al.* 2018). Actualment, gràcies als avanços tecnològics, s'ha pogut seqüenciar l'ADN bacterià i s'ha pogut determinar que el 80% de la microbiota intestinal humana està formada per Bacteroidetes i Firmicutes (Wu *et al.* 2011; Angelakis *et al.* 2012). El desequilibri en aquest perfil microbià pot contribuir al desenvolupament de certes malalties, ja que afecta el sistema immune i a l'homeòstasi metabòlica (Nyangale *et al.* 2012).

Estudis en animals, concretament en ratolins obesos *ob/ob* (obesitat causada per una mutació al gen de la leptina), han evidenciat una disminució de fins al 50% en l'abundància de Bacteroidetes i un augment en la proporció de Firmicutes en la femta en condició d'obesitat (Ley *et al.* 2006). De la mateixa manera, en humans obesos també s'ha descrit una proporció baixa en la relació Bacteroidetes/Firmicutes en la microbiota fecal (Ley *et al.* 2006; Furet *et al.* 2010). A més, aquesta proporció augmenta quan hi ha pèrdua de pes (Ley *et al.* 2005) sent els gèneres *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Campylobacter* i *Staphylococcus* predominants en individus que pateixen obesitat i, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* i *Akkermansia* en individus primis (Le Chatelier *et al.* 2013). Per altra banda, un estudi realitzat recentment en nens obesos també descriu una composició de la microbiota intestinal similar a la dels adults obesos (Riva *et al.* 2017).

### **1.5.2 Paper potencial de la microbiota en el desenvolupament de l'obesitat**

Les diferències entre la microbiota intestinal d'individus obesos i subjectes primis suggereix un vincle entre la microbiota intestinal i l'homeòstasi energètica però els mecanismes pels quals existeix aquesta relació encara no estan completament definits. Alguns dels mecanismes proposats per tal de poder explicar el paper de la microbiota intestinal en el desenvolupament de l'obesitat es descriuen a continuació:

- i) Una de les funcions de la microbiota intestinal és la fermentació dels polisacàrids com la fibra soluble. La fermentació de les fibres dietàries dona com a resultat la formació d'àcids grassos de cadena curta (SCFA; de l'anglès, *Short Chain Fatty Acids*) com el butirat, l'acetat o el propionat. Després de ser absorbits, els SCFA poden induir lipogènesi i augmentar les reserves de TG. Els SCFA han demostrat activar la proteïna ChREBP i el factor de transcripció SREBP1 en el fetge, ambdós involucrats en la lipogènesi. A més, també poden suprimir el factor de dejú induït per adipòcits inhibint la lipoproteïna lipasa i l'acumulació de TG en els adipòcits (Khan *et al.* 2016).

- ii) La microbiota intestinal té capacitat per disminuir l'oxidació dels àcids grassos del fetge en disminuir l'activitat de l'adenosina trifosfat quinasa (AMPk) (López 2017). Aquest enzim es troba en el fetge i en les fibres musculars i la seva funció és actuar com a indicador de combustible en controlar l'estat d'energia cel·lular. La seva activitat és regulada per les hormones leptina i adiponectina, la hipòxia, l'activitat física i per baixos nivells de glucosa. La seva inhibició fa que disminueixi l'oxidació dels àcids grassos i, per tant, afavoreix la seva acumulació en les cèl·lules del colon, fetge i teixit adipós (Bäckhed et al. 2007; Hardie 2008; López 2017).
- iii) Una dieta alta en greixos pot alterar la composició de la microbiota intestinal, augmentant les concentracions de LPS en l'intestí (Cani et al. 2007). Aquests LPS poden unir-se a receptors tipo Toll, principalment el receptor tipo Toll4. Aquesta interacció és essencial per la transducció del senyal dels LPS i la posterior inducció de l'expressió de TNF $\alpha$  i IL-6 (Frost et al. 2002) conduint a un estat proinflamatori.

Tot i això, les alteracions en la composició, la diversitat i els metabòlits derivats de la microbiota intestinal no només s'han relacionat amb l'obesitat sinó que també s'associen a altres malalties que afecten diferents òrgans del cos humà, com les CVD o les malalties neurodegeneratives (Schroeder and Bäckhed 2016; Roy Sarkar and Banerjee 2019; Forkosh and Ilan 2019). Això suggereix que la manipulació de la microbiota a favor d'una microbiota intestinal específica podria ser beneficiosa en restaurar la integritat funcional intestinal i revertir les alteracions característiques de certes patologies.

Cada vegada hi ha més interès en l'estudi de la modulació de la microbiota com a tractament enfront l'obesitat, ja que pot ser una alternativa menys invasiva i costosa en comparació amb intervencions utilitzades actualment com la cirurgia bariàtrica (Al-Assal et al. 2018). En aquest sentit, els probiòtics poden ser una bona opció per tal de manipular la composició de la microbiota a favor d'una microbiota intestinal específica (Azad et al. 2018).

### 1.5.3 Probiòtics

Els probiòtics van ser definits per l'Organització d'Alimentació i d'Agricultura i per la WHO com "un microorganisme viu que, quan s'administra de forma adequada, confereix un benefici en la salut de l'hoste" (Ontario 2002). L'any 2014, aquesta definició va ser revisada per l'Associació Científica Internacional de Probiòtics i Prebiòtics, incloent-hi en el terme probiòtic el següent: "microorganisme pel qual hi ha evidències científiques de seguretat i eficàcia" (de Carvalho Marchesin et al. 2018a). Aquests microorganismes han de romandre vius al llarg de tota la

longitud del tracte digestiu i per tant, per tal de considerar-los bons candidats, les soques microbianes hauran de tenir unes certes característiques que contribuiran a la colonització de l'hoste. Algunes d'aquestes característiques són tolerància al pH baix que hi ha en l'estómac, la resistència a les sals biliars i l'adhesió a l'epiteli de l'hoste. Els probiòtics poden regular i millorar el microecosistema intestinal i el metabolisme energètic reduint la inflamació crònica i l'estrès oxidatiu (*Cani and Delzenne 2009; Wall et al. 2009; Reilly and Saltiel 2017*). Aquests estudis indiquen que poden tenir un paper en la prevenció i el tractament de l'obesitat mitjançant la regulació de la microbiota intestinal (*Cani and Delzenne 2009; Delzenne et al. 2011; Brunkwall and Orho-Melander 2017*). Tot i això, encara no està clar l'efecte dels probiòtics per controlar el pes corporal i els indicadors clínics relacionats en l'obesitat. En aquest sentit, diversos estudis han avaluat els efectes dels probiòtics sobre el control del pes, el perfil lipídic i el control glucèmic (s'estudien aquests paràmetres perquè el sobrepès i l'obesitat s'han associat a nivells elevats de perfils lipídics plasmàtics que concorren amb el metabolisme de la glucosa deteriorat) (*Hendijani and Akbari 2018; Serena et al. 2018*) i suggereixen que tenen un paper important en la prevenció de l'obesitat tant en animals (*Yin et al. 2010; Kondo et al. 2010; An et al. 2011; Dardmeh et al. 2017; Li et al. 2018b; de Carvalho Marchesin et al. 2018; Shin et al. 2018*) com en humans (*Kadooka et al. 2010; Jung et al. 2013; Kadooka et al. 2013; Sharafedinov et al. 2013; Lindsay et al. 2014; Minami et al. 2015; Osterberg et al. 2015; Stenman et al. 2016; Minami et al. 2018; Kim et al. 2018; Szulińska et al. 2018; Sanchis-Chordà et al. 2019; Pedret et al. 2019*).

Recentment, en una revisió sistemàtica i metanàlisi, s'han descrit resultats que suggereixen que els probiòtics tenen efectes positius en la pèrdua de pes en paral·lel amb la millora del perfil lipídic plasmàtic i del metabolisme de la glucosa (*Wang et al. 2019a*). Pel que fa als probiòtics i la pèrdua de pes, estan inclosos en el treball 12 assaigs controlats aleatoritzats en la metanàlisi, dels quals 10 estudis descriuen canvis en el pes corporal, 11 en el BMI, 8 en la WC, 9 en la massa de greix i 6 en el percentatge de greix total. Per caracteritzar els efectes dels probiòtics en el perfil lipídic plasmàtic, s'inclouen 7 assaigs aleatoritzats, dels quals 7 descriuen canvis en el colesterol total, TG i colesterol LDL, i 6 en el colesterol HDL. En relació als canvis en el metabolisme de la glucosa, s'inclouen 8 assaigs controlats aleatoritzats, dels quals 6 descriuen canvis en els nivells de glucosa en dejú, d'hemoglobina glicosilada i insulina. Finalment, 5 estudis descriuen canvis en el model homeostàtic per avaluar la resistència a la insulina (HOMA-IR; de l'anglès, *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*) calculat a partir de la glicèmia en dejú (mg/dl) per la insulinèmia basal (uU/mL) dividit entre 405.

Un dels mecanismes que han proposat per explicar els resultats anteriors és que la suplementació amb probiòtics pot augmentar els bacteris que produeixen els SCFA, disminuir l'abundància de LPS i alleujar el teixit i la inflamació induïda per aquests. Els probiòtics també poden reduir els patògens oportunistes i els seus metabòlits, com la TMA. A més, podrien reduir l'acumulació de greix, rebaixar els nivells d'inflamació i millorar la sensibilitat a la insulina acompanyada de l'augment dels neuropèptids i dels pèptids gastrointestinals i l'abundància de diversos bacteris beneficiosos. Tot i això, la utilització de diferents soques probiòtiques poden ser més efectives que altres per millorar els efectes metabòlics relacionats amb l'obesitat però, en general, l'efectivitat dels probiòtics en l'obesitat humana i els seus mecanismes d'acció encara no s'han dilucidat per complet (Wang et al. 2019a).

Dins dels probiòtics per combatre els efectes deleteris de l'obesitat, les espècies més estudiades són el *Lactobacillus* i el *Bifidobacterium*. A més, els omega-3 també s'han suggerit en la millora dels efectes causats per l'obesitat millorant el perfil lipídic (Hartweg et al. 2009; Pirillo and Catapano 2013; Rajkumar et al. 2014) i la inflamació crònica (Tai and Ding 2010; Adkins and Kelley 2010; Root et al. 2013) gràcies a les seves propietats antiinflamatòries (Bays et al. 2008). Només s'ha trobat un article en la bibliografia on s'han avaluat els efectes dels probiòtics juntament amb els omega-3 sobre paràmetres com la sensibilitat a la insulina, el perfil lipídic i la inflamació (Rajkumar et al. 2014) i els resultats han demostrat que el probiòtic amb l'omega-3 té un efecte més pronunciat sobre el colesterol HDL, la sensibilitat a la insulina i la reducció de la inflamació.

### 1.5.3.1 *Bifidobacterium breve*

Entre les diferents espècies que pertanyen al gènere de *Bifidobacterium*, el *Bifidobacterium breve* és un dels més consolidats i ben documentats gràcies a la gran quantitat d'estudis en models animals (Cionci et al. 2018). El *B. breve* s'ha estudiat en diferents trastorns, entre els quals s'hi troba l'obesitat, on també s'ha vist que pot participar en mecanismes de protecció contra aquesta. S'ha descrit que l'administració de *B. breve* en models de ratolí amb obesitat induïda per dieta han suprimit l'augment de pes corporal, millorant els nivells sèrics de colesterol total, glucosa i insulina en dejú possiblement regulant les vies d'expressió gènica involucrades en el metabolisme dels lípids i la resposta a l'estrès oxidatiu en el fetge (Kondo et al. 2010, 2013). En humans obesos, l'administració de *B. breve* durant 12 setmanes a una dosi de  $20 \cdot 10^{10}$  ufc/dia redueix significativament el percentatge de greix corporal i la massa de greix corporal sent la ingesta de nutrients una variable no significativa entre els dos grups durant el període d'estudi. Els nivells de TG disminueixen lleugerament, mentre que el colesterol HDL



millora lleugerament, tot i no arribar a ser significatiu, des del principi de la intervenció. Per contra, els marcadors d'inflamació estudiats en aquest treball no es veuen afectats pel consum de *B. breve* (Minami et al. 2018). En relació a l'obesitat infantil, s'ha descrit que l'administració de *B. breve* és capaç de restablir l'homeòstasi metabòlica i reduir la inflamació crònica en nens obesos (Solito et al. 2018). Tot i que l'estudi encara no s'ha finalitzat, els resultats preliminars han demostrat que l'administració de *B. breve* en nens obesos és prometedora, ja que el tractament de 8 setmanes sembla millorar el metabolisme de la glucosa i podria ajudar a controlar el pes reduint el BMI, la relació cintura/alçada i la WC (Solito et al. 2018).

Adicionalment a aquests canvis, cada vegada hi ha més evidència de la presència d'un eix entre el cervell, l'intestí i la microbiota, anomenat eix intestí-cervell (de Clercq et al. 2016). S'ha descobert que les bifidobacteries milloren el comportament i posseeixen una acció potencial sobre els trastorns relacionats amb l'estrès en ratolins (Dinan et al. 2013). Diferents soques de *B. breve* també s'han estudiat en l'estudi de malalties neurològiques. Per exemple, un estudi realitzat per Kobayashi et al. (Kobayashi et al. 2017) demostra que la soca *B. breve* A1 pot prevenir el deteriorament cognitiu en ratolins amb malaltia d'Alzheimer, amb una reducció de la inflamació neuronal. A més, l'estudi també descriu que el probiòtic proporciona millores tant en la memòria de treball com en la memòria a llarg termini. Per altra banda, es descriu un augment en els nivells plasmàtics d'acetat després del tractament amb aquest probiòtic i una reducció de la inflamació neuronal. Aquestes observacions poden ser conseqüència de l'administració de *B. breve*, ja que s'ha demostrat en ratolins que els SCFA tenen funcions immunomoduladores (Smith et al. 2013).

A més, la suplementació amb *B. breve* també pot afectar el metabolisme dels àcids grassos. Entre ells l'EPA, que deriva de la metabolització de l'ALA, i té un paper important com a component essencial de la membrana cel·lular, en el desenvolupament del cervell i del sistema nerviós i en la resposta inflamatòria (Simopoulos 2002). El DHA, que deriva de la metabolització de l'EPA, és un dels principals PUFA n3 en el cervell i és essencial pel correcte desenvolupament de l'encèfal fetal (Salem et al. 1996). Alguns estudis han revelat que els microorganismes poden sintetitzar isòmers bioactius de l'àcid linoleic conjugat (CLA) a partir de LA. S'ha demostrat que el CLA posseeix propietats antiateroscleròtiques, antidiabètiques i immunomoduladores (Kritchevsky et al. 2000; Bassaganya-Riera et al. 2002). Per altra banda, l'estudi de Wall et al. (Wall et al. 2009) demostra que l'administració en diferents animals (ratolins i porcs) de la soca de *B. breve* NCIMB 702258, una soca productora de CLA, en combinació amb LA com a substrat, augmenta la concentració de l'isòmer de CLA que predomina en el fetge. A més, la

suplementació en ratolins augmenta els nivells de l'EPA i DHA en el teixit adipós i redueix els nivells de TNF $\alpha$ . Els mateixos autors demostren que l'administració de la mateixa soca de *B. breve* i ALA, dóna com a resultat un augment de les concentracions de l'EPA i DHA al cervell (Wall et al. 2012) indicant que podria ser un bon candidat pel tractament de la inflamació i la neurodegeneració.

De forma general, l'administració de *B. breve* afecta al pes corporal, al perfil lipídic i al metabolisme de la glucosa dins d'un context d'obesitat sent una necessitat l'estudi d'altres modificacions metabòliques. A més, tot i que hi ha alguns estudis del paper de *B. breve* sobre el deteriorament cognitiu i la demència, encara hi ha manca d'estudis sobre els efectes d'aquest probiòtic en el cervell durant el procés d'obesitat infantil. Altrament, la majoria d'estudis publicats sobre les modificacions del metabolisme després de la suplementació amb aquest probiòtic s'han realitzat en rosegadors adults, cosa que impedeix l'avaluació dels possibles efectes de *B. breve* cap a una protecció en l'obesitat infantil. Per tant, els estudis realitzats en animals d'edat prepuberal representen un millor enfocament per avaluar els canvis en el metaboloma i lipidoma en un context d'obesitat infantil i com l'administració de *B. breve* podria arribar a proporcionar un tractament preventiu abans que els subjectes arribin a l'edat adulta.



# HIPÒTESI I OBJECTIUS



## **2. HIPÒTESI I OBJECTIUS**

---

### **2.1. Hipòtesi de partida**

Com s'ha indicat en la introducció, l'obesitat es defineix com una malaltia crònica caracteritzada per un excés d'acumulació de greix corporal, relacionada amb un desequilibri entre la ingesta calòrica i la despesa energètica. La seva prevalença augmenta, tant en adults com en infants, amb major probabilitat de que l'obesitat que comença en la infància perduri per tota la vida. L'obesitat juga un paper fisiopatològic important en el desenvolupament de diverses malalties cròniques, tot i que no tots els individus obesos tenen el mateix risc metabòlic. Per aquest motiu, és important la caracterització d'una signatura metabòlica en subjectes obesos que podria ajudar a identificar aquells subjectes amb major risc de patir malalties metabòliques derivades de l'obesitat. Però, encara és més important la identificació d'una signatura metabòlica en l'obesitat infantil, ja que podria arribar a proporcionar tractaments preventius més eficients per l'obesitat abans que els individus arribin a l'edat adulta.

La metabolòmica, juntament amb la lipidòmica, són eines útils per avaluar els canvis metabòlics relacionats amb l'obesitat, obtenint d'aquesta manera una signatura metabòlica de l'obesitat. A més, els estudis metabolòmics en individus obesos també permeten centrar-se en metabòlits específics i vies crítiques per arribar a tractar o inclús prevenir el desenvolupament de l'obesitat i les seves comorbiditats. La majoria d'estudis metabolòmics en obesitat descrits en la literatura se centren en plasma o sèrum i en teixit adipós o fetge, essent una necessitat l'estudi del paper dels metabòlits i dels lípids en la resta de teixits, com el cervell, també afectats pel procés de l'obesitat. A més, en l'estudi de l'obesitat normalment s'utilitzen rosegadors com a model animal per dur a terme la investigació dels diferents mecanismes patològics però, l'ús del model porcí en l'estudi de malalties humanes està incrementant en els últims anys a causa de la semblança anatòmica i fisiològica amb l'ésser humà.

Actualment, l'estudi de la microbiota intestinal està guanyant importància com a possible factor endogen involucrat en aquesta epidèmia. Per aquest motiu es creu que la modulació de la microbiota intestinal mitjançant l'ús de probiòtics pot convertir-se en una estratègia terapèutica per reduir els riscos i minimitzar la gravetat i complicacions associades amb aquests trastorns. Els beneficis de la utilització de probiòtics, amb o sense omega-3, també suggerit com a estratègia enfront l'obesitat, han estat més estudiats en adults amb sobrepès i obesitat i semblen importants en la prevenció i el control de l'obesitat però, els seus beneficis en l'obesitat infantil són escassos.

Davant d'aquestes evidències i la relació entre els diferents processos, la nostra hipòtesi de treball suposa que: La intervenció nutricional amb una dieta alta en greixos en un model porcí pot induir obesitat amb signatura metabòlica en plasma i cervell; i que una intervenció combinada basada amb *B. breve* com a agent probiòtic amb o sense omega-3 pot produir canvis en el metaboloma i el lipidoma i contribuir a la disminució dels efectes deleteris de l'obesitat induïda per dieta.

## 2.2. Objectius

Per a contrastar aquesta hipòtesi, s'ha dividit la tesi en tres objectius principals:

**Objectiu 1: Estudiar els efectes de l'obesitat induïda per dieta en el perfil metabòlic i lipídomic plasmàtic, a través de la caracterització en un model experimental porcí en època prepuberal.**

El primer objectiu d'aquesta tesi ha estat caracteritzar un model experimental d'obesitat prepuberal. Aquest estudi permetrà descriure un perfil metabòlic i lipídomic plasmàtic i d'aquesta manera obtenir una signatura metabòlica d'aquest model.

**Objectiu 2: Descriure els possibles efectes de l'obesitat induïda per dieta en el perfil metabòlic i lipídomic en el CNS del model animal d'obesitat.**

La falta d'estudis relacionats amb l'afectació de l'obesitat infantil en òrgans com el cervell, i vista la relació entre obesitat i patologies neurodegeneratives, han fet que el segon objectiu d'aquesta tesi hagi estat l'estudi dels canvis metabòlics que es produeixen en el cervell després de la ingesta sostinguda d'una dieta hipercalòrica. Aquest estudi permetrà descriure l'efecte de l'obesitat en el metaboloma i el lipidoma cerebral i estudiar les diferències entre les mostres de plasma i el cervell.

**Objectiu 3: Avaluat els efectes d'una intervenció nutricional basada en probiòtics en el perfil metabòlic i lipídomic del model animal d'obesitat.**

El tercer objectiu ha estat avaluar l'efecte de la proteïna d'arròs hidrolitzada, del *Bifidobacterium breve* i del omega-3 en el perfil metabòlic i lipídomic en plasma i en cervell del model animal d'obesitat prepuberal. Aquest estudi permetrà avaluar els efectes de l'administració oral d'un probiòtic específic sol o amb omega-3 en un model prepuberal d'obesitat induïda per dieta.

# **MATERIALS I MÈTODES**





### **3. MATERIALS I MÈTODES**

---

#### **3.1. Animals i disseny experimental**

Per aquest estudi s'han utilitzat un total de 45 femelles d'un model porcí de la raça Duroc de l'espècie *Sus scrofa domesticus*. Després del deslletament, els animals s'han traslladat a l'estabulari de l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària (IRTA), on s'ha començat amb un període d'alimentació amb una dieta estàndard. Els procediments d'experimentació i gestió s'han avaluat i aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de l'IRTA. A les 9 setmanes d'edat, els animals s'han separat en 4 àrees i s'han alimentat *ad-libitum* durant 10 setmanes amb 4 dietes diferents (tractaments de T1 a T4). S'ha subministrat aigua dolça a tots els animals i s'ha obtingut la ingesta d'aliment individual mitjançant un sistema d'enregistrament automàtic d'alimentació (HOKOFARM, IVO-G®, Marknesse, Països Baixos) on es registra cada ingesta d'àpat (entre 10 i 20 vegades al dia) per tal de calcular l'alimentació diària ingerida completa per a cada animal. L'augment de pes s'ha obtingut pesant els porcs de forma individual al principi, cada dues setmanes durant tot l'experiment, i just abans del sacrifici.

L'experiment s'ha iniciat amb 11 porcs femelles que s'han alimentat amb una dieta normocalòrica (grup control o grup T1) i 33 porcs que s'han alimentat amb una dieta hipercalòrica. Dins d'aquest grup, 10 porcs han estat alimentats amb aquesta dieta (grup dieta hipercalòrica o grup T2) mentre que, les altres 22 s'han dividit en dos grups on 11 han estat suplementades amb proteïna d'arròs hidrolitzada i *Bifidobacterium breve* (grup probiòtic o grup T3) i 11 han estat suplementades amb proteïna d'arròs hidrolitzada, *Bifidobacterium breve* i 2% d'àcids grassos omega-3 (grup probiòtic i omega-3 o grup T4).

En el moment del sacrifici, s'han transportat a l'escorxador en dejú, on, en primer lloc, s'han quedat atònits per l'exposició durant 3 min del 90% de CO<sub>2</sub> en l'aire atmosfèric i posteriorment, s'han dessagnat. Les mostres de sang s'han obtingut dels animals en dejú justament abans del sacrifici. Després del sacrifici, es va eliminar i mesurar el greix pèlvic-renal. En relació a les mostres d'escorça frontal, aquestes s'han recollit just després del sacrifici i s'han congelat fins al seu processament.

#### **3.2. Dietes**

Les dietes experimentals s'han elaborat a l'IRTA, amb cereals, proteïna vegetal o provinent de la llet, midó, sucre i minerals, micronutrients i aminoàcids en diferents proporcions. Tots els animals han rebut una ració diària de 18 grams de formatge tou (amb un total de 42 kcal

d'energia). En les dietes T3 i T4, el formatge tou conté  $5 \cdot 10^{10}$  ufc/dia de *Bifidobacterium breve* i en la dieta T4 també inclou un 2% d'àcids grassos omega-3. La composició de la dieta es mostra en la **Taula 7** i la **Taula 8**.

**Taula 7.** Composició de les dietes experimentals.

Component (%)	Dieta control (T1)	Dieta hipercalòrica (T2)
Civada	55,28	-
Blat	-	43,87
Blat de moro	-	13,56
Caseïnat	9,76	8,54
Midó	13,13	5,00
Sacarosa	-	4,00
Segó de blat	15,00	-
Cascos de soja	4,00	10,00
Mantega	-	1,51
Fosfat dicàlcic	1,27	0,51
Sal	0,36	0,37
Etoxiquins	0,02	0,02
Complex Vit-Min (*)	0,40	0,40

(\*) Proporcions per cada kg d'aliment: Vitamina A (E672) 5500 UI; Vitamina D3 (E671) 1100 UI; Vitamina E (alfa-tocoferol) 7 mg; Vitamina B1 0,5 mg; Vitamina B2 1,4 mg; Vitamina B6 1 mg; Vitamina B12 8 µg; Vitamin K3 0,5 mg; Pantotenat de Calci 5,6 mg; Àcid Nicotínic 8 mg; Colina 120 mg; Ferro (E1) (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) 80 mg; Iode (E2) (Ca(I<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) 0,5 mg; Cobalt (E3) (2CoCO<sub>3</sub>·3Co(OH)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O) 0,4 mg; Coure (E4) (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) 5 mg; Coure (E4) (quelat d'aminoàcids) 5 mg; Manganès (E5) (MnO) 40 mg; Zinc (E6) (ZnO) 100 mg; Sel-ieni (E8) (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) 0,25 mg.

**Taula 8.** Composició nutricional de les dietes.

Quantitat (%)	Dieta control (T1)	Dieta hipercalòrica (T2)
Proteïna	16,05	14,00
Greix	4,38	11,38
Fibra	10,70	1,72
Sodi	0,15	0,15
Clorur	0,29	0,31
Calci	0,80	0,70
Fòsfor total	0,56	0,49
Digestibilitat del fòsfor	0,27	0,27
Lisina	0,99	0,90
Treonina	0,66	0,57
Metionina	0,36	0,37
Metionina + Cisteïna	0,61	0,56
Triptòfan	0,23	0,20
(ASH)	5,55	
Energia Metabolitzable (MJ ME/kg)	10,93	15,36

### 3.3. Població i obtenció de les mostres humanes

En el cas de les mostres humanes, aquestes s'han obtingut de la cohort de l'estudi FLORINASH (número de contracte EU FP7-HEALTH-2009,241913) (*Lelouvier et al. 2016*). Els individus que formen part de l'estudi s'han reclutat des del gener de 2010 fins al febrer de 2012 a l'Hospital Josep Trueta de Girona i al Centre Hospitalari de Toulouse Rangueil. Els criteris d'inclusió de l'estudi han estat tenir una edat compresa entre 30 i 65 anys, tenir un BMI > 30 kg/m<sup>2</sup> i tenir capacitat per comprendre els procediments de l'estudi. Els criteris d'exclusió han estat patir una malaltia sistèmica, haver patit una infecció el mes anterior, tenir una malaltia crònica aguda, consumir >20 g d'etanol al dia o l'ús de medicaments que puguin interferir amb l'acció de la

insulina. El protocol d'estudi ha estat aprovat per la junta de revisió del l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta i tots els subjectes d'estudi han donat el seu consentiment informat per escrit.

Cada pacient s'ha sotmès a mesures antropomètriques i vasculars mitjançant ultrasons i a l'extracció de sang per a l'avaluació d'altres paràmetres de laboratori el mateix dia, després de 8 hores de dejú. Després de l'extracció de sang i l'extracció de plasma per centrifugació, les mostres s'han guardat degudament en congeladors a -80 °C fins al seu processament.

Per la comparació amb els biomarcadors derivats del model porcí, s'han utilitzat els valors de BMI i HOMA-IR. En la **Taula 9** es mostren les característiques clíniques d'aquesta cohort.

**Taula 9.** Característiques clíniques de la cohort utilitzada per a l'aplicabilitat translacional.

Paràmetre	Valor Mitjana ± SD
n	44
Edat	49,41 ± 8,71
Gènere	52% dones
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	35,04 ± 10,7
Relació cintura-maluc	0,90 ± 0,11
Colesterol (mg/dL)	196,2 ± 40,35
Colesterol LDL (mg/dL)	122,9 ± 34
Colesterol HDL (mg/dL)	54,6 ± 15,5
Triglicèrids (mg/dL)	95,5 ± 49,49
Glucosa en dejú (mg/dL)	94,2 ± 12,5
HOMA-IR	3,08 ± 3,07

### 3.4. Exploració de tomografia computeritzada i anàlisi d'imatges

El teixit adipós de tots els porcs s'han analitzat per tomografia computeritzada (TC) una setmana abans del sacrifici mitjançant l'equip General Electric HiSpeed ZX/I (Fairfield, CN, USA) situat en l'IRTA de Monells (Girona, Espanya), tal com s'explica en un article publicat anteriorment (*Carabús et al. 2016*) i les imatges s'han analitzat mitjançant el programari VisualPork (*Boada et al. 2009*) desenvolupat per la Universitat de Girona i l'IRTA.

### 3.5. Determinació dels paràmetres bioquímics

Els lípids sèrics i altres variables bioquímiques convencionals s'han mesurat en els animals en dejú de la sang obtinguda immediatament abans del sacrifici mitjançant l'ús de kits comercials, incloent-hi TG, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL i glucosa tal i com s'ha descrit anteriorment en el següent article (*Serrano et al. 2013*). El contingut d'insulina en plasma s'ha mesurat mitjançant un kit comercial ELISA (Abcam, Cambridge, Regne Unit).

### 3.6. Processament previ de la mostra

Aquest protocol previ s'ha fet servir quan la mostra ha estat l'escorça frontal dels animals excepte en la anàlisi de lipidòmica dirigida.

#### 3.6.1 Homogeneïtzació de la mostra

Per dur a terme l'homogeneïtzació de la mostra s'ha utilitzat de 50-150 mg de teixit en una solució tampó i mantenint la mostra sempre en gel. La solució tampó conté 180 mM de clorur de potassi, 5 mM de MOPS (de l'anglès, *3-(N-morpholino) propanesulfonic acid*), 2 mM d'àcid etilendiamintetraacètic (EDTA; de l'anglès *Ethylenediamine-tetraacetic acid*), 1 mM de d'àcid dietilenetriaminopentaacètic (DTPAC; de l'anglès, *Dethyl-triamine-penta acetic acid*) i 1 µM de 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT), ajustat a un pH 7,4. És imprescindible la presència de tots aquests components en el tampó per tal d'evitar els quelants de metalls i l'oxidació dels lípids durant el processament de la mostra. L'homogeneïtzació s'ha dut a terme amb un Ultra-Turrax (#3420000 IKA, Alemanya), seguit d'una centrifugació a 1.000 rpm a 4 °C durant 1 min per tal d'eliminar les partícules cel·lulars. El sobrenedant obtingut s'utilitza per als diferents anàlisis i experiments.

#### 3.6.2 Quantificació de proteïnes

Per tal de determinar la quantitat de proteïna del teixit homogeneïtzat s'ha utilitzat el mètode Bradford (*Bradford 1976*) utilitzant una dilució prèvia, fent servir com a diluent aigua miliQ. En aquest cas, s'ha utilitzat una alíquota de 3 µL de la dilució prèvia (1:50), 157 µL d'aigua miliQ i 40 µL del reactiu Bradford (Ref. 500-0006 Bio-Rad, Munich, Alemanya) per a mesurar l'absorbància (Multiskan ascent 354, Thermo Labssystem) i, realitzar el càlcul de la concentració. La concentració proteica de les mostres s'ha analitzat mitjançant una recta patró realitzada amb concentracions conegudes d'albumina sèrica bovina (BSA, de l'anglès, *Bovine Serum Albumine*). La linealitat de la recta ha estat de 0-250 µg/µL de BSA.

### 3.7. Anàlisi metabolòmic

#### 3.7.1 Anàlisi metabolòmic no dirigit

##### 3.7.1.1 Preparació de la mostra

Per l'extracció de metabòlits de les mostres es segueix el protocol descrit per Jové et al. (*Jové et al. 2014b*). Breument, s'ha afegit 20 volums de metanol fred (que conté 1 µg/mL de fenilalanina marcada isotòpicament amb un <sup>13</sup>C (Ref. 490091, Sigma-Aldrich, Madrid, Espanya) i 1 µM de BHT

com a antioxidant) a 50 mg de teixit o a 10 µL de plasma. Seguidament, s'ha homogeneïtzat el teixit mitjançant un Ultra-Turrax (3420000 IKA, Alemanya) i, s'ha incubat a -20 °C durant 60 min. Posteriorment, s'ha centrifugat a 13.000 rpm durant 3 min, en aquest punt s'aconsegueix la desproteïnitació de la mostra quedant la proteïna al *pellet* i l'extracte de metabòlits en el sobrenedant. S'ha transferit el sobrenedant en eppendorfs UltraFree amb 0,22 µm de mida de porus (#UFC3LTK00, Millipore, Bedford, MA, EUA) i s'ha centrifugat 10 minuts a 3.000 rpm. Finalment, s'ha transferit 30 µL del sobrenedant filtrat en vials preparats per ser injectats en el sistema LC/MS. També, s'ha preparat un *pool* de totes les mostres i s'ha dividit en diferents alíquotes per tal d'utilitzar-los a com a control de qualitat.

### 3.7.1.2 Sistema cromatogràfic

L'anàlisi s'ha realitzat mitjançant LC/MS amb una font de ionització ESI i un analitzador de masses híbrid quadrupol temps de vol (LC-ESI-QTOF-MS/MS; de l'anglès, *Liquid Chromatography with Electrospray Ionization coupled to Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry*). La cromatografia líquida d'ultra alta resolució (UPLC; de l'anglès, *Ultra performance liquid chromatography*) utilitzada ha estat un UPLC model 1290 d'Agilent Technologies (Barcelona, Espanya) acoblat a un ESI-QTOF MS/MS model 6520 d'Agilent Technologies (Barcelona, Espanya).

### 3.7.1.3 Condicions cromatogràfiques

Per a l'anàlisi metabòmic s'ha injectat 2 µL de l'extracte metanòlic de cada mostra a una columna C<sub>18</sub> de fase reversa (Zorbax SB-Aq de 2,1 x 50 mm i 1,8 µm de mida de partícula; Agilent Technologies, Barcelona, Espanya) a una temperatura de 60 °C i equipada a una precolumna (Zorbax SB-C8 *Rapid Resolution Cartridge* de 2,1 x 30 mm i 3,5 µm de mida de partícula; Agilent Technologies, Barcelona, Espanya). La velocitat del flux ha estat constant a 0,6 mL/min i amb un gradient inicial del 2% de fase mòbil B (*Jové et al. 2014b*). Seguidament, s'ha arribat al 98% de fase B en el min 13 i s'ha mantingut a aquest percentatge durant 6 min. Finalment, el sistema s'ha reequilibrat durant 5 min al 2% de fase B. La fase mòbil A està formada per aigua amb un 0,2% (v/v) d'àcid acètic i la fase mòbil B de metanol amb un 0,2% (v/v) d'àcid acètic.

Les dades s'han recollit en mode positiu i negatiu operant en mode TOF de rastreig des de 100 fins a 3.000 m/z. El voltatge capil·lar ha estat de 3.500 V, la velocitat d'escaneig d'1 escaneig/s i el rang dinàmic de 2 GHz. Com a gas nebulitzador s'ha utilitzat nitrogen amb un flux de 5 L/min i una temperatura de 350 °C. El calibratge es du a terme contínuament amb compostos de

referència els quals tenen una  $m/z$  de 121,050873, 922,009798 (en mode ió positiu) i 119,036320 i 966,000725 (en mode ió negatiu) per al calibratge continu de masses.

#### 3.7.1.4 Anàlisi de dades

Per a l'obtenció de dades s'ha utilitzat el programari MassHunter Data Acquisition (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya) per extreure les característiques moleculars de cada mostra, que representen diferents espècies iòniques co-migradores d'una entitat molecular determinada utilitzant l'algoritme extractor de funcions moleculars (MFE; de l'anglès, *Molecular feature extractor*) (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya) (Jové *et al.* 2013). Breument, l'algoritme MFE utilitza la precisió de les mesures de massa per agrupar ions relacionats (basant-se en la càrrega, la distribució isotòpica i/o presència de diferents adductes, dímers i trímers) assignant múltiples espècies (ions) a un sol compost. Finalment, s'ha utilitzat el programari MassHunter Mass Profiler (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya) per realitzar un anàlisi metabolòmic no dirigit sobre les característiques extreures. Només s'han seleccionat aquelles funcions amb una abundància mínima de 5.000 *counts* i 2 ions com a mínim. Després d'això, les característiques moleculars presents en la mostra s'han alineat utilitzant una finestra de RT de  $0,1\% \pm 0,25$  min i una finestra de masses de  $30,0$  ppm  $\pm 2,0$  mDa. Per evitar soroll de fons, s'han seleccionat només aquelles característiques moleculars que es troben en almenys el 50% de les mostres del mateix grup. A partir d'aquestes característiques moleculars s'han obtingut els anàlisis estadístics mitjançant la plataforma *on-line* Metaboanalyst (*MetaboAnalyst*; <https://www.metaboanalyst.ca>) després de realitzar l'autoescalat i la transformació logarítmica de les variables. Per últim, les molècules estadísticament significatives entre els grups s'han contrastat amb la base de dades METLIN (*METLIN*; <http://www.metlin.scripps.edu>) (precisió < 30 ppm) (Zhu *et al.* 2013) per tal d'obtenir una potencial identitat basada en la massa exacta, RT i distribució isotòpica.

### 3.7.2 Anàlisi metabolòmic dirigit

#### 3.7.2.1 Optimització analítica

El primer pas a realitzar en un estudi de metabolòmica dirigida, un cop s'han escollit els metabòlits a quantificar, és l'optimització de les condicions cromatogràfiques i d'espectrometria de masses a partir d'estàndards comercials obtinguts a Sigma-Aldrich amb la màxima puresa possible. Els metabòlits a detectar s'han definit per una relació  $m/z$ , un espectre de fragmentació MS/MS i un RT en un sistema cromatogràfic específic.

Per tal de detectar aquests metabòlits, s'ha realitzat un escaneig amb el monitoratge de reacció múltiple (MRM; de l'anglès, *Multiple Reaction Monitoring*) com a tipus d'escaneig, en ionització positiva i negativa, per tal de poder optimitzar el voltatge del fragmentador i les diferents energies de col·lisió mitjançant el programari MassHunter Optimizer (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya). No obstant, en alguns casos, s'ha requerit una optimització manual. Per l'optimització manual s'ha utilitzat el programari MassHunter Data Acquisition (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya) i per a obtenir els resultats s'ha emprat el programari MassHunter Qualitative Analysis (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya). Tots els paràmetres MRM obtinguts durant l'optimització s'han comparat amb la bibliografia i les diferents bases de dades disponibles. Finalment, s'ha aplicat el sistema cromatogràfic per poder determinar el RT de cada estàndard. La determinació del pic i la integració de l'àrea d'aquest s'ha dut a terme amb el programari MassHunter Quantitative Analyses (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya).

### 3.7.2.2 Preparació de la mostra

Per dur a terme l'extracció dels metabòlits de l'escorça frontal i del plasma s'han utilitzat dos mètodes diferents segons el contingut de sulfur: **Mètode A**, metabòlits no sulfurats i, **Mètode B** per a metabòlits sulfurats.

**Mètode A:** Metabòlits no sulfurats. Per a l'extracció d'aquests metabòlits s'ha seguit el protocol descrit per Jové et al. (*Jové et al. 2014b*). Breument, s'ha afegit 20 volums de metanol fred (que conté 1 µg/mL de fenilalanina marcada isotòpicament amb un <sup>13</sup>C i 1 µM de BHT com a antioxidant) a 50 mg de teixit o a 10 µL de plasma. Seguidament, en el cas del teixit, s'ha homogeneïtzat mitjançant un Ultra-Turrax (#3420000 IKA, Alemanya) i, en ambdós casos, s'ha incubat a -20 °C durant 60 min. Posteriorment s'ha centrifugat a 13.000 rpm durant 3 min, en aquest punt s'aconsegueix la desproteïnitació de la mostra quedant la proteïna al *pellet* i l'extracte de metabòlits en el sobrenedant. S'ha transferit el sobrenedant en eppendorfs UltraFree amb 0,22 µm de mida de porus (UFC3LTK00, Millipore, Bredford, MA, EUA) i s'ha centrifugat 10 min a 3.000 rpm. Finalment, s'ha transferit 30 µL del sobrenedant filtrat en vials preparats per ser injectats en el sistema LC/MS.

**Mètode B:** Metabòlits sulfurats. Per a l'extracció dels metabòlits sulfurats s'ha seguit el protocol descrit per Yu Liu et al. (*Liu et al. 2017*). Breument, s'ha afegit 2 µL de 5% de ditriotreitol (DTT) a 10 µL de plasma. La solució resultant s'ha vortejat durant 1 min i s'ha mantingut a temperatura ambient durant 10 min. Per tal de precipitar la proteïna, s'ha afegit 40 µL de 0,1% de fòrmic àcid amb 0,05% de trifluoroacètic àcid en acetonitril que conté 1 µg/mL de fenilalanina



marcada isotòpicament amb un  $^{13}\text{C}$  com a estàndard intern i la solució s'ha vortejat durant 2 min. En el cas del teixit, s'han afegit els 40  $\mu\text{L}$  esmentats anteriorment però aquest també conté el 5% de DTT. Ambdós, s'han incubat a temperatura ambient durant 15 min i s'han centrifugat a 13.000 rpm durant 3 min. Finalment, el sobrenedant s'ha filtrat en eppendorfs UltraFree amb 0,22  $\mu\text{m}$  de mida de porus (UFC3LTK00, Millipore, Bredford, MA, EUA) i s'ha centrifugat 10 minuts a 3.000 rpm per ser sotmesos a l'anàlisi LC/MS.

### 3.7.2.3 Sistema cromatogràfic

L'anàlisi s'ha realitzat mitjançant LC/MS amb una font de ionització ESI i un analitzador de masses de QQQ (LC-ESI-QQQ-MS/MS; de l'anglès, *Liquid Chromatography with Electrospray Ionization coupled to Triple Quadrupole Mass Spectrometry*). El UPLC utilitzat ha estat un UPLC model 1290 d'Agilent Technologies (Barcelona, Espanya) acoblat a un ESI-QQQ MS/MS model 6420 d'Agilent Technologies (Barcelona, Espanya).

### 3.7.2.4 Condicions cromatogràfiques

Les condicions cromatogràfiques han variat segons el mètode de preparació de la mostra.

**Mètode A:** Metabòlits no sulfurats. S'ha injectat 2  $\mu\text{L}$  de l'extracte metanòlic de cada mostra a una columna  $\text{C}_{18}$  de fase reversa (Zorbax SB-Aq de 2,1 x 50 mm i 1,8  $\mu\text{m}$  de mida de partícula; Agilent Technologies, Barcelona, Espanya) a una temperatura de 60  $^{\circ}\text{C}$  i equipada a una precolumna (Zorbax SB-C8 *Rapid Resolution Cartridge* de 2,1 x 30 mm i 3,5  $\mu\text{m}$  de mida de partícula; Agilent Technologies, Barcelona, Espanya). La velocitat del flux ha estat constant a 0,6 mL/min i amb un gradient inicial del 2% de fase mòbil B. Seguidament, s'ha arribat al 98% de fase B en el min 13 i s'ha mantingut a aquest percentatge durant 6 min. Finalment el sistema s'ha reequilibrat durant 5 min al 2% de fase B. La fase mòbil A està formada per aigua amb un 0,2% (v/v) d'àcid acètic i la fase mòbil B de metanol amb un 0,2% (v/v) d'àcid acètic.

**Mètode B:** Metabòlits sulfurats. S'ha injectat 10  $\mu\text{L}$  de l'extracte de cada mostra a una columna de fase reversa Supercosil LC-CN (Supelco de 4,6 x 250 mm i 5  $\mu\text{m}$  de mida de partícula; Sigma-Aldrich, Madrid, Espanya) a una temperatura de 30  $^{\circ}\text{C}$ . La velocitat del flux ha estat constant a 0,5 mL/min durant 10 min i amb un gradient constant del 10% de fase mòbil B. La fase mòbil A està formada per aigua amb un 0,1% (v/v) d'àcid fòrmic i la fase mòbil B d'acetonitril amb un 0,1% (v/v) d'àcid fòrmic.

Les dades s'han recollit en mode positiu i negatiu segons el metabòlit a analitzar, utilitzant com a gas nebulitzador el nitrogen a una pressió de 50 psi amb un flux de 12 L/min a una temperatura de 325 °C.

La llista dels metabòlits quantificats per cada mètode es troben en la **Taula 10** i els detalls cromatogràfics i els paràmetres en l'espectròmetre de masses es proporcionen a la **Taula 11**. Cada 5 mostres injectades en l'equip, s'han injectat *pools* de mostres com a control de qualitat.

**Taula 10.** Nomenclatura dels metabòlits identificats mitjançant LC/MS.

Metabòlit	Tipus d'aminòcid o via
<b>Mètode A</b>	
Alanina	Aminoàcid alifàtic
Arginina	Aminoàcid bàsic
Asparagina	Aminoàcid àcid i les seves amides
Àcid aspartic	Aminoàcid àcid i les seves amides
Citrat/Isocitrat	Cicle de l'àcid tricarbòxilic
Fumarat	Cicle de l'àcid tricarbòxilic
Àcid glutàmic	Aminoàcid àcid i les seves amides
Leucina/Isoleucina	Aminoàcid alifàtic, BCAA
Glicina	Aminoàcid alifàtic
Histidina	Aminoàcid bàsic
Malat	Cicle de l'àcid tricarbòxilic
Metionina	Aminoàcid sulfurós / Cicle de la metionina
Fenilalanina	Aminoàcid aromàtic
Prolina	Aminòcid cíclic
S-Adenosil-L-homocisteïna	Cicle de la metionina
S-Adenosil metionina	Cicle de la metionina
Serina	Aminoàcid hidroxilat
Succinat	Cicle de l'àcid tricarbòxilic
Taurina	Cicle de la metionina
Treonina	Aminoàcid hidroxilat
Tirosina	Aminoàcid aromàtic
Valina	Aminoàcid alifàtic, BCAA
<b>Phenylalanine-C<sup>13</sup></b>	
<b>Mètode B</b>	
Cistationina	Cicle de la metionina
Cisteïna	Aminoàcid sulfurós / Cicle de la metionina
Glutatió	Cicle de la metionina
Homocisteïna	Cicle de la metionina

### 3.7.2.1 Quantificació dels metabòlits

Per a la quantificació dels metabòlits s'ha preparat solucions estàndards (10X) de tots els metabòlits pesant i dissolent el compost en aigua. Les concentracions de cada solució depenen de la concentració plasmàtica normal de cada metabòlit i es calculen dels valors de referència descrits en la major base de dades del metaboloma humà (*Human Metabolome Database*; <http://www.hmdb.ca>). La corba s'ha realitzat afegint 10 µL de la solució estàndard de cada metabòlit a 10 µL d'aigua seguit de l'extracció segons el metabòlit a analitzar. Una vegada feta l'extracció, s'ha sotmès la mostra a l'anàlisi LC/MS. Finalment, s'ha utilitzat el programari MassHunter Quantitative Analysis (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya) que permet la integració i extracció de les intensitats dels pics d'una manera ràpida i automatitzada utilitzant el pic de fenilalanina marcada isotòpicament amb un <sup>13</sup>C com a estàndard intern.

**Taula 11.** Condicions LC-MS/MS dels metabòlits quantificats pel Mètode A i B en les mostres de plasma i escorça frontal.

Metabòlit	RT (min)	Transició MRM (Q1>Q3) (m/z)	Fragmentador (V)	CE (V)	Voltatge de la cel·la d'acceleració (V)	Polaritat
<b>Mètode A</b>						
Alanina	0,38	90,06 > 44,2	40	8	7	Positive
Arginina	0,32	175,1 > 70,2	60	20	7	Positive
Asparagina	0,38	133 > 74,1	60	15	7	Positive
Àcid aspartic	0,36	134 > 43,2	60	15	7	Positive
Citrat/Isocitrat	1,78	191,01 > 111	88	8	7	Negative
Fumarat	1,86	115,01 > 71	64	4	7	Negative
Glicina	0,34	76,04 > 30	40	4	7	Positive
Histidina	0,32	156 > 110,1	60	15	7	Positive
Leucina/Isoleucina	0,59	132,1 > 86	64	8	7	Positive
Malat	1,10	133,0215 > 71	64	12	7	Negative
Metionina	0,48	150,05 > 104	64	4	7	Positive
Fenilalanina	0,84	164 > 103,1	100	15	7	Positive
Prolina	0,39	116 > 70,2	60	15	7	Positive
S-Adenosil-L-homocisteïna	1,13	385,1 > 88	112	48	7	Positive
S-Adenosil metionina	0,4	399,1 > 250	112	12	7	Positive
Serina	0,35	106,05 > 60	64	8	7	Positive
Succinat	2,25	117,0266 > 73	64	8	7	Negative
Taurina	0,38	124 > 80	112	20	7	Negative
Treonina	0,36	120 > 74,2	60	15	7	Positive
Tirosina	1,23	205 > 146,1	60	15	7	Positive
Valina	0,43	118,08 > 72	64	64	7	Positive
<b>Phenilalanine-C<sup>13</sup></b>	0,87	167,09 > 120,1	70	70	7	Positive
<b>Mètode B</b>						
Cistationina	6,82	223,07 > 88	88	28	7	Positive
Cisteïna	6,31	122,02 > 59	64	24	7	Positive
Glutatió	0,5	308,09 > 179	88	8	7	Positive
Homocisteïna	7,22	136,18 > 56,2	135	15	7	Positive

RT: Temps de retenció (de l'anglès, *Retention time*); MRM: Monitoratge de reacció múltiple (de l'anglès, *Multiple reaction monitoring*); Q1: Transició quantitativa; Q3: Transició qualitativa; CE: Cel·la de col·lisió (de l'anglès, *Collision energy*).

### 3.7.2.2 Anàlisi de dades

Les diferències entre les mitjanes dels grups experimentals s'han analitzat realitzant la prova T d'Student o s'ha aplicat un anàlisi de variància (ANOVA) d'una via seguit d'un test post hoc Tukey. Els anàlisis s'han realitzat amb el programa Prism versió 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA). El nivell mínim de significació ha estat de 0,05 en totes les comparacions; aquest es representa a les gràfiques com: \*(p<0,05), \*\*(p<0,01), \*\*\*(p<0,001) i \*\*\*\*(p<0,0001).

## 3.8. Anàlisi lipídomic

### 3.8.1 Anàlisi lipídomic no dirigit

#### 3.8.1.1 Preparació dels estàndards lipídics

Per l'anàlisi lipídomic no dirigit s'utilitzen estàndards lipídics marcats isotòpicament com a estàndards externs (representatius de classe) i com a estàndards interns (per saber les variàncies inter i intra-assaig). Les solucions mare es van preparar dissolent els lípids en el dissolvent recomanat per la casa comercial a una concentració d'1 mg/mL i, les solucions de treball a 2,5 µg/mL en metil tert-butil èter (MTBE). Els estàndards interns utilitzats s'especifiquen en la **Taula 12**.

**Taula 12.** Estàndards interns representatius de classe i estàndards interns afegits a les mostres en l'anàlisi lipídomic.

Nom	Casa comercial	Referència
1,3(d5)-dihexadecanoyl-glycerol	Avanti Polar Lipids	110537
1,3(d5)-dihexadecanoyl-2-octadecanoyl-glycerol	Avanti Polar Lipids	110543
1-hexadecanoyl(d31)-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphate	Avanti Polar Lipids	110920
1-hexadecanoyl(d31)-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	Avanti Polar Lipids	110918
1-hexadecanoyl(d31)-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	Avanti Polar Lipids	110921
1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol-1',1',2',3',3'-d5)	Avanti Polar Lipids	110899
1-hexadecanoyl(d31)-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phospho-myo-inositol	Avanti Polar Lipids	110923
1-hexadecanoyl(d31)-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-[phospho-L-serine]	Avanti Polar Lipids	110922
26:0-d4 Lyso PC	Avanti Polar Lipids	860389
18:1 Chol (D7) ester	Avanti Polar Lipids	111015
cholest-5-en-3 $\beta$ -ol(d7)	Avanti Polar Lipids	LM-4100
D-erythro-sphingosine-d7	Avanti Polar Lipids	860657
D-erythro-sphingosine-d7-1-phosphate	Avanti Polar Lipids	860659
N-palmitoyl-d31-D-erythro-sphingosine	Avanti Polar Lipids	868516
N-palmitoyl-d31-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine	Avanti Polar Lipids	868584
Octadecanoic acid-2,2-d2	Sigma-Aldrich	19905-58-9

### 3.8.1.2 Preparació de la mostra

Una vegada ja es troba la mostra homogeneïtzada i per tal de precipitar la part proteica, 5  $\mu$ L d'aigua miliQ i 20  $\mu$ L de metanol s'han afegit a 10  $\mu$ L de mostra. Seguidament, les mostres s'han barrejat amb el vòrtex durant 2 min. Per a l'extracció de la part lipídica, s'han addicionat 250  $\mu$ L de MTBE (que conté els estàndards interns) i s'han submergit en un bany d'aigua (ATU Ultrasons, València, Espanya) amb una freqüència d'ultrasons de 40 kHz i 100 Q de potència, a 10  $^{\circ}$ C durant 30 min. Posteriorment, s'han afegit 75  $\mu$ L d'aigua miliQ a la barreja i s'han centrifuga a 3000 rpm a 10  $^{\circ}$ C durant 10 min per tal de poder separar la fase orgànica. Finalment, s'han transferit 160  $\mu$ L de la fase superior que conté els extractes lipídics i s'han emmagatzemat en vials preparats per ser injectats en el sistema LC/MS. També, s'ha preparat un *pool* de totes les mostres i s'ha dividit en diferents alíquotes per tal d'utilitzar-los com a control de qualitat.

### 3.8.1.3 Sistema cromatogràfic

L'anàlisi s'ha realitzat mitjançant LC-ESI-QTOF-MS/MS. El UPLC utilitzat ha estat un UPLC model 1290 d'Agilent Technologies (Barcelona, Espanya) acoblat a un ESI-QTOF MS/MS model 6520 d'Agilent Technologies (Barcelona, Espanya).

### 3.8.1.4 Condicions cromatogràfiques

Per aquesta anàlisi s'han injectat 10  $\mu$ L de l'extracte lipídic de cada mostra a una columna de Waters Acquity HSS T3 (2,1 x 100 mm i 1,8  $\mu$ m de mida de partícula; Waters, Mildford, MA) mantinguda a una temperatura de 55  $^{\circ}$ C i equipada amb una precolumna (Zorbax SB-C8 *Rapid Resolution Cartridge* de 2,1 x 30 mm i 3,5  $\mu$ m de mida de partícula; Agilent Technologies, Barcelona, Espanya). S'ha aplicat un flux constant a 200  $\mu$ L/min amb un gradient d'elució de 16 min. El gradient s'inicia amb 40% de fase mòbil B, augmenta fins a 100% de fase B en 10 min i es manté durant 2 min. Finalment, torna a 60% de B durant 3 min per tal d'equilibrar el sistema. La

fase mòbil A està formada per acetat d'amoni 10 mM en acetonitril-aigua (40:60; v/v) i la fase mòbil B d'acetat d'amoni 10 mM en acetonitril-isopropanol (10:90; v/v).

Les dades s'han recollit en mode positiu i negatiu operant en mode TOF de rastreig des de 100 fins a 3.000 m/z. El voltatge capil·lar ha estat de 3.500 V, la velocitat d'escaneig d'1 escaneig/s i el rang dinàmic de 2 GHz. Com a gas nebulitzador s'ha utilitzat nitrogen amb un flux de 5 L/min i una temperatura de 350 °C. El calibratge es du a terme contínuament amb compostos de referència els quals tenen una m/z de 121,050873, 922,009798 (en mode ió positiu) i 119,036320 i 966,000725 (en mode ió negatiu) per al calibratge continu de masses.

### 3.8.1.5 Anàlisi de dades

Per a l'obtenció de dades s'ha utilitzat el programari MassHunter Data Acquisition (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya) per extreure les característiques moleculars de cada mostra, que tenen en compte adductes, sals i altres compostos que es mouen cromatogràficament de la mateixa manera. Les característiques moleculars presents en la mostra s'han alineat utilitzant una finestra de RT de  $0,1\% \pm 0,25$  min i una finestra de masses de  $20,0$  ppm  $\pm 2,0$  mDa. Finalment, per evitar soroll de fons, s'han seleccionat només aquelles característiques moleculars que es troben en almenys el 75% de les mostres del mateix grup. A partir d'aquestes característiques moleculars s'han obtingut els anàlisis estadístics mitjançant la plataforma Metaboanalyst (*MetaboAnalyst*; <https://www.metaboanalyst.ca>) després de realitzar l'autoescalat i la transformació logarítmica de les variables. Per últim, les molècules estadísticament significatives s'han contrastat amb la base de dades LIPIDMAPS (*LIPID MAPS Lipidomics Gateway*; <https://www.lipidmaps.org>) (precisió < 20 ppm) (*Fahy et al. 2007*) per tal d'obtenir una potencial identitat basada en la massa exacta, RT i distribució isotòpica. Finalment, les identitats s'han confirmat per MS/MS mitjançant la comprovació dels espectres MS/MS utilitzant el programari LipidBlast (*Kind et al. 2013*) i LipidMatch (*Koelmel et al. 2017*), una eina basada en R per a la identificació lipídica.

## 3.8.2 Anàlisi lipídomic dirigit

### 3.8.2.1 Estàndards i reactius

Tots els estàndards d'oxilipines s'han comprat a Cayman Chemicals (Ann Arbor, Mi, EEUU) amb l'excepció de 12,13-EpODE, 9,10,13-TriHOME i 9,12,13-TriHOME que s'han obtingut de Larodan (Solna, Suècia). La **Taula 14** proporciona la nomenclatura de tots els mediadors lipídics utilitzats per aquesta tècnica.

### 3.8.2.2 Preparació de la mostra

Per dur a terme l'extracció dels mediadors lipídics de plasma i d'escorça frontal s'han utilitzat dos mètodes diferents. Per a l'extracció dels mediadors lipídics en les mostres de plasma, s'han afegit 10 µL de la solució d'estàndards interns (conté 42 estàndards deuterats) a 250 µL de plasma i s'ha diluït amb 750 µL de tampó d'extracció (0,042M d'àcid cítric i 0,116M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en aigua a un pH de 5,6) abans de realitzar l'extracció en fase sòlida (SPE; de l'anglès, *Solid phase extraction*). En el cas del teixit, s'han homogeneïtzat 30 mg de cada mostra en 20 volums d'un mix format per metanol fred (conté els 42 estàndards deuterats) i tampó d'extracció (50:50, v/v), s'ha afegit una quantitat determinada de *bead balls* i s'ha vortejat durant 30 seg. A continuació, s'ha homogeneïtzat la mostra amb un homogeneïtzador (3ISBBX24 Bullet Blender de Innovative Solutions, Beverly Hill, MI, EEUU) durant 2 min, 2 vegades i a una freqüència de 8. Posteriorment, s'ha centrifugat durant 10 min a 12.000 rpm a una temperatura de 4 °C. S'han recollit 500 µL de sobrenedant i s'ha afegit tampó d'extracció fins a 3 mL.

En ambdós casos, l'extracció SPE ha sigut automatitzada utilitzant un sistema de manipulació de líquids Extrahera (Biotage, Uppsala, Suècia) i columnes Evolute Express ABN SPE amb capacitat de 60 mg i 3 mL de volum de mostra (610-0006-BXG, Biotage, Uppsala, Suècia). Primer de tot s'ha procedit a l'etapa de condicionament de les columnes que ha consistit en 2,5 mL de metanol seguit de 2,5 mL d'aigua. Posteriorment, s'ha carregat la mostra en les columnes i s'ha rentat amb 2 mL de tampó de rentat (10% de metanol). Finalment, s'han eluït els anàlits en 3 mL de metanol i s'han evaporat i assecat utilitzant nitrogen gas (TurboWap LV, Biotage, Uppsala, Suècia). Per a l'extracció dels mediadors lipídics s'ha reconstruït la mostra en un volum final de 70 µL de metanol/aigua (6:1, v/v), s'ha filtrat utilitzant eppendorfs amb filtre (0,1 µm de mida de porus, UFC30VV00, Merck Milipore, Darmstadt, Alemanya) i s'ha centrifugat 4 min a 8000 rpm i a 4 °C per ser sotmesos a l'anàlisi LC/MS.

### 3.8.2.3 Sistema cromatogràfic

L'anàlisi s'ha realitzat mitjançant LC-ESI-QQQ-MS/MS. El UPLC utilitzat ha estat un Acuity UPLC acoblat a un ESI-QQQ MS/MS model Xevo TQ-XS de Waters (Milford, MA).

### 3.8.2.4 Condicions cromatogràfiques

Les condicions cromatogràfiques han variat segons el metabòlit ha analitzar.

**Mètode A:** Eicosanoids i metabòlits relacionats. S'ha injectat 7,5 µL de cada mostra a una columna C<sub>18</sub> (Acquity UPLC BEH de 2,1 x 150 mm i 1,7 µm de mida de partícula; Waters, Milford, MA) a una temperatura de 60 °C i equipada a una precolumna (ACQUITY UPLC BEH C18

VanGuard de 2,1 x 5 mm i 1,7 µm de mida de partícula; Waters, Milford, MA). La velocitat del flux ha estat constant a 500 µL/min i amb un gradient inicial del 20% de fase mòbil B. Seguidament, s'ha augmentat de forma lineal el percentatge de fase B a un 35% a 2,5 min, al 40% al minut 4,5, a un 42% en el minut 6, a un 50% al minut 8, a un 65% al minut 14, a un 72,5% al minut 15,5 i al 100% al minut 16,6. Finalment el sistema s'ha rentat amb el solvent B durant 0,9 min i s'ha reequilibrat a les condicions inicials. La fase mòbil A està formada per aigua amb un 0,1% (v/v) d'àcid acètic i la fase mòbil B de acetonitril-isopropanol (90:10; v/v). L'anàlisi s'ha realitzat en ionització negativa i els paràmetres han sigut els següents: voltatge capil·lar de 2,4 kV, flux del gas de desolvatació 1.000 L/H, el flux del gas del conus de 150 L/H i la temperatura de desolvatació de 600 °C.

**Mètode B:** Cisteinil leucotriens. La columna i la precolumna utilitzades en aquest mètode són les mateixes que en el mètode A però la fase mòbil A està formada per aigua amb un 0,2% (v/v) d'àcid fòrmic i la fase mòbil B d'acetonitril-isopropanol (90:10, v/v) amb un 0,2% d'àcid fòrmic. La velocitat del flux ha estat constant a 450 µL/min i amb un gradient inicial del 40% de fase mòbil B. Seguidament, s'ha augmentat el percentatge de fase B a un 50% a 4,25 min i al 95% al minut 4,5. Finalment, la columna s'ha rentat amb un 95% de fase B durant 3 min i s'ha reequilibrat a les condicions inicials. L'anàlisi s'ha realitzat en ionització positiva i els paràmetres han sigut els següents: voltatge capil·lar de 3,2 kV, flux del gas de desolvatació 1.000 L/H, el flux del gas del conus de 150 L/H i la temperatura de desolvatació de 500 °C.

La llista dels metabòlits quantificats per cada mètode es troben en la **Taula 14** i els detalls cromatogràfics i els paràmetres en l'espectròmetre de masses es proporcionen a la **Taula 13**. També es mostren els estàndards interns utilitzats per a cada mediador lipídic. Cada 9 mostres injectades en l'equip, s'han injectat *pools* de les mostres que contenen una quantitat coneguda de tots els estàndards a quantificar com a control de qualitat.

### 3.8.2.5 Quantificació dels metabòlits

Per a la quantificació dels metabòlits s'han preparat corbes de calibració dels estàndards de tots els metabòlits que s'han quantificat. Les solucions estoc s'han diluït en metanol fins a una concentració de 2 µg/mL i a partir d'aquesta solució s'han preparat les corbes de calibració per a cada estàndard, de 11 punts cada una, i amb un rang de concentració de 0,002 fins a 834 ng/mL. Finalment s'ha utilitzat el programari TargetLynx (Waters, Milford, MA) per calcular la concentració de cada analit segons la seva corresponent corba de calibració.

### 3.8.2.6 Anàlisi de dades

A partir dels resultats obtinguts s'han obtingut els anàlisis estadístics multivariants estadístics mitjançant la plataforma Metaboanalyst (*MetaboAnalyst*; <https://www.metaboanalyst.ca>). A més, les diferències entre les mitjanes dels grups experimentals s'han analitzat realitzant la prova T d'Student o s'ha aplicat un anàlisi de variància (ANOVA) d'una via seguit d'un test post hoc Tukey. Els anàlisis s'han realitzat amb el programa Prism versió 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA). El nivell mínim de significació ha estat de 0,05 en totes les comparacions.

**Taula 13.** Condicions LC-MS/MS dels mediadors lipídics quantificats pel Mètode A i B en les mostres de plasma i escorça frontal.

Lipid	RT (min)	Transició MRM (Q1>Q3) (m/z)	CE (eV)
<b>Mètode A (ESI-)</b>			
tetranor-PGEM	1,02	327,14 > 291,03	14
<b>[D<sub>6</sub>]-tetranor-PGEM</b>	1,01	333,18 > 297,08	18
tetranor-PGDM	1,09	327,10 > 143,00	17
<b>[D<sub>6</sub>]-tetranor-PGDM</b>	1,08	333,18 > 149,01	23
8-iso-PGF <sub>3α</sub>	3,34	351,20 > 191,07	23
8-isoPGF <sub>2α</sub>	3,99	353,20 > 193,05	27
PGF <sub>2α</sub>	4,56	353,32 > 193,00	24
11β-PGF <sub>2α</sub>	4,14	353,20 > 193,05	27
6-keto-PGF <sub>1α</sub>	3,15	369,20 > 162,92	26
<b>[D<sub>4</sub>]-8-epi-PGF<sub>2α</sub></b>	3,99	357,20 > 197,05	28
TXB <sub>3</sub>	3,35	367,20 > 195,15	11
TXB <sub>1</sub>	3,87	371,20 > 171,00	11
TXB <sub>2</sub>	4,01	369,20 > 168,91	15
<b>[D<sub>4</sub>]-TXB<sub>2</sub></b>	4,02	373,20 > 172,95	15
20-OH-LTB <sub>4</sub>	3,31	351,27 > 151,00	18
20-COOH-LTB <sub>4</sub>	3,11	365,20 > 195,10	20
6-trans-LTB <sub>4</sub>	8,19	335,20 > 194,95	16
LTB <sub>4</sub>	8,47	335,20 > 195,00	15
LTB <sub>3</sub>	9,79	337,20 > 195,00	17
<b>[D<sub>4</sub>]-LTB<sub>4</sub></b>	8,43	339,27 > 153,00	20
iPGF <sub>2α</sub> -IV	3,76	353,20 > 127,00	25
<b>[D<sub>4</sub>]-iPGF<sub>2α</sub>-VI</b>	4,94	380,24 > 174,96	19
11-keto-TXB <sub>3</sub>	3,79	365,22 > 169,20	22
11-keto-TXB <sub>2</sub>	4,62	367,20 > 161,05	19
<b>[D<sub>4</sub>]-11-keto-TXB<sub>2</sub></b>	4,63	371,24 > 309,16	11
5-iPGF <sub>2α</sub> -VI	4,35	353,20 > 114,90	19
<b>[D<sub>11</sub>]-5-iPGF<sub>2α</sub>-VI</b>	4,27	364,24 > 114,94	20
LXA <sub>5</sub>	4,59	349,20 > 114,90	12
LXB <sub>4</sub>	4,89	351,20 > 221,00	16
LXA <sub>4</sub>	5,63	351,20 > 115,00	13
<b>[D<sub>5</sub>]-LXA<sub>4</sub></b>	5,58	356,25 > 114,92	20
PGE <sub>3</sub>	3,88	349,30 > 269,30	15
9,12,13-TriHOME	4,45	329,14 > 211,04	21
8-iso-PGE <sub>2</sub>	4,52	351,20 > 271,10	17
9,10,13-TriHOME	4,55	329,02 > 139,00	25
PGE <sub>2</sub>	4,65	351,20 > 271,10	17
<b>[D<sub>4</sub>]-PGE<sub>2</sub></b>	4,63	355,27 > 275,10	17
PGD <sub>3</sub>	4,06	349,30 > 233,10	15
PGD <sub>2</sub>	4,91	351,10 > 271,10	16
<b>[D<sub>4</sub>]-PGD<sub>2</sub></b>	4,89	355,32 > 193,10	20
PGD <sub>1</sub>	4,94	353,30 > 317,30	14
PGE <sub>1</sub>	4,87	353,30 > 317,30	14



Lipid	RT (min)	Transició MRM (Q1>Q3) (m/z)	CE (eV)
<b>[D<sub>4</sub>]-PGD<sub>1</sub></b>	4,93	357,26 > 321,19	15
RvD <sub>2</sub>	4,98	375,20 > 174,90	20
RvD <sub>1</sub>	5,55	375,10 > 140,90	16
17-epi-RvD <sub>1</sub>	5,62	375,10 > 140,90	16
<b>[D<sub>3</sub>]-RvD<sub>2</sub></b>	4,94	380,24 > 174,96	19
13,14-dihydro-15-keto-PGE <sub>2</sub>	5,40	351,20 > 175,03	22
<b>[D<sub>4</sub>]-13,14-dihydro-15-keto-PGE<sub>2</sub></b>	5,38	355,24 > 179,03	25
15-epi-LXA <sub>4</sub>	5,68	351,20 > 115,00	13
<b>[D<sub>3</sub>]-LXA<sub>4</sub></b>	5,58	356,25 > 114,92	15
14,15-LTE <sub>4</sub>	6,45	438,20 > 351,11	13
LTE <sub>4</sub>	7,70	438,40 > 333,30	19
<b>[D<sub>3</sub>]-LTE<sub>4</sub></b>	7,67	443,13 > 338,10	17
delta-12-PGJ <sub>2</sub>	6,73	332,95 > 188,90	17
PGJ <sub>2</sub>	6,73	332,95 > 188,90	17
PGB <sub>2</sub>	6,78	333,23 > 174,97	20
<b>[D<sub>4</sub>]-PGB<sub>2</sub></b>	6,76	337,23 > 179,00	21
8,15-DiHETE	7,75	335,30 > 155,10	16
17,18-DiHETE	8,01	335,20 > 247,10	17
10,17-DiHDoHE	8,03	359,20 > 153,00	17
5,15-DiHETE	8,09	335,30 > 173,00	16
7-Maresin-1	8,19	359,20 > 177,03	14
7,17-hydroxy-DPA	8,46	361,20 > 143,00	12
14,15-DiHETrE	9,31	337,27 > 206,99	17
19,20-DiHDPA	9,36	361,20 > 229,11	16
<b>[D<sub>11</sub>]-14,15-DiHETrE</b>	9,23	348,33 > 207,05	18
14,15-DiHETE	8,33	335,20 > 207,10	17
11,12-DiHETrE	9,81	337,27 > 166,97	18
<b>[D<sub>11</sub>]-11,12-DiHETrE</b>	9,72	348,20 > 166,99	17
12,13-DiHOME	8,73	313,14 > 183,06	21
<b>[D<sub>4</sub>]-12,13-DiHOME</b>	8,65	317,26 > 185,04	20
9,10-DiHOME	9,04	313,23 > 201,10	21
<b>[D<sub>4</sub>]-9,10-DiHOME</b>	8,99	317,18 > 202,93	20
12-HHTrE	9,34	279,20 > 179,00	13
13-HOTrE	10,18	293,20 > 195,20	16
13-HOTrE(γ)	10,39	293,10 > 193,05	13
15-HEDE	13,85	323,20 > 223,10	18
13-HODE	11,38	295,20 > 195,04	17
<b>[D<sub>4</sub>]-13-HODE</b>	11,31	299,18 > 198,05	20
EKODE	10,01	309,20 > 291,00	14
<b>[D<sub>4</sub>]-9(10)-EpOME</b>	13,31	299,15 > 172,09	17
9-HOTrE	10,06	293,20 > 170,90	16
9-HODE	11,55	295,27 > 171,01	18
11-HEDE	13,9	323,20 > 199,04	20
<b>[D<sub>4</sub>]-9-HODE</b>	11,48	299,27 > 171,97	18
18-HEPE	10,19	317,20 > 215,10	12
15-HEPE	10,59	317,11 > 219,05	13
15-HETE	11,76	319,12 > 174,81	14
17-HDoHE	11,91	343,20 > 281,20	12
14-HDoHE	12,2	343,20 > 281,20	13
15-HETrE	12,64	321,27 > 221,08	15
<b>[D<sub>8</sub>]-15-HETE</b>	11,65	327,27 > 182,01	15
8,9-DiHETrE	10,28	337,20 > 126,90	21
5,6-DiHETE	10,62	335,20 > 114,90	16
5,6-DiHETrE	10,96	337,27 > 144,91	18
<b>[D<sub>11</sub>]-8,9-DiHETrE</b>	10,17	348,22 > 126,96	20
15-deoxy-delta-12,14-PGJ <sub>2</sub>	10,36	315,20 > 271,08	14
<b>[D<sub>4</sub>]-15-deoxy-PGJ<sub>2</sub></b>	10,34	319,22 > 275,14	15
19-HETE	10,49	319,20 > 275,13	15

Lipid	RT (min)	Transició MRM (Q1>Q3) (m/z)	CE (eV)
20-HETE	10,65	319,20 > 275,13	15
11-HEPE	10,72	317,04 > 166,75	14
12-HEPE	10,91	317,00 > 178,78	13
8-HEPE	10,93	317,00 > 154,90	13
9-HEPE	11,09	316,90 > 148,99	15
11-HETE	12,16	319,00 > 166,81	15
12-HETE	12,39	319,05 > 178,78	14
11-HDoHE	12,45	343,30 > 121,00	14
8-HETE	12,5	319,05 > 154,85	14
9-HETE	12,7	319,19 > 179,09	14
<b>[D<sub>8</sub>]-12-HETE</b>	12,28	327,28 > 184,02	15
9-KOTrE	10,67	291,20 > 121,00	20
9-KODE	12,15	293,20 > 185,00	18
<b>[D<sub>3</sub>]-9-KODE</b>	12,1	296,23 > 186,04	18
5-HEPE	11,43	317,27 > 114,84	15
8-HDoHE	12,76	343,20 > 189,00	13
5-HETE	13,04	319,12 > 114,92	15
8-HETrE	13,07	321,30 > 157,00	18
4-HDoHE	13,4	343,20 > 101,00	12
5-HETrE	14,84	321,27 > 205,06	16
<b>[D<sub>8</sub>]-5-HETE</b>	12,94	327,21 > 115,88	15
13-KODE	11,74	293,20 > 112,90	20
15-KEDE	14,32	321,20 > 113,00	27
<b>[D<sub>3</sub>]-13-KODE</b>	11,69	296,23 > 114,03	23
12(13)-EpODE	11,91	293,20 > 183,00	17
12(13)-EpOME	13,15	295,18 > 195,04	16
9(10)-EpOME	13,38	295,20 > 170,90	16
<b>[D<sub>4</sub>]-9(10)-EpOME</b>	13,31	299,15 > 172,09	17
17(18)-EpETE	11,67	317,30 > 215,10	11
14(15)-EpETE	12,12	317,30 > 207,00	10
19(20)-EpDPE	13,08	343,20 > 281,10	12
14(15)-EpETrE	13,29	319,30 > 219,10	13
16(17)-EpDPE	13,51	343,30 > 233,20	11
11(12)-EpETrE	13,84	319,21 > 166,91	14
<b>[D<sub>11</sub>]-11(12)-EpETrE</b>	13,73	330,27 > 166,89	14
15-KETE	12,05	317,20 > 112,90	17
12-KETE	12,64	317,20 > 153,00	17
5-KETE	13,79	317,20 > 203,05	17
<b>[D<sub>6</sub>]-5-KETE</b>	13,7	323,17 > 209,13	17
8(9)-EpETrE	14,07	319,30 > 155,00	12
<b>[D<sub>11</sub>]-8(9)-EpETrE</b>	13,96	330,29 > 154,97	11
5(6)-EpETrE	14,34	319,20 > 191,06	12
<b>[D<sub>11</sub>]-5(6)-EpETrE</b>	14,22	330,23 > 202,16	10
DHA	16,49	327,30 > 283,16	12
<b>[D<sub>3</sub>]-DHA</b>	16,47	332,20 > 288,20	10
EPA	15,74	301,20 > 257,15	10
<b>[D<sub>5</sub>]-EPA</b>	15,69	306,20 > 262,20	11
<b>Mètode B (ESI+)</b>			
LTC <sub>4</sub>	3,70	626,22 > 308,17	13
14,15-LTC <sub>4</sub>	2,48	626,30 > 308,02	14
<b>[D<sub>3</sub>]-LTC<sub>4</sub></b>	3,66	631,10 > 308,22	13
LTD <sub>4</sub>	3,63	497,14 > 189,15	15
<b>[D<sub>3</sub>]-LTD<sub>4</sub></b>	3,60	502,15 > 194,20	15

RT: Temps de retenció (de l'anglès, *Retention time*); MRM: Monitoratge de reacció múltiple (de l'anglès, *Multiple reaction monitoring*); Q1: Transició quantitativa; Q3: Transició qualitativa; CE: Cel·la de col·lisió (de l'anglès, *Collision energy*).

**Taula 14.** Nomenclatura dels mediadors lipídics quantificats mitjançant LC/MS. Els lípids es troben ordenats segons el seu RT seguits del seu estàndard intern utilitzat. Addicionalment, els lípids es classifiquen segons el seu origen d'àcid gras poliinsaturat.

Abreviació	Origen	Nom comú	Nom químic
<b>Mètode A</b>			
tetranor-PGEM	AA	tetranor-PGEM	9,15-dioxo-11 $\alpha$ -hydroxy-13,14-dihydro-2,3,4,5-tetranor-prostan-1,20-dioic acid
<b>[D<sub>6</sub>]-tetranor-PGEM</b>		tetranor-PGEM-d <sub>6</sub>	9,15-dioxo-11 $\alpha$ -hydroxy-13,14-dihydro-2,3,4,5-tetranor-prostan-13,13,14,14,15,15-d <sub>6</sub> -1,20-dioic acid
tetranor-PGDM	AA	tetranor-PGDM	9 $\alpha$ -hydroxy-11,15-dioxo-13,14-dihydro-2,3,4,5-tetranor-prostan-1,20-dioic acid
<b>[D<sub>6</sub>]-tetranor-PGDM</b>		tetranor-PGDM-d <sub>6</sub>	9 $\alpha$ -hydroxy-11,15-dioxo-2,3,4,5-tetranor-prostan-1,20-dioic acid-17,17,18,18,19,19-d <sub>6</sub>
8-iso-PGF <sub>3<math>\alpha</math></sub>	EPA	8-iso Prostaglandin F <sub>3<math>\alpha</math></sub>	9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ ,15S-trihydroxy-(8 $\beta$ )-prosta-5Z,13E,17Z-trien-1-oic acid
8-isoPGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	AA	8-iso Prostaglandin F <sub>2<math>\alpha</math></sub>	9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ ,15S-trihydroxy-(8 $\beta$ )-prosta-5Z,13E-dien-1-oic acid
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	AA	prostaglandin F <sub>2<math>\alpha</math></sub>	9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ ,15S-trihydroxy-prosta-5Z,13E-dien-1-oic acid
11B-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	AA	9 $\alpha$ ,11 $\beta$ -prostaglandin F <sub>2<math>\alpha</math></sub>	9 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,15S-trihydroxy-prosta-5Z,13E-dien-1-oic acid
6-keto-PGF <sub>1<math>\alpha</math></sub>	AA	6-keto-prostaglandin F <sub>1<math>\alpha</math></sub>	6-oxo-9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ ,15S-trihydroxy-prost-13E-en-1-oic acid
<b>[D<sub>4</sub>]-8-epi-PGF<sub>2<math>\alpha</math></sub></b>		8-iso-prostaglandin F <sub>2<math>\alpha</math></sub> -d <sub>4</sub>	9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ ,15S-trihydroxy-(8 $\beta$ )-prosta-5Z,13E-dien-1-oic-3,3,4,4-d <sub>4</sub> acid
TXB <sub>3</sub>	EPA	thromboxane B <sub>3</sub>	9 $\alpha$ ,11,15S-trihydroxy-thromba-5Z,13E,17Z-trien-1-oic acid
TXB <sub>1</sub>	DGLA	thromboxane B <sub>1</sub>	9,11,15-trihydroxy-thrombox-13-en-1-oic acid
TXB <sub>2</sub>	AA	thromboxane B <sub>2</sub>	9 $\alpha$ ,11,15S-trihydroxythromba-5Z,13E-dien-1-oic acid
<b>[D<sub>4</sub>]-TXB<sub>2</sub></b>	AA	thromboxane B <sub>2</sub> -d <sub>4</sub>	9 $\alpha$ ,11,15S-trihydroxy-thromba-5Z,13E-dien-1-oic-3,3,4,4-d <sub>4</sub> acid
20-OH-LTB <sub>4</sub>	AA	20-hydroxy-leukotriene B <sub>4</sub>	5S,12R,20-trihydroxy-6Z,8E,10E,14Z-eicosatetraenoic acid
20-COOH-LTB <sub>4</sub>	AA	20-carboxy-leukotriene B <sub>4</sub>	5S,12R-dihydroxy-6Z,8E,10E,14Z-eicosatetraene-1,20-dioic acid
6-trans-LTB <sub>4</sub>	AA	6-trans-leukotriene B <sub>4</sub>	5S,12R-dihydroxy-6E,8E,10E,14Z-eicosatetraenoic acid
LTB <sub>4</sub>	AA	leukotriene B <sub>4</sub>	5S,12R-dihydroxy-6Z,8E,10E,14Z-eicosatetraenoic acid
LTB <sub>3</sub>	MA	leukotriene B <sub>3</sub>	5S,12R-dihydroxy-6Z,8E,10E-eicosatrienoic acid
<b>[D<sub>4</sub>]-LTB<sub>4</sub></b>		leukotriene B <sub>4</sub> -d <sub>4</sub>	5S,12R-dihydroxy-6Z,8E,10E,14Z-eicosatetraenoic-6,7,14,15-d <sub>4</sub> acid
iPGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> -IV	AA	iPGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> -IV	(8S)-10-[(1R,2S,3S,5R)-3,5-dihydroxy-2-pentylcyclopentyl]-8-hydroxydeca-5,9-dienoic acid
<b>[D<sub>4</sub>]-iPGF<sub>2<math>\alpha</math></sub>-VI</b>		iPGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> -IV-d <sub>4</sub>	(8S)-10-[(1R,2S,3S,5R)-3,5-dihydroxy-2-pentylcyclopentyl]-8-hydroxydeca-5,9-dienoic acid-d <sub>4</sub>
11-keto-TXB <sub>3</sub>	EPA	11-dehydro Thromboxane B <sub>3</sub>	9 $\alpha$ ,15S-dihydroxy-11-oxo-thromba-5Z,13E,17Z-trien-1-oic acid
11-keto-TXB <sub>2</sub>	AA	11-dehydro Thromboxane B <sub>2</sub>	9 $\alpha$ ,15S-dihydroxy-11-oxothromba-5Z,13E-dien-1-oic acid
<b>[D<sub>4</sub>]-11-keto-TXB<sub>2</sub></b>		11-dehydro Thromboxane B <sub>2</sub> -d <sub>4</sub>	9 $\alpha$ ,15S-dihydroxy-11-oxothromba-5Z,13E-dien-1-oic-3,3,4,4-d <sub>4</sub> acid
5-iPGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> -VI	AA	5-iPGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> -VI	5,9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -trihydroxy-(8 $\beta$ )-prosta-6E,14Z-dien-1-oic acid
<b>[D<sub>11</sub>]-5-iPGF<sub>2<math>\alpha</math></sub>-VI</b>		5-iPGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> -VI-d <sub>11</sub>	( $\pm$ )5,9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -trihydroxy-(8 $\beta$ )-prosta-6E,14Z-dien-1-oic-16,16,17,17,18,18,19,19,20,20-d <sub>11</sub> acid
LXA <sub>5</sub>	EPA	5(S),6(R),15(S)-lipoxin A <sub>5</sub>	5S,6R,15S-trihydroxy-7E,9E,11Z,13E,17Z-eicosapentaenoic acid
LXB <sub>4</sub>	AA	5(S),14(R)-lipoxin B <sub>4</sub>	5S,14R,15S-trihydroxy-6E,8Z,10E,12E-eicosatetraenoic acid
LXA <sub>4</sub>	AA	5(S),6(R)-lipoxin A <sub>4</sub>	5S,6R,15S-trihydroxy-7E,9E,11Z,13E-eicosatetraenoic acid
<b>[D<sub>5</sub>]-LXA<sub>4</sub></b>		Lipoxin A <sub>4</sub> -d <sub>5</sub>	5S,6R,15S-trihydroxy-7E,9E,11Z,13E-tetraenoic-19,19,20,20-d <sub>5</sub> acid
PGE <sub>3</sub>	EPA	prostaglandin E <sub>3</sub>	9-oxo-11 $\alpha$ ,15S-dihydroxy-prosta-5Z,13E,17Z-trien-1-oic acid
9,12,13-TriHOME	LA	9,12,13-TriHOME	9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid
8-isoPGE <sub>2</sub>	AA	8-iso-prostaglandin E <sub>2</sub>	9-oxo-11 $\alpha$ ,15S-dihydroxy-(8 $\beta$ )-prosta-5Z,13E-dien-1-oic acid
9,10,13-TriHOME	LA	9,10,13-TriHOME	9,10,13-trihydroxy-11E-octadecenoic acid
PGE <sub>2</sub>	AA	prostaglandin E <sub>2</sub> ; dinoprostone	9-oxo-11 $\alpha$ ,15S-dihydroxy-prosta-5Z,13E-dien-1-oic acid
<b>[D<sub>4</sub>]-PGE<sub>2</sub></b>		prostaglandin E <sub>2</sub> -d <sub>4</sub>	9-oxo-11 $\alpha$ ,15S-dihydroxy-prosta-5Z,13E-dien-1-oic-3,3,4,4-d <sub>4</sub> acid
PGD <sub>3</sub>	EPA	prostaglandin D <sub>3</sub>	9 $\alpha$ ,15S-dihydroxy-11-oxo-prosta-5Z,13E,17Z-trien-1-oic acid
PGD <sub>2</sub>	AA	prostaglandin D <sub>2</sub>	9 $\alpha$ ,15S-dihydroxy-11-oxo-prosta-5Z,13E-dien-1-oic acid
<b>[D<sub>4</sub>]-PGD<sub>2</sub></b>		prostaglandin D <sub>2</sub> -d <sub>2</sub>	9 $\alpha$ ,15S-dihydroxy-11-oxo-prosta-5Z,13E-dien-1-oic-d <sub>4</sub> acid

Abreviació	Origen	Nom comú	Nom químic
PGD <sub>1</sub>	DGLA	prostaglandin D <sub>1</sub>	9 $\alpha$ ,15S-dihydroxy-11-oxo-prost-13E-en-1-oic acid
PGE <sub>1</sub>	DGLA	prostaglandin E <sub>1</sub>	9-oxo-11 $\alpha$ ,15S-dihydroxy-prost-13E-en-1-oic acid
<b>[D<sub>4</sub>]-PGD<sub>1</sub></b>		prostaglandin D <sub>1</sub> -d <sub>4</sub>	9 $\alpha$ ,15S-dihydroxy-11-oxo-prost-13E-en-1-oic -d <sub>4</sub> acid
RvD <sub>2</sub>	DHA	resolvin D <sub>2</sub>	7S,16R,17S-trihydroxy-4Z,8E,10Z,12E,14E,19Z-docosahexaenoic acid
RvD <sub>1</sub>	DHA	resolvin D <sub>1</sub>	7S,8R,17S-trihydroxy-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid
17-epi-RvD <sub>1</sub>	DHA	17-epi-resolvin D <sub>1</sub>	7S,8R,17R-trihydroxy-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid
<b>[D<sub>5</sub>]-RvD<sub>4</sub></b>		Resolvin D <sub>4</sub> -d <sub>5</sub>	7S,16R,17S-trihydroxy-4Z,8E,10Z,12E,14E,19Z-21,21',22,22,22-d <sub>5</sub> docosahexaenoic acid
13,14-dihydro-15-keto-PGE <sub>2</sub>	AA	13,14-dihydro-15-keto-PGE <sub>2</sub>	9,15-dioxo-11 $\alpha$ -hydroxy-prost-5Z-en-1-oic acid
<b>[D<sub>4</sub>]-13,14-dihydro-15-keto-PGE<sub>4</sub></b>		13,14-dihydro-15-keto-PGE <sub>2</sub> -d <sub>4</sub>	9,15-dioxo-11 $\alpha$ -hydroxy-prost-5Z-en-1-oic-3,3,4,4-d <sub>4</sub> acid
15-epi-LXA <sub>4</sub>	AA	15(R)-Lipoxin A <sub>4</sub>	5S,6R,15R-trihydroxy-7E,9E,11Z,13E-eicosatetraenoic acid
<b>[D<sub>5</sub>]-LXA<sub>4</sub></b>		Lipoxin A <sub>4</sub> -d <sub>5</sub>	5S,6R,15S-trihydroxy-7E,9E,13E-eicosatetraenoic acid-d <sub>5</sub>
14,15-LTE <sub>4</sub>	AA	14,15-leukotriene E <sub>4</sub>	15S-hydroxy-14R-(S-cysteinyl)-5Z,8Z,10E,12E-eicosatetraenoic acid
LTE <sub>4</sub>	AA	leukotriene E <sub>4</sub>	5S-hydroxy-6R-(S-cysteinyl)-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid
<b>[D<sub>3</sub>]-LTE<sub>4</sub></b>		leukotriene E <sub>4</sub> -d <sub>3</sub>	5S-hydroxy-6R-(S-cysteinylglyciny)-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraenoic-19,19,20,20,20-d <sub>5</sub> acid
delta-12-PGJ <sub>2</sub>	AA	delta-12-PGJ <sub>2</sub>	11-oxo-15S-hydroxy-prosta-5Z,9,12E-trien-1-oic acid
PGJ <sub>2</sub>	AA	Prostaglandin J <sub>2</sub>	11-oxo-15S-hydroxy-prosta-5Z,9,13E-trien-1-oic acid
PGB <sub>2</sub>	AA	prostaglandin B <sub>2</sub>	9-oxo-15S-hydroxy-prosta-5Z,8(12),13E-trien-1-oic acid
<b>[D<sub>4</sub>]-PGB<sub>2</sub></b>		prostaglandin B <sub>2</sub> -d <sub>4</sub>	9-oxo-15S-hydroxy-prosta-5Z,8(12),13E-trien-1-oic-3,3,4,4-d <sub>4</sub> acid
8,15-DIHETE	AA	8,15-DIHETE	8,15-dihydroxy-5Z,9E,11Z,13E-eicosatetraenoic acid
17,18-DIHETE	EPA	17,18-DIHETE	17,18-dihydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid
10,17-DiHDoHE	DHA	10,17-DiHDoHE	10(S),17(S)-dihydroxy-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid
5,15-DIHETE	AA	5,15-DIHETE	5,15-dihydroxy-6E,8Z,10Z,13E-eicosatetraenoic acid
7-Maresin-1	DHA	7-epi Maresin 1	7S,14S-dihydroxy-4Z,8E,10E,12Z,16Z,19Z-docosahexaenoic acid
7,17-hydroxy-DPA	EDA	7,17-hydroxy-DPA	7,17-dihydroxy-8E,10Z,13Z,15E,19Z-docosapentaenoic acid
14,15-DiHETrE	AA	14,15-DHET	( $\pm$ )14,15-dihydroxy-5Z,8Z,11Z-eicosatrienoic acid
19,20-DiHDPA	DHA	19,20-DiHDPA	( $\pm$ )19,20-dihydroxy-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-docosapentaenoic acid
<b>[D<sub>11</sub>]-14,15-DiHETrE</b>		14,15-DHET-d <sub>11</sub>	( $\pm$ )14,15-dihydroxy-5Z,8Z,11Z-eicosatrienoic-16,16,17,17,18,18,19,19,20,20,20-d <sub>11</sub> acid
14,15-DIHETE	EPA	14,15-DIHETE	( $\pm$ )14,15-dihydroxy-eicosa-5,8,11,17-tetraenoic acid
11,12-DiHETrE	AA	11,12-DHET	( $\pm$ )11,12-dihydroxy-5Z,8Z,14Z-eicosatrienoic acid
<b>[D<sub>11</sub>]-11,12-DiHETrE</b>		( $\pm$ )11(12)-DHET-d <sub>11</sub>	( $\pm$ )11,12-dihydroxy-5Z,11Z,14Z-eicosatrienoic-16,16,17,17,18,18,19,19,20,20,20-d <sub>11</sub> acid
12,13-DiHOME	LA	isoleukotoxin diol	12,13-dihydroxy-9Z-octadecenoic acid
<b>[D<sub>4</sub>]-12,13-DiHOME</b>		( $\pm$ )12(13)-DiHOME-d <sub>4</sub>	( $\pm$ )12,13-dihydroxy-9Z-octadecenoic-9,10,12,13-d <sub>4</sub> acid
9,10-DiHOME	LA	leukotoxin diol	( $\pm$ )9(10)-dihydroxy-12Z-octadecenoic acid
<b>[D<sub>4</sub>]-9,10-DiHOME</b>		9,10-DiHOME-d <sub>4</sub>	( $\pm$ )9,10-dihydroxy-12Z-octadecenoic-9,10,12,13-d <sub>4</sub> acid
12-HHTrE	AA	12-HHT	12-hydroxy-5Z,8E,10E-heptadecatrienoic acid
13-HOTrE	ALA	13-HOTE	13S-hydroxy-9Z,11E,15Z-octadecatrienoic acid
13-HOTrE( $\gamma$ )	DGLA	13(S)-HOTrE( $\gamma$ )	13S-hydroxy-6Z,9Z,11E-octadecatrienoic acid
15-HEDE	EDA	( $\pm$ )15-HEDE	( $\pm$ )15-hydroxy-11Z,13E-eicosadienoic acid
13-HODE	GLA	13-HODE	( $\pm$ )13-hydroxy-9Z,11E-octadecadienoic acid
<b>[D<sub>4</sub>]-13-HODE</b>		13(S)-HODE-d <sub>4</sub>	13S-hydroxy-9Z,11E-octadecadienoic-9,10,12,13-d <sub>4</sub> acid
EKODE	LA	trans-EKODE-(E)-Ib	9-oxo-11-(3-pentyl-2-oxiranyl)-10E-undecenoic acid
9-HOTrE	ALA	9-HOTE	9S-hydroxy-10E,12Z,15Z-octadecatrienoic acid
9-HODE	LA	9-HODE	( $\pm$ )9-hydroxy-10E,12Z-octadecadienoic acid
11-HEDE	EDA	( $\pm$ )11-HEDE	( $\pm$ )11-hydroxy-12E,14Z-eicosadienoic acid
<b>[D<sub>4</sub>]-9-HODE</b>		9(S)-HODE-d <sub>4</sub>	9S-hydroxy-10E,12Z-octadecadienoic-9,10,12,13-d <sub>4</sub> acid

Abreviació	Origen	Nom comú	Nom químic
18-HEPE	EPA	18-HEPE	(±)-18-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-eicosapentaenoic acid
15-HEPE	EPA	15-HEPE	(±)-15-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E,17Z-eicosapentaenoic acid
15-HETE	AA	15-HETE	(±)15-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid
17-HDoHE	DHA	17-HDoHE	(±)17-hydroxy-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid
14-HDoHE	DHA	14-HDoHE	(±)14-hydroxy-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-docosahexaenoic acid
15-HETrE	DGLA	15-HETrE	15S-hydroxy-8Z,11Z,13E-eicosatrienoic acid
<b>[D<sub>8</sub>]-15-HETE</b>		15(S)-HETE-d <sub>8</sub>	15S-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic-5,6,8,9,11,12,14,15-d <sub>8</sub> acid
8,9-DiHETrE	AA	8,9-DHET	(±)8,9-dihydroxy-5Z,11Z,14Z-eicosatrienoic acid
5,6-DIHETE	EPA	5,6-DIHETE	5,6-dihydroxy-8Z,11Z,14Z,17Z-eicosatetraenoic acid
5,6-DiHETrE	AA	5,6-DHET	(±)5,6-dihydroxy-8Z,11Z,14Z-eicosatrienoic acid
<b>[D<sub>11</sub>]-8,9-DIHETrE</b>		8,9-DiHETrE-d <sub>11</sub>	(±)8,9-dihydroxy-5Z,11Z,14Z-eicosatrienoic-16,16,17,17,18,18,19,19,20,20-d <sub>11</sub> acid
15-deoxy-delta-12,14-PGJ <sub>2</sub>	AA	15-deoxy-delta-12,14-PGJ <sub>2</sub>	11-oxo-prosta-5Z,9,12E,14E-tetraen-1-oic acid
<b>[D<sub>4</sub>]-15-deoxy-PGJ<sub>2</sub></b>		15-deoxy-PGJ <sub>2</sub> -d <sub>4</sub>	11-oxo-prosta-5Z,9,12E,14E-tetraen-1-oic-3,3,4,4-d <sub>4</sub> acid
19-HETE	AA	19-HETE	(±)19-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid
20-HETE	AA	20-HETE	(±)20-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid
11-HEPE	EPA	11-HEPE	(±)-11-hydroxy-5Z,8Z,12E,14Z,17Z-eicosapentaenoic acid
12-HEPE	EPA	12-HEPE	(±)-12-hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-eicosapentaenoic acid
8-HEPE	EPA	8-HEPE	(±)-8-hydroxy-5Z,9E,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoic acid
9-HEPE	EPA	9-HEPE	(±)-9-hydroxy-5Z,7E,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoic acid
11-HETE	AA	11-HETE	(±)11-hydroxy-5Z,8Z,12E,14Z-eicosatetraenoic acid
12-HETE	AA	12-HETE	(±)12-hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraenoic acid
11-HDoHE	DHA	(±)11-HDHA	(±)11-hydroxy-4Z,7Z,9E,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoic acid
8-HETE	AA	8-HETE	(±)8-hydroxy-5Z,9E,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid
9-HETE	AA	9-HETE	(±)-9-hydroxy-5Z,7E,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid
<b>[D<sub>8</sub>]-12-HETE</b>		12(S)-HETE-d <sub>8</sub>	12S-hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraenoic-5,6,8,9,11,12,14,15-d <sub>8</sub> acid
9-KOTrE	ALA	9-KOTE	9-oxo-10E,12Z,15Z-octadecatrienoic acid
9-KODE	LA	9-KODE	9-oxo-10E,12Z-octadecadienoic acid
<b>[D<sub>3</sub>]-9-KODE</b>		9-OxoODE-d <sub>3</sub>	9-oxo-10E,12Z-10,12,13-d <sub>3</sub> -octadecadienoic acid
5-HEPE	EPA	5-HEPE	(±)-5-hydroxy-6E,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoic acid
8-HDoHE	DHA	(±)8-HDHA	(±)8-hydroxy-4Z,6E,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoic acid
5-HETE	AA	5-HETE	(±)5-hydroxy-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid
8-HETrE	DGLA	8-HETrE	8S-hydroxy-9E,11Z,14Z-eicosatrienoic acid
4-HDoHE	DHA	(±)4-HDHA	(±)4-hydroxy-5E,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoic acid
5-HETrE	ETA	5-HETrE	5S-hydroxy-6E,8Z,11Z-eicosatrienoic acid
<b>[D<sub>8</sub>]-5-HETE</b>		5(S)-HETE-d <sub>8</sub>	5S-hydroxy-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic-5,6,8,9,11,12,14,15-d <sub>8</sub> acid
13-KODE	GLA	13-OxoODE	13-oxo-9Z,11E-octadecadienoic acid
15-KEDE	EDA	15-OxoEDE	15-oxo-11Z,13E-eicosadienoic acid
<b>[D<sub>3</sub>]-13-KODE</b>		13-OxoODE-d <sub>3</sub>	13-oxo-9Z,11E-9,10,12-d <sub>3</sub> -octadecadienoic acid
12(13)-EpODE	LA	12(13)-EpODE	(±)-cis-12,13-epoxy-9Z,15Z-octadecadienoic acid
12(13)-EpOME	LA	iso-leukotoxin	(±)12(13)epoxy-9Z-octadecenoic acid
9(10)-EpOME	LA	leukotoxin	(±)9(10)-epoxy-12Z-octadecenoic acid
<b>[D<sub>4</sub>]-9(10)-EpOME</b>		9(10)-EpOME-d <sub>4</sub>	(±)9(10)epoxy-12Z-octadecenoic 9,10,12,13-d <sub>4</sub> acid
17(18)-EpETE	EPA	17,18-epoxy eicosatetraenoic acid	(±)17(18)-epoxy-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid
14(15)-EpETE	EPA	14,15-epoxy eicosatetraenoic acid	(±)14(15)-epoxy-5Z,8Z,11Z,17Z-eicosatetraenoic acid
19(20)-EpDPE	DHA	19(20)-EpDPE	(±)19(20)-epoxy-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-docosapentaenoic acid

Abreviació	Origen	Nom comú	Nom químic
14(15)-EpETrE	AA	14(15)-EpETrE	(±)14(15)-epoxy-5Z,8Z,11Z-eicosatrienoic acid
16(17)-EpDPE	DHA	16(17)-EpDPE	(±)16(17)-epoxy-4Z,7Z,10Z,13Z,19Z-docosapentaenoic acid
11(12)-EpETrE	AA	11(12)-EpETrE	(±)11,12-dihydroxy-5Z,8Z,14Z-eicosatrienoic acid
<b>[D<sub>11</sub>]-11(12)-EpETrE</b>		11(12)-EET-d <sub>11</sub>	(±)11(12)-epoxy-5Z,8Z,14Z-eicosatrienoic-16,16,17,17,18,18,19,19,20,20,20-d <sub>11</sub> acid
15-KETE	AA	15-oxoETE	15-oxo-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid
12-KETE	AA	12-oxoETE	12-oxo-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraenoic acid
5-KETE	AA	5-oxoETE	5-oxo-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid
<b>[D<sub>6</sub>]-5-KETE</b>		5-OxoETE-d <sub>6</sub>	5-oxo-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic-6,8,9,11,12,14,15-d <sub>6</sub> acid
8(9)-EpETrE	AA	8(9)-EET	(±)8(9)-epoxy-5Z,11Z,14Z-eicosatrienoic acid
<b>[D<sub>11</sub>]-8(9)-EpETrE</b>		(±)8(9)-EET-d <sub>11</sub>	(±)8(9)-epoxy-5Z,8Z,14Z-eicosatrienoic-16,16,17,17,18,18,19,19,20,20,20-d <sub>11</sub> acid
5(6)-EpETrE	AA	5(6)-EET	(±)5(6)-epoxy-8Z,11Z,14Z-eicosatrienoic acid
<b>[D<sub>11</sub>]-5(6)-EpETrE</b>		(±)5(6)-EET-d <sub>11</sub>	(±)5(6)-epoxy-8Z,11Z,14Z-eicosatrienoic-16,16,17,17,18,18,19,19,20,20,20-d <sub>11</sub> acid
DHA	DHA	Docosahexaenoic acid	4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoic acid
<b>[D<sub>3</sub>]-DHA</b>		Docosahexaenoic acid-d <sub>5</sub>	4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoic-21,21,22,22-d <sub>5</sub> acid
EPA	EPA	Eicosapentaenoic acid	5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoic acid
<b>[D<sub>5</sub>]-EPA</b>		Eicosapentaenoic acid-d <sub>5</sub>	5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoic-19,19,20,20-d <sub>5</sub> acid
<b>Mètode B</b>			
14,15-LTC <sub>4</sub>	AA	14,15-leukotriene C <sub>4</sub>	15S-hydroxy-14R-(S-glutathionyl)-5Z,8Z,10E,12E-eicosatetraenoic acid
LTC <sub>4</sub>	AA	leukotriene C <sub>4</sub>	5S-hydroxy-6R-(S-glutathionyl)-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid
<b>[D<sub>5</sub>]-LTC<sub>4</sub></b>		leukotriene C <sub>4</sub> -d <sub>5</sub>	5S-hydroxy-6R-(S-glutathionyl)-7E,9E,11Z,14Z-d <sub>5</sub> -eicosatetraenoic acid
LTD <sub>4</sub>	AA	leukotriene D <sub>4</sub>	5S-hydroxy-6R-(S-cysteinylglycyl)-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid
<b>[D<sub>5</sub>]-LTD<sub>4</sub></b>		leukotriene D <sub>4</sub> -d <sub>5</sub>	5S-hydroxy-6R-(S-cysteinylglycyl)-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraenoic-19,19,20,20-d <sub>5</sub> acid

**AA:** Àcid araquidònic; **LA:** Àcid linoleic; **GLA:** Àcid gamma-linoleic; **DGLA:** Àcid dihomog- $\gamma$ -linolènic; **DHA:** Àcid docosahexaenoic; **EPA:** Àcid eicosapentaenoic; **EDA:** Àcid 11,14-eicosadienoic; **ETA:** Àcid 5,8,11-eicosatrienoic; **ALA:** Àcid  $\alpha$ -linolènic; **DPA:** Àcid docosapentaenoic.

### 3.9. Anàlisi composicional dels àcids grassos

#### 3.9.1 Preparació de la mostra

El contingut d'àcids grassos dels lípids de mostra s'han analitzat a partir de la fracció lipídica extreta amb cloroform:metanol (2:1, v/v) d'una alíquota de mostra de 500 µg de proteïna total en 500 µL de tampó d'homogeneïtzació, en presència de BHT al 0,01% per tal d'evitar l'oxidació dels lípids durant el processament de la mostra. S'han realitzat dos extraccions en el cas del plasma i tres extraccions en el cas de l'escorça frontal. La fase de cloroform s'ha separat i s'ha evaporat sota flux de nitrogen en un evaporador (N-evap Model 113 Organomation Association, Berlin, MA, EUA). Els grups acils dels àcids grassos s'han transesterificat incubant-los en 2 mL de metanol-àcid clorhídric al 5% (v/v) a 75 °C durant 90 min en un bany sec (Tembloc Selecta, Barcelona, Espanya). La solució de metanol, amb l'objectiu de produir àcid clorhídric anhidre, s'ha realitzat en la campana afegint 6,5% de clorur d'acetil sobre el metanol (s'ha de treballar amb cura ja que és una reacció molt exotèrmica). Els èsters metílics dels àcids grassos resultats (FAMES, de l'anglès, *Fatty Acid Methyl Ester*) s'han extret afegint, i per aquest ordre: primerament 1 mL de solució saturada de clorur de sodi i posteriorment 2,5 mL de n-pentà, tot seguit s'ha agitat durant 15-30 min en un vibrador de braç oscil·lant (Vibromatic #384 Selecta, Barcelona, Espanya) i s'ha centrifugat a 400 rpm durant 15 min a 4 °C. La fase de n-pentà s'ha separat i s'ha evaporat sota flux de nitrogen. Per últim, el residu s'ha dissolt en 80 µL de disulfur de carboni com a vehicle per al seu posterior anàlisi.

#### 3.9.2 Sistema cromatogràfic

La separació dels èsters metílics s'ha portat a terme mitjançant un cromatògraf de gasos model 7890A d'Agilent Technologies (Barcelona, Espanya) equipat amb una columna capil·lar DB-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,20 µ) i amb un injector automàtic model 7683B Series d'Agilent Technologies (Barcelona, Espanya) acoblat a un detector de ionització amb flama.

#### 3.9.3 Condicions cromatogràfiques

El mètode que s'ha utilitzat per la separació dels èsters metílics dels àcids grassos ha estat per gradient de temperatura. El pont d'injecció s'ha mantingut a 220 °C i el detector a 250 °C. El programa de temperatura ha consistit en mantenir la temperatura a 145 °C durant els primers 5 min; a continuació, s'ha incrementat 2 °C cada minut fins a 245 °C mantenint-se en aquesta temperatura durant 10 min. Finalment, s'ha mantingut a 250 °C en un període de 10 min en l'etapa post-run. La velocitat del flux d'heli (99,9%), com a gas portador, s'ha mantingut a una velocitat constant de 1,2 mL/min. En cada cursa cromatogràfica s'ha injectat 2 µL de mostra.

### 3.9.4 Quantificació dels analits

La identificació dels FAMES s'ha realitzat per comparació amb els RT i patrons de fragmentació dels corresponents estàndards en un estudi previ realitzat en el propi laboratori. Aquests estàndards ens han permès identificar i quantificar la major part dels pics obtinguts en el cromatograma (**Taula 15**). Els resultats, s'han expressat d'una manera semiquantitativa, calculant-se mitjançant el % que suposa cada àcid gras en relació al total de la mostra. Finalment, els resultats s'han expressat com a mols en %.

**Taula 15.** Èsters metílics identificats mitjançant GC-FID.

Nom lipídic	Nom comú	Nom químic
<b>Àcids grassos monoinsaturats</b>		
C14:0	Àcid mirístic	Àcid Tetradecanoic
C16:0	Àcid palmític	Àcid Hexadecanoic
C18:0	Àcid esteàric	Àcid Octadecanoic
C20:0	Àcid araquídic	Àcid eicosanoic
C22:0	Àcid behènic	Àcid docosanoic
<b>Àcids grassos poliinsaturats</b>		
<b>De la sèrie n3</b>		
C18:3n-3	Àcid $\alpha$ -linolènic	Àcid tot-cis-6,9,12-octadecatrienoic
C18:4n-3	Àcid estearidònic	Àcid tot-cis-6,9,12,15-octadecatetraenoic
C20:5n-3	Àcid eicosapentaenoic	Àcid tot-cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic
C22:5n-3	Àcid clupanodonic	Àcid tot-cis-7,10,13,16,19-docosapentaenoic
C22:6n-3	Àcid cervònic	Àcid tot-cis-4,7,10,13,16,19-docasahexaenoic
<b>De la sèrie n6</b>		
C18:2n-6	Àcid linoleic	Àcid tot-cis-9,12-octadecadienoic
C20:2n-6	Àcid eicosadienoic	Àcid tot-cis-11,14-eicosadienoic
C20:3n-6	Àcid eicosatrienoic	Àcid tot-cis-8,11,14-eicosatrienoic
C20:4n-6	Àcid araquidònic	Àcid tot-cis-5,8,11,14-eicosatetraenoic
C22:4n-6	Àcid adrènic	Àcid tot-cis-7,10,13,16-docosatetraenoic
C22:5n-6	Àcid osbond	Àcid tot-cis-4,7,10,13,16-docosapentaenoic
<b>O De la sèrie n7</b>		
C16:1n-7	Àcid palmitoleic	Àcid (Z)-9-hexadecenoic
<b>De la sèrie n9</b>		
C18:1n-9 cis/trans	Àcid oleic-elaídic	Àcid (Z)-9-octadecenoic
C20:1n-9	Àcid gondoic	Àcid (Z)-11-eicosenoic
C22:1n-9	Àcid erúic	Àcid (Z)-13-docosenoic

### 3.9.5 Índexs calculats

A partir de la composició d'àcids grassos de cada mostra s'ha calculat els següents índex (**Taula 16**) i, les activitats de les elongases i desaturases han estat estimades mitjançant ratios del producte específic versus el seu substrat (**Taula 17**).

**Taula 16.** Índex calculats a partir de la composició d'àcids grassos.

Abreviació	Nom	Fórmula
ACL	Longitud mitjana de la cadena	$ACL = [(\%mol C_{14} * 14) + (\%mol C_{16} * 16) + (\%mol C_{18} * 18) + (\%mol C_{20} * 20) + (\%mol C_{22} * 22) + (\%mol C_{24} * 24)]$
SFA	Àcids grassos saturats	$SFA = \sum \%mol \text{ d'àcids grassos saturats}$
UFA	Àcids grassos insaturats	$UFA = \sum \%mol \text{ d'àcids grassos insaturats}$
MUFA	Àcids grassos monoinsaturats	$MUFA = \sum \%mol \text{ d'àcids grassos monoinsaturats}$
PUFA	Àcids grassos poliinsaturats	$PUFA = \sum \%mol \text{ d'àcids grassos poliinsaturats}$
PUFAn6	Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n6	$PUFAn6 = \sum \%mol \text{ d'àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n6}$
PUFAn3	Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n3	$PUFAn3 = \sum \%mol \text{ d'àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n3}$
DBI	Índex de dobles enllaços	$DBI = [(\%mol \text{ monoenoic} * 1) + (\%mol \text{ dienoic} * 2) + (\%mol \text{ trienoic} * 3) + (\%mol \text{ tetraenoic} * 4) + (\%mol \text{ pentaenoic} * 5) + (\%mol \text{ hexaenoic} * 6)]$
Pln	Índex de peroxidabilitat lipídica	$Pln = [(\%mol \text{ monoenoic} * 0,025) + (\%mol \text{ dienoic} * 1) + (\%mol \text{ trienoic} * 2) + (\%mol \text{ tetraenoic} * 4) + (\%mol \text{ pentaenoic} * 6) + (\%mol \text{ hexaenoic} * 8)]$
AI	Índex antiinflamatori	$AI = [(20:3n6 + 20:5n3 + 22:6n3) / 20:4n6] * 100$



L'índex DBI indica la susceptibilitat a la peroxidació i el PI<sub>n</sub> indica la densitat de dobles enllaços. Els àcids grassos són precursors de moltes molècules pro-inflamatòries com l'AA, i de molècules anti-inflamatòries com el DHA, l'EPA o l'àcid eicosatrienoic.

**Taula 17.** Activitat estimada de les elongases i desaturases calculades a partir dels ratios entre els àcids grassos.

	Elongasa o desaturasa	Ratio		Elongasa o desaturasa	Ratio
n-6	$\Delta 5$	C20:4/C20:3	n-9	Elovl 3	C20:1/C18:1
n-3	$\Delta 6$	C18:4/C18:3	n-6	Elovl 5	C20:2/C18:2
n-6	$\Delta 8$	C20:3/C20:2	n-9	Elovl 6	C18:0/C16:0
n-7	$\Delta 9$	C16:1/C16:0	n-9	Elovl 1-3-7 <sup>a</sup>	C20:0/C18:0
n-9	$\Delta 9$	C18:1/C18:0	n-9	Elovl 1-3-7 <sup>b</sup>	C22:0/C20:0
n-6	Tota la via	C22:5/C18:2	n-6	Elovl 2-5	C22:4/C20:4
n-3	Tota la via	C22:6/C18:3	n-3	Elovl 2-5	C22:5/C20:5

### 3.9.6 Anàlisi de dades

Les diferències entre les mitjanes dels grups experimentals s'han analitzat realitzant la prova T d'Student o s'ha aplicat un anàlisi de variància (ANOVA) d'una via seguit d'un test post hoc Tukey. Els anàlisis s'han realitzat amb el programa Prism versió 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA). El nivell mínim de significació ha estat de 0.05 en totes les comparacions; aquest es representa a les gràfiques com: \*(p<0,05), \*\*(p<0,01), \*\*\*(p<0,001) i \*\*\*\*(p<0,0001).

## 3.10. Quantificació de marcadors de modificació oxidativa

### 3.10.1 Preparació de la mostra

El dany oxidatiu proteic s'ha analitzat a partir de la fracció metanol:tampó d'homogenització obtinguda en les extraccions cloroform:metanol (2:1, v/v) d'una alíquota de mostra de 500 µg de proteïna total. S'han realitzat dos extraccions en el cas del plasma i tres extraccions en el cas de l'escorça frontal. Les proteïnes s'han precipitat afegint àcid tricloroacètic al 10% i s'han centrifugat a 4.000 rpm durant 15 min a 4 °C. Seguidament, s'han reduït totes les proteïnes incubant-les tota la nit amb una solució reductora (0,01% de borhidrur sòdic en una solució tampó d'àcid bòric a pH 9,2) a la que s'ha afegit una gota d'hexanol com a agent antiescumant. Al dia següent, les proteïnes reduïdes s'han precipitat afegint 1 mL d'àcid tricloroacètic al 10% i s'han centrifugat de nou; aquest pas s'ha repetit dues vegades. A les mostres reduïdes s'han afegit els estàndards interns deuterats marcats isotòpicament (**Taula 18**) i s'han hidrolitzat amb 1 mL d'àcid clorhídric 6 N incubant-les a 155 °C durant 30 min en un bany sec (Tembloc Selecta, Barcelona, Espanya). Els hidrolitzats s'han evaporat al buit (#SPD121P Speed Vac Savant, Barcelona, Espanya); posteriorment, s'han incubat amb 1 mL de metanol-àcid clorhídric 6,5% (v/v) a 64 °C durant 30 min per obtenir els èsters metílics i, seguidament, s'han evaporat sota flux de nitrogen (N-evap Model 113 Organomation Association, Berlin, MA, EUA). D'aquesta manera s'obtenen els derivats N,O-trifluoracetil metils èsters dels diferents aminoàcids de

l'hidrolitzat. Finalment, les mostres es re-dissolen amb 80 µL de diclorometà, que actua com a vehicle per al seu posterior anàlisi.

**Taula 18.** Estàndards deuterats afegits a les mostres.

Estàndard	Nom	Concentració
[ <sup>2</sup> H <sub>8</sub> ]Lysina	d <sub>8</sub> -3,3,4,4,5,5,6,6-L-lisina	12 nmol
[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]HAVA	Àcid 5-hidroxi-2-amino-d <sub>5</sub> -2,3,3,4,4-valè	72 pmol
[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]CEL	N <sup>ε</sup> -carboxietil-d <sub>4</sub> -4,4,5,5-D,L-lisina	144.1 pmol
[ <sup>2</sup> H <sub>8</sub> ]MDA-Lisina	N <sup>ε</sup> -malondialdehid-lisina-d <sub>8</sub> -3,3,4,4,5,5,6,6-L-lisina	20.6 pmol
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]CML	N <sup>ε</sup> -carboximetil-d <sub>4</sub> -4,4,5,5-D,L-lisina	162.2 pmol
<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -CMC	S- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> -caboximetil-L-cisteïna	112.4 pmol

### 3.10.2 Sistema cromatogràfic

L'anàlisi s'ha realitzat mitjançant GC/MS. El cromatògraf de gasos utilitzat ha estat el model 6893 d'Agilent Technologies (Barcelona, Espanya) equipat amb una columna capil·lar HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), acoblat a un injector automàtic model 7683 Series d'Agilent Technologies (Barcelona, Espanya) i a un espectròmetre de masses selectiu 5973A d'Agilent Technologies (Barcelona, Espanya) en el mode d'impacte iònic.

### 3.10.3 Condicions cromatogràfiques

El port d'injecció s'ha mantingut a 275 °C i el programa de temperatura ha consistit en el següent: 5 min a 110 °C, després ha augmentat 2 °C/min fins a 150 °C, 5 °C/min fins a 240 °C, 25 °C/min fins a 300 °C i un manteniment final a 300 °C durant 5 min. S'han injectat 2 µL de mostra en cada cursa cromatogràfica.

### 3.10.4 Quantificació dels analits

La quantificació s'ha realitzat mitjançant una estandarització externa utilitzant corbes patrò construïdes a partir de la mescla d'estàndards interns deuterats i no deuterats. Aquests estàndards s'han comprat a PolyPeptide Group (Strasbourg, France), a excepció dels estàndards Lisina, [<sup>2</sup>H<sub>8</sub>]Lisina i CMC obtinguts a Sigma-Aldrich (Madrid, Espanya) i, HAVA i [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]AHAV proporcionats al laboratori. Els anàlisis s'han realitzat mitjançant la monitorització dels ions específics seleccionats prèviament. Els ions que s'han utilitzat i la seva descripció química es presenten en la **Taula 19**. Les concentracions finals s'expressen com a µmol de HAVA, CEL, MDA-Lisina, CML i CMC per mol de lisina.

**Taula 19.** Ions (m/z) dels analits mesurats mitjançant GC/MS.

Estàndard	Nom	Ió (m/z)
Lisina	Lisina	180
[ <sup>2</sup> H <sub>8</sub> ]Lisina	d <sub>8</sub> -3,3,4,4,5,5,6,6-L-lisina	187
HAVA*	Àcid 5-hidroxi-2-aminovalèric	280
[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]HAVA*	Àcid 5-hidroxi-2-amino-d <sub>5</sub> -2,3,3,4,4-valè	285
CEL	N <sup>ε</sup> -carboxietil-lisina	379
[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]CEL	N <sup>ε</sup> -carboxietil-d <sub>4</sub> -4,4,5,5-D,L-lisina	383
MDA-Lisina	N <sup>ε</sup> -malondialdehid-lisina	474
[ <sup>2</sup> H <sub>8</sub> ]MDA-Lisina	N <sup>ε</sup> -malondialdehid-lisina-d <sub>8</sub> -3,3,4,4,5,5,6,6-L-lisina	482
CML	N <sup>ε</sup> -carboximetil-lisina	392

Estàndard	Nom	Ió (m/z)
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]CML	N <sup>ε</sup> -carboximetil-d <sub>4</sub> -4,4,5,5-D,L-lisina	394
CMC	S-caboximetil-cisteïna	271
<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -CMC	S- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> -caboximetil-L-cisteïna	273

\*El producte d'oxidació es la molècula semialdehid glutàmic (SAG), però l'analit que es detecta en el cromatògraf és el seu derivat després de la reducció a HAVA.

### 3.10.5 Control de qualitat intern

Durant aquesta anàlisi ha estat necessari la utilització d'un control intern en el processament per tal de garantir el procés de quantificació dels analits. Per aquest motiu, a partir d'una mostra de mitocondris de fetge de rata, amb la qual s'han realitzats estudis previs per conèixer els valors dels marcadors oxidatius, es preparada i processada juntament amb el conjunt de mostres a analitzar com a control intern del processament. A partir dels valors dels marcadors oxidatius en les mostres de les mitocòndries de fetge de rata obtinguts a cada tanda de mostres, juntament amb els valors de les rectes patrons dels estàndards, s'ha obtingut la quantificació final dels marcadors oxidatius de cada mostra.

### 3.10.6 Anàlisi de dades

Les diferències entre les mitjanes dels grups experimentals s'han analitzat realitzant la prova T d'Student o s'ha aplicat un anàlisi de variància (ANOVA) d'una via seguit d'un test post hoc Tukey. Els anàlisis s'han realitzat amb el programa Prism versió 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA). El nivell mínim de significació ha estat de 0,05 en totes les comparacions; aquest es representa a les gràfiques com: \*(p<0,05), \*\*(p<0,01), \*\*\*(p<0,001) i \*\*\*\*(p<0,0001).

## 3.11. Immunodetecció per Western Blot

### 3.11.1 Preparació de la mostra

Una vegada obtinguts els homogenats, s'ha afegit una mescla d'inhibidors de proteases comercial (Ref. 80-6501-23 Amersham Biosciences, Madrid, Espanya) i ortovanadat de sodi i fluorur de sodi 1 mM com a inhibidors de fosfatases. Cada alíquota s'ha congelat ja dissolta en la solució que contenia 62,5 Mm de 2-Amino-2-hidroximetil-1,3-propandiol hidroclorur (TRIS-HCl) a pH 6,8, dodecil-sulfat de sodi (SDS) al 2% (p/v), glicerol al 10% (v/v), 2-β-mercaptoetanol al 20% (v/v) i Blau de Bromofenol 0,02% (p/v). En el moment de la utilització s'ha descongelat, barrejat i escalfat a 95 °C en un bany sec (Tembloc Selecta, Barcelona, Espanya) durant 3 min, per a desnaturalitzar del tot les proteïnes abans de carregar-les al gel.

### 3.11.2 Electroforesi

Per a la separació de les proteïnes presents en les mostres s'han utilitzat gels d'acrilamida en presència del detergent SDS. El detergent aniònic SDS actua solubilitzant i desnaturalitzant la

major part de les proteïnes de la mostra. A més, confereix una càrrega catiònica determinada a cada proteïna, fet que permet que la separació de les proteïnes es realitzi segons el seu pes molecular. Un cop es sotmet el gel amb la mostra a un camp elèctric, les proteïnes migren cap a l'ànode amb més o menys velocitat depenent de la seva mida.

S'ha utilitzat com a suport físic gel separadors del 10% d'acrilamida i 1,0 mm de gruix i gel apilador del 5%, partint d'una solució comercial d'acrilamida-bisacrilamida que s'ha forçat a polimeritzar afegint els catalitzadors persulfat d'amoni al 10% (p/v) i de TEMED al 0,03% (v/v). Com a mesura de control i d'identificació, s'han utilitzat 2,5 µL del marcador de pesos moleculars *MagicMark XP Western Protein Standard* (#1610374 de BioRad, Barcelona, Espanya) per gel. La separació electroforètica s'ha dut a terme utilitzant una solució tampó formada per 25 mM de TRIS, 192 mM de glicerol i SDS al 0,1% (p/v) a un pH 8,3 i s'ha realitzat en cubetes d'electroforesis Mini-PROTEAN II (#165-2940 de BioRad, Barcelona, Espanya). L'amperatge que s'ha utilitzat ha estat 15 mA/gel la part de l'apilador i a 20 mA/gel la part del separador.

### 3.11.3 Electrotransferència

Un cop les proteïnes han estat separades en funció del seu pes molecular, s'han transferit a membranes de PVDF (#IPVH00010 Imobilon-P de Milipore, Bedford, MA, EE.UU) prèviament activades durant 1 min amb metanol al 99,9% i s'han equilibrat amb una solució tampó de transferència formada per 25 mM de TRIS, 192 mM de glicerol i metanol al 20% (v/v). S'han preparat els sandvitxs cartó-gel-membrana-cartó (en sentit ànode-càtode) damunt del suport per a la transferència en submarí utilitzant els Mini Trans-Blot Transfer Cell (BioRad, Munich, Alemanya). El voltatge aplicat per a la transferència ha estat de 100 V constants durant 90 min.

### 3.11.4 Bloqueig de la membrana

Una vegada ja s'han acabat de transferir les proteïnes separades en el gel a la membrana, a aquesta se li ha realitzat un bloqueig amb agitació suau, per tal de bloquejar les posicions de la membrana on no s'han enganxat les proteïnes de la mostra i, evitar així falsos negatius. La incubació s'ha realitzat a temperatura ambient durant 1 h amb una solució de bloqueig formada per BSA al 5% en TBS-T 0.1% (TRIS 2 M, clorur de sodi 2,5 M i Tween-20 al 0,1%).

### 3.11.5 Immunodetecció

Després del bloqueig es realitzen dos rentats de 5 min amb solució TBS-T 0,1% per retirar l'excés de bloquejant i, a continuació s'ha incubat amb l'anticòs primari dissolt en les mateixes condicions (**Taula 20**) durant 16 h a 4 °C i en agitació suau. Després de la incubació de l'anticòs primari s'han realitzat tres rentats de 5 min amb la solució tampó TBS-T 0,1% i seguidament

s'han incubat les membranes amb l'anticòs secundari adequat (**Taula 21**), els quals estan acoblats a peroxidasa. En tots els casos, aquest s'ha dissolt en la mateixa solució de rentats i la incubació sempre s'ha realitzat a temperatura ambient durant 1 h i en agitació suau.

**Taula 20.** Condicions experimentals detallades dels anticossos primaris de les diferents subunitats del complex I utilitzats en la tècnica de immunotransferència.

Anticòs	Descripció	Referència	P.M (kDa) <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>	µg <sup>3</sup>	Dilució <sup>4</sup>	Anticòs secundari <sup>5</sup>
NDUFV9	Subunitat NDUFV9 del complex I	SAB2107279, Sigma	27	10	20	1/1000	Anti-Rabbit
NDUFS3	Subunitat NDUFS3 del complex I	459130, Invitrogen	29	10	20	1/1000	Anti-Mouse
NDUFS4	Subunitat NDUFS4 del complex I	ab96549, Abcam	20	10	20	1/1000	Anti-Rabbit
NDUFA9	Subunitat NDUFA9 del complex I	459100, Life Technologies	39	10	20	1/1000	Anti-Mouse
CII	Subunitat Flavoprotein del complex II	459200-Invitrogen	70	10	20	1/500	Anti-mouse
CIII	Subunitat CORE 2 del complex III	459220-Invitrogen	48	10	20	1/1000	Anti-mouse
CIV	Subunitat COXI del complex IV	59600-Invitrogen	57	10	20	1/1000	Anti-mouse
Porina	Porina	ab15898, Abcam	31	10	20	1/5000	Anti-Rabbit

<sup>1</sup>Pes molecular de la proteïna; <sup>2</sup>% d'acrilamida de la part separadora del gel; <sup>3</sup>Quantitat en µg de proteïna utilitzat; <sup>4</sup>Dilució de l'anticòs utilitzada; <sup>5</sup>Anticòs secundari utilitzat.

**Taula 21.** Condicions experimentals i referència dels anticossos secundaris utilitzats.

Anticòs	Descripció	Referència	Dilució
Anit-Mouse	ECL Anti-Mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody (from sheep)	NA931 GE-Healthcare	1/50000
Anti-Rabbit	Anti-Rabbit IgG, H&L, Horseradish Peroxidase-Linked species (from goat)	31460 Pierce	1/100000

A continuació, s'han realitzat cinc rentats de 5 min amb TBS-T al 0,1% amb agitació ràpida.

### 3.11.6 Revelat i anàlisi de dades

Per últim, s'ha aplicat a la membrana durant 5 min i a temperatura ambient el substrat quimioluminescent (luminol<sup>TM</sup> Western Chemiluminescent HRP de Millipore Corporation, Billerica, MA, EE.UU). S'ha revelat amb l'aparell Molecular Imager ChemiDoc XRS (BioRad, Munich, Alemanya) i s'han analitzat amb el programa Image Lab software versió 4.0 (BioRad, Hèrcules, CA, EE.UU). La quantitat de luminescència és proporcional a la quantitat de proteïna. En aquest cas, la senyal s'ha relativitzat amb un marcador de càrrega total, la porina, ja que totes les proteïnes que s'han detectat són proteïnes mitocondrials. A més a més, també s'ha realitzat una tinció de tota la proteïna de la membrana. La membrana s'ha submergit en la solució de tinció amb Blau de Coomassie al 0,1% (p/v), 50% de metanol (v/v) i 10% d'àcid acètic (v/v). Un cop s'ha tenyit, es destenyeix el fons en una solució amb 50% metanol i 10% d'àcid acètic i es deixa assecar.

### 3.11.7 Anàlisi de dades

Les diferències entre les mitjanes dels grups experimentals s'han analitzat realitzant la prova T d'Student o s'ha aplicat un anàlisi de variància (ANOVA) d'una via seguit d'un test post hoc Tukey. Els anàlisis s'han realitzat amb el programa Prism versió 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA). El nivell mínim de significació ha estat de 0.05 en totes les comparacions; aquest es representa a les gràfiques com: \*(p<0,05), \*\*(p<0,01), \*\*\*(p<0,001) i \*\*\*\*(p<0,0001).

# RESULTATS



## 4. RESULTATS

### 4.1. Estudi dels efectes de l'obesitat induïda per dieta en el perfil metabolòmic i lipidòmic plasmàtic: caracterització d'un model experimental porcí en època prepuberal

El primer objectiu d'aquesta tesi ha estat caracteritzar fenotípicament i molecularment un model experimental d'obesitat prepuberal. Per tal d'assolir aquest objectiu s'ha realitzat una anàlisi comparativa entre un grup control (grup alimentat amb una dieta normo-calòrica amb un 5% de greix) i un grup amb dieta hipercalòrica (grup alimentat amb una dieta hipercalòrica que conté el 12% de greix) en mostres de plasma. Els animals s'han estabulat en les mateixes condicions i els grups no presenten diferències significatives en l'inici de la intervenció, essent l'única diferència entre els dos grups experimentals la dieta que han ingerit (**Taula 7**). Per tant, els canvis que s'han observat entre aquests dos grups poden ser atribuïts únicament al canvi de dieta. La caracterització d'aquest model s'ha basat en la determinació de les característiques morfològiques i bioquímiques relacionables amb l'obesitat seguit de l'estudi del seu metaboloma i del seu lipidoma circulant.

#### 4.1.1 Característiques morfològiques i bioquímiques del model porcí d'obesitat prepuberal

Les característiques morfològiques i el consum de calories dels animals es mostren en la **Taula 22**. El grup amb dieta hipercalòrica ha ingerit un 37% més de calories al dia i ha incrementat el pes final un 13%. A més, la mesura de l'adipositat per tomografia computeritzada (TC) indica que els animals amb dieta hipercalòrica han augmentat fins a dues vegades el percentatge de greix total (sense tenir en compte el greix visceral) i el percentatge de greix pèlvic-renal en relació amb el volum total de la imatge. Aquest augment de greix es pot observar en la **Figura 25**.



**Figura 25.** La dieta hipercalòrica induïx més acumulació de teixit adipós. A) Imatge representativa del model porcí d'obesitat prepuberal que mostra l'acumulació de teixit adipós en els animals alimentats amb una dieta hipercalòrica; B) exemple de determinació de greix subcutani (vermell), greix intramuscular (verd) i greix pèlvic-renal (taronja) a partir d'imatges de TC. T1: grup dieta control i T2: grup amb dieta hipercalòrica.



**Taula 22.** Característiques morfològiques i consum de calories del grup dieta control (T1) i del grup amb dieta hipercalòrica (T2).

Parameter	T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (Student's t-test)
Initial weight (Kg)	16,5 ± 0,86	16,7 ± 0,67	0,861
Final weight (Kg)	53,27 ± 1,74	60 ± 2,52	<b>0,043</b>
Weight gain (Kg/d)	0,58 ± 0,02	0,69 ± 0,03	<b>0,018</b>
Caloric consumption (Kcal/d)	3819,75 ± 71,33	5213,93 ± 155,85	<b>0,000</b>
Relative fat volume at VL2 (%)	12,66 ± 0,35	19,35 ± 0,78	<b>0,000</b>
Pelvicorenal fat weight (Kg)	0,19 ± 0,01	0,41 ± 0,02	<b>0,000</b>

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup. **Relative fat volume at VL2:** Percentatge de greix subcutani i intramuscular en relació al volum total de la imatge mesurat en la segona vèrtebra lumbar.

Pel que fa a les característiques bioquímiques associades a l'obesitat, representades en la **Taula 23**, els animals alimentats amb una dieta hipercalòrica presenten nivells de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL i TG més elevats en plasma, quan es compara amb el grup control. Paral·lelament, també es troben augmentats la glucèmia i la resistència a la insulina calculada amb l'índex HOMA-IR.

**Taula 23.** Característiques bioquímiques del grup dieta control (T1) i del grup dieta hipercalòrica (T2).

Parameter	T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (Student's t-test)
Cholesterol (mg/dL)	125,9 ± 7,37	155,74 ± 26,44	<b>0,015</b>
LDL-Cholesterol (mg/dL)	46,87 ± 2,45	57,11 ± 8,52	<b>0,011</b>
HDL-Cholesterol (mg/dL)	45,25 ± 2,99	61,36 ± 13,9	<b>0,007</b>
Triglycerides (mg/dL)	21,67 ± 1,93	29,22 ± 5,94	<b>0,014</b>
Glucose (mg/dL)	89,2 ± 9,71	108,54 ± 23,99	<b>0,01</b>
Fructosamine (mg/dL)	177,61 ± 7,53	152,14 ± 46,81	0,131
Insulin (pg/mL)	5,65 ± 0,15	5,77 ± 0,13	0,26
HOMA-IR	1,09 ± 0,13	1,56 ± 0,13	<b>0,009</b>

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup. **HOMA-IR:** Model homeostàtic per avaluar la resistència a la insulina (de l'anglès, *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*).

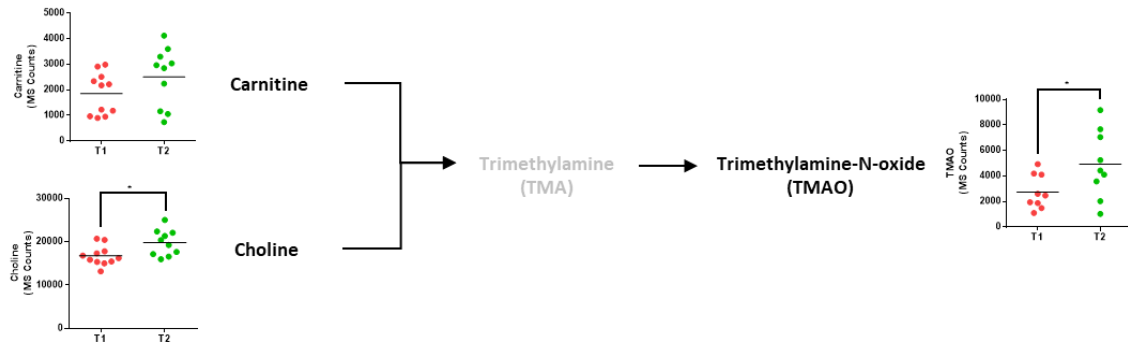
#### 4.1.2 Influència de la dieta sobre el perfil metabòlic i lipídomic plasmàtic en el model porcí d'obesitat prepuberal

##### 4.1.2.1 Anàlisi de molècules rellevants associades a l'obesitat

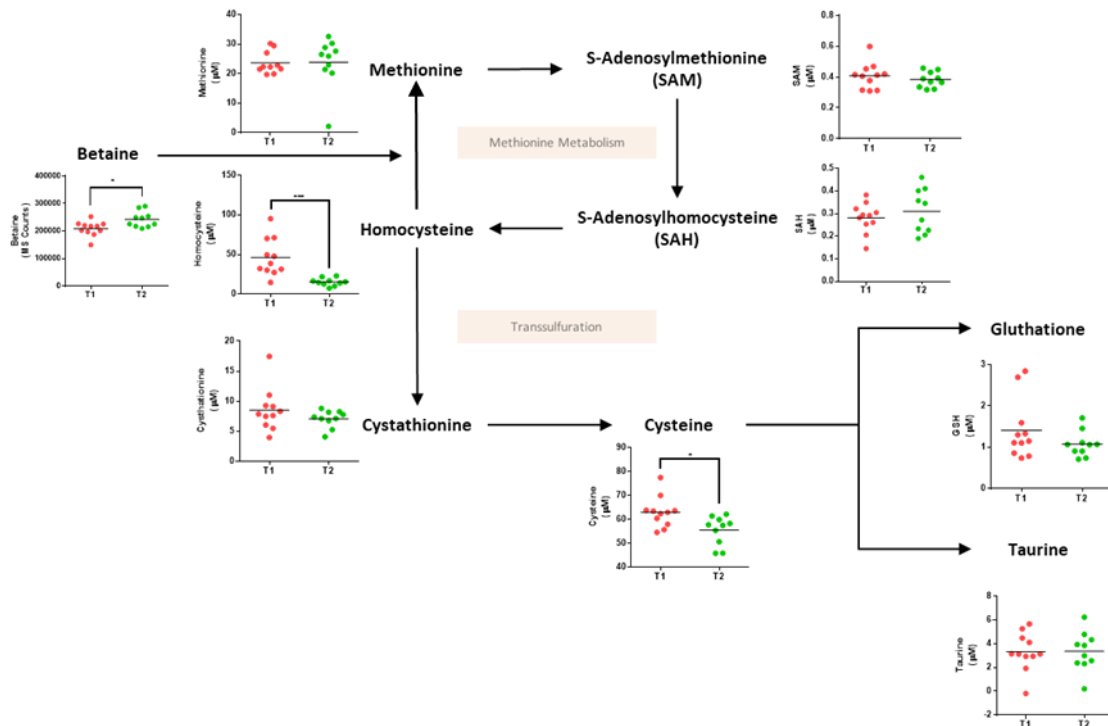
En aquest apartat i continuant amb la caracterització del model animal sota una perspectiva bioquímica, s'han analitzat les concentracions plasmàtiques del TMAO (*Barrea et al. 2018*) i de l'HCys (*Jacques et al. 2001; Tungtrongchitr et al. 2003*) com a biomarcadors descrits d'obesitat i risc cardiovascular. Per dur a terme aquest objectiu, s'ha realitzat una anàlisi de metabòmica dirigida on les mostres s'han analitzat en un sistema LC-ESI-QQQ-MS/MS.

Els aliments rics en colesterol i grasses saturades normalment tenen un alt contingut en colina, fosfatilcolina i carnitina, substàncies que utilitzen determinades espècies de la microbiota intestinal com a font d'energia per produir TMA. Aquest producte és incorporat a la circulació i s'oxida per l'acció d'enzims hepàtics formant el TMAO (*Barrea et al. 2018*). Com es pot veure en

la **Figura 26**, que mostra els nivells dels metabòlits de la via de formació de TMAO, els nivells de colina i TMAO augmenten significativament en els animals alimentats amb una dieta hipercalòrica. Per altra banda, tot i que existeix una tendència, l'augment dels nivells de carnitina en el grup que ha ingerit una dieta hipercalòrica no esdevé significatiu.



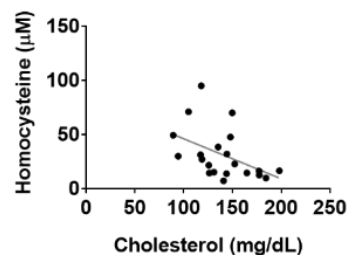
**Figura 26.** L'obesitat induïda per dieta s'associa a canvis plasmàtics en els nivells de TMAO i colina del model porcí d'obesitat prepuberal. Es mostra un esquema representatiu de la via de formació del TMAO i dels nivells en mostres de plasma tenint en compte els dos grups experimentals del treball. Els valors representats en les gràfiques indiquen les concentracions (avaluades mitjançant l'espectre de masses (*MS Counts*)) en plasma provinents del grup amb dieta hipercalòrica (T2) respecte el grup control (T1). Els asteriscs representen diferències significatives on  $*p < 0,05$  per la prova T d'Student. **TMA:** Trimetilamina; **TMAO:** Òxid de trimetilamina.



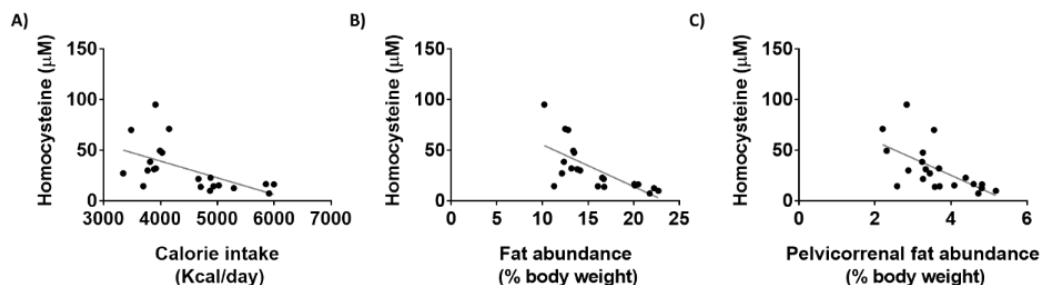
**Figura 27.** L'obesitat s'associa a canvis en la concentració circulant de determinats metabòlits que formen el metabolisme de la metionina, incloent-hi el cicle de la metionina i la via de transsulfuració del model porcí d'obesitat prepuberal. Es mostra un esquema representatiu de la via de la metionina i dels nivells en mostres de plasma tenint en compte els dos grups experimentals del treball. Els valors representats en les gràfiques indiquen les concentracions (en µM o avaluades mitjançant l'espectre de masses (*MS Counts*)) en plasma provinents del grup amb dieta hipercalòrica (T2) respecte al grup control (T1). Els asteriscs representen diferències significatives on  $*p < 0,05$  i  $***p < 0,001$  per la prova T d'Student. **SAM:** S-adenosilmetionina; **SAH:** S-adenosilhomocisteïna; **GSH:** Glutatió.

L'HCys és un producte intermediari en la biosíntesi normal dels aminoàcids metionina i cisteïna i és produït a través de la desmetilació de la metionina ingerida en la dieta, que és abundant en les proteïnes animals. Basant-nos en aquestes premisses, s'han analitzat els nivells dels metabòlits del metabolisme de la metionina incloent-hi la via de transsulfuració. Els metabòlits analitzats han estat: metionina, betaïna, HCys, cistationina, S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteïna (SAH), cisteïna, glutatió i taurina. Com es pot veure en la **Figura 27**, les concentracions dels metabòlits del cycle del metabolisme de la metionina mostren nivells significativament menors en el grup amb una dieta hipercalòrica respecte al grup control en l'HCys i la cisteïna i, nivells més alts de betaïna. Tots els altres metabòlits no mostren canvis deguts al canvi de dieta.

Finalment, s'ha volgut relacionar els biomarcadors "clàssics" de risc cardiovascular derivats de l'excés de pes (colesterol, colesterol LDL, colesterol HDL i TG) i els paràmetres que afecten al pes final amb els nivells de TMAO i HCys. Els resultats indiquen que no existeix correlació significativa entre cap paràmetre estudiat amb els nivells de TMAO. En canvi, la concentració d'HCys en plasma correlaciona negativament amb els nivells plasmàtics de colesterol total (**Figura 28**) i amb variables relacionades amb la dieta i el teixit adipós com la ingesta calòrica, l'abundància de greix total o el greix pèlvic-renal (**Figura 29**).



**Figura 28.** La concentració d'HCys mostra una relació significativa amb els nivells de colesterol total plasmàtic. Correlació significativa ( $p < 0,05$ ) entre la concentració plasmàtica d'HCys amb la concentració de colesterol total ( $p = 0,0358$  i  $R^2 = 0,2118$ ) segons l'estadística de Spearman.



**Figura 29.** La concentració d'HCys plasmàtica mostra una relació significativa amb variables relacionades amb la dieta i el teixit adipós. Correlació significativa ( $p < 0,05$ ) entre la concentració plasmàtica d'HCys amb **A)** la ingesta de calories individuals ( $p = 0,0066$  i  $R^2 = 0,3283$ ); **B)** amb l'abundància de greix total ( $p = 0,0005$  i  $R^2 = 0,4795$ ) i **C)** amb l'abundància de greix pèlvic-renal ( $p = 0,0029$  i  $R^2 = 0,2118$ ) mesurat amb TC, segons l'estadística de Spearman.

#### 4.1.2.2 Anàlisi del perfil d'aminoàcids

Continuant amb l'objectiu de caracteritzar aquest model, s'han analitzat un dels majors grups de metabòlits descrits en l'obesitat, els aminoàcids. Per tant, mitjançant una anàlisi de metabolòmica dirigida utilitzant un sistema LC-ESI-QQQ-MS/MS, s'han quantificat diferents aminoàcids en plasma. Els resultats obtinguts mostren que els animals que han ingerit una dieta hipercalòrica tenen concentracions més altes de prolina i leucina/isoleucina, valina i més baixes d'arginina i cisteïna respecte al grup control (**Taula 24**).

**Taula 24.** Concentracions ( $\mu\text{M}$ ) dels aminoàcids quantificats en plasma del grup control (T1) respecte al grup amb dieta hipercalòrica (T2).

Metabolite	Class	T1 average $\pm$ SEM	T2 average $\pm$ SEM	[T1 vs. T2] p-value (Student's t-test)
<b>Amino acids</b>				
Alanine	Aliphatic	4,742 $\pm$ 0,317	5,309 $\pm$ 0,439	0,3013
Arginine	Basic	26,556 $\pm$ 0,902	22,598 $\pm$ 1,059	<b>0,0100</b>
Asparagine	Acidic and their amide	0,525 $\pm$ 0,044	0,551 $\pm$ 0,04	0,6746
Aspartic acid	Acidic and their amide	14,772 $\pm$ 1,031	15,822 $\pm$ 0,703	0,4198
Cysteine	Hydroxyl or Sulfur-containing	62,969 $\pm$ 1,947	55,505 $\pm$ 1,903	<b>0,0132</b>
Glutamic acid	Acidic and their amide	5,921 $\pm$ 0,458	6,657 $\pm$ 0,659	0,3637
Glycine	Aliphatic	13,152 $\pm$ 4,579	8,102 $\pm$ 0,539	0,3101
Histidine	Basic	ND	ND	
Leucine/ Isoleucine	Aliphatic, BCAA	226,523 $\pm$ 7,831	280,214 $\pm$ 9,336	<b>0,0002</b>
Methionine	Hydroxyl or Sulfur -containing	21,702 $\pm$ 2,295	23,877 $\pm$ 2,71	0,5451
Phenylalanine	Aromatic	82,682 $\pm$ 3,774	86,711 $\pm$ 2,188	0,3798
Proline	Cyclic	252,237 $\pm$ 9,527	355,884 $\pm$ 26,078	<b>0,0010</b>
Serine	Hydroxyl or Sulfur -containing	5,942 $\pm$ 0,369	7,401 $\pm$ 0,677	0,0671
Threonine	Hydroxyl or Sulfur -containing	12,013 $\pm$ 0,758	10,8 $\pm$ 0,98	0,3352
Tryptophan	Aromatic	36,071 $\pm$ 1,798	34,452 $\pm$ 1,455	0,4978
Tyrosine	Aromatic	34,021 $\pm$ 3,003	39,204 $\pm$ 2,075	0,1800
Valine	Aliphatic, BCAA	101,764 $\pm$ 2,731	117,182 $\pm$ 4,061	<b>0,0047</b>

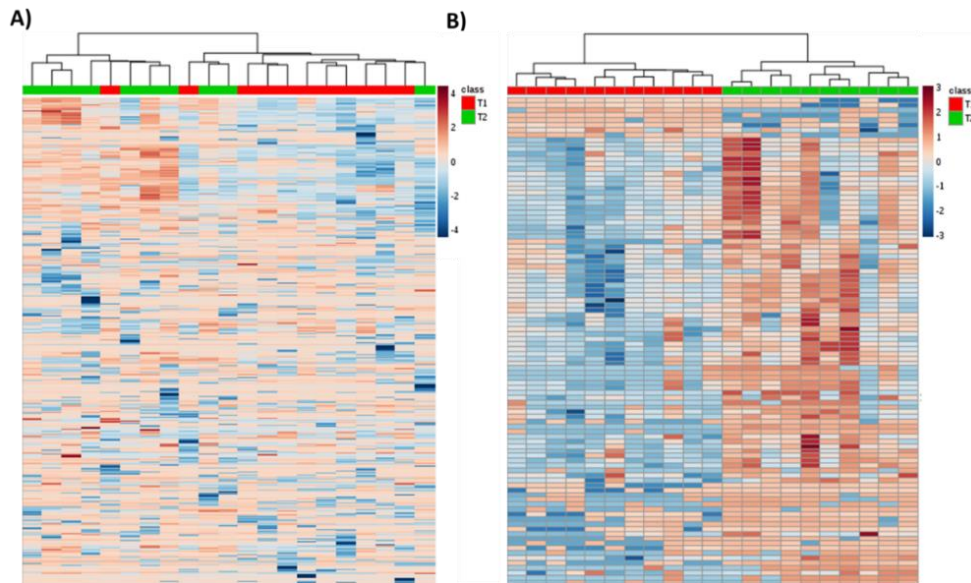
Els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM de mínim 8 animals per grup. **BCAA:** Aminoàcids de cadena ramificada (de l'anglès, *Branched-chain amino acid*); **ND:** No detectable.

#### 4.1.2.3 Anàlisi lipídomic no dirigit

Amb l'objectiu de descobrir nous potencials biomarcadors d'obesitat en aquest model experimental, s'ha aplicat una anàlisi de lipídomic no dirigida mitjançant un sistema LC-ESI-QTOF-MS/MS. L'estudi s'ha centrat en l'anàlisi de lípids per la importància que té el metabolisme lipídic en l'obesitat i en les malalties associades a aquesta.

Mitjançant aquesta metodologia s'han detectat 8809 espècies moleculars. Posteriorment, per tal d'evitar el soroll de fons s'ha aplicat un filtratge en les mostres (selecció de només aquelles característiques moleculars presents com a mínim en el 75% de les mostres del mateix grup) quedant un total de 667 espècies lipídiques. Partint d'aquestes espècies, s'ha realitzat una anàlisi d'agrupació jeràrquica per tal d'obtenir una imatge general del lipidoma plasmàtic en les mostres analitzades i per buscar patrons i similituds entre elles (**Figura 30A**). Tenint en compte

el lipidoma global, l'agrupació jeràrquica mostra una separació dels dos grups estudiats. A més, s'ha realitzat la mateixa anàlisi, però en lloc d'analitzar tot el lipidoma complet, s'han utilitzat només els 100 lípids que presenten un valor menor de p (prova T d'Student) (**Figura 30B**). En tots dos casos es pot veure una bona divisió de les mostres segons quina ha estat la dieta d'aquests animals, tot i que la separació només és perfecta quan es tenen en compte les 100 espècies lipídiques estadísticament més significatives.

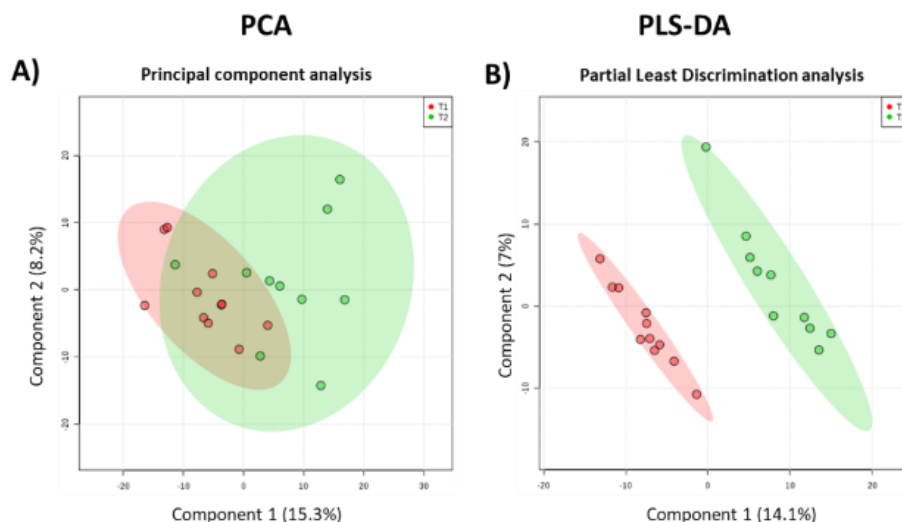


**Figura 30. Anàlisi d'agrupació jeràrquica on es pot veure l'abundància dels lípids en el plasma del model porcí d'obesitat prepuberal. A)** Anàlisi d'agrupament jeràrquic on es representa la distribució de les 667 espècies lipídiques detectades; **B)** Anàlisi d'agrupament jeràrquic utilitzant només 100 dels lípids més significatius estadísticament aplicant una prova T d'Student. Cada línia del gràfic representa una massa exacta ordenada pel seu RT i, els colors mostren quina és la seva abundància relativa. Les mostres dels diferents grups s'agrupen en el dendrograma basant-se en una anàlisi d'agrupació pel mètode Wards amb una mesura de distància d'Euclídea. L'anàlisi només s'ha realitzat en mode de ionització positiva. T1: grup dieta control i T2: grup amb dieta hipercalòrica.

A continuació, i amb l'objectiu de profunditzar en l'anàlisi global del lipidoma, s'ha realitzat una anàlisi PCA (**Figura 31A**). Aquesta anàlisi permet establir la variabilitat intrínseca de cada mostra sense coneixement previ del grup al qual pertanyen. Aplicant aquest tipus d'anàlisi en els dos grups d'estudi s'observa que el factor "dieta" és important a l'hora de separar els dos grups d'estudi amb una variabilitat explicada del 31,3%. Aquests resultats es confirmen en l'anàlisi PLS-DA, representat en la **Figura 31B**, que està enfocat per obtenir l'algoritme que permet aconseguir la màxima separació entre els diferents grups d'estudi sabent a quin grup pertany cada mostra.

L'aplicació del PLS-DA comporta tenir en compte un sobreajustament del model. Això significa que, tot i que el nostre model de PLS-DA es capaç de classificar les nostres mostres, si se'n volen afegir de noves, pot ser que no siguin assignades de forma correcta. Per tal d'evitar això, és important realitzar proves de validació creuada o proves de permutació (*Westerhuis et al. 2008*).

En el nostre cas, utilitzant la prova de validació creuada, s'han obtingut valors de precisió del 90% amb una  $R^2$  de 0,99 i valors de  $Q^2$  de 0,53 utilitzant 3 components. A més, l'error predictiu obtingut de l'anàlisi de boscos aleatoris és igual a 0,0952. Per tant, podem dir que s'ha aconseguit un bon model de predicció.



**Figura 31.** L'anàlisi multivariant revela diferències entre el perfil lipídic del plasma del model porcí d'obesitat prepuberal. **A)** Anàlisi PCA on es mostra la separació de les dades obtingudes en la anàlisi de lipidòmica; **B)** Anàlisi PLS-DA que mostra una bona agrupació dels dos grups amb una precisió del 90% demostrant que comparteixen la majoria de característiques moleculars. L'anàlisi només s'ha realitzat en mode de ionització positiva. T1: grup dieta control i T2: grup amb dieta hipercalòrica.

Finalment, i amb l'objectiu de definir quins lípids són diferencials entre els dos grups, s'ha aplicat una anàlisi univariant (prova T d'Student) als lípids obtinguts després del filtratge ( $n=667$ ). Els resultats indiquen que existeixen un total de 146 lípids estadísticament diferents entre el plasma del grup control respecte al plasma del grup amb dieta hipercalòrica. D'aquests 146 lípids, s'han identificat (basant-nos en la massa exacta, en el RT i en la distribució isotòpica) 75 que es troben en la **Taula 25** i tota la resta de lípids no identificats es troben en el repositori virtual Figshare (doi: 10.6084/m9.figshare.11658678).

En concret, de tots els glicerofosfolípids identificats, el 86% es troben disminuïts i el 14% es troben augmentats en el grup amb dieta hipercalòrica respecte al grup control. Dins dels glicerofosfolípids, els canvis es troben en PA, PE, PG, PI i PS i en la LysoPE (21:0). De tots els glicerolípid trobats, el 100% es troben disminuïts en el grup amb dieta hipercalòrica respecte al grup control on el 30% són DG i el 70% TG. Pel que fa als esfingolípid identificats, només el Cerebròsid D (pertanyent a la categoria de glicoesfingolípid) es troba augmentat en el grup amb dieta hipercalòrica respecte al grup control.

Taula 25. Identitat de les espècies lipídiques plasmàtiques diferencials en femelles porc prepuberals en ionització positiva.

Lipid	Exact Mass	Retention Time (min)	Fold Change (abs)	Regulation (T1 vs. T2)	p value
<b>Glycerophospholipids</b>					
PA(37:0)	700,5395	6,25	1,65	up	0,0076
PA(39:0)	728,5829	6,88	1,67	up	0,0019
PA(41:0)	756,6127	7,43	1,74	up	0,0023
PA(44:0)	798,6576	8,11	1,83	up	0,0097
PA(O-36:1)	688,547	6,51	1,65	up	0,0065
PA(O-37:1)	702,5681	6,82	1,50	up	0,0047
PA(P-38:0)	716,5814	7,11	1,97	up	0,0021
PA(P-41:0)	758,6291	7,90	1,77	up	0,0008
PE(19:0)	495,333	2,74	1,84	up	0,0020
PE(36:0)	729,5672	8,01	1,42	down	0,0324
PE(40:5)	793,5666	6,80	1,81	up	0,0008
PE(41:0)	816,6737	7,90	1,71	up	0,0008
PE(41:3)	793,5983	7,65	806,27	down	0,0047
PE(42:0)	851,6173	6,74	1,81	up	0,0008
PE(44:4)	851,6385	7,61	7565,66	down	0,0000
PE(45:0)	872,7432	8,84	1,80	up	0,0010
PE(O-20:0)	1028,683	6,82	674,97	down	0,0024
PE(O-41:0)	823,615	7,13	1,56	up	0,0398
PG(29:0)	662,4486	7,25	1,82	up	0,0014
PG(29:0)	662,4481	7,48	1,81	up	0,0045
PI(34:1)	818,5236	4,03	2,11	up	0,0047
PS(31:0)	720,5005	7,49	1,92	up	0,0008
PS(31:0)	720,5005	7,25	1,85	up	0,0008
PS(44:2)	881,6517	6,91	101,10	down	0,0426
PS(44:6)	891,5979	7,88	1,45	up	0,0441
PS(44:7)	889,5867	7,52	2,16	up	0,0014
PS(O-35:0)	745,561	7,13	1,64	up	0,0092
PS(O-36:0)	759,5791	7,38	1,34	up	0,0159
PS(O-36:1)	757,5632	6,97	1,49	up	0,0140
PS(O-37:0)	773,5925	7,64	1,73	up	0,0058
PS(O-37:1)	771,5786	7,23	1,88	up	0,0023
PS(O-38:3)	781,5627	6,87	11387,05	up	0,0026
PS(O-40:6)	803,544	6,09	1,81	up	0,0008
PS(P-39:0)	817,6314	7,38	1,45	up	0,0036
PS(P-40:0)	813,6265	7,93	1,38	up	0,0058
LysoPE(21:0)	523,3649	3,63	1,58	up	0,0468
<b>Glycerolipids</b>					
DG(35:2)	588,5159	8,10	1,90	up	0,0015
DG(37:4)	612,5082	7,01	1,87	up	0,0015
DG(38:2)	686,5358	9,95	1,79	up	0,0149
DG(42:0)	728,6188	9,63	1,81	up	0,0008
DG(45:1)	612,5082	6,70	1,69	up	0,0011
DG(44:0)	756,6409	8,93	1,85	up	0,0008
DG(44:7)	704,5812	7,05	1,43	up	0,0333
DG(46:6)	734,6231	9,49	1,93	up	0,0015
TG(49:3)	814,6919	8,84	1,63	up	0,0017
TG(49:4)	812,6773	8,30	1,70	up	0,0008
TG(50:4)	826,6827	8,53	2,43	up	0,0004
TG(52:2)	880,7486	10,00	1,51	up	0,0140
TG(52:3)	878,7342	9,82	1,58	up	0,0066
TG(52:3)	894,7066	9,81	1,73	up	0,0019
TG(52:4)	876,7198	9,64	1,68	up	0,0042
TG(54:3)	906,7647	9,99	1,53	up	0,0190

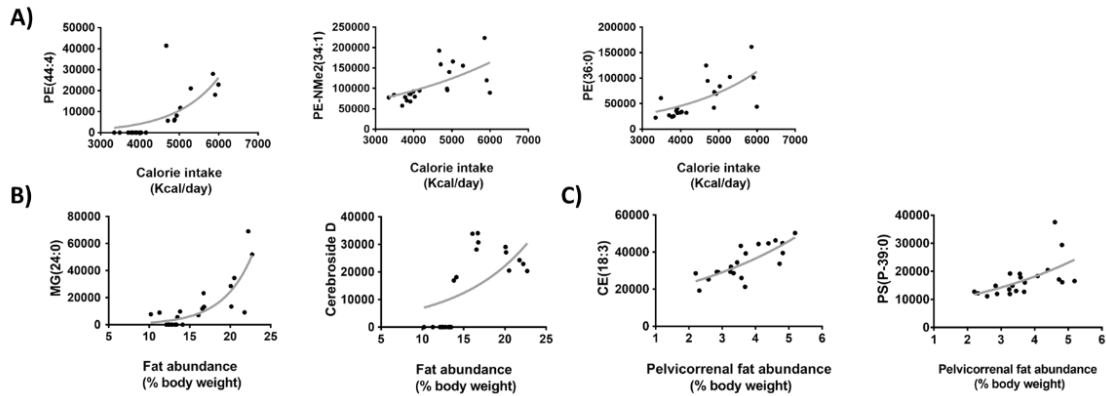
Lipid	Exact Mass	Retention Time (min)	Fold Change (abs)	Regulation (T1 vs. T2)	p value
TG(54:4)	904,749	9,82	1,48	up	0,0242
TG(54:5)	902,7357	9,66	1,73	up	0,0122
TG(54:7)	858,7236	8,61	1,63	up	0,0114
TG(55:9)	868,7061	7,88	2,09	up	0,0005
TG(56:1)	936,7885	9,50	1,69	up	0,0190
TG(58:6)	934,774	9,34	1,71	up	0,0117
TG(58:9)	966,7097	6,69	1,80	up	0,0050
TG(58:11)	941,7416	9,15	1,81	up	0,0008
TG(60:7)	980,7568	8,95	1,81	up	0,0008
TG(62:8)	1006,769	9,03	1,81	up	0,0008
TG(62:13)	996,6975	8,56	1,88	up	0,0033
<b>Sphingolipids</b>					
Cer(16:0)	1271,148	10,20	1,74	up	0,0008
Cer(18:2)	1297,165	10,17	1,61	up	0,0037
Cer(18:2)	1319,15	9,95	1,99	up	0,0021
Cer(20:5)	670,5663	9,95	1,89	up	0,0020
GlcCer(d44:2)	854,7317	10,01	1,41	up	0,0477
LacCer(d18:0/26:0)	1041,754	0,84	1,85	up	0,0008
2-Hydroxy-C18-cerebroside	760,6199	6,81	1,51	up	0,0020
Cerebroside D	777,5747	7,60	2502,01	down	0,0004
Ganglioside GM3 (d41:0)	1234,835	6,72	1,83	up	0,0066
N-(24-hydroxytetracosanyl)sphinganine	687,5949	9,65	1,81	up	0,0008
Sphingosine (d14:2)	740,6451	9,54	1,92	up	0,0010

L'anàlisi univariant (prova T d'Student) mostra determinades espècies lipídiques diferencials ( $p < 0.05$ ) entre el grup dieta control (T1) i el grup amb dieta hipercalòrica (T2) i quina identitat es proposa basant-se en la massa exacta, RT i distribució isotòpica. **RT**: Temps de retenció (de l'anglès, *Retention time*); **FC**: Magnitud de canvi (de l'anglès, *Fold change value*).

Tenint en compte que l'alta ingesta calòrica afecta de manera diferent a cada individu (per exemple, variacions superiors al 10% del pes final, **Taula 22**), s'ha estudiat si els lípids circulants específics trobats correlacionen amb paràmetres individuals que afecten el pes final. Pel que fa al consum de calories, s'han trobat 218 molècules, de les 667 filtrades, que correlacionen significativament amb la ingesta de calories (valors de  $p$  que oscil·len entre  $7,61 \cdot 10^{-7}$  i  $0,05$  i valors absoluts en les correlacions de Spearman entre  $0,85$  i  $0,43$ ) identificant tres PE entre els principals lípids que correlacionen amb la ingesta de calories (**Figura 32A**). Tots els altres lípids no comentats ni representats en la figura es troben el repositori virtual Figshare amb el doi: 10.6084/m9.figshare.11658747. Tenint en compte el contingut de greix total s'han descrit 226 molècules que correlacionen (valors de  $p$  entre  $6,8 \cdot 10^{-6}$  i  $0,05$ , amb valors absoluts en les correlacions de Spearman de  $0,81$  i  $0,43$  (Figshare; doi: 10.6084/m9.figshare.11658759)). Entre aquestes, s'han trobat PE però, també altres lípids com un MG i el cerebròsid D (**Figura 32B**). Finalment, les correlacions amb l'abundància del depòsit pèlvic-renal han donat un total de 169 espècies lipídiques que correlacionen (valors de  $p$  entre  $5,9 \cdot 10^{-5}$  i  $0,05$  i valors absoluts en les correlacions de Spearman entre  $0,76$  i  $0,43$  (Figshare; doi: 10.6084/m9.figshare.11658768)). Aquestes espècies lipídiques són diferents en comparació amb el greix total, el que suggereix que el greix subcutani constitueix dipòsits amb trets fisiològics únics. Tot i que també han

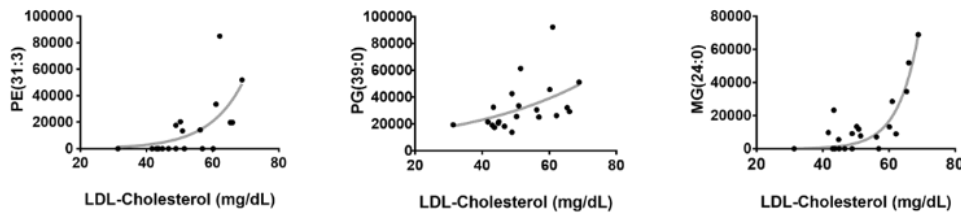


correlacionat les PE, els lípids que tenen una correlació més alta són un Chole i una PS (**Figura 32C**).



**Figura 32. Variables relacionades amb la dieta i el teixit adipós amb lípids circulants específics.** A) Correlació entre la concentració plasmàtica de lípids específics amb la ingesta de calories individuals; B) amb l'abundància de greix total; C) amb l'abundància de greix pèlvic-renal mesurat per TC. Els lípids mostrats són una selecció entre totes les molècules que mostren una correlació significativa ( $p < 0,05$ ) per l'estadística de Spearman.

Per altra banda, i tenint en compte que el colesterol LDL s'ha vist afectat pel règim alt en calories, s'ha realitzat una anàlisi de correlacions entre els nivells de colesterol LDL i els lípids circulants. En total, 165 molècules han correlacionat amb el colesterol LDL (valors de  $p$  entre  $2,5 \cdot 10^5$  i  $0,05$  i valors absoluts en la correlació de Spearman amb valors entre  $0,71$  i  $0,43$  (Figshare; doi: 10.6084/m9.figshare.11658771)). Entre aquestes molècules es representa una PE específica (diferent de la que correlacionava amb el contingut de greix), un PG i un MG (**Figura 33**).



**Figura 33. Els nivells de colesterol LDL plasmàtic estan correlacionats amb lípids plasmàtics específics.** Correlació entre la concentració plasmàtica de lípids específics amb la concentració de colesterol LDL. Els lípids mostrats són una selecció entre totes les molècules que mostren una correlació significativa ( $p < 0,05$ ) per l'estadística de Spearman.

A més, malgrat no haver-se detectat hiperinsulinèmia en aquest model d'obesitat prepuberal, existeixen 90 lípids que correlacionen amb les concentracions d'insulina com un PA i una lactosilceramida, entre altres (valors de  $p$  entre  $0,0005$  i  $0,05$  i valors absoluts en les correlacions de Spearman entre  $0,68$  i  $0,43$  (Figshare; doi: 10.6084/m9.figshare.11663823)) (**Figura 34A**). De la mateixa manera, s'han trobat correlacions significatives en un total de 76 molècules amb l'índex HOMA-IR (valors de  $p$  entre  $0,001$  i  $0,048$  i valors absoluts en les correlacions de Spearman entre  $0,65$  i  $0,43$  (Figshare; doi: 10.6084/m9.figshare.11663829)) com per exemple dos TG i un esfingolípid (**Figura 34B**).

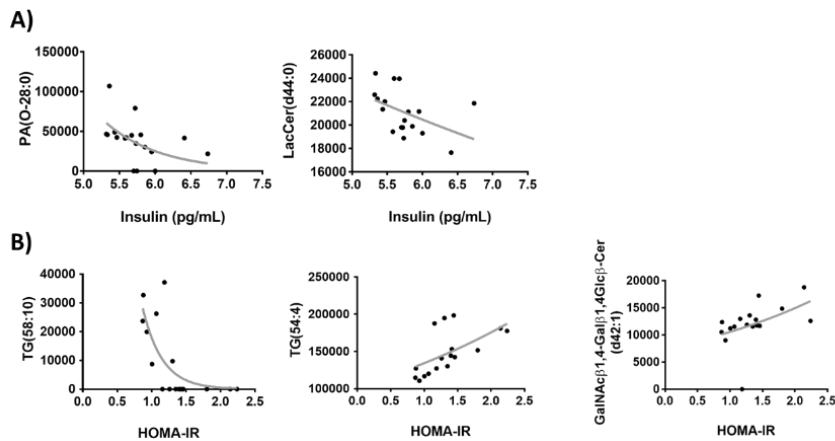


Figura 34. Els nivells d'insulina i HOMA-IR s'associen a lípids plasmàtics específics. A) Correlació entre la concentració plasmàtica de lípids específics amb les concentracions individuals d'insulina i B) valors HOMA-IR. Els lípids mostrats són una selecció entre totes les molècules que mostren una correlació significativa ( $p < 0,05$ ) per l'estadística de Spearman.

#### 4.1.2.3.1 Validació dels canvis lipídics obtinguts en el model porcí d'obesitat prepuberal

Per tal d'avaluar si aquest model pot ser d'utilitat a l'hora d'estudiar l'obesitat humana, s'han comparat els resultats obtinguts de l'anàlisi lipídomic no dirigit en plasma del model porcí d'obesitat amb el mateix anàlisi realitzat en una cohort d'humans obesos (Lelouvier et al. 2016). L'objectiu aquí és poder confirmar la robustesa dels canvis lipídics observats anteriorment en el model animal utilitzat.

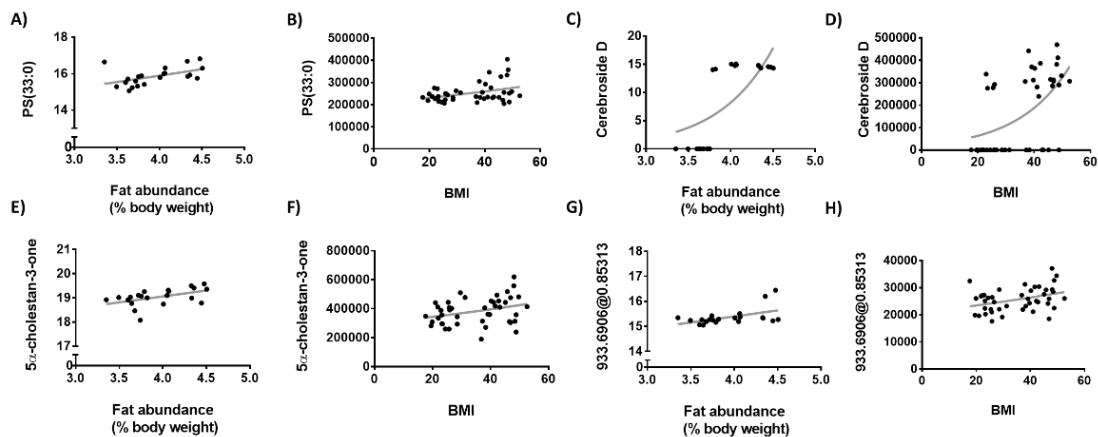
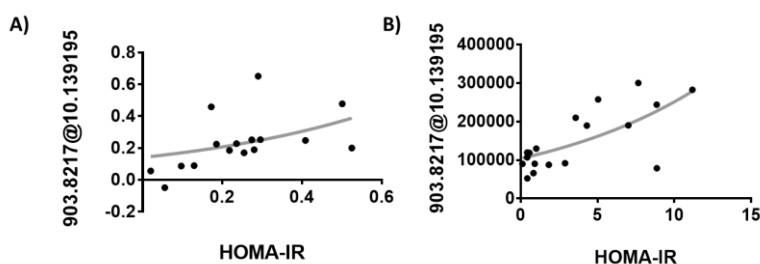


Figura 35. Validació dels biomarcadors proposats en una cohort d'individus obesos. Certs lípids mostren una correlació positiva similar entre l'abundància de greix en el model porcí d'obesitat prepuberal (A, C, E i G) i el BMI en humans (B, D, F i H). Totes les correlacions són significatives ( $p < 0,05$ ) després d'un test de correlació d'Spearman. A)  $R^2 = 0,2543$  i  $p = 0,0197$ ; B)  $R^2 = 0,1238$  i  $p = 0,0192$ ; C)  $R^2 = 0,6643$  i  $p < 0,0001$ ; D)  $R^2 = 0,3175$  i  $p < 0,0001$ ; E)  $R^2 = 0,2411$  i  $p = 0,0238$ ; F)  $R^2 = 0,09942$  i  $p = 0,0371$ ; G)  $R^2 = 0,2523$  i  $p = 0,0203$  i H)  $R^2 = 0,1273$  i  $p = 0,0174$ .

Com mostra la Figura 35 hi ha una sèrie de lípids, comuns entre el model experimental i l'humà, que correlacionen de forma significativa tant amb l'abundància de greix d'aquest model animal com amb els valors de BMI en humans. Dins d'aquests lípids hi ha un fosfoglicèrid, en concret la PS (33:0), un lípid esterol,  $5\alpha$ -cholestan-3-one, i un lípid sense identificar que té com a massa exacta 933,6906 i un RT de 0,85 min. També s'observa el mateix comportament en un

esfingolípid, el cerebròsid D. També s'han avaluat altres paràmetres bioquímics, com el HOMA-IR, on s'ha trobat un lípid comú en les dues cohorts. Aquest lípid no està identificat i té una massa exacta de 903,8217 i un RT igual a 10,13 min en el sistema analitzat (**Figura 36**).



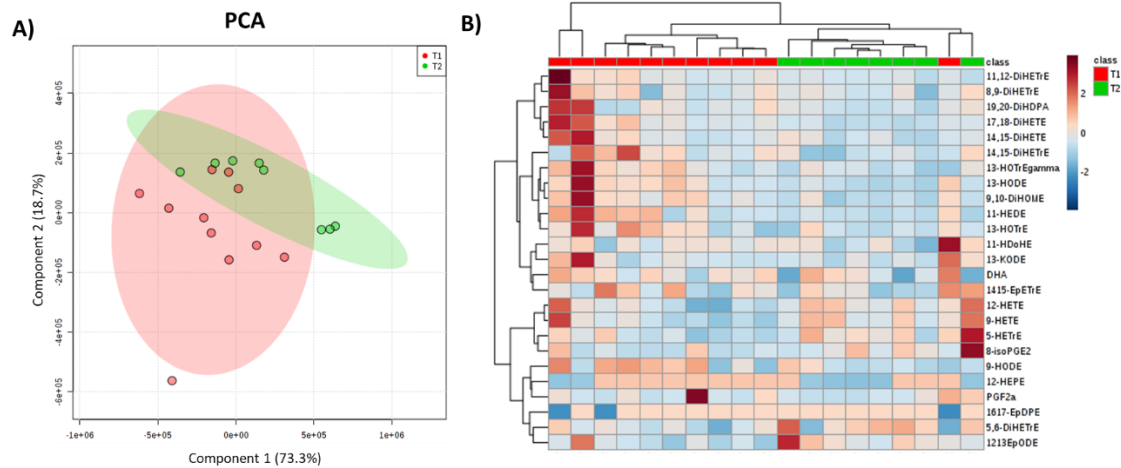
**Figura 36.** Correlació positiva entre un lípid específic i l'índex HOMA-IR en humans i porcs. Un lípid específic de massa exacta de 903,8217 i un RT de 10,14 min mostra una correlació positiva amb l'índex HOMA-IR en el model porcí d'obesitat prepuberal (A) i en humans (B). **A)**  $R^2=0,2642$  i  $p=0,0416$  i **B)**  $R^2=0,516$  i  $p=0,0008$ .

#### 4.1.2.4 Quantificació de mediadors lipídics inflamatoris

Després d'avaluar les característiques lipídiques de les mostres de plasma del model animal mitjançant una aproximació no dirigida, s'ha realitzat una anàlisi dirigida a un grup específic de lípids derivats de l'oxidació enzimàtica dels PUFA, els mediadors lipídics, comunament anomenats oxilipines, mitjançant un sistema LC-ESI-QQQ-MS/MS. S'han examinat un total de 109 oxilipines derivades de diferents PUFA però, només s'ha pogut realitzar la detecció, la identificació i la quantificació de 76.

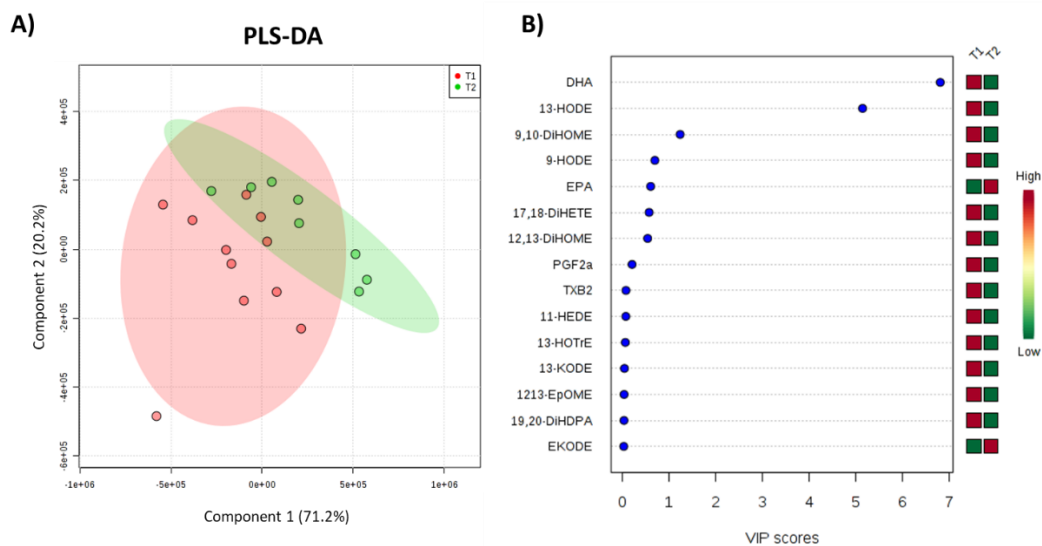
En primer lloc s'ha aplicat estadística multivariant no supervisada on l'anàlisi PCA mostra una diferència clara entre els dos grups amb una variabilitat explicada del 92% (**Figura 37A**). A més, mitjançant l'anàlisi d'agrupació jeràrquica utilitzant les 25 oxilipines estadísticament més diferents entre els dos grups, es pot concloure que l'obesitat induïda per dieta en el plasma del model porcí d'obesitat prepuberal presenta un perfil diferent d'oxilipines, tal com es presenta en la **Figura 37B**.

Quan s'aplica una anàlisi específica per agrupament com és el PLS-DA, també s'observa com ambdós grups experimentals es troben ben separats on és visible una divisió segons el tipus de dieta que han ingerit (**Figura 38A**). A més, la **Figura 38B** mostra els lípids que defineixen aquesta separació. A la dreta es mostren les abundàncies de les oxilipines en els dos grups i els punts o valors VIP (en anglès, *Variable Importance in the Projection*) determinen la importància que tenen aquests lípids.



**Figura 37.** L’anàlisi multivariant no supervisat revela un perfil d’oxilipines característic del plasma del model porcí d’obesitat prepuberal. **A)** Anàlisi PCA on es mostra la separació de les dades obtingudes en la lipidòmica dirigida; **B)** Anàlisi d’agrupació jeràrquica utilitzant les 25 oxilipines més significatives estadísticament aplicant una prova T d’Student. Cada línia del gràfic representa una massa exacta ordenada pel seu RT i, els colors mostren quina és la seva abundància relativa. Les mostres dels diferents grups s’agrupen en el dendrograma basant-se en una anàlisi de clusterització pel mètode Wards amb una mesura de distància d’Euclídea. T1: grup dieta control i T2: grup amb dieta hipercalòrica.

La prova de validació creuada dóna com a resultat una precisió del 74% amb valors de  $R^2$  de 0,33 i valors de  $Q^2$  de 0,2 utilitzant un sol component. L’error predictiu obtingut de l’anàlisi de boscos aleatoris és de 0.1. A més, el test de permutació dóna un valor de  $p < 0,013$  ( $n = 1000$ ) i per tant es pot dir que la classificació que s’ha realitzat per aquest model és millor que qualsevol altra classificació escollida a l’atzar (**Figura 39**).



**Figura 38.** L’estadística multivariant supervisada indica que la concentració d’oxilipines en plasma és capaç de discriminar els animals que han ingerit una dieta hipercalòrica. **A)** L’anàlisi PLS-DA defineix una signatura lipidòmica específica per a cada grup; **B)** Oxilipines més importants que defineixen el PLS-DA. T1: grup dieta control i T2: grup amb una dieta hipercalòrica.

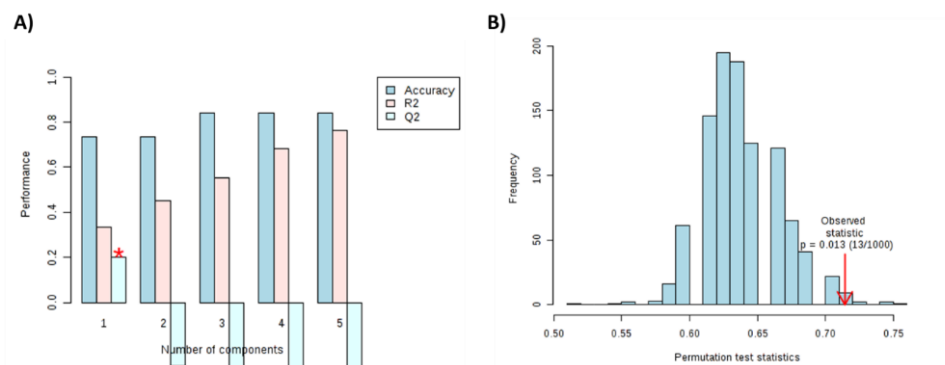


Figura 39. Prova de validació creuada (A) i test de permutació (B) del model PLS-DA generat amb el perfil d'oxilipines en plasma entre el grup control i el grup amb dieta hipercalòrica.

A continuació es mostren les concentracions de les oxilipines quantificades en plasma (Taula 26). Específicament, s'observa un augment significatiu en el grup amb dieta hipercalòrica respecte al grup control de 9-HETE, 12-HETE, 5,6-DiHETrE i 5-iPGF2α-VI derivats de AA, 12(13)-EpODE derivat de LA i de 12-HEPE i TXB3 derivats de EPA. Per contra, les oxilipines que disminueixen de forma significativa en els animals alimentats amb una dieta hipercalòrica són 11,12-DiHETrE derivat de l'AA, 9-HODE i 9,10-DiHOME derivats de LA, 13-HODE derivat de l'àcid gamma-linoleic (GLA), 13-HOTrE(γ) derivat de l'àcid dihomo-γ-linolènic (DGLA), 19,20-DiHDPA derivat de DHA, 17,18-DiHETE derivat de EPA i, per últim 11-HEDE derivat de l'àcid eicosadienoiic (EDA).

Taula 26. Concentracions (ng/mL) de les oxilipines derivades dels diferents PUFA en plasma del grup control (T1) respecte al grup amb dieta hipercalòrica (T2) classificades segons quin és el seu precursor.

Lipid	T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (Student's t-test)
<b>AA derived lipids</b>			
PGD <sub>2</sub>	0,7 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,3468
PGF <sub>2α</sub>	9,6 ± 3,2	10,0 ± 3,3	0,9362
PGE <sub>2</sub>	0,7 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,3080
13,14-dihydro-15-keto-PGE <sub>2</sub>	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,8923
8-isoPGE <sub>2</sub>	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,8220
6-keto-PGF <sub>1α</sub>	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,1539
12-HHTrE	4,9 ± 1,9	4,0 ± 1,6	0,7319
5-HETE	5,7 ± 0,7	6,4 ± 0,7	0,4656
5-KETE	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,2375
8-HETE	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,4795
9-HETE	2,3 ± 0,2	3,7 ± 0,5	<b>0,0113</b>
11-HETE	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,2	0,7312
12-HETE	2,1 ± 0,2	4,0 ± 0,6	<b>0,0120</b>
15-HETE	1,9 ± 0,3	1,8 ± 0,4	0,8342
15-KETE	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,2918
20-HETE	3,6 ± 0,5	2,9 ± 0,6	0,3439
5,6-DiHETrE	0,4 ± 0,0	0,8 ± 0,1	<b>&lt;0,0001</b>
8,9-DiHETrE	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3526
11,12-DiHETrE	0,9 ± 0,1	0,5 ± 0,1	<b>0,0347</b>
14,15-DiHETrE	2,1 ± 0,5	1,7 ± 0,6	0,1145
5(6)-EpETrE	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,5	0,5389
8(9)-EpETrE	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,5795

Lipid	T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (Student's t-test)
11(12)-EpETrE	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,5149
14(15)-EpETrE	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,5325
TXB <sub>2</sub>	6,7 ± 3,6	5,7 ± 2,2	0,8217
PGB <sub>2</sub>	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5297
12-KETE	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,9640
LTB <sub>4</sub>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2624
PGJ <sub>2</sub>	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2726
delta-12-PGJ <sub>2</sub>	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2959
5,15-DiHETE	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2834
5-iPGF <sub>2α</sub> -VI	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	<b>0,0188</b>
8-isoPGF <sub>2α</sub>	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,9976
11-keto-TXB <sub>2</sub>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,7628
19-HETE	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,7114
11B-PGF <sub>2α</sub>	ND	ND	
20-COOH-LTB <sub>4</sub>	ND	ND	
LTE <sub>4</sub>	ND	ND	
6-trans-LTB <sub>4</sub>	ND	ND	
20-OH-LTB <sub>4</sub>	ND	ND	
8,15-DiHETE	ND	ND	
LXA <sub>4</sub>	ND	ND	
LXB <sub>4</sub>	ND	ND	
iPGF <sub>2α</sub> -IV	ND	ND	
tetranor-PGEM	ND	ND	
tetranor-PGDM	ND	ND	
15-epi-LXA <sub>4</sub>	ND	ND	
14,15-LTE <sub>4</sub>	ND	ND	
15-deoxy-delta-12,14-PGJ <sub>2</sub>	ND	ND	
<b>LA derived lipids</b>			
9-HODE	104,6 ± 13,4	61,1 ± 13,6	<b>0,0362</b>
9-KODE	3,5 ± 1,0	3,8 ± 0,8	0,8333
9(10)-EpOME	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,3	0,6721
12(13)-EpOME	5,9 ± 0,7	6,0 ± 0,7	0,8854
9,10-DiHOME	66,2 ± 7,0	32,3 ± 5,3	<b>0,0014</b>
12,13-DiHOME	66,1 ± 7,3	50,6 ± 6,9	0,1487
9,10,13-TriHOME	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2	0,9941
9,12,13-TriHOME	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2	0,9113
EKODE	2,7 ± 1,5	3,9 ± 1,5	0,5647
12(13)-EpODE	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,1	<b>0,0061</b>
<b>GLA derived lipids</b>			
13-HODE	255,7 ± 29,4	100,0 ± 19,0	<b>0,0004</b>
13-KODE	4,3 ± 1,2	2,2 ± 0,4	0,1787
<b>DGLA derived lipids</b>			
15-HETrE	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,5628
PGE <sub>1</sub>	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,7764
13-HOTrE(γ)	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	<b>0,0303</b>
TXB <sub>1</sub>	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0871
PGD <sub>1</sub>	0,048 ± 0,0	0,04 ± 0,0	0,4567
8-HETrE	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,0868
<b>DHA derived lipids</b>			
DHA	820,7 ± 77,2	998,5 ± 138,2	0,2540
4-HDoHE	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,7993
11-HDoHE	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,4976
17-HDoHE	0,9 ± 0,2	1,3 ± 0,7	0,5845
19,20-DiHDPA	3,6 ± 0,8	1,4 ± 0,3	<b>0,0358</b>
16(17)-EpDPE	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,0	0,2026
19(20)-EpDPE	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,4024

Lipid	T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (Student's t-test)
10,17-DiHDoHE	ND	ND	
7-Maresin-1	ND	ND	
RvD <sub>1</sub>	ND	ND	
RvD <sub>2</sub>	ND	ND	
17-epi-RvD <sub>1</sub>	ND	ND	
8-HDoHE	ND	ND	
14-HDoHE	ND	ND	
<b>EPA derived lipids</b>			
EPA	160,4 ± 12,6	212,8 ± 41,7	0,2248
12-HEPE	0,04 ± 0,01	0,13 ± 0,03	<b>0,0164</b>
14,15-DiHETE	1,7 ± 0,5	1,0 ± 0,1	0,2805
11-HEPE	0,012 ± 0,0	0,037 ± 0,017	0,1283
8-HEPE	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3219
5-HEPE	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,0788
17,18-DiHETE	31,8 ± 8,4	9,4 ± 1,4	<b>0,0395</b>
18-HEPE	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,7408
TXB <sub>3</sub>	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	<b>0,0090</b>
15-HEPE	0,062 ± 0,0	0,062 ± 0,0	>0,9999
9-HEPE	0,026 ± 0,0	0,026 ± 0,0	>0,9999
14(15)-EpETE	0,010 ± 0,0	0,010 ± 0,0	>0,9999
17(18)-EpETE	0,027 ± 0,0	0,027 ± 0,0	>0,9999
PGD <sub>3</sub>	ND	ND	
PGE <sub>3</sub>	ND	ND	
5,6-DiHETE	ND	ND	
LXA <sub>5</sub>	ND	ND	
8-iso-PGF <sub>3α</sub>	ND	ND	
11-keto-TXB <sub>3</sub>	ND	ND	
<b>EDA derived lipids</b>			
15-HEDE	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,1134
11-HEDE	4,6 ± 0,9	1,3 ± 0,2	<b>0,0059</b>
15-KEDE	ND	ND	
<b>ETA derived lipids</b>			
5-HETrE	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,0752
LTB <sub>3</sub>	ND	ND	
<b>ALA derived lipids</b>			
9-HOTrE	3,3 ± 0,4	3,9 ± 0,8	0,4825
9-KOTrE	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,4775
13-HOTrE	5,9 ± 1,0	4,1 ± 0,7	0,1698
<b>DPA derived lipids</b>			
7,17-hydroxy-DPA	ND	ND	

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup. **AA**: Àcid araquidònic; **LA**: Àcid linoleic; **GLA**: Àcid gamma-linoleic; **DGLA**: Àcid dihomogamma-linolenic; **DHA**: Àcid docosahexaenoic; **EPA**: Àcid eicosapentaenoic; **EDA**: Àcid 11,14-eicosadienoic; **ETA**: Àcid 5,8,11-eicosatrienoic; **ALA**: Àcid α-linolenic; **DPA**: Àcid docosapentaenoic. **ND**: No detectable.

#### 4.1.2.5 Anàlisi composicional dels àcids grassos

Continuant amb l'estudi de la influència de la dieta en el perfil lipídomic s'ha realitzat la detecció, la identificació i la quantificació de la composició d'àcids grassos totals en plasma de la mostra mitjançant la tècnica de cromatografia de gasos acoblada a un detector de ionització amb flama (GC-FID; de l'anglès *Gas Chromatography with Flame-Ionization Detection*). S'ha de tenir en compte que fins al moment s'han analitzat lípids intactes però en aquest cas, els àcids grassos quantificats són tots àcids grassos presents en totes les espècies lipídiques que conté la mostra,

bàsicament lípids de membrana. Per tant, amb la realització d'aquest estudi podrem saber quin tipus d'àcid gras es troba unit a fosfolípids, glicerolípid i esfingolípid, entre altres.

En la **Taula 27** s'observa com la ingesta d'una dieta hipercalòrica modifica el perfil global d'àcids grassos del plasma. En concret, hi ha un augment significatiu en el grup amb dieta hipercalòrica respecte al grup control en els percentatges de C16:1 n7, C18:1 n9 trans, C20:3 n6 i el C20:5 n3. Per contra, s'observa una disminució significativa del C16:0, C18:4 n3, C20:0, C22:0, C22:1 n9 i C22:4 n6. Els àcids grassos que no varien significativament entre els grups són el C14:0, C18:0, C18:1 n9 cis, C18:2 n6, C18:3 n3, C20:0, C20:1 n9, C20:2 n6, C20:4 n6, C22:5 n6 i C22:6 n3.

**Taula 27.** Composició lipídica del plasma de femelles porc prepuberals del grup control (T1) respecte al grup amb dieta hipercalòrica (T2).

Lipid	T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (Student's t-test)
C14:0	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,7194
C16:0	19,7 ± 0,3	18,4 ± 0,3	<b>0,0148</b>
C16:1 n7	0,9 ± 0,1	1,3 ± 0,0	<b>&lt;0,0001</b>
C18:0	16,2 ± 0,6	15,8 ± 0,4	0,5442
C18:1 n9 cis	19,7 ± 0,6	21,2 ± 0,5	0,0532
C18:1 n9 trans	1,9 ± 0,1	2,2 ± 0,1	<b>0,0039</b>
C18:2 n6	22,9 ± 0,6	24,2 ± 0,9	0,2618
C18:3 n3	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,2526
C18:4 n3	2,9 ± 0,3	1,8 ± 0,1	<b>0,0005</b>
C20:0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	<b>0,0044</b>
C20:1 n9	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4951
C20:2 n6	0,027 ± 0,0	0,024 ± 0,0	0,3107
C20:3 n6	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,1	<b>0,0093</b>
C20:4 n6	6,8 ± 0,4	7,6 ± 0,3	0,1185
C20:5 n3	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	<b>0,0009</b>
C22:0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	<b>0,0103</b>
C22:1 n9	4,4 ± 0,3	2,5 ± 0,1	<b>&lt;0,0001</b>
C22:4 n6	0,084 ± 0,0	0,07 ± 0,0	<b>0,0114</b>
C22:5 n6	0,42 ± 0,0	0,44 ± 0,0	0,4428
C22:5 n3	0,022 ± 0,0	0,032 ± 0,0	<b>0,0335</b>
C22:6 n3	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,1014

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup.

#### 4.1.2.5.1 Índex derivats de la composició en àcids grassos

A partir de l'anàlisi composicional dels àcids grassos s'han calculat una sèrie d'índexs que ens indiquen els canvis composicionals de forma global (**Taula 28**).

**Taula 28.** Índexs derivats de la composició en àcids grassos en plasma de femelles porc prepuberals del grup control (T1) respecte al grup amb dieta hipercalòrica (T2).

Fatty acid indexes	T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (Student's t-test)
ACL	17,947 ± 0,024	17,767 ± 0,136	0,2610
SFA	37,712 ± 0,671	35,828 ± 0,372	<b>0,0198</b>
UFA	62,288 ± 0,671	63,453 ± 0,996	0,3722
MUFA	27,201 ± 0,497	27,26 ± 0,638	0,9450
PUFA	35,087 ± 0,476	36,194 ± 0,741	0,2535



Fatty acid indexes	T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (Student's t-test)
PUFAn6	30,53 ± 0,555	32,911 ± 0,826	<b>0,0378</b>
PUFAn3	4,557 ± 0,278	3,282 ± 0,155	<b>0,0007</b>
DBI	123,59 ± 1,074	124,922 ± 1,226	0,4402
PI <sub>n</sub>	75,998 ± 1,407	75,496 ± 0,825	0,7511
AI	22,056 ± 1,586	20,482 ± 1,48	0,4807

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup. **ACL**: Longitud mitjana de la cadena (de l'anglès, *Average chain length*); **SFA**: Àcids grassos saturats (de l'anglès, *Saturated fatty acids*); **UFA**: Àcids grassos insaturats (de l'anglès, *Unsaturated fatty acids*); **MUFA**: Àcids grassos monoinsaturats (de l'anglès, *Monounsaturated fatty acids*); **PUFA**: Àcids grassos poliinsaturats (de l'anglès, *Polyunsaturated fatty acids*); **PUFAn6**: Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n6 (de l'anglès, *n6 Polyunsaturated fatty acids*); **PUFAn3**: Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n3 (de l'anglès, *n3 Polyunsaturated fatty acids*); **DBI**: Índex de dobles enllaços (de l'anglès, *Double bond index*); **PI<sub>n</sub>**: Índex de peroxidibilitat (de l'anglès, *Peroxidizability index*); **AI**: Índex antiinflamatori (de l'anglès, *Anti-inflammatory index*).

S'ha calculat quina és la longitud mitjana de la cadena (ACL; de l'anglès, *Average Chain Length*) dels àcids grassos analitzats i quants d'aquests són saturats o insaturats mitjançant l'índex de SFA i l'índex d'UFA. Dins dels àcids grassos insaturats diferenciem entre els que tenen un sol doble enllaç o els que en tenen més d'un. Per tant, tenim l'índex dels MUFA i l'índex dels PUFA. Però, dins dels PUFA hi ha dos tipus de poliinsaturacions, els de la sèrie n3 i els de la sèrie n6 segons on es troba localitzat el primer doble enllaç del carboni contant des de l'extrem metil de la cadena. Els dos paràmetres calculats que ens indiquen el grau d'insaturació de la membrana (nombre d'insaturacions per cada 100 molècules d'àcid gras) i la susceptibilitat d'aquesta a ser oxidada són l'índex de dobles enllaços (DBI; de l'anglès, *Double Bond Index*) i l'índex de peroxidibilitat (PI<sub>n</sub>; de l'anglès, *Peroxidizability Index*), respectivament. L'alteració de la composició de la membrana també pot alterar l'índex antiinflamatori (AI; de l'anglès, *Anti-inflammatory Index*), ja que els àcids grassos són precursors de molècules que modulen el procés inflamatori i, per tant, aquest índex permet establir la relació entre els àcids grassos precursors de molècules amb efectes antiinflamatoris i proinflamatoris (Jové et al. 2017).

En la **Taula 28** s'observa l'existència de diferències estadísticament significatives en l'índex SFA i en el contingut de PUFA n3 observant una disminució en el grup amb dieta hipercalòrica respecte al grup control. Per contra, també s'observa un augment significatiu en el contingut de PUFA n6 en el grup que ha ingerit una hipercalòrica. Els altres índexs no mostren diferències estadísticament significatives.

#### 4.1.2.5.2 Estimació de les activitats desaturases i elongases

A partir de l'anàlisi composicional en àcids grassos s'han estimat les activitats desaturases (**Taula 29**) i elongases (**Taula 30**). Els resultats obtinguts mostren diferències significatives en la majoria d'activitats estimades de les desaturases i, també existeixen diferències significatives en l'activitat estimada de les elongases, mostrant una disminució d'Elovl 1-3-7<sup>a</sup> (n9) i Elovl 2-5 (n6) en el grup amb dieta hipercalòrica respecte al grup control.

**Taula 29.** Estimació de l'activitat desaturasa en plasma de femelles porc prepuberals del grup control (T1) respecte al grup amb dieta hipercalòrica (T2).

		T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (Student's t-test)
Δ5 (n6)	C20:4/C20:3	0,176 ± 0,019	0,252 ± 0,017	<b>0,0088</b>
Δ6 (n3)	C18:4/C18:3	6,118 ± 0,613	4,202 ± 2,558	<b>0,0138</b>
Δ8 (n6)	C20:3/C20:2	13,377 ± 0,898	23,627 ± 4,775	<b>0,0107</b>
Δ9 (n7)	C16:1/C16:0	0,046 ± 0,002	0,068 ± 0,211	<b>&lt;0,0001</b>
Δ9 (n9)	C18:1/C18:0	1,352 ± 0,092	1,491 ± 0,233	0,1854

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup.

**Taula 30.** Estimació de l'activitat elongasa en plasma de femelles porc prepuberals del grup control (T1) respecte al grup amb dieta hipercalòrica (T2).

		T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (Student's t-test)
Elovl 3 (n9)	C20:1/C18:1	0,016 ± 0,001	0,014 ± 0,002	0,5745
Elovl 5 (n6)	C20:2/C18:2	0,001 ± 0	0,001 ± 0	0,2709
Elovl 6 (n9)	C18:0/C16:0	0,828 ± 0,036	0,862 ± 0,032	0,4901
Elovl 1-3-7 <sup>a</sup> (n9)	C20:0/C18:0	0,022 ± 0,002	0,017 ± 0,001	<b>0,0301</b>
Elovl 1-3-7 <sup>b</sup> (n9)	C22:0/C20:0	0,722 ± 0,017	0,772 ± 0,025	0,1368
Elovl 2-5 (n6)	C22:4/C20:4	0,013 ± 0,001	0,009 ± 0,001	<b>0,0131</b>
Elovl 2-5 (n3)	C22:5/C20:5	0,549 ± 0,045	0,553 ± 0,056	0,9579

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup.

#### 4.1.2.6 Anàlisi de marcadors de modificació oxidativa proteica

Posteriorment a l'anàlisi del perfil en àcids grassos s'ha realitzat l'anàlisi del dany proteic, per tal de determinar si també existeixen diferències en l'afectació de la dieta hipercalòrica en el plasma d'aquest model animal d'obesitat prepuberal. Per dur a terme aquest objectiu, s'han mesurat diferents tipus de marcadors d'oxidació proteica mitjançant la tècnica de cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC/MS; de l'anglès, *Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry*).

Els marcadors que s'han estudiat han estat:

- i) per a l'estudi de l'oxidació proteica produïda directament a les proteïnes, concretament a nivell de la prolina i arginina, s'ha optat per estudiar els nivells de l'àcid aminovalèric (HAVA),
- ii) per a l'estudi de l'oxidació proteica provocada per l'oxidació de glúcids s'han mesurat els nivells de CEL,
- iii) s'ha utilitzat el marcador de lipoxidació MDAL per a l'estudi de la lesió proteica provinent de productes de lipoxidació i, finalment,
- iv) per a l'estudi de l'oxidació proteica provocada per derivats de glicoxidació i lipoxidació s'han mesurat els nivells de CMC i CML. En ambdós casos es tracta d'una carboximetilació però, en CML aquesta és en l'aminoàcid lisina i en CMC en la cisteïna.

En la **Taula 31** s’observa com, la ingesta d’una dieta hipercalòrica no modifica els nivells dels diferents marcadors d’oxidació proteica estudiats.

**Taula 31.** Marcadors de dany oxidatiu proteic en plasma de femelles porc prepuberals del grup control (T1) respecte al grup amb dieta hipercalòrica (T2).

<b>Markers</b>	<b>T1 average±SEM</b>	<b>T2 average±SEM</b>	<b>[T1 vs. T2] p-value (Student’s t-test)</b>
HAVA	7277,1 ± 384,3	6827,6 ± 472,8	0,4769
CEL	114,7 ± 10,3	116 ± 7,8	0,9178
CML	1155,7 ± 121,9	1132,8 ± 79,3	0,4135
MDAL	161,2 ± 7,9	148,1 ± 12,9	0,8744
CMC	490,7 ± 45,1	439,2 ± 57,3	0,4964

Els valors s’expressen com a µmol de HAVA, CEL, MDAL, CML i CMC / mol de lisina i es representen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals. **HAVA:** Àcid aminovalèric; **CEL:** N<sup>ε</sup>-carboxietil-lisina; **CML:** N<sup>ε</sup>-(carboximetil)-lisina; **MDAL:** Malondialdehid-lisina; **CMC:** S-(carboximetil)-cisteïna.

## 4.2. Estudi dels efectes de l’obesitat induïda per dieta en el perfil metabolòmic i lipídomic en el CNS del model animal d’obesitat

El segon objectiu d’aquesta tesi ha estat caracteritzar quins són els efectes de la dieta hipercalòrica en el CNS del model experimental. Per tal d’assolir aquest objectiu s’ha realitzat una anàlisi comparativa entre un grup control (grup alimentat amb una dieta normo-calòrica amb un 5% de greix) i un grup amb dieta hipercalòrica (grup alimentat amb una dieta que conté el 12% de greix) en mostres d’escorça frontal. Per tal d’abordar aquest objectiu s’ha utilitzat la combinació d’una anàlisi de metabòmica i lipídòmica per analitzar quines són les diferències en el CNS d’aquests dos grups experimentals.

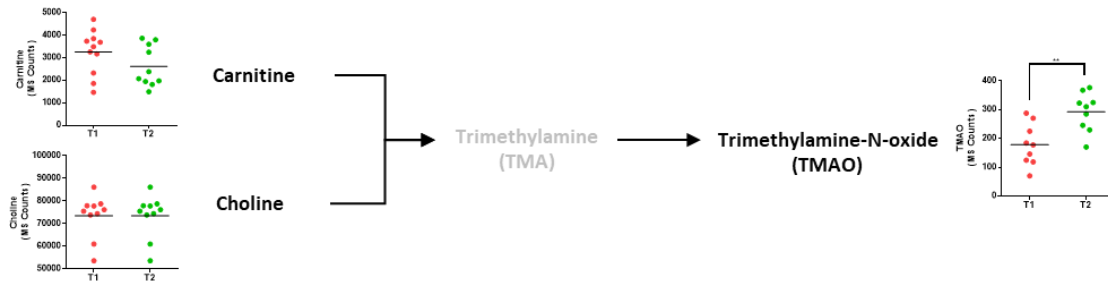
### 4.2.1 Influència de la dieta sobre el perfil metabolòmic i lipídomic en escorça frontal en el model porcí d’obesitat prepuberal

#### 4.2.1.1 Anàlisi de molècules rellevants associades a l’obesitat

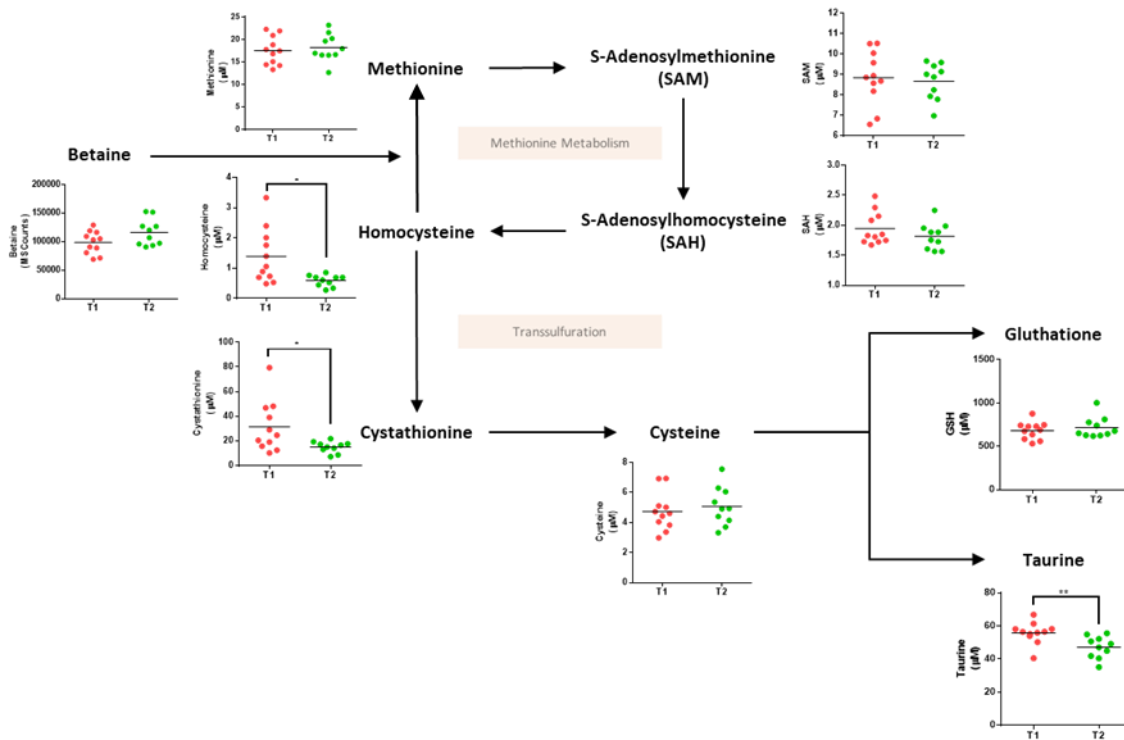
Mitjançant l’anàlisi de metabòmica dirigida utilitzant un sistema LC-ESI-QQQ-MS/MS s’han quantificat els nivells de carnitina, colina i TMAO i els metabòlits del metabolisme de la metionina en les mostres d’escorça frontal. La **Figura 40** mostra els nivells dels metabòlits que formen la via de formació del TMAO on es pot observar que els nivells de carnitina i colina no mostren canvis significatius, en canvi, els nivells de TMAO augmenten significativament en els animals alimentats amb una dieta hipercalòrica. Aquesta troballa és important ja que demostra que un producte del metabolisme de la flora intestinal que el trobem en plasma, pot arribar i acumular-se en el CNS, reforçant la importància d’estudiar l’eix intestí-cervell en processos patològics com l’obesitat.

Per altra banda, s’ha analitzat el contingut dels diferents metabòlits, incloent-hi el cicle de la metionina i la via de transsulfuració. Els metabòlits analitzats han estat: la metionina, SAM, SAH,

HCys, betaïna, cistationina, cisteïna, glutatió i taurina. Com es pot veure en la **Figura 41**, les concentracions dels metabòlits del cicle de la metionina mostren nivells significativament menors en el grup amb una dieta hipercalòrica respecte el grup control en l'HCys, cistationina i taurina indicant que la dieta hipercalòrica és capaç de modificar els nivells d'aquests metabòlits a nivell del CNS.



**Figura 40.** L'obesitat induïda per dieta s'associa a canvis en els nivells de TMAO en l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal. Es mostra un esquema representatiu de la via de formació del TMAO i dels nivells en mostres d'escorça frontal tenint en compte els dos grups experimentals del treball. Els valors representats en les gràfiques indiquen les concentracions (avaluades mitjançant l'espectre de masses (*MS Counts*)) en escorça frontal provinents del grup amb dieta hipercalòrica (T2) respecte al grup control (T1). Els asteriscs representen diferències significatives on  $*p < 0,01$ ,  $**p < 0,001$  per la prova T d'Student. **TMA:** Trimetilamina; **TMAO:** Òxid de trimetilamina.



**Figura 41.** L'obesitat s'associa a canvis en la concentració de determinats metabòlits que formen el metabolisme de la metionina, incloent-hi el cicle de la metionina i la via de transsulfuració en l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal. Es mostra un esquema representatiu de la via de la metionina i dels nivells en mostres d'escorça frontal tenint en compte els dos grups experimentals del treball. Els valors representats en les gràfiques indiquen les concentracions (en  $\mu\text{M}$  o avaluades mitjançant l'espectre de masses (*MS Counts*)) en escorça frontal provinents del grup amb dieta hipercalòrica (T2) respecte al grup control (T1). Els asteriscs representen diferències significatives on  $*p < 0,05$  i  $**p < 0,01$  per la prova T d'Student. **SAM:** S-adenosilmetionina; **SAH:** S-adenosilhomocisteïna; **GSH:** Glutatió.

### 4.2.1.2 Anàlisi del perfil d'aminoàcids

Continuant amb la caracterització dels canvis en el CNS induïts per una dieta hipercalòrica, s'han analitzat, mitjanant un sistema LC-ESI-QQQ-MS/MS, una sèrie d'aminoàcids. Els resultats obtinguts mostren que l'escorça frontal dels animals que han ingerit una dieta hipercalòrica tenen concentracions més altes, comparat amb el grup control, d'àcid aspàrtic i de serina, i més baixes d'arginina i treonina (**Taula 32**).

**Taula 32.** Concentracions ( $\mu\text{M}$ ) dels aminoàcids quantificats en escorça frontal del grup control (T1) respecte al grup dieta hipercalòrica (T2).

Metabolite	Class	T1 average $\pm$ SEM	T2 average $\pm$ SEM	[T1 vs. T2] p-value (Student's t-test)
<b>Amino acids</b>				
Alanine	Aliphatic	17,079 $\pm$ 0,83	15,949 $\pm$ 1,285	0,4609
Arginine	Basic	12,153 $\pm$ 0,704	8,669 $\pm$ 0,442	<b>0,0006</b>
Asparagine	Acidic and their amide	1,157 $\pm$ 0,047	1,206 $\pm$ 0,054	0,4986
Aspartic acid	Acidic and their amide	295,11 $\pm$ 7,655	324,069 $\pm$ 10,383	<b>0,0348</b>
Cysteine	Hydroxyl or Sulfur-containing	4,728 $\pm$ 0,383	5,071 $\pm$ 0,408	0,5477
Glutamic acid	Acidic and their amide	246,999 $\pm$ 5,547	239,623 $\pm$ 4,513	0,3211
Glycine	Aliphatic	12,323 $\pm$ 2,756	9,366 $\pm$ 1,068	0,3477
Histidine	Basic	ND	ND	
Leucine/Isoleucina	Aliphatic, BCAA	531,772 $\pm$ 17,121	604,617 $\pm$ 58,496	0,2279
Methionine	Hydroxyl or Sulfur -containing	17,562 $\pm$ 0,951	18,202 $\pm$ 0,957	0,6411
Phenylalanine	Aromatic	10,676 $\pm$ 0,728	10,901 $\pm$ 0,666	0,8233
Proline	Cyclic	73,75 $\pm$ 3,739	77,176 $\pm$ 1,128	0,4109
Serine	Hydroxyl or Sulfur -containing	65,685 $\pm$ 3,874	95,488 $\pm$ 7,469	<b>0,0017</b>
Threonine	Hydroxyl or Sulfur -containing	94,659 $\pm$ 5,07	46,378 $\pm$ 4,151	<b>&lt;0,00001</b>
Tryptophan	Aromatic	1,995 $\pm$ 0,159	1,964 $\pm$ 0,107	0,8747
Tyrosine	Aromatic	4,177 $\pm$ 0,674	4,102 $\pm$ 0,637	0,9365
Valine	Aliphatic, BCAA	37,914 $\pm$ 1,362	35,244 $\pm$ 0,694	0,1068

Els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM de mínim 8 animals per grup. **BCAA:** Aminàcids de cadena ramificada (de l'anglès, *Branched-chain amino acid*); **ND:** No detectable.

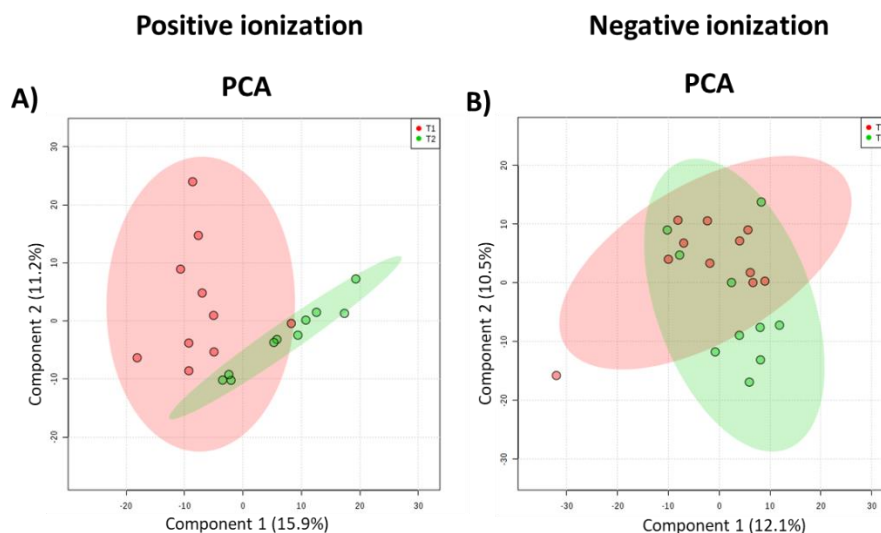
### 4.2.1.3 Anàlisi metabòlic i lipídomic no dirigit

En l'estudi metabòlic realitzat mitjançant un sistema LC-ESI-QTOF-MS/MS, s'han detectat 8227 metabòlits en ionització positiva i 6882 en ionització negativa. A partir d'aquí, s'han seleccionat només aquelles característiques moleculars presents com a mínim en el 75% de les mostres del mateix grup obtenint 675 característiques moleculars en ionització positiva i 836 en ionització negativa. Addicionalment, en l'anàlisi lipídomic s'han detectar 1906 espècies lipídiques en positiu i 1564 lípids en negatiu i, després del filtratge, el nombre de lípids ha estat de 388 i 427.

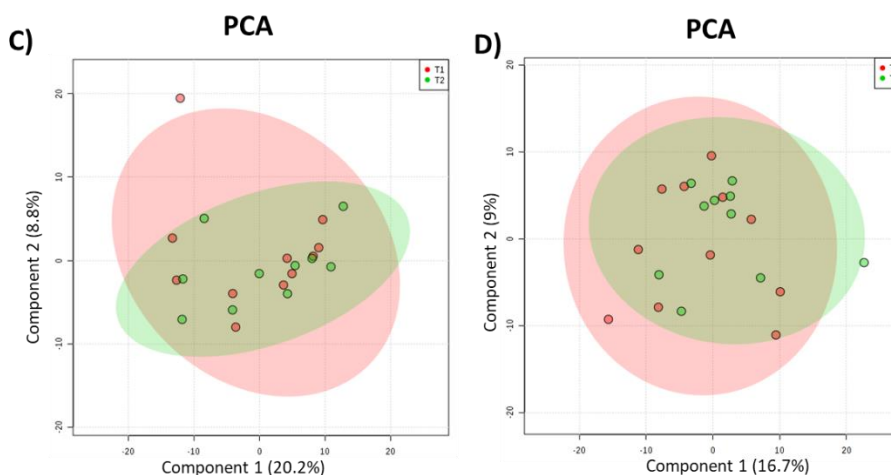
El primer que ens mostra la gràfica que representa l'anàlisi PCA realitzat amb les mostres ionitzades positivament, és que existeix un patró metabòlic que permet separar de manera raonable els dos grups d'estudi (**Figura 42A**). En canvi, en les mostres analitzades amb mode de ionització negativa, aquesta diferència no és tan clara (**Figura 42B**). En el cas de la lipídomic, en

la gràfica s'observa com les mostres no se separen en dos grups, ni en ionització positiva ni en negativa (**Figura 42C i Figura 42D**). Aquests resultats suggereixen que la dieta és un component important explicant el metaboloma de l'escorça frontal d'aquests animals però, en canvi, no és el que més preval en la diferenciació del lipidoma de l'escorça frontal d'aquestes mostres.

### METABOLOMIC PROFILE



### LIPIDOMIC PROFILE



**Figura 42.** L'estadística multivariant no supervisada determina un perfil metabolòmic específic, en canvi el factor "dieta" no és el que més preval en la diferenciació del lipidoma de l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal. Representació de l'anàlisi PCA en l'anàlisi metabolòmic **A)** en positiu i **B)** en negatiu i, en l'anàlisi lipidòmic **C)** en positiu i **D)** en negatiu. T1: grup control i T2: grup amb dieta hipercalòrica.

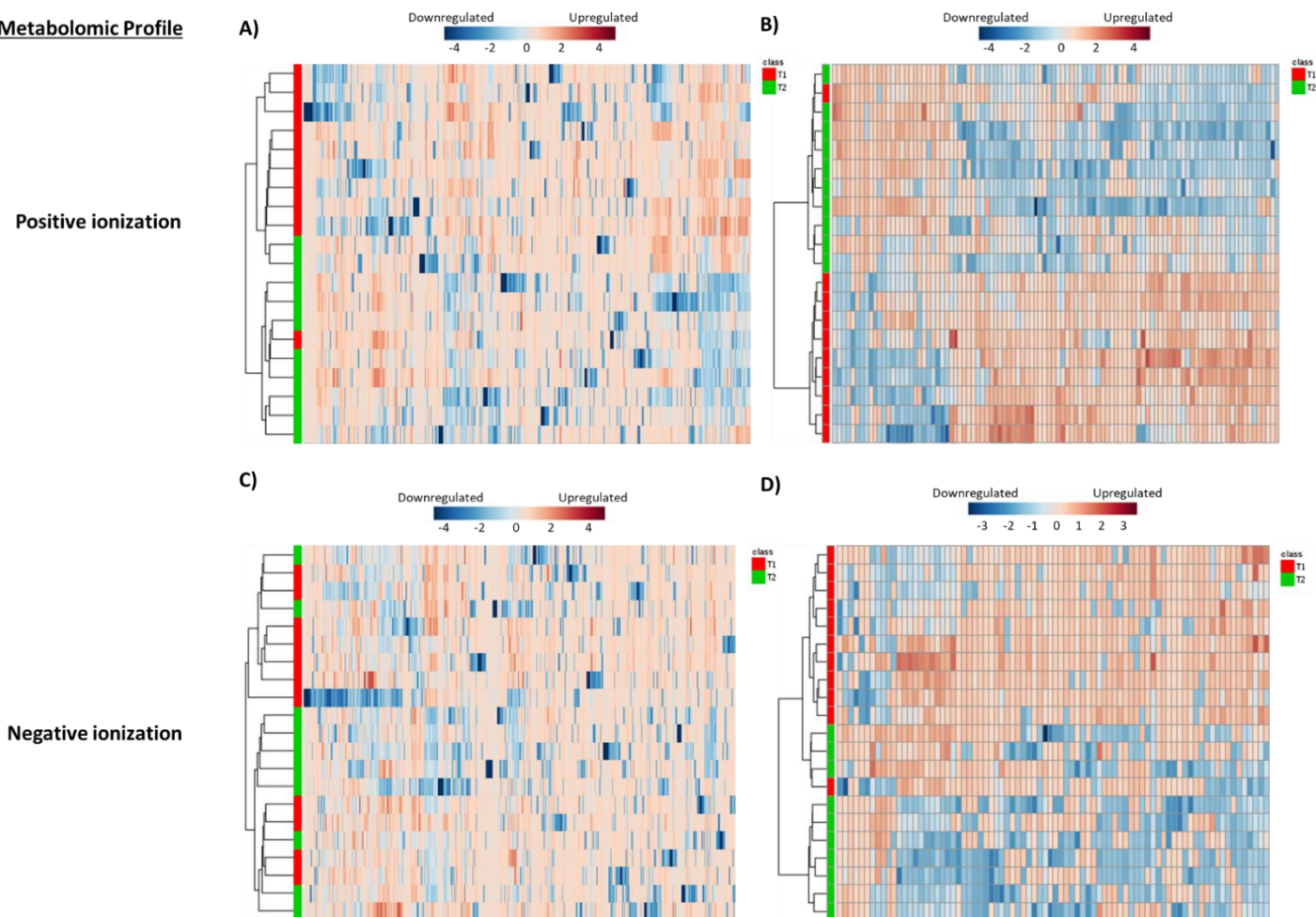
A més, quan s'utilitza l'anàlisi d'agrupació jeràrquica per estudiar com es distribueixen els compostos trobats en les mostres, els resultats que s'obtenen també varien segons si s'analitzen els metabòlits més polars (metabolòmica) (**Figura 43**) o els més apolars (lipidòmica) (**Figura 44**). Si només es té en compte l'anàlisi metabolòmic, es veu com el grup dieta hipercalòrica es troba separat del grup control en ionització positiva (**Figura 43A**) però, aquesta diferenciació no és tan clara en el cas del mode de ionització negativa (**Figura 43C**). En el cas de la lipidòmica, igual que

s'observava en l'anàlisi PCA, el factor "dieta" no és capaç de diferenciar les mostres entre el grup dieta hipercalòrica i el grup control ni en mode de ionització positiva ni en negativa (**Figura 44A** i **Figura 44C**). A més d'analitzar tot el metaboloma i el lipidoma, s'ha realitzat la mateixa anàlisi d'estadística multivariant no supervisada amb les 100 espècies moleculars que presenten un valor menor de p (prova T d'Student). En la **Figura 43B** i **Figura 43D** es mostren els resultats obtinguts en la metabolòmica i la **Figura 44B** i **Figura 44D** els resultats de la lipidòmica en ambdues ionitzacions, on s'observa una divisió perfecta de les mostres segons quina ha estat la dieta d'aquests animals. Per tant, es pot dir que els grups experimentals mostren clarament diferents perfils induïts per l'obesitat en el metaboloma però, aquest fet no és tan clar en el lipidoma, indicant que el perfil metabolòmic podria estar més alterat en obesitat que el perfil lipídic en escorça frontal.

Un cop analitzat el metaboloma i el lipidoma de manera global i no supervisada, s'aplica una anàlisi específica per agrupament com és el PLS-DA. Utilitzant aquesta aproximació es veuen diferències clares causades per l'obesitat i aquests efectes es reflecteixen tant en el metaboloma (**Figura 45A** i **Figura 45B**) com en el lipidoma (**Figura 45C** i **Figura 45D**) d'aquest teixit, ja que ambdós grups es troben separats. La prova de validació creuada en la metabolòmica en ionització positiva dóna com a resultat una precisió del 95% amb valors de  $R^2$  de 0,96 i valors de  $Q^2$  de 0,53 utilitzant dos components. En el cas de la metabolòmica en ionització negativa els valors de precisió són del 71%,  $R^2$  de 0,99 i valors de  $Q^2$  de 0,24 utilitzant quatre components. L'error predictiu obtingut de l'anàlisi de boscos aleatoris és de 0,2 en positiu i 0,476 en negatiu. Per altra banda, la prova de validació creuada en els resultats obtinguts en la lipidòmica no dirigida mostren que el nostre model generat té una capacitat predictiva limitada.

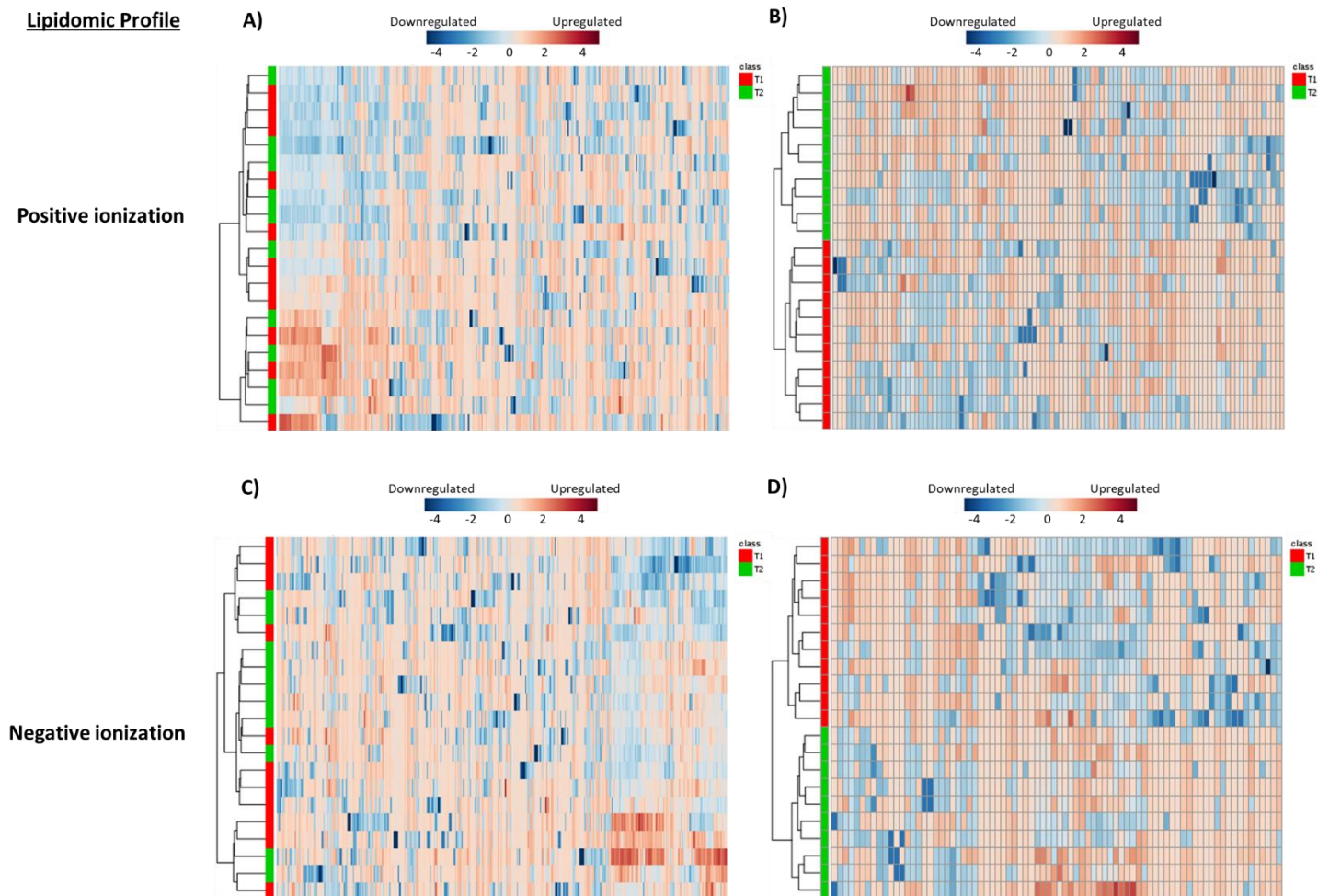
Finalment, s'aplica una anàlisi univariant (prova T d'Student) tant en l'anàlisi metabolòmic com lipídic per tal de determinar quines són les molècules diferencials entre els dos grups d'estudi. Dels 675 metabòlits detectats en positiu, 118 són estadísticament significatius, dels quals s'han identificat un total de 22. En negatiu, dels 836 compostos detectats, 17 són estadísticament significatius on només s'han identificat 2. En el cas de l'anàlisi lipídic, dels 338 lípids detectats en ionització positiva, 22 són estadísticament significatius, 3 dels quals s'han identificat i, en ionització negativa, de les 427 espècies lipídiques detectades, 30 són diferencials i s'han identificat un total de 10. Els compostos diferencials identificats es mostren en la **Taula 33** i **Taula 34** mentre que els compostos no identificats es troben dipositats en el repositori virtual Figshare (doi: 10.6084/m9.figshare.11663040).

### Metabolomic Profile



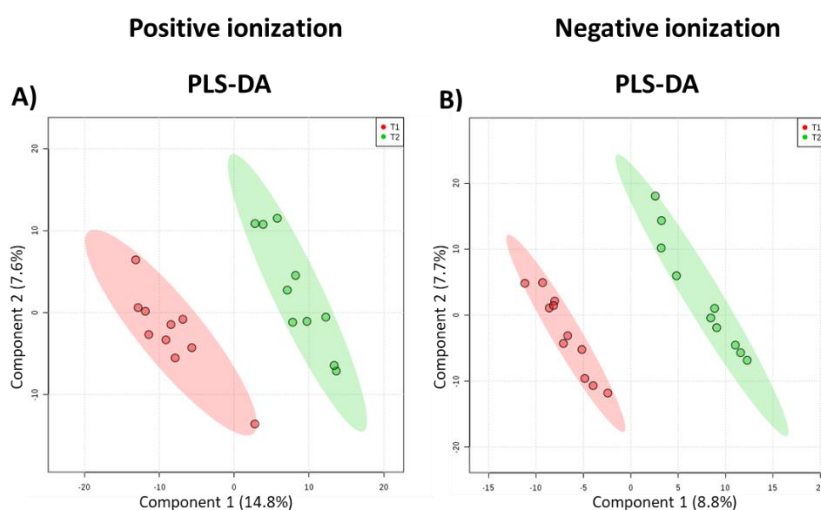
**Figura 43. Diferències metabolòmiques en escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal.** L'agrupació jeràrquica mostra l'abundància relativa de tot el metaboloma (A/C) i la dels 100 metabòlits més significatius (B/D) de l'escorça frontal en ionització positiva (part superior) i en ionització negativa (part inferior) del grup control (T1) i del grup amb dieta hipercalòrica (T2). Les mostres dels diferents grups s'agrupen en el dendrograma basant-se en una anàlisi de clusterització pel mètode Wards, amb una mesura de distància d'Euclídea. L'escala del mapa de color en base log<sub>2</sub> des del rang -4 (blau) a +4 (vermell).





**Figura 44.** Diferències en les espècies lipídiques en escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal. L'agrupació jeràrquica mostra l'abundància relativa de tot el lipidoma (A/C) i la dels 100 lípids més significatius (B/D) de l'escorça frontal en ionització positiva (part superior) i en ionització negativa (part inferior) del grup control (T1) i del grup amb dieta hipercalòrica (T2). Les mostres dels diferents grups s'agrupen en el dendrograma basant-se en una anàlisi de clusterització pel mètode Wards, amb una mesura de distància d'Euclídea. L'escala del mapa de color en base  $\log_2$  des del rang -4 (blau) a +4 (vermell).

## METABOLOMIC PROFILE



## LIPIDOMIC PROFILE

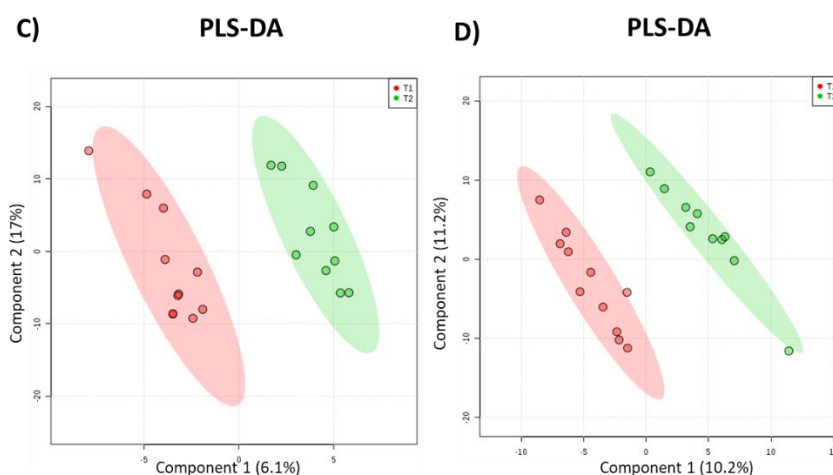


Figura 45. L'estadística multivariant supervisada determina un perfil metabolòmic i lipidòmic específic de l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal. Representació de l'anàlisi PLS-DA en l'anàlisi metabolòmic A) en positiu i B) negatiu i, en l'anàlisi lipidòmic C) en positiu i D) en negatiu. T1: grup control i T2: grup amb dieta hipercalòrica.

Entre els compostos identificats en ionització positiva, el 84% de metabòlits es troben augmentats i el 16% es troben disminuïts en el grup dieta hipercalòrica respecte al grup control. Dins dels que es troben augmentats s'han identificat aminoàcids, nucleòtids i l'hormona angiotensina II però, la majoria dels metabòlits identificats en l'anàlisi metabolòmic són lípids, ja que aquesta anàlisi permet la detecció de metabòlits apolars incloent-hi diverses espècies de lípids i, a més, actualment les bases de dades i les biblioteques d'espectres de MS/MS dels lípids contenen més informació en comparació amb les bases de dades de metabòlits, per aquest motiu, és més fàcil la identificació d'aquests. D'aquesta manera, en l'anàlisi metabolòmic s'identifiquen àcids grassos, àcids grassos oxidats i el LTB4 oxidat (oxilipina derivada de l'AA). A més, s'identifiquen glicerofosfolípids, la majoria LysoGP, dos MG, específicament el MG (14:0) i el MG (18:0), l'àcid quenodeoxicòlic sulfat o ursodeoxicòlic sulfat (no es poden diferenciar, ja

que són isòmers) que pertanyen a la categoria de lípids esterol i l'ubiquinol 8 que pertany a la categoria de lípid prenol. En l'anàlisi lipidòmic s'identifica la PC (P-38:6), la PE (O-32:0) i la PS (39:0). Mentre que, en ionització negativa, la majoria de compostos es troben augmentats en el grup dieta hipercalòrica respecte al grup control excepte l'àcid biliar quenodeoxicòlic o l'àcid ursodeoxicòlic que es troba disminuït en el grup dieta hipercalòrica. Dins dels que es troben augmentats hi ha glicerofosfolípids, la SM (d35:2) i un lípid prenol.

**Taula 33.** Identitat dels metabòlits i lípids trobats en escorça frontal en femelles porc prepuberals en ionització positiva.

Classification	Compound	Mass	RT	FC (abs)	Regulation (T1 vs. T2)	P value (Corr)
<b>Metabolomic analysis</b>						
Aminoacids	L-Aspartic Acid	133,0376	0,58	1,13	up	0,03350144
	N-acetylaspartate	175,0482	0,49	1,27	up	0,00376385
	N-Formyl-L-glutamate	175,0482	0,58	1,22	up	0,01439807
Bile acids	Chenodeoxycholic acid sulfate	472,248	11,72	1,28	up	0,00364085
	Ursodeoxycholic acid 3-sulfate					
Fatty acyls	Arachidic Acid	626,5258	13,164	1,314	up	0,03006365
	L-Citramalyl-CoA	897,1596	13,11	539,91	up	0,00280504
	Oleamide	281,2702	11,28	1,23	up	0,00561485
Glycerophospholipids	LysoPA(22:2)	490,312	5,11	8457,92	up	1,15E-17
	LysoPC(18:0)	523,375	11,18	1,30	up	0,02419729
	LysoPE(22:4)	529,3188	10,84	1,42	up	0,03335549
	LysoPE(24:0)	565,4209	11,71	1,307	up	0,03331444
	Phosphatidylinositol phosphate(36:4)	1012,5206	10,69	111,02	up	0,04489882
	1-Phosphatidyl-D-myo-inositol	390,2754	11,90	1,348	up	0,01439807
Glycerolipids	MG(14:0)	302,2445	10,52	1,26	up	0,02689973
	MG(18:0)	358,3069	11,71	1,37	up	0,04826669
Nucleotids	NADPH	745,0805	11,71	1,33	up	0,03741523
	Uridine diphosphate (UDP)	404,0134	0,58	1,381	up	0,00215134
Oxo fatty acids	7-oxo-11E,13-Tetradecadienoic acid	238,1528	8,30	1,17	down	0,03534823
Lipid mediators	10,11-dihydro-20-trihydroxy-leukotriene B4	386,2381	6,00	2689,65	up	3,69E-06
Polypeptide hormone	angiotensin II	436,1438	9,50	81,18	up	0,01939517
Prenol lipids	UQH2 8	728,5796	13,22	1,39	up	0,00243947
Pyrimidine nucleotide	Cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid	614,1459	12,98	1,25	up	0,01564551
<b>Lipidomic analysis</b>						
Glycerophospholipids	PC(P-38:6)	789,5623	6,77	54,61	down	0,03473007
	PE(O-32:0)	663,5762	8,57	11,53	down	0,01008323
	PS(39:0)	833,6187	7,67	207,91	down	0,01498166

L'anàlisi univariante (prova T d'Student) mostra determinades espècies diferencials ( $p < 0,05$ ) entre el grup dieta control (T1) i el grup dieta hipercalòrica (T2) i quina identitat es proposa basant-se en la massa exacta, RT i distribució isotòpica. **RT:** Temps de retenció (de l'anglès, *Retention time*); **FC:** Magnitud de canvi (de l'anglès, *Fold change value*).

**Taula 34.** Identitat dels metabòlits i lípids trobats en escorça frontal en femelles porc prepuberals en ionització negativa.

Classification	Compound	Mass	RT	FC (abs)	Regulation (T1 vs. T2)	P (Corr)
<b>Metabolomic analysis</b>						
Aminoacids	Homocysteine	135,1857	1,16	581,68	up	6,0786413E-5
Bile acids	Chenodeoxycholic acid	392,2933	12,06	302,94	up	8,0139877E-4
	Ursodeoxycholic acid					

Lipidomic analysis						
Glycerophospholipids	CL(70:3)	1431,0101	10,81	23,48	down	0,03224277
	PC(P-38:6)	789,5682	6,80	69,99	down	0,03215918
	PE(34:2)	743,5605	7,38	10,43	down	0,0070136543
	PE(P-36:1)	729,5812	8,11	231,53	down	1,5623413E-4
	PE(P-38:3)	753,5707	6,15	9,768	down	0,01194393
	PS(34:0)	763,5266	6,75	44,81	down	0,030590631
	PS(36:0)	791,5614	7,26	46,47	down	8,0154085E-4
Sphingolipids	SM(d35:2)	827,7003	8,30	25,18	down	0,03677041
	Prenol lipids	Dodecaprenyl diphosphate	994,718	10,02	158,79	down

L'anàlisi univariant (prova T d'Student) mostra determinades espècies diferencials ( $p < 0,05$ ) entre el grup dieta control (T1) i el grup dieta hiperlàbrica (T2) i quina identitat es proposa basant-se en la massa exacta, RT i distribució isotòpica. RT: Temps de retenció (de l'anglès, *Retention time*); FC: Magnitud de canvi (de l'anglès, *Fold change value*).

A partir d'aquests resultats, s'ha realitzat una anàlisi de vies (Figura 46) on es mostra que les vies metabòliques més alterades en les mostres d'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal són el metabolisme de l'alanina, aspartat i glutamat, el metabolisme dels glicerofosfolípids i el metabolisme de la cisteïna i la metionina.

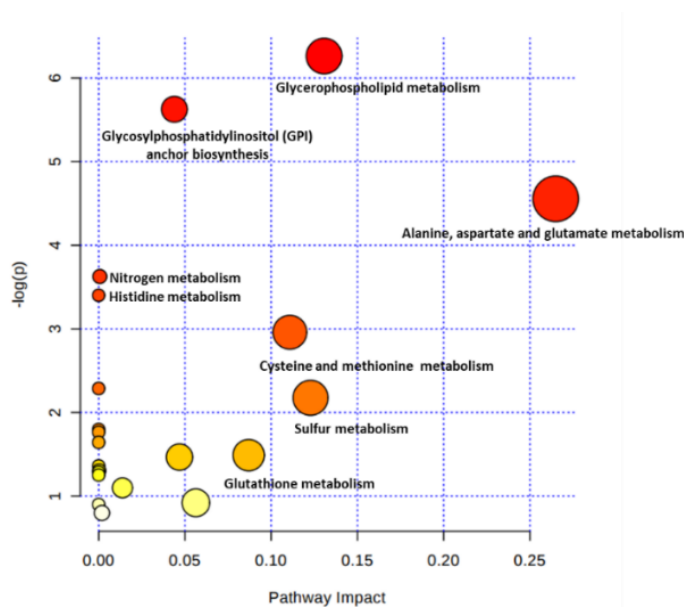


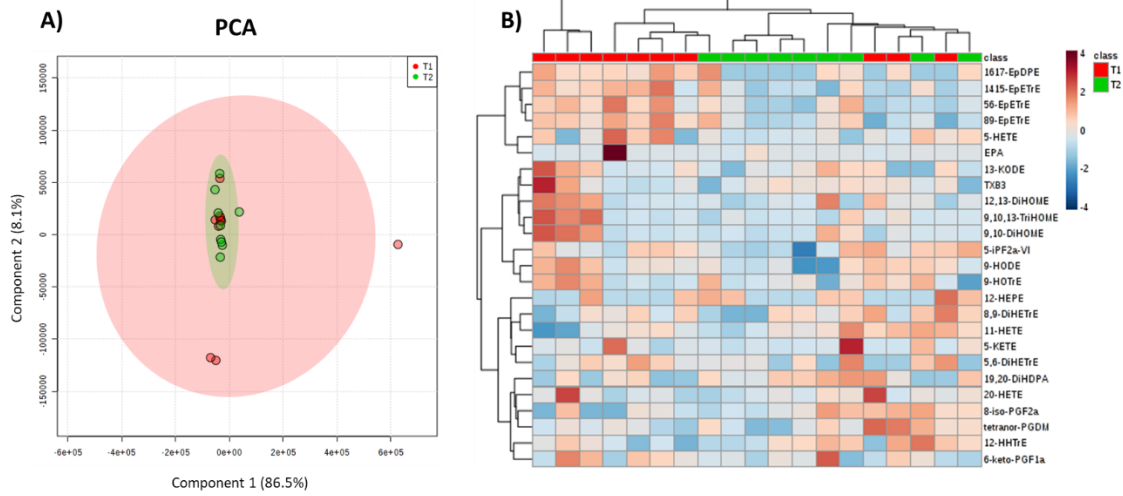
Figura 46. Representació gràfica de les vies metabòliques més alterades en escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal. La gràfica representa el log del valor de p utilitzant un test Welch (eix Y) i el percentatge d'impacte de la via (eix X). La mida dels cercles representa el nombre de metabòlits identificats que formen part d'una mateixa via.

#### 4.2.1.4 Quantificació de mediadors lipídics inflamatoris

Per establir quines són les diferències en el perfil d'oxilipines en les mostres d'escorça frontal del model d'obesitat prepuberal s'utilitza una anàlisi de lipidòmica dirigida mitjançant un sistema LC-ESI-QQQ-MS/MS.

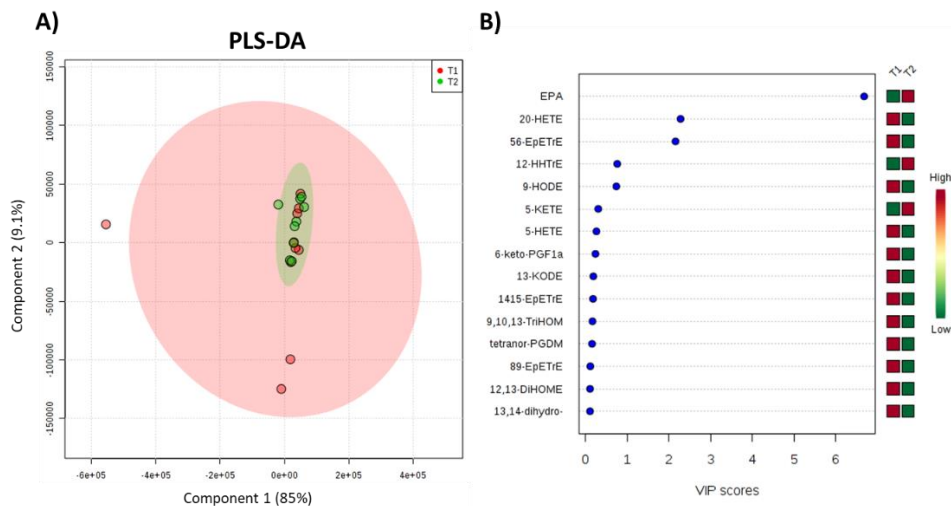
En total s'han examinat un total de 109 oxilipines però en aquest cas només s'han pogut identificar 57. Amb aquestes molècules s'ha realitzat una anàlisi multivariant no supervisada (PCA) (Figura 47A) on no s'observa un patró associat a la dieta. En canvi, mitjançant l'anàlisi d'agrupació jeràrquica utilitzant les 25 oxilipines amb un valor de p més baix entre els dos grups,

mostra que l'obesitat induïda per dieta hipercalòrica en l'escorça frontal d'aquest model animal presenta un perfil diferent, tal i com es mostra en la **Figura 47B**.



**Figura 47.** L'anàlisi multivariant no supervisada revela un perfil d'oxilipines característic en escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal. **A)** Anàlisi PCA on es mostra la separació de les dades obtingudes en la lipidòmica dirigida. **B)** Anàlisi de clusterització utilitzant les 25 oxilipines més significatives estadísticament aplicant una prova T d'Student. Cada línia del gràfic representa una massa exacta ordenada pel seu RT i, els colors mostren quina és la seva abundància relativa. Les mostres dels diferents grups s'agrupen en el dendrograma basant-se en una anàlisi de clusterització pel mètode Wards amb una mesura de distància d'Euclídea. T1: grup dieta control i T2: grup dieta hipercalòrica.

Quan s'aplica una anàlisi específic per agrupament com és el PLS-DA (**Figura 48A**), els resultats obtinguts són els mateixos que s'obtenen amb l'anàlisi PCA. La **Figura 48B** representa les oxilipines més importants que defineixen el PLS-DA on trobem com l'EPA com a màxim contribuïdor en aquesta separació seguit de 20-HETE, 5,6-EpETrE, 12-HHTrE i el 9-HODE.



**Figura 48.** L'estadística multivariant supervisada indica que la concentració d'oxilipines en escorça frontal no és capaç de discriminar els animals que han ingerit una dieta hipercalòrica. **A)** L'anàlisi PLS-DA defineix una signatura lipidòmica específica per a cada grup; **B)** Oxilipines més importants que defineixen el PLS-DA. T1: grup dieta control i T2: grup dieta hipercalòrica.

Els resultats obtinguts en la prova de validació creuada són un valor de  $R^2=0,05$  i un valor de  $Q^2=0,8$  i en el test de permutació valors de  $p>0,05$  en aquest conjunt de lípids suggerint que la capacitat predictiva és millorable.

Posteriorment, i amb l'objectiu de definir quins d'aquests lípids presenten diferències significatives entre els dos grups en escorça frontal, s'ha aplicat una prova T d'Student. Els resultats obtinguts, representats en la **Taula 35**, mostren que la ingesta d'una dieta hipercalòrica no produeix diferències significatives en el perfil d'oxilipines analitzades en el CNS d'aquests animals.

**Taula 35.** Concentracions (ng/mL) de les oxilipines derivades dels diferents PUFA en escorça frontal del grup control (T1) respecte al grup dieta hipercalòrica (T2).

Lipid	T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (test T Student)
<b>AA derived lipids</b>			
PGD <sub>2</sub>	18,6 ± 1,5	16,6 ± 2,5	0,4896
PGF <sub>2α</sub>	49,7 ± 4,4	49,8 ± 7,9	0,9945
PGE <sub>2</sub>	1,1 ± 0,0	1,4 ± 0,2	0,1499
13,14-dihydro-15-keto-PGE <sub>2</sub>	5,9 ± 1,2	3,5 ± 0,8	0,1275
8-isoPGE <sub>2</sub>	1,2 ± 0,1	1,4 ± 0,2	0,2489
6-keto-PGF <sub>1α</sub>	9,4 ± 1,5	6,7 ± 0,8	0,1666
12-HHTrE	22,2 ± 2,3	21,8 ± 3,4	0,9281
5-HETE	11,8 ± 1,3	8,6 ± 0,9	0,0797
5-KETE	9,4 ± 2,1	7,5 ± 1,4	0,4961
8-HETE	1,4 ± 0,4	1,6 ± 0,3	0,6999
9-HETE	5,4 ± 1,2	5,2 ± 1,2	0,9128
11-HETE	6,3 ± 0,4	5,8 ± 0,7	0,5664
12-HETE	5,8 ± 0,7	4,2 ± 0,5	0,1032
15-HETE	12,4 ± 0,9	9,9 ± 1,3	0,1273
15-KETE	7,2 ± 1,5	5,8 ± 1,0	0,4594
20-HETE	68,6 ± 17,9	45,0 ± 5,8	0,2476
5,6-DiHETrE	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,9730
8,9-DiHETrE	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,8149
11,12-DiHETrE	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3082
14,15-DiHETrE	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,2	0,8283
5(6)-EpETrE	49,1 ± 9,1	35,7 ± 6,4	0,2546
8(9)-EpETrE	5,3 ± 0,8	4,0 ± 0,6	0,2039
11(12)-EpETrE	4,2 ± 0,6	3,2 ± 0,5	0,2408
14(15)-EpETrE	5,2 ± 0,8	4,2 ± 0,6	0,3870
TXB <sub>2</sub>	3,3 ± 0,3	3,8 ± 0,6	0,4678
PGB <sub>2</sub>	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,6297
12-KETE	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,5539
LTB <sub>4</sub>	ND	ND	
PGJ <sub>2</sub>	ND	ND	
delta-12-PGJ <sub>2</sub>	ND	ND	
5,15-DiHETE	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,9792
5-iPGF <sub>2α</sub> -VI	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,2802
8-isoPGF <sub>2α</sub>	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,9757
11-keto-TXB <sub>2</sub>	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3689
19-HETE	ND	ND	
11B-PGF <sub>2α</sub>	ND	ND	
20-COOH-LTB <sub>4</sub>	ND	ND	
LTE <sub>4</sub>	ND	ND	
6-trans-LTB <sub>4</sub>	ND	ND	
20-OH-LTB <sub>4</sub>	ND	ND	
8,15-DiHETE	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7038
LXA <sub>4</sub>	ND	ND	
LXB <sub>4</sub>	ND	ND	
iPGF <sub>2α</sub> -IV	ND	ND	

Lipid	T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (test T Student)
tetranor-PGEM	ND	ND	
tetranor-PGDM	ND	ND	
15-epi-LXA <sub>4</sub>	ND	ND	
14,15-LTE <sub>4</sub>	ND	ND	
15-deoxy-delta-12,14-PGJ <sub>2</sub>	ND	ND	
<b>LA derived lipids</b>			
9-HODE	16,5 ± 1,1	13,8 ± 1,0	0,1037
9-KODE	10,4 ± 0,9	9,2 ± 0,8	0,3286
9(10)-EpOME	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,1	0,9984
12(13)-EpOME	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,2	0,9854
9,10-DiHOME	2,8 ± 0,7	1,4 ± 0,2	0,0831
12,13-DiHOME	2,6 ± 0,6	1,6 ± 0,2	0,1223
9,10,13-TriHOME	2,5 ± 0,7	1,7 ± 0,4	0,3123
9,12,13-TriHOME	1,8 ± 0,5	1,2 ± 0,3	0,2833
EKODE	2,0 ± 0,8	2,1 ± 1,1	0,9070
12(13)-EpODE	ND	ND	
<b>GLA derived lipids</b>			
13-HODE	25,3 ± 2,2	21,6 ± 1,9	0,2212
13-KODE	5,4 ± 0,7	4,3 ± 0,5	0,2454
<b>DGLA derived lipids</b>			
15-HETrE	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,9248
PGE <sub>1</sub>	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,9290
13-HOTrE(γ)	ND	ND	
TXB <sub>1</sub>	ND	ND	
PGD <sub>1</sub>	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3327
8-HETrE	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,5029
<b>DHA derived lipids</b>			
DHA	Over	Over	
4-HDoHE	3,0 ± 0,4	2,8 ± 0,5	0,7412
11-HDoHE	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,0827
17-HDoHE	3,4 ± 0,4	2,8 ± 0,6	0,4657
19,20-DiHDPA	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5757
16(17)-EpDPE	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,1631
19(20)-EpDPE	2,7 ± 0,2	2,5 ± 0,3	0,6176
10,17-DiHDoHE	ND	ND	
7-Maresin-1	ND	ND	
RvD <sub>1</sub>	ND	ND	
RvD <sub>2</sub>	ND	ND	
17-epi-RvD <sub>1</sub>	ND	ND	
8-HDoHE	ND	ND	
14-HDoHE	3,5 ± 0,3	3,1 ± 0,4	0,5210
<b>EPA derived lipids</b>			
EPA	22,7 ± 3,9	21,2 ± 2,8	0,7682
12-HEPE	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,8668
14,15-DiHETE	ND	ND	
11-HEPE	ND	ND	
8-HEPE	ND	ND	
5-HEPE	ND	ND	
17,18-DiHETE	ND	ND	
18-HEPE	ND	ND	
TXB <sub>3</sub>	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,1	0,7979
15-HEPE	ND	ND	
9-HEPE	ND	ND	
14(15)-EpETE	ND	ND	
17(18)-EpETE	ND	ND	
PGD <sub>3</sub>	ND	ND	

Lipid	T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (test T Student)
PGE <sub>3</sub>	ND	ND	
5,6-DiHETE	ND	ND	
LXA <sub>5</sub>	ND	ND	
8-iso-PGF <sub>3α</sub>	ND	ND	
11-keto-TXB <sub>3</sub>	ND	ND	
<b>EDA derived lipids</b>			
15-HEDE	ND	ND	
11-HEDE	ND	ND	
15-KEDE	ND	ND	
<b>ETA derived lipids</b>			
5-HETrE	ND	ND	
LTB <sub>3</sub>	ND	ND	
<b>ALA derived lipids</b>			
9-HOTrE	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,9315
9-KOTrE	ND	ND	
13-HOTrE	ND	ND	
<b>DPA derived lipids</b>			
7,17-hydroxy-DPA	ND	ND	

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup. **AA:** Àcid araquidònic; **LA:** Àcid linoleic; **GLA:** Àcid gamma-linoleic; **DGLA:** Àcid dihomog-linolènic; **DHA:** Àcid docosahexaènic; **EPA:** Àcid eicosapentaènic; **EDA:** Àcid 11,14-eicosadiènic; **ETA:** Àcid 5,8,11-eicosatriènic; **ALA:** Àcid α-linolènic; **DPA:** Àcid docosapentaènic. **ND:** No detectable; **Over:** per damunt dels límits quantificables.

A partir dels resultats obtinguts en la quantificació d'oxilipines en les mostres de plasma i d'escorça frontal, ens vàrem plantejar la idea que algunes d'aquestes oxilipines podrien estar-se generant *in situ* en el cervell o que, senzillament, podrien estar creuant la barrera hematoencefàlica acumulant-se en aquest òrgan. Per tal d'abordar aquesta idea, s'han realitzat ratios d'aquests valors, tenint en compte només els animals que han ingerit una dieta control, on s'han considerat les ratios superiors a 10, indicant un ordre de magnitud superior en escorça frontal i, les ratios inferiors a 0,1 per indicar un ordre de magnitud inferior en escorça frontal. Els resultats obtinguts es mostren la **Taula 36**.

**Taula 36.** Ratios entre les concentracions de les oxilipines quantificades en les mostres d'escorça frontal i plasma del grup control.

Lipid	Ratio Brain/Plasma average±SEM
<b>AA derived lipids</b>	
PGD <sub>2</sub>	185,732 ± 87,656
PGF <sub>2α</sub>	13,526 ± 4,549
13,14-dihydro-15-keto-PGE <sub>2</sub>	57,743 ± 9,563
8-isoPGE <sub>2</sub>	20,911 ± 3,899
6-keto-PGF <sub>1α</sub>	36,54 ± 6,743
12-HHTrE	11,995 ± 3,874
5-KETE	58,474 ± 15,63
9-HETE	15,538 ± 12,418
15-KETE	22,05 ± 4,393
20-HETE	23,096 ± 6,948
5(6)-EpETrE	64,195 ± 16,505
8(9)-EpETrE	46,931 ± 18,912
11(12)-EpETrE	18,879 ± 4,173
14(15)-EpETrE	10,885 ± 2,468
<b>LA derived lipids</b>	
9,10-DiHOME	40,309 ± 8,778



12,13-DiHOME	0,04 ± 0,01
<b>GLA derived lipids</b>	
13-HODE	0,11 ± 0,019
<b>DGLA derived lipids</b>	
PGE <sub>1</sub>	12,22 ± 6,053
<b>DHA derived lipids</b>	
11-HDoHE	31,669 ± 8,265
17-HDoHE	41,362 ± 8,372
16(17)-EpDPE	18,609 ± 4,258
19(20)-EpDPE	10,09 ± 2,337
<b>ALA derived lipids</b>	
9-HOTrE	0,08 ± 0,017

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de 10 animals.

A més, també hi ha certes oxilipines que es detecten en escorça frontal i no en les mostres de plasma, com ara l'oxilipina 14-HDoHE, derivada del DHA, o la 8,15-DiHETE derivada de l'AA. Per contra, hi ha altres oxilipines que es detecten en plasma però no en escorça frontal.

A continuació, i per tal de saber si l'obesitat podria variar la permeabilitat a aquests productes per la barrera hematoencefàlica, quina funció s'ha estimat a través de les ratios, s'ha realitzat una anàlisi estadística mitjançant una prova Levene, on només s'han trobat diferències significatives en l'oxilipina 13-HODE, derivada del GLA per l'acció de l'enzim LOX, que es troba molt poc concentrada en escorça frontal respecte el plasma. Aquests resultats estan dipositats en el repositori virtual Figshare (doi: 10.6084/m9.figshare.11770617).

#### 4.2.1.5 Anàlisi composicional dels àcids grassos

Seguidament s'ha analitzat la influència de la dieta hipercalòrica en el perfil d'àcids grassos mitjançant la tècnica GC-FID. En la **Taula 37** es mostren els resultats de tots els àcids grassos analitzats en aquest experiment, on no s'observen canvis significatius en cap d'ells. Per tant, es podria dir que la dieta hipercalòrica no estaria induint canvis en el perfil d'àcids grassos en escorça frontal, en aquest model porcí d'obesitat prepuberal.

**Taula 37.** Composició lipídica en escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup control (T1) respecte al grup dieta hipercalòrica (T2).

Lipid	T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (Student's t-test)
C14:0	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,3918
C16:0	24,05 ± 0,3	24,1 ± 0,2	0,9155
C16:1 n7	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,4079
C18:0	23,1 ± 0,2	23,3 ± 0,3	0,6817
C18:1 n9 cis	18,6 ± 0,5	18,6 ± 0,3	0,9539
C18:1 n9 trans	5,6 ± 0,1	5,5 ± 0,0	0,4013
C18:2 n6	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,1101
C18:3 n3	0,02 ± 0,0	0,02 ± 0,0	0,2220
C18:4 n3	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1023
C20:0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,9476
C20:1 n9	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,4830

Lipid	T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (Student's t-test)
C20:2 n6	0,03 ± 0,0	0,03 ± 0,0	0,4903
C20:3 n6	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,0716
C20:4 n6	9,8 ± 0,2	9,9 ± 0,2	0,7406
C20:5 n3	0,01 ± 0,0	0,01 ± 0,0	0,7278
C22:0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,9047
C22:1 n9	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,6434
C22:4 n6	0,09 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,7278
C22:5 n6	4,4 ± 0,1	4,4 ± 0,1	0,8755
C22:5 n3	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	>0,9999
C22:6 n3	8,96 ± 0,3	9,03 ± 0,3	0,8774

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup.

#### 4.2.1.5.1 Índexs derivats de la composició en àcids grassos

A partir de l'anàlisi composicional dels àcids grassos s'han calculat una sèrie d'índexs que ens indiquen els canvis composicionals de forma global (**Taula 38**) però, en aquest cas, tampoc s'han observat canvis significatius entre els dos grups d'estudi.

**Taula 38.** Índex derivats de la composició en àcids grassos en l'escorça frontal del grup control (T1) respecte al grup dieta hipercalòrica (T2).

Fatty acid indexes	T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (Student's t-test)
ACL	18,136 ± 0,149	18,282 ± 0,013	0,9823
SFA	48,525 ± 0,391	48,789 ± 0,268	0,9787
UFA	50,736 ± 0,822	51,211 ± 0,268	0,9932
MUFA	26,339 ± 0,649	26,234 ± 0,29	0,9999
PUFA	24,397 ± 0,601	24,977 ± 0,375	0,8363
PUFAn6	15,383 ± 0,338	15,711 ± 0,213	0,8257
PUFAn3	9,014 ± 0,354	9,266 ± 0,269	0,9488
DBI	144,168 ± 3,093	146,665 ± 1,835	0,9372
PI <sub>n</sub>	139,403 ± 3,898	142,365 ± 2,606	0,9213
AI	95,876 ± 3,164	96,797 ± 2,876	0,9969

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup. **ACL:** Longitud mitjana de la cadena (de l'anglès, *Average chain length*); **SFA:** Àcids grassos saturats (de l'anglès, *Saturated fatty acids*); **UFA:** Àcids grassos insaturats (de l'anglès, *Unsaturated fatty acids*); **MUFA:** Àcids grassos monoinsaturats (de l'anglès, *Monounsaturated fatty acids*); **PUFA:** Àcids grassos poliinsaturats (de l'anglès, *Polyunsaturated fatty acids*); **PUFAn6:** Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n6 (de l'anglès, *n6 Polyunsaturated fatty acids*); **PUFAn3:** Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n3 (de l'anglès, *n3 Polyunsaturated fatty acids*); **DBI:** Índex de dobles enllaços (de l'anglès, *Double bond index*); **PI<sub>n</sub>:** Índex de peroxidibilitat (de l'anglès, *Peroxidizability index*); **AI:** Índex antiinflamatori (de l'anglès, *Anti-inflammatory index*).

#### 4.2.1.5.2 Estimació de les activitats desaturases i elongases

A partir de l'anàlisi composicional en àcids grassos també s'han estimat les activitats desaturases (**Taula 39**) i elongases (**Taula 40**) però en la mateixa línia del que s'ha descrit, no s'observen diferències significatives en aquestes estimacions.

**Taula 39.** Estimació de l'activitat desaturasa en escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup control (T1) respecte al grup dieta hipercalòrica (T2).

		T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (Student's t-test)
Δ5 (n6)	C20:4/C20:3	20,603 ± 0,771	19,222 ± 0,6	0,1745
Δ6 (n3)	C18:4/C18:3	4,739 ± 0,47	5,736 ± 0,447	0,1417
Δ8 (n6)	C20:3/C20:2	15,069 ± 0,358	15,935 ± 0,881	0,3944

		T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (Student's t-test)
Δ9 (n7)	C16:1/C16:0	0,033 ± 0,001	0,033 ± 0,001	>0,9999
Δ9 (n9)	C18:1/C18:0	1,047 ± 0,026	1,039 ± 0,015	0,7929

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup.

**Taula 40.** Estimació de l'activitat elongasa en escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup control (T1) respecte al grup dieta hipercalòrica (T2).

		T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (Student's t-test)
Elovl 3 (n9)	C20:1/C18:1	0,025 ± 0,001	0,024 ± 0,001	0,4886
Elovl 5 (n6)	C20:2/C18:2	0,049 ± 0,002	0,047 ± 0,003	0,5859
Elovl 6 (n9)	C18:0/C16:0	0,963 ± 0,014	0,967 ± 0,016	0,8529
Elovl 1-3-7 <sup>a</sup> (n9)	C20:0/C18:0	0,011 ± 0,001	0,011 ± 0	>0,9999
Elovl 1-3-7 <sup>b</sup> (n9)	C22:0/C20:0	1,381 ± 0,033	1,408 ± 0,024	0,5165
Elovl 2-5 (n6)	C22:4/C20:4	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,001	>0,9999
Elovl 2-5 (n3)	C22:5/C20:5	6,253 ± 0,978	5,251 ± 0,519	0,3774

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup.

#### 4.2.1.6 Anàlisi de marcadors de modificació oxidativa proteica

Paral·lelament a l'anàlisi del perfil en àcids grassos s'ha realitzat l'anàlisi de modificació proteica en les mostres d'escorça d'aquest model animal per veure quina es l'afectació de la dieta hipercalòrica en el CNS mitjançant la tècnica de GC/MS.

Els diferents marcadors que s'han estudiat han estat en HAVA com a marcador de dany oxidatiu directe a proteïnes, el CEL per dany glicooxidatiu, el MDAL pel dany lipooxidatiu i CMC i CML com marcadors de dany glico- i lipooxidatiu.

Els valors obtinguts es representen en la **Taula 41** on es pot observar que hi ha un augment significatiu de modificació oxidativa a proteïnes derivat de l'oxidació de lípids en escorça frontal del grup dieta hipercalòrica. Podem dir doncs que tot i no observar canvis en aquest paràmetre en plasma, la dieta hipercalòrica indueix un augment del dany lipooxidatiu en escorça frontal.

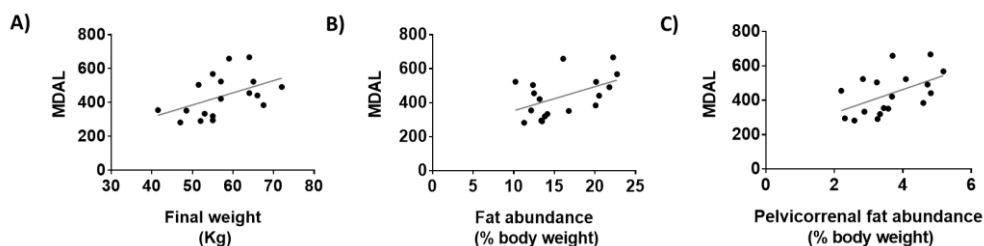
**Taula 41.** Marcadors de dany oxidatiu en escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup control (T1) respecte al grup dieta hipercalòrica (T2).

Markers	T1 average±SEM	T2 average±SEM	[T1 vs. T2] p-value (Student's t-test)
HAVA	18989,7 ± 739	17649,9 ± 1198	0,3454
CEL	297,8 ± 28,8	237,3 ± 17,6	0,0994
CML	1083,1 ± 51,6	1138,9 ± 49	0,4459
MDAL	378,2 ± 28,8	510,8 ± 41,5	<b>0,0156</b>
CMC	225,4 ± 10,3	256,9 ± 20,2	0,2016

Els valors s'expressen com a μmol de HAVA, CEL, MDAL, CML i CMC / mol de lisina i es representen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals. **HAVA:** Àcid aminovalèric; **CEL:** N<sup>ε</sup>-carboxietil-lisina; **CML:** N<sup>ε</sup>-carboximetil-lisina; **MDALys:** Malondialdehid-lisina; **CMC:** S-(carboximetil)-cisteïna.

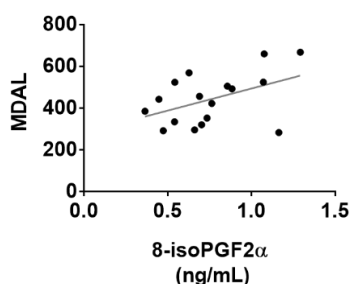
Degut als canvis que s'observen en el marcador de lipooxidació MDAL, s'han volgut correlacionar aquests valors individuals amb el pes final o variables relacionades amb el teixit adipós com el

percentatge de greix total i el percentatge de greix pèlvic-renal (**Figura 49**). Els resultats mostren una correlació positiva entre aquestes variables i l'acumulació de MDAL en escorça frontal.



**Figura 49.** La concentració de MDAL mostra una relació significativa amb el pes final i amb variables relacionades amb el teixit adipós. Correlació significativa ( $p < 0,05$ ) entre la concentració de MDAL en escorça frontal amb **A)** pes final ( $p = 0,0472$  i  $R^2 = 0,2242$ ); **B)** amb l'abundància de greix total ( $p = 0,0393$  i  $R^2 = 0,2395$ ) i **C)** amb l'abundància de greix pèlvic-renal ( $p = 0,0298$  i  $R^2 = 0,2621$ ) mesurat amb TC.

El 8-isoprostà F2 $\alpha$ , oxilipina derivada de l'AA per l'acció de l'enzim COX, és també un marcador de peroxidació lipídica (Codoñer-Franch *et al.* 2011). Per aquest motiu, també s'han volgut correlacionar aquests valors amb els valors obtinguts de la quantificació d'aquesta oxilipina quantificada en les mostres d'escorça. Els resultats es mostren en la **Figura 50** i, tot i que existeix una tendència, la correlació entre aquests dos marcadors de peroxidació lipídica no esdevé significativa.



**Figura 50.** La correlació entre dos marcadors típics de peroxidació lipídica no esdevé significativa. Correlació entre la concentració de MDAL ( $\mu\text{mol MDAL/mol Lisina}$ ) i l'oxilipina 8-isoPGF2 $\alpha$  amb valor de  $p = 0,06$  i una  $R^2 = 0,2097$ .

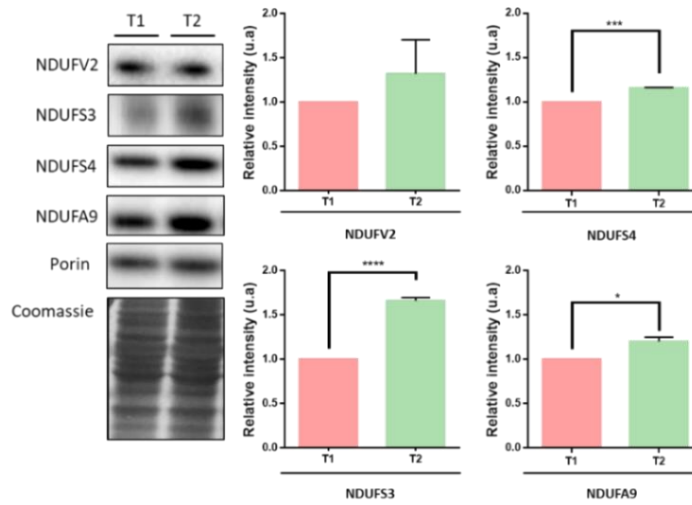
#### 4.2.1.6.1 Determinació del contingut de complexes mitocondrial

Tal i com s'ha explicat en la introducció, la cadena de transport d'electrons és la màxima responsable de la producció de ROS a la cèl·lula. Degut als resultats obtinguts en la lesió oxidativa proteica en mostres d'escorça frontal, s'ha volgut analitzar si les subunitats d'aquesta cadena respiratòria estan afectades per una dieta hipercalòrica. La tècnica utilitzada per a realitzar aquestes anàlisis ha estat la immunodetecció per Western Blot i tots els càlculs s'han relativitzat amb la càrrega de porina.

##### 4.2.1.6.1.1 Complex I

S'ha analitzat la quantitat de les subunitat NDUFV2, NDUFS3, NDUFS4 i NDUFA9 del complex I de la cadena de transport electrònic mitocondrial (**Figura 51**). Si ens centrem en cada subunitat per separat, en la subunitat NDUFV2 no s'observen diferències significatives entre els grups tot

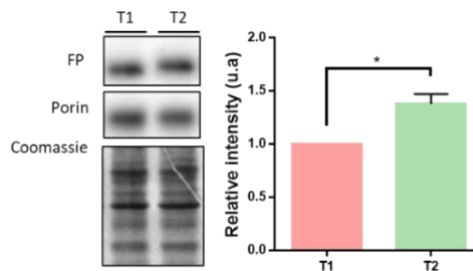
i que, s'observa una tendència a l'alça quan es compara el grup dieta hipercalòrica respecte al grup control. Les subunitats *NDUFS3*, *NDUFS4* i *NDUFA9* mostren un augment significatiu en el seu contingut en el grup dieta hipercalòrica respecte al grup control.



**Figura 51.** L'obesitat induïda per dieta provoca un augment en el contingut d'algunes subunitats del complex I en l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal. Quantitat de les subunitats *NDUFV2*, *NDUFS3*, *NDUFS4* i *NDUFA9* del complex I en escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup control (T1) i del grup dieta hipercalòrica (T2). Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi dels grups experimentals respecte al grup control calculant la relació de la densitometria de CI/densitometria de porina i estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM de mínim 8 animals per grup. Els asteriscs representen diferències significatives on \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  i \*\*\*\* $p < 0,0001$  per la prova T d'Student.

#### 4.2.1.6.1.1 Complex II

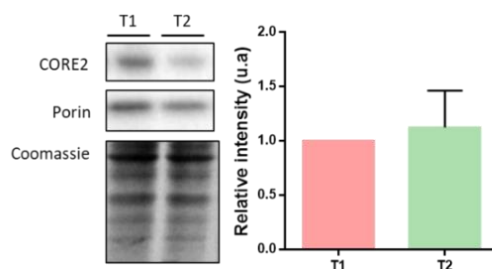
S'ha analitzat la subunitat Flavoproteïna del complex II de la cadena de transport electrònic mitocondrial (**Figura 52**) on s'observa un augment significatiu del grup amb dieta hipercalòrica respecte al grup control.



**Figura 52.** L'obesitat induïda per dieta provoca un augment en el contingut del complex II en l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal. Quantitat de la subunitat *Flavoprotein* del complex II en escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup control (T1) i del grup dieta hipercalòrica (T2). Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi dels grups experimentals respecte al grup control calculant la relació de la densitometria de CII/densitometria de porina i estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM de mínim 8 animals per grup. Els asteriscs representen diferències significatives on \* $p < 0,05$  per la prova T d'Student.

#### 4.2.1.6.1.2 Complex III

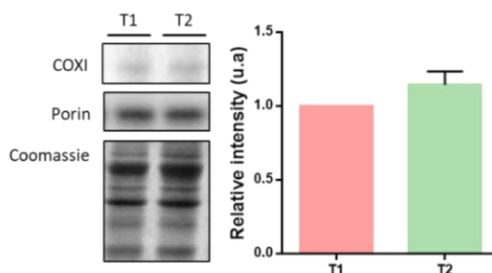
S'ha analitzat la quantitat de la subunitat *CORE2* del complex III de la cadena de transport electrònic mitocondrial (**Figura 53**). No s'observen canvis significatius en el contingut d'aquesta subunitat del complex III.



**Figura 53.** L'obesitat no provoca canvis en el complex III en l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal. Quantitat de les subunitats *CORE2* del complex III en escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup control (T1) i del grup dieta hipercalòrica (T2). Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi dels grups experimentals respecte al grup control calculant la relació de la densitometria de ClI/densitometria de porina i estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM de mínim 8 animals per grup.

#### 4.2.1.6.1.3 Complex IV

S'ha analitzat la quantitat de *COXI* del complex IV de la cadena de transport electrònic mitocondrial (**Figura 54**). No s'observen diferències significatives en el contingut d'aquesta subunitat del complex IV.



**Figura 54.** L'obesitat no produeix canvis en el contingut del complex VI en l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal. Quantitat de les subunitats *COXI* del complex III en escorça frontal de porc del grup control (T1) i del grup dieta hipercalòrica (T2). Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi dels grups experimentals respecte al grup control calculant la relació de la densitometria de ClI/densitometria de porina i estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM de mínim 8 animals per grup.

#### 4.2.1.6.2 Metabolisme energètic

Donat que la dieta hipercalòrica és capaç de modificar la composició d'alguns dels component de la cadena respiratòria mitocondrial es planteja l'anàlisi de metabòlits relacionats amb el metabolisme energètic. Per aquest motiu, es realitza la quantificació dels metabòlits que formen el cicle del TCA per tal de determinar si hi ha alteracions en aquesta via en el CNS produïts per la ingesta d'una dieta hipercalòrica mitjançant una anàlisi de metabolòmica dirigida on les mostres s'han analitzat en un sistema LC-ESI-QQQ-MS/MS. La **Figura 55** representa un esquema del cicle del TCA on es comparen els nivells presents en els animals alimentats amb una dieta control respecte als alimentats amb una dieta hipercalòrica. No s'han detectat diferències entre els dos grups experimentals, suggerint que els canvis induïts en la cadena respiratòria mitocondrial no es veuen reflexats a nivell de metabolisme energètic.

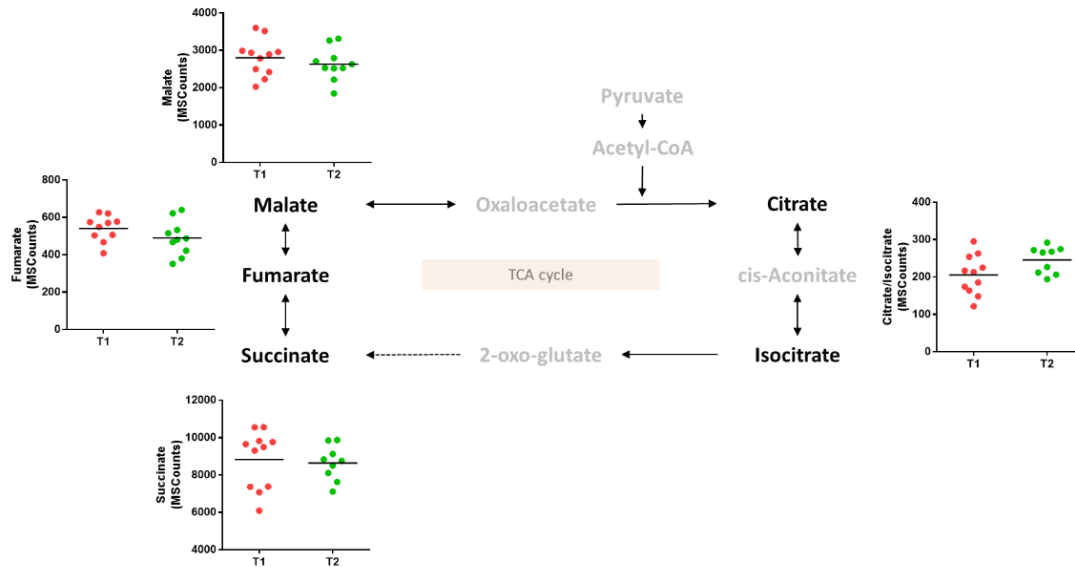


Figura 55. L'obesitat no mostra canvis en la concentració dels metabòlits que formen el cicle de l'àcid tricarboxílic en l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal. Esquema representatiu dels metabòlits que formen el cicle de l'àcid tricarboxílic on els valors representats indiquen les concentracions (avaluades mitjançant l'espectre de masses (*MS Counts*)) en escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup control (T1) respecte al grup dieta hipercalòrica (T2). Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM de mínim 8 animals per grup.

### 4.3. Estudi dels efectes d'una intervenció nutricional basada en probiòtics en el perfil metabolòmic i lipídomic plasmàtic del model animal d'obesitat

El tercer objectiu d'aquesta tesi ha estat l'avaluació de l'efecte de la proteïna d'arròs hidrolitzada, del *Bifidobacterium breve* i de l'omega-3 juntament amb la dieta hipercalòrica en el model experimental d'obesitat prepuberal. Per tal d'assolir aquest objectiu s'ha realitzat una anàlisi comparativa entre el grup dieta hipercalòrica (grup alimentat amb una dieta hipercalòrica que conté el 12% de greix), el grup probiòtic (grup alimentat amb una dieta hipercalòrica suplementada amb proteïna d'arròs hidrolitzada i *Bifidobacterium breve*) i el grup probiòtic més omega-3 (grup alimentat amb la mateixa dieta descrita anteriorment juntament amb un suplement de 2% d'omega-3). En aquest capítol de la tesi s'ha volgut estudiar l'efecte d'aquest probiòtic (amb o sense omega-3) per saber quin és el seu efecte sobre el metabolisme i el potencial paper que pot tenir en la prevenció de l'obesitat infantil.

#### 4.3.1 Influència dels probiòtics en les característiques morfològiques i bioquímiques del model porcí d'obesitat prepuberal

Les característiques morfològiques i el consum de calories dels animals es mostren en la **Taula 42**. Els tres grups han ingerit el mateix contingut en calories per dia. Tot i això, el grup probiòtic i el grup probiòtic més omega-3 mostren una disminució significativa del seu pes final. Aquesta

disminució del pes final no s'observa en la mesura del greix, ja que els tres grups tenen el mateix contingut d'adipositat mesurat per TC.

**Taula 42.** Característiques morfològiques i consum de calories del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).

Parameter	T2 average±SEM	T3 average±SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average±SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
Initial weight (Kg)	16,7 ± 0,67	16,3 ± 0,6	0,547	16,27 ± 0,41	0,600	0,853
Final weight (Kg)	60 ± 2,52	52,2 ± 2,12	<b>0,019</b>	50,23 ± 2,07	<b>0,008</b>	0,705
Weight gain (Kg/d)	0,69 ± 0,03	0,57 ± 0,03	<b>0,008</b>	0,54 ± 0,03	<b>0,005</b>	0,616
Caloric consumption (Kcal/d)	5213,93 ± 155,85	4868,25 ± 156,87	0,153	4693,72 ± 196,73	0,059	0,475
Relative fat volume at VL2 (%)	19,35 ± 0,78	18,36 ± 0,66	0,196	17,74 ± 0,68	0,153	0,86
Pelvico-renal fat weight (Kg)	0,41 ± 0,02	0,36 ± 0,03	0,213	0,32 ± 0,03	0,053	0,481

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup i el valor de p aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey. **Relative fat volume at VL2:** Percentatge de greix subcutani i intramuscular en relació al volum total de la imatge mesurat en la segona vèrtebra lumbar.

Pel que fa a les característiques bioquímiques associades a l'obesitat avaluades (**Taula 43**), els animals alimentats amb la dieta hipercalòrica juntament amb el probiòtic no mostren diferències significatives en cap dels paràmetres estudiats. Tot i això, quan es compara el grup probiòtic més omega-3 respecte el grup hipercalòric s'observa una disminució dels nivells de colesterol LDL. Quan es comparen els resultats dels dos grups suplementats s'observa que el grup probiòtic més omega-3 té nivells més baixos de colesterol HDL i de TG.

**Taula 43.** Característiques bioquímiques del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).

Parameter	T2 average±SEM	T3 average±SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average±SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
Cholesterol (mg/dL)	155,74 ± 26,44	170,91 ± 10,06	0,385	144,19 ± 10,94	0,419	0,130
LDL-Cholesterol (mg/dL)	57,11 ± 8,52	52,17 ± 2,86	0,147	45,33 ± 2,29	<b>0,003</b>	0,129
HDL-Cholesterol (mg/dL)	61,36 ± 13,9	69,72 ± 2,64	0,155	59,1 ± 3,59	0,700	<b>0,040</b>
Triacylglyceride (mg/dL)	29,22 ± 5,94	33,15 ± 1,77	0,132	25,15 ± 2,21	0,205	<b>0,010</b>
Glucose (mg/dL)	108,54 ± 23,99	117,12 ± 11,39	0,532	119,78 ± 9,3	0,369	0,893
Fructosamine (mg/dL)	152,14 ± 46,81	179,68 ± 6,23	0,094	165,97 ± 6,91	0,394	0,161
Insulin (pg/mL)	5,77 ± 0,13	5,59 ± 0,1	0,4791	5,58 ± 0,08	0,4455	0,9981
HOMA-IR	1,56 ± 0,13	1,62 ± 0,18	0,9679	1,65 ± 0,13	0,9309	0,9920

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup i el valor de p aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey. **HOMA-IR:** Model homeostàtic per avaluar la resistència a la insulina (de l'anglès, *Homeostatic model assessment for insulin resistance*).

### 4.3.2 Influència dels probiòtics sobre el perfil metabòlic i lipídic plasmàtic i en escorça frontal en el model porcí d'obesitat prepuberal

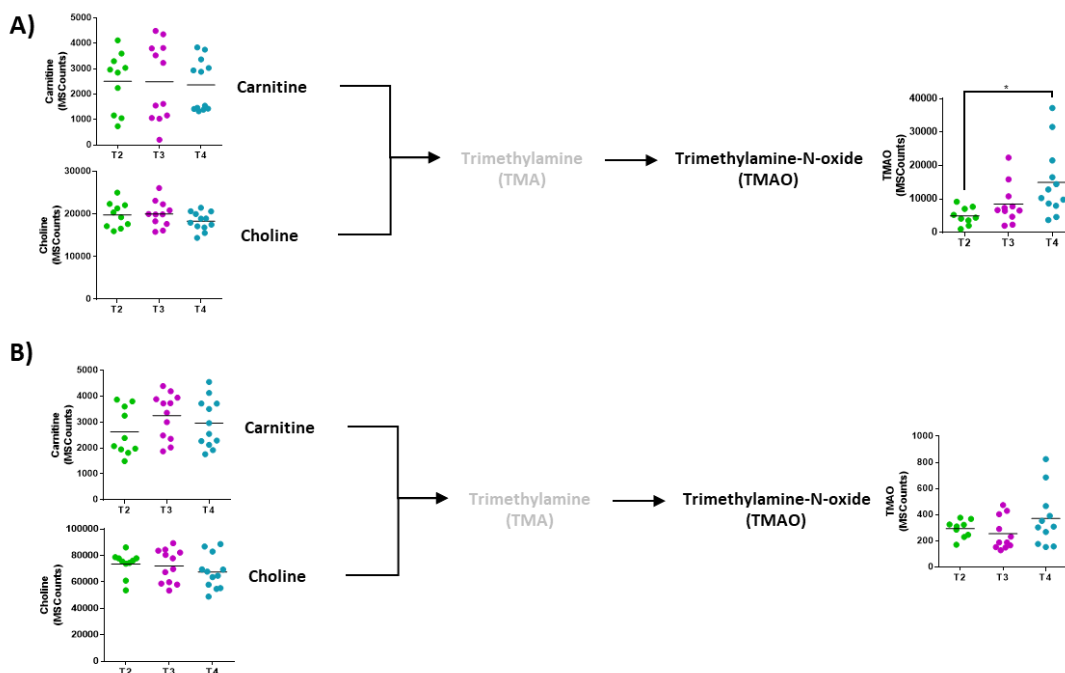
#### 4.3.2.1 Anàlisi de molècules rellevants associades a l'obesitat

Mitjançant l'anàlisi de metabòlica dirigida s'han quantificat els nivells de carnitina, colina i TMAO i els metabòlits del metabolisme de la metionina en les mostres de plasma i en les mostres d'escorça frontal per veure quin és l'efecte dels probiòtics en aquestes vies metabòliques.



Els resultats obtinguts en el plasma d'aquests animals indiquen que el grup probiòtic més omega-3 indueix un augment en els nivells de TMAO mentre que, la suplementació amb només el probiòtic no indueix cap canvi (**Figura 56A**). En canvi no varia el contingut de carnitina ni colina. Els resultats obtinguts en escorça frontal indiquen que aquests probiòtics no tenen cap efecte en els metabòlits analitzats (**Figura 56B**).

Respecte a la via de la metionina, els probiòtics no tenen cap efecte quan s'analitzen les mostres de plasma, excepte en els nivells de betaïna que augmenten amb la suplementació amb probiòtic i amb probiòtic més omega-3 (**Figura 57A**). En canvi, en les mostres d'escorça frontal els resultats mostren l'existència de variacions en els nivells de l'HCys i cistationina, mentre que els altres metabòlits no varien després de la suplementació amb probiòtics (**Figura 57B**). L'HCys mostra nivells augmentats significativament en el grup probiòtic respecte al grup dieta hipercalòrica i, aquest augment disminueix quan hi ha presència de l'omega-3 en la dieta. Respecte a la cistationina s'obtenen nivells augmentats en el grup probiòtic respecte el grup dieta hipercalòrica tot i així, el probiòtic més l'omega-3 no indueix cap canvi.



**Figura 56.** L'efecte del probiòtic i omega-3 en obesitat produeix un augment dels nivells de TMAO en plasma. Es mostra un esquema representatiu de la via de formació del TMAO en **A)** mostres de plasma i **B)** en escorça frontal tenint en compte els tres grups experimentals del treball. Els valors representats en les gràfiques indiquen les concentracions (avaluades mitjançant l'espectre de masses (*MS Counts*)) provinents del grup dieta hipercalòrica (T2), del grup probiòtic (T3) i del grup probiòtic més omega-3 (T4). Els asteriscs representen diferències significatives on \*p<0,05 aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey. **TMA:** Trimetilamina; **TMAO:** Òxid de trimetilamina.

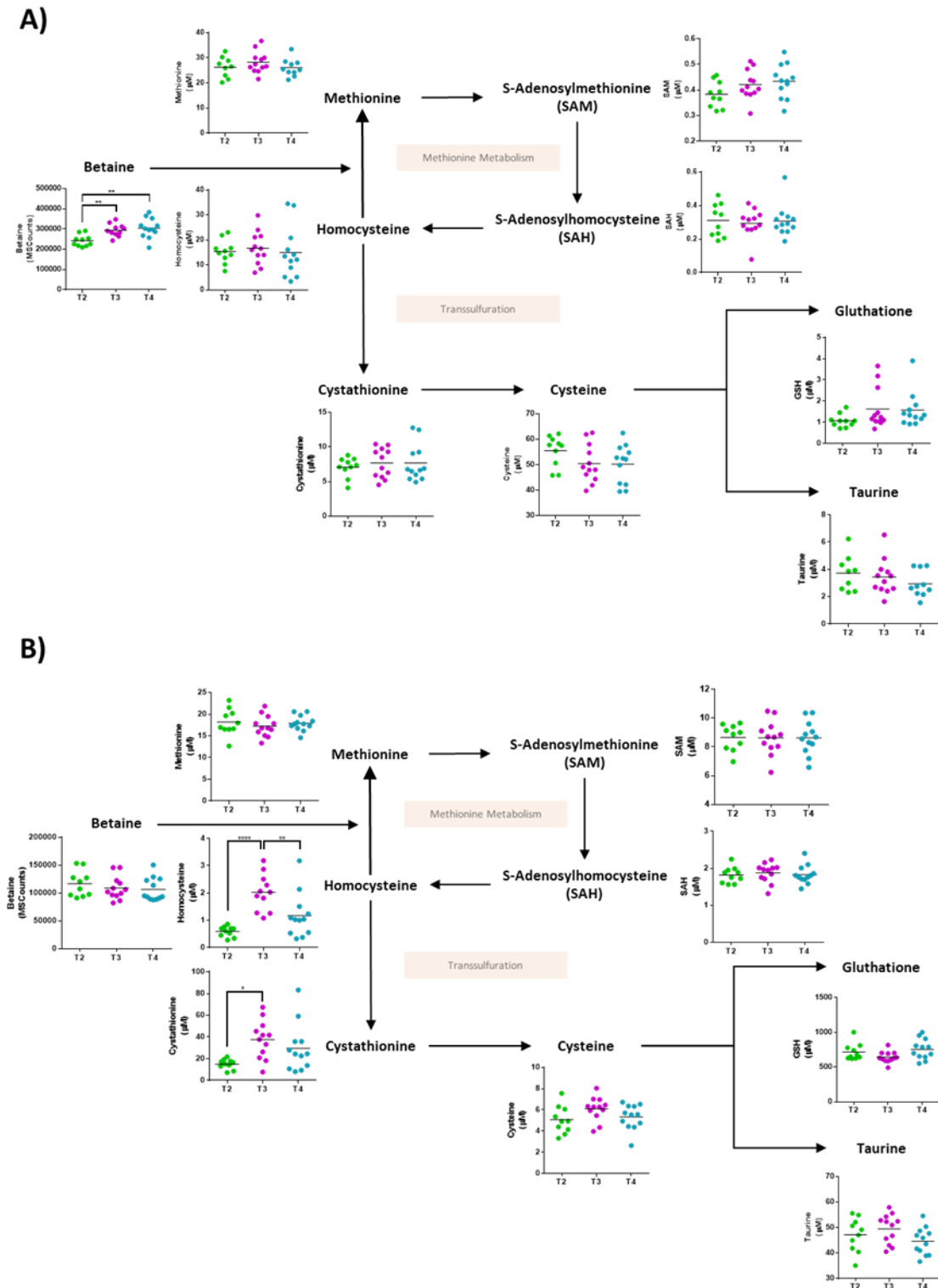


Figura 57. La suplementació amb probiòtics no mostra canvis en la concentració plasmàtica dels diferents metabòlits que formen el metabolisme de la metionina en canvi, si que produeix canvis en la concentració tissular d'alguns metabòlits. Es mostra un esquema representatiu de la via de la metionina en **A)** mostres de plasma i **B)** en escorça frontal tenint en compte els tres grups experimentals del treball. Els valors representats en les gràfiques indiquen les concentracions (en µM o avaluades mitjançant l'espectre de masses (*MS Counts*)) provinents del grup dieta hipercalòrica (T2), del grup probiòtic (T3) i del grup probiòtic més omega-3 (T4). Els asteriscs representen diferències significatives on \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,0001$  aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey. **SAM:** S-adenosilmetionina; **SAH:** S-adenosilhomocisteïna; **GSH:** Glutatió.

### 4.3.2.2 Anàlisi del perfil d'aminoàcids

Mitjançant una anàlisi de metabolòmica dirigida s'han quantificat diferents aminoàcids per tal d'observar quins són els possibles canvis en aquest conjunt de metabòlits quan s'afegeixen els probiòtics juntament amb la dieta hipercalòrica, tant en les mostres de plasma com en les mostres d'escorça frontal.

Els resultats obtinguts en les mostres de plasma mostren que els probiòtics són capaços de modular la quantitat dels aminoàcids glicina, treonina i els BCAA, augmentant el contingut de glicina i disminuint la concentració de treonina i BCAA en el grup probiòtic i en el grup probiòtic més omega-3 respecte al grup dieta hipercalòrica. L'omega-3 també té efectes sobre la concentració d'alanina augmentant la seva concentració respecte al grup alimentat amb dieta hipercalòrica (**Taula 44**).

**Taula 44.** Concentracions (µM) dels aminoàcids quantificats en plasma del grup dieta hipercalòrica (T2), grup dieta probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).

Metabolite	T2 average±SEM	T3 average±SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average±SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
Alanine	5,309 ± 0,439	6,663 ± 0,621	0,1024	7,009 ± 0,514	<b>0,0233</b>	0,6714
Arginine	22,598 ± 1,059	22,976 ± 2,091	0,8809	23,45 ± 0,95	0,5552	0,8384
Asparagine	0,551 ± 0,04	0,591 ± 0,048	0,5346	0,61 ± 0,044	0,3349	0,7727
Aspartic acid	15,822 ± 0,703	14,661 ± 1,106	0,4080	14,749 ± 0,533	0,2300	0,9433
Cysteine	55,505 ± 1,903	50,452 ± 2,152	0,1002	50,248 ± 2,192	0,0916	0,9477
Glutamic acid	6,657 ± 0,659	7,375 ± 0,681	0,4622	7,827 ± 0,574	0,1935	0,6174
Glycine	8,102 ± 0,539	10,31 ± 0,374	<b>0,0025</b>	9,537 ± 0,388	<b>0,0389</b>	0,1659
Histidine	ND	ND		ND		
Leucine/ Isoleucine	280,214 ± 9,336	249,996 ± 10,608	0,0474	233,038 ± 8,457	<b>0,0012</b>	0,2213
Methionine	23,877 ± 2,71	28,2 ± 1,226	0,5472	21,973 ± 2,905	0,5561	0,7110
Phenylalanine	86,711 ± 2,188	82,029 ± 6,717	0,5475	82,754 ± 1,606	0,1524	0,9173
Proline	355,884 ± 26,078	315,946 ± 31,354	0,3512	340,474 ± 10,657	0,5664	0,4667
Serine	7,401 ± 0,677	9,306 ± 0,698	0,0669	8,323 ± 0,558	0,3011	0,2831
Threonine	10,8 ± 0,98	6,267 ± 0,833	<b>0,0020</b>	6,446 ± 0,445	<b>0,0004</b>	0,8516
Tryptophan	34,452 ± 1,455	29,214 ± 3,217	0,1808	35,179 ± 0,897	0,6639	0,0879
Tyrosine	39,204 ± 2,075	33,022 ± 3,823	0,1948	33,08 ± 3,803	0,1970	0,9916
Valine	117,182 ± 4,061	88,585 ± 8,305	<b>0,0088</b>	91,298 ± 2,698	<b>&lt;0,00001</b>	0,7590

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup i el valor de p aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey. **ND:** No detectable.

Els resultats obtinguts en les mostres d'escorça frontal del grup probiòtic mostren canvis en les concentracions de prolina, treonina i triptòfan respecte el grup dieta hipercalòrica. Més concretament, s'observa un augment de l'aminoàcid treonina i una disminució de la prolina i el triptòfan. No s'observen canvis quan es compara la dieta hipercalòrica respecte el grup probiòtic i omega-3 però, quan es comparen els dos probiòtics hi ha un augment significatiu de l'asparagina i del triptòfan i una disminució de la treonina i la valina (**Taula 45**).

**Taula 45.** Concentracions ( $\mu\text{M}$ ) dels aminoàcids quantificats en escorça frontal del grup dieta hipercalòrica (T2), grup dieta probiòtic (T3) i grup dieta probiòtic més omega-3 (T4).

Metabolite	T2 average $\pm$ SEM	T3 average $\pm$ SEM	[T2 vs. T3] <i>p</i> -value	T4 average $\pm$ SEM	[T2 vs. T4] <i>p</i> -value	[T3 vs. T4] <i>p</i> -value
Alanine	15,949 $\pm$ 1,285	16,624 $\pm$ 0,653	0,6277	16,932 $\pm$ 0,407	0,4409	0,6930
Arginine	8,669 $\pm$ 0,442	7,606 $\pm$ 0,405	0,0915	8,94 $\pm$ 0,656	0,7463	0,0976
Asparagine	1,206 $\pm$ 0,054	1,058 $\pm$ 0,061	0,0916	1,232 $\pm$ 0,042	0,6963	<b>0,0279</b>
Aspartic acid	324,069 $\pm$ 10,383	304,669 $\pm$ 6,36	0,1141	312,336 $\pm$ 11,211	0,4586	0,5580
Cysteine	5,071 $\pm$ 0,408	6,094 $\pm$ 0,322	0,0599	5,327 $\pm$ 0,339	0,6325	0,1149
Glutamic acid	239,623 $\pm$ 4,513	241,488 $\pm$ 3,246	0,7351	233,664 $\pm$ 5,664	0,4337	0,2435
Glycine	9,366 $\pm$ 1,068	11,284 $\pm$ 0,815	0,1622	9,603 $\pm$ 0,926	0,8679	0,1870
Histidine	NQ	NQ		NQ		
Leucine/ Isoleucina	604.617 $\pm$ 58.496	563.178 $\pm$ 12.966	0,4600	560.903 $\pm$ 19.615	0,4548	0,92380
Methionine	18,202 $\pm$ 0,957	17,239 $\pm$ 0,71	0,4195	17,935 $\pm$ 0,51	0,7990	0,4344
Phenylalanine	10,901 $\pm$ 0,666	10,517 $\pm$ 0,678	0,6931	10,331 $\pm$ 0,376	0,4456	0,8128
Proline	77,176 $\pm$ 1,128	71,733 $\pm$ 1,681	<b>0,0181</b>	74,21 $\pm$ 1,623	0,1651	0,3005
Serine	95,488 $\pm$ 7,469	80,028 $\pm$ 6,218	0,1242	95,087 $\pm$ 6,741	0,9686	0,1148
Threonine	46,378 $\pm$ 4,151	71,943 $\pm$ 3,974	<b>0,0003</b>	43,333 $\pm$ 4,213	0,6159	<b>0,0001</b>
Tryptophan	1,964 $\pm$ 0,107	1,579 $\pm$ 0,099	<b>0,0160</b>	1,885 $\pm$ 0,074	0,5453	<b>0,0217</b>
Tyrosine	4,102 $\pm$ 0,637	3,834 $\pm$ 0,599	0,7636	4,567 $\pm$ 0,709	0,6367	0,4381
Valine	35,244 $\pm$ 0,694	37,205 $\pm$ 0,872	0,1030	34,659 $\pm$ 0,804	0,5960	<b>0,0431</b>

Els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM de mínim 8 animals per grup i el valor de *p* aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey. **BCAA:** Aminoàcids de cadena ramificada (de l'anglès, *Branched-chain amino acid*); **ND:** No detectable.

### 4.3.2.3 Anàlisi lipídomic plasmàtic

#### 4.3.2.3.1 Estudi lipídomic no dirigit

L'anàlisi global del lipidoma del plasma, analitzat mitjançant un arbre d'agrupament jeràrquic, dels animals amb i sense probiòtics suggereix que el grup probiòtic més omega-3 té un perfil lipídomic característic, ja que les mostres d'aquest grup es troben molt més properes entre elles mentre que, les mostres del grup dieta hipercalòrica i les mostres del grup probiòtic no se separen indicant una major similitud en el seu lipidoma plasmàtic (**Figura 58A**). Quan enlloc d'analitzar tot el lipidoma analitzem només els 100 lípids que presenten un valor menor de *p* (test ANOVA) veiem la mateixa tendència, tot i que existeix una major separació dels grups hipercalòrics i probiòtic (**Figura 58B**).

Continuant amb l'objectiu de profunditzar en l'efecte dels probiòtics en el lipidoma plasmàtic, s'ha realitzat l'anàlisi PCA, representat en la **Figura 59A**, on s'observa la mateixa tendència que s'observa en l'anàlisi anterior amb una variabilitat explicada del 20,4%. En tots dos casos, l'efecte del probiòtic juntament amb l'omega-3 és el que més preval en la diferenciació d'aquestes mostres. Tot i això, en la **Figura 59B**, on es representa l'anàlisi del PLS-DA, s'observa una bona separació entre els tres grups d'estudi. Com ja s'ha comentat anteriorment, és important realitzar el test de validació creuada per tal de saber si hi ha hagut sobreajustament del model. En aquest cas, aquest test ens proporciona un valor de precisió del 84% amb una  $R^2$  de 0,99 i

valors de  $Q^2$  de 0,73 utilitzant 3 components. A més, l'error predictiu obtingut de l'anàlisi de boscos aleatoris és igual a 0,25.

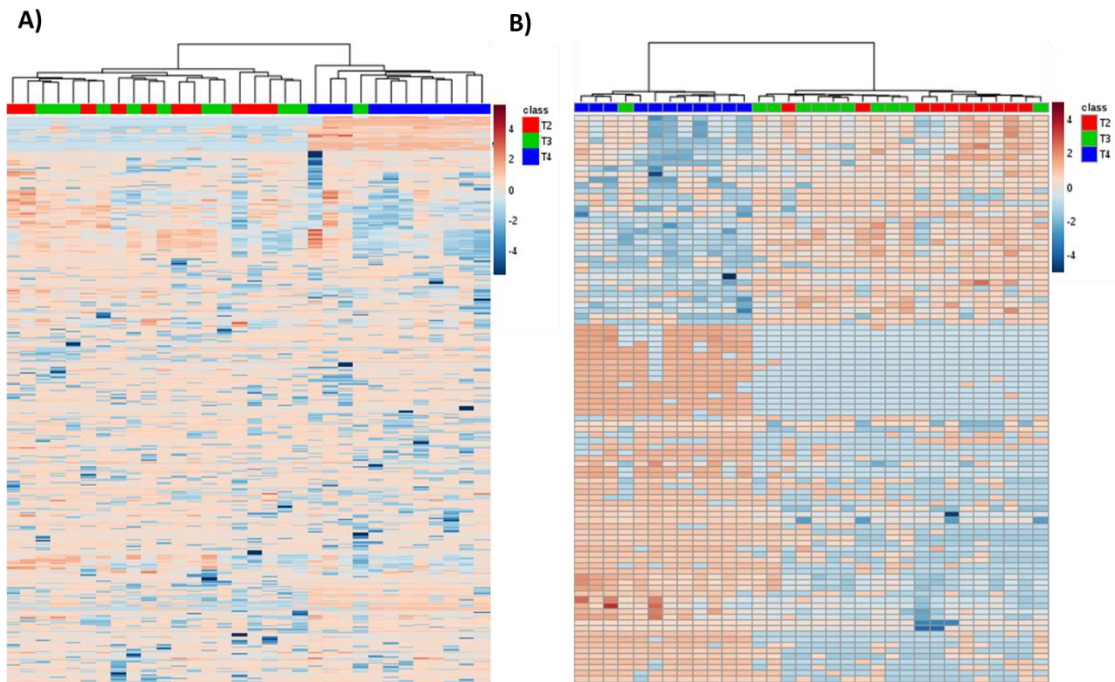


Figura 58. Anàlisi d'agrupació jeràrquica on es pot veure la influència dels probiòtics en l'abundància dels lípids en el plasma del model porcí d'obesitat prepuberal. **A)** Anàlisi d'agrupació jeràrquica on es representa la distribució de les 667 espècies lipídiques. **B)** Anàlisi d'agrupació utilitzant només els 100 lípids estadísticament més significatius aplicant un test ANOVA d'una via. Cada línia del gràfic representa una massa exacta ordenada pel seu RT i, els colors mostren quina és la seva abundància. Les mostres dels diferents grups s'agrupen en el dendrograma basant-se en una anàlisi de clusterització pel mètode Wards, amb una mesura de distància d'Euclídea. L'anàlisi només s'ha realitzat en ionització positiva. T2: grup dieta hipercalòrica, T3: grup probiòtic i T4: grup probiòtic més omega-3.

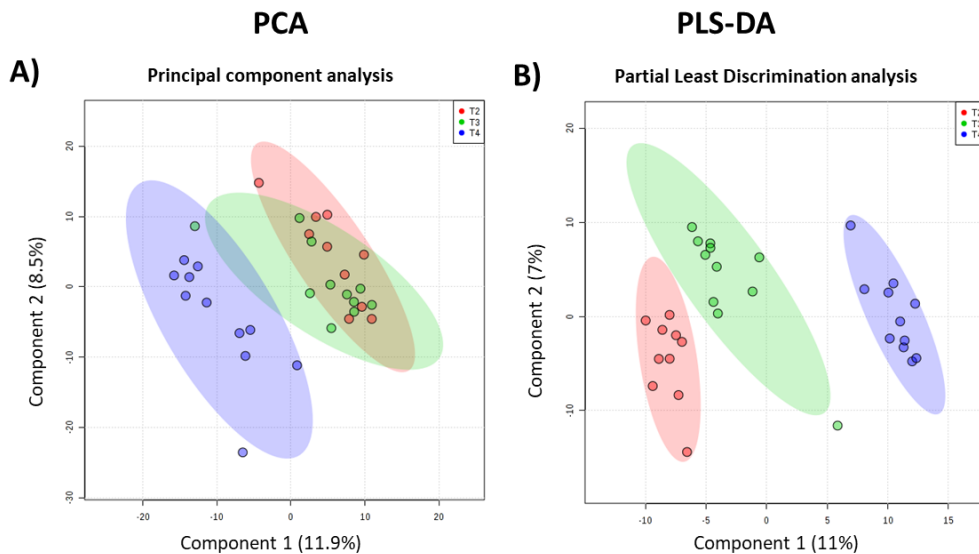


Figura 59. L'anàlisi multivariant revela diferències entre el perfil lipídomic del plasma dels animals que han ingerit probiòtics en la seva dieta. **A)** Anàlisi PCA on es mostra la separació de les dades obtingudes en la lipidòmica en el mode de ionització positiva. **B)** Anàlisi PLS-DA que mostra una bona agrupació dels tres grups amb una precisió del 84% demostrant que comparteixen la majoria de característiques moleculars. T2: grup dieta hipercalòrica, T3: grup probiòtic i T4: grup probiòtic més omega-3.

**Taula 46.** Identitat de les espècies lipídiques plasmàtiques en femelles de porc prepuberals en ionització positiva després de la suplementació amb probiòtics.

Lipid	Mass	RT	FC (abs)	Regulation (T3 vs. T2)	FC (abs)	Regulation (T4 vs. T2)	FC (abs)	Regulation (T3 vs. T4)	P value
<b>Glycerophospholipids</b>									
PA(39:0)	728,5829	6,88	1,20	down	1,68	down	1,40	up	0,015112868
PA(P-38:0)	716,5814	7,11	1,08	down	1,96	down	1,81	up	0,001955761
PE(36:0)	753,53	6,27	2,14	up	145,55	up	68,14	down	0,01641927
PE(40:5)	793,5666	6,80	4,80	up	7302,57	up	1521,44	down	6,96E-08
PE(41:1)	819,6147	7,60	1,14	down	244,93	up	279,77	down	0,009718367
PE(42:0)	851,6173	6,74	55,98	up	4794,17	up	85,65	down	3,11E-06
PE(42:3)	845,5588	7,03	1,19	down	1046,49	up	1245,37	down	8,07E-06
PE(43:0)	865,6309	6,88	1,14	down	1,93	down	1,69	up	1,91E-04
PE(43:0)	865,6313	7,06	76,50	up	18446,06	up	241,11	down	9,71E-05
PE(43:1)	863,6147	6,72	1,41	up	2,54	up	1,81	down	1,49E-04
PE(43:1)	863,6168	6,46	2,51	up	42,97	down	107,81	up	0,013908086
PE(44:3)	853,6658	7,74	1,34	down	1,90	down	1,42	up	6,44E-05
PE(44:4)	851,6385	7,61	81,67	down	22,59	down	3,62	down	0,031934243
PE(O-20:0)	1028,6833	6,82	244,18	down	52,07	down	4,69	down	0,01972037
PE(O-39:0)	813,602	6,58	40,33	up	8746,16	up	216,87	down	3,69E-05
PE(O-42:4)	829,5623	7,06	1,20	up	390,51	down	468,05	up	0,002495058
PE(P-41:0)	839,6151	6,87	1,14	down	1,98	down	1,74	up	1,20E-04
PE-NMe2(34:1)	727,5532	7,68	1,18	down	1,49	down	1,27	up	0,006967159
PG(29:0)	662,4486	7,25	1,15	down	1,38	down	1,21	up	0,025134074
PG(37:0)	791,6133	7,38	1,08	down	1,19	up	1,29	down	0,011040092
PG(41:1)	845,6623	7,88	1,04	down	1,38	down	1,32	up	0,033930678
PI(42:6)	937,5824	7,25	29,30	up	407,63	up	13,91	down	0,005103963
PS(38:2)	797,5693	7,36	14,46	up	42,56	up	2,94	down	0,04546716
PS(39:0)	815,616	6,97	1,09	down	1,27	down	1,16	up	0,024767231
PS(40:4)	843,527	6,73	27,84	up	2167,51	up	77,84	down	9,27E-05
PS(41:1)	859,6124	7,71	5,78	up	941,48	up	162,83	down	0,001295055
PS(41:3)	837,5999	6,50	1,45	up	62,37	up	42,92	down	0,009135451
PS(41:4)	853,5676	6,73	4,60	up	377,66	up	82,13	down	0,005928783
PS(43:2)	867,6469	7,38	1,15	down	1,85	down	1,61	up	3,84E-04
PS(42:5)	847,5775	7,38	16,10	down	288,02	down	17,89	up	0,020344324
PS(43:0)	871,6777	7,93	1,06	down	1,28	down	1,21	up	0,03601522

Lipid	Mass	RT	FC (abs)	Regulation (T3 vs. T2)	FC (abs)	Regulation (T4 vs. T2)	FC (abs)	Regulation (T3 vs. T4)	P value
PS(O-35:0)	745,561	7,13	1,16	up	1,37	down	1,59	up	0,007658829
PS(O-36:0)	759,5791	7,38	1,02	up	1,27	down	1,29	up	0,008616786
PS(O-36:1)	757,5632	6,97	1,05	down	1,27	down	1,21	up	0,018423084
PS(O-36:2)	755,5476	6,59	1386,85	up	20966,07	up	15,12	down	1,72E-06
PS(O-37:0)	773,5925	7,64	1,12	up	1,38	down	1,55	up	0,023163263
PS(O-38:0)	787,6101	7,88	1,03	down	1,35	down	1,31	up	0,045272537
PS(O-38:1)	785,595	7,50	1,17	down	1,33	down	1,14	up	0,010384415
PS(O-38:3)	781,5627	6,87	2129,85	up	5023,56	up	2,36	down	3,70E-04
PS(O-38:3)	781,5609	7,34	3,91	up	97,20	down	379,92	up	0,028731626
PS(O-38:4)	779,5467	6,49	5,00	up	39,64	up	7,94	down	3,00E-04
PS(O-40:5)	805,5628	6,71	1,35	up	2,56	up	1,89	down	4,14E-04
PS(O-40:6)	803,544	6,09	2,31	up	4041,33	up	1747,80	down	2,49E-07
PS(O-41:0)	829,6639	7,82	86,07	down	1,80	up	155,10	down	0,024267353
PS(O-42:6)	831,579	6,73	7,11	up	16,58	up	2,33	down	0,021638477
PS(P-39:0)	817,6314	7,38	1,01	down	1,25	down	1,24	up	0,019900052
PS(P-40:2)	809,5945	7,38	3,37	down	371,65	down	110,41	up	0,02899481
PS(P-40:3)	807,5779	6,88	1,11	down	2,02	down	1,82	up	2,72E-05
PS(P-42:0)	859,6754	7,48	1,14	down	1,44	down	1,27	up	0,006615852
PS(P-42:2)	837,624	7,73	1,43	down	24,73	down	17,28	up	8,00E-04
<b>Glycerolipids</b>									
DG(35:1)	612,5082	6,70	1,11	down	1,34	down	1,21	up	0,044643644
DG(42:0)	728,6188	9,63	2,58	up	8037,20	up	3112,57	down	7,89E-07
DG(44:7)	704,5812	7,05	1,42	down	1,93	down	1,36	up	4,18E-04
DG(44:9)	718,5601	9,73	1,06	up	1560,26	up	1478,22	down	5,63E-05
DG(46:6)	934,774	9,34	1,17	up	2,38	up	2,04	down	2,93E-04
TG(30:0)	576,4363	6,69	1,12	down	1,47	down	1,31	up	0,009786003
TG(52:2)	880,7486	10,00	1,00	up	1,60	down	1,61	up	3,62E-04
TG(52:2)	875,7934	9,99	1,04	up	1,65	down	1,72	up	0,007187493
TG(52:3)	878,7342	9,82	1,05	down	1,47	down	1,40	up	0,002558754
TG(52:3)	873,7781	9,81	1,04	up	1,50	down	1,56	up	0,04772454
TG(54:3)	906,7647	9,99	1,02	down	1,33	down	1,31	up	0,023685152
TG(54:7)	893,7456	9,35	7,23	up	16,51	up	2,28	down	0,04434727
TG(56:1)	936,7885	9,50	3,07	down	1053,09	down	343,12	up	0,001802716

Lipid	Mass	RT	FC (abs)	Regulation (T3 vs. T2)	FC (abs)	Regulation (T4 vs. T2)	FC (abs)	Regulation (T3 vs. T4)	P value
TG(56:1)	916,82	9,99	1,01	down	1,73	down	1,72	up	0,005459376
TG(56:10)	915,7311	9,08	2,23	up	3111,06	up	1395,81	down	6,53E-07
TG(57:9)	896,7152	10,00	2,51	up	61,49	down	154,04	up	0,006137319
TG(58:11)	941,7416	9,15	2,37	up	14187,43	up	5982,41	down	1,82E-09
TG(58:3)	960,7909	9,41	8,40	up	17,95	up	2,14	down	0,035342153
TG(58:5)	956,7854	9,08	94,92	up	8412,03	up	88,62	down	1,29E-05
TG(58:7)	932,7614	9,17	21,95	up	773,37	up	35,23	down	0,003619799
TG(58:8)	930,7694	9,88	1,12	down	159,26	down	141,88	up	0,019347213
TG(58:9)	950,7419	9,48	6,05	up	2094,83	up	346,14	down	4,58E-04
TG(60:13)	948,7261	9,31	5,68	down	1075,52	up	6107,44	down	1,37E-05
TG(60:4)	986,802	9,47	1,01	up	1,99	up	1,97	down	0,003729828
TG(60:6)	962,8022	9,57	1,09	up	1,56	up	1,43	down	0,03704254
TG(60:7)	980,7568	8,95	2,33	up	12227,22	up	5236,57	down	1,72E-09
TG(62:7)	1008,7856	9,22	2,50	down	9078,04	up	22718,65	down	1,61E-10
TG(62:8)	1006,769	9,03	2,25	up	9069,88	up	4039,86	down	1,89E-09
TG(65:4)	1018,9419	10,15	1,21	down	1,89	down	1,57	up	6,12E-04
TG(65:5)	1016,926	9,95	1,29	down	1,47	down	1,14	up	0,03258154
<b>Sphingolipids</b>									
Cer18:1	1323,1812	10,15	1,21	down	1,78	down	1,47	up	0,010810643
Cer(20:4)	689,6109	9,85	1,23	down	2,08	down	1,69	up	8,19E-04
GlcCer(d44:2)	854,7317	10,01	1,02	down	1,48	down	1,51	up	0,008722415
Sphingosine (d14:2)	740,6451	9,54	1,22	down	1,71	down	1,40	up	0,012503168

L'anàlisi univariant (ANOVA) d'una via mostra determinades espècies lipídiques diferencials ( $p < 0,05$ ) entre el grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4) i quina identitat es proposa basant-nos en massa exacta, RT i distribució isotòpica. **RT**: Temps de retenció (de l'anglès, *Retention time*); **FC**: Magnitud de canvi (de l'anglès, *Fold change value*).



Un cop realitzada l'estadística multivariant, s'ha volgut analitzar quines espècies concretes presenten diferències significatives entre els dos grups. Per assolir aquest objectiu s'ha realitzat una anàlisi univariant (test ANOVA d'una via) seguit d'un test post hoc Tukey per poder comparar tots els grups entre ells. De les 667 espècies lipídiques detectades i filtrades en l'anàlisi lipídomic no dirigit, 161 són estadísticament significatives entre els diferents grups i s'han identificat un total de 84. La **Taula 46** conté tots els lípids identificats i la regulació d'aquests en els 3 grups experimentals. La resta de lípids no identificats obtinguts en l'anàlisi lipídomic no dirigit es troben en el repositori virtual Figshare (doi: 10.6084/m9.figshare.11663553).

En concret, dins de la categoria de glicerofosfolípids identificats hi ha fosfolípids com PE, PG, PI i PS. La majoria dels glicerofosfolípids tenen la mateixa direcció de canvi quan es comparen el grup probiòtic i el grup probiòtic més omega-3 respecte el grup dieta hipercalòrica, és a dir, es troben augmentats o disminuïts. De tots els glicerolípid trobats, el 17% són DG mentre que la resta són TG formats per diferent longitud i grau d'insaturacions de les cadenes d'àcids grassos. Pel que fa als esfingolípid identificats, hi ha dues Cer, concretament la Cer (18:1) i la Cer (20:4), la GlcCer (d44:2) i la SM (d14:2) disminuïdes en el grup probiòtic i en el grup probiòtic més omega-3 respecte el grup dieta hipercalòrica. Quan es comparen els dos probiòtics, totes elles es troben augmentades en el grup probiòtic respecte el grup probiòtic més omega-3.

#### 4.3.2.3.2 Quantificació dels mediadors lipídics

Aplicant estadística multivariant de totes les oxilipines quantificades, l'anàlisi d'agrupació jeràrquica mostra com el grup probiòtic més omega-3 té un perfil diferent de la resta veient una separació d'aquest grup (**Figura 60A**). A més, quan es tenen en compte només les 25 oxilipines que presenten un valor menor de p (test ANOVA) (**Figura 60B**) s'observa com l'abundància relativa d'aquests lípids en el grup probiòtic més omega-3 presenta un lipidoma completament diferent de la resta. La majoria de lípids amb major abundància en aquest grup, tenen menys abundància en els altres dos grups i viceversa.

Continuant amb l'estudi de l'efecte dels probiòtics en el perfil d'oxilipines s'ha realitzat una anàlisi PCA, representat en la **Figura 61A**, on s'observa la mateixa tendència que en l'anàlisi d'agrupació jeràrquica. El grup probiòtic més omega-3 se separa de la resta de grups mentre que, el grup dieta hipercalòrica i el grup probiòtic s'agrupen amb una variabilitat explicada del 99,9%. En la mateixa línia van els resultats obtinguts de l'estadística multivariant supervisada (**Figura 61B**) on els lípids més rellevants a l'hora de separar aquests grups són el DHA i el EPA (**Figura 61C**). La prova de validació creuada dóna un valor de precisió del 67% amb valors de  $R^2$  de 0,59 i valors de  $Q^2$  de 0,55 utilitzant un sol component. A més, el test de permutació dóna un

valor de  $p < 0,001$  ( $n = 1000$ ) i per tant es pot dir que la classificació que s'ha realitzat per aquest model és millor que qualsevol altra classificació escollida a l'atzar. En conjunt, podem dir que podem establir una empremta lipidòmica que defineix perfectament el grup probiòtic amb omega-3 a través de les oxilipines estudiades en plasma.

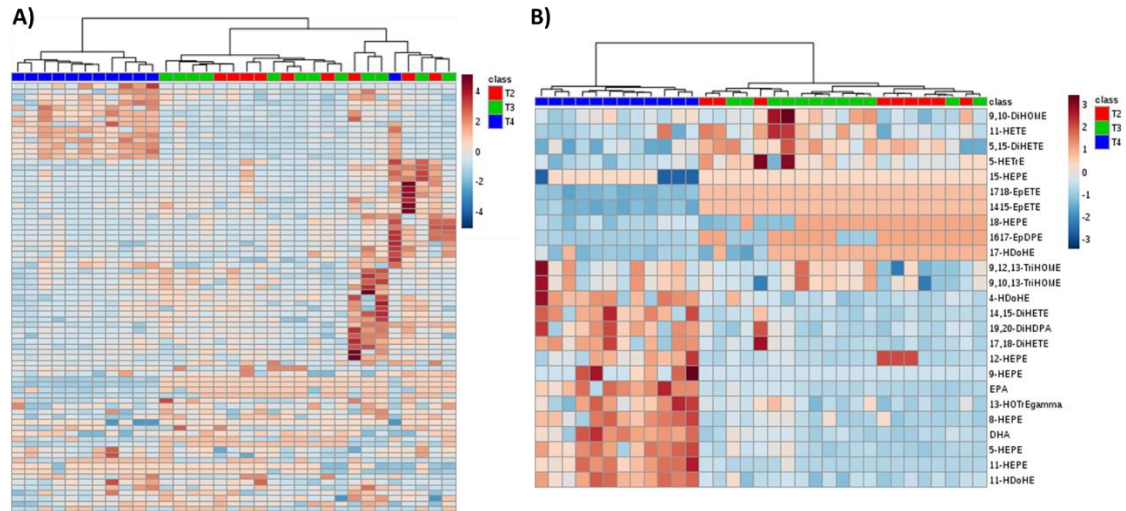


Figura 60. Anàlisi d'agrupació jeràrquica on es pot veure la influència que tenen els probiòtics en l'abundància de les oxilipines quantificades en el plasma del model porcí d'obesitat prepuberal. **A)** Anàlisi d'agrupació jeràrquica on es representa la distribució de les oxilipines identificades i quantificades. **B)** Anàlisi d'agrupació jeràrquica utilitzant les 25 oxilipines més significatives estadísticament aplicant una test ANOVA. Cada línia del gràfic representa una massa exacta ordenada pel seu RT i, els colors mostren quina és la seva abundància relativa. Les mostres dels diferents grups s'agrupen en el dendrograma basant-se en una anàlisi d'agrupament pel mètode Wards amb una mesura de distància d'Euclídea. T2: grup dieta hipercalòrica, T3: grup probiòtic i T4: grup probiòtic més omega-3.

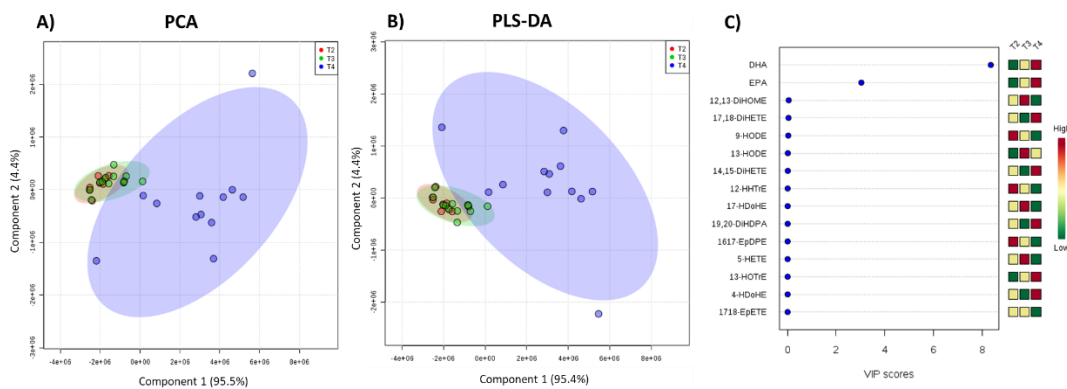


Figura 61. L'anàlisi multivariant revela diferències en el perfil d'oxilipines plasmàtiques dels animals que han ingerit probiòtic més omega-3 en la seva dieta. **A)** Anàlisi PCA on es mostra la separació de les dades obtingudes en la lipidòmica dirigida. **B)** Anàlisi PLS-DA que mostra l'agrupació dels tres grups amb una precisió del 67%. **C)** Oxilipines més importants que defineixen el PLS-DA. T2: grup dieta hipercalòrica, T3: grup probiòtic i T4: grup probiòtic més omega-3.

Quan es compara el grup probiòtic respecte al grup dieta hipercalòrica només s'observen canvis significatius en dos oxilipines derivades de LA; 12,13-DiHOME que es troba augmentat respecte al grup dieta hipercalòrica i 9-KODE que es veu disminuït. També s'observa una disminució significativa en el grup probiòtic més omega-3 en 8-isoPGE2, 5-HETE, 5-KETE, 11-HETE, 15-HETE, 15-KETE, 5,6-DiHETrE, 5,15-DiHETE i 5-iPGF2 $\alpha$ -VI derivats de AA per contra, s'observa un augment significatiu de tots els lípids derivats del DHA i del EPA (excepte TXB3 que no mostra

diferències entre aquests grups) i del 13-HOTrE( $\gamma$ ) derivat de DGLA respecte el grup dieta hipercalòrica. Quan es compara el grup probiòtic més omega-3 respecte al grup probiòtic es troba un augment significatiu de 12(13)-EpODE derivat de LA, 13-HOTrE( $\gamma$ ) derivat de DGLA, de tots els derivats de DHA i de EPA excepte en el TXB3 que no hi ha diferències. Per contra, es troben disminuïts significativament 8-isoPGE<sub>2</sub>, 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , 5-HETE, 8-HETE, 11-HETE, 5,6-DiHETrE, 8,9-DiHETrE, 11,12-DiHETrE, 5,15-DiHETE, 5-iPGF<sub>2 $\alpha$</sub> -VI i 8-isoPGF<sub>2 $\alpha$</sub>  derivats de AA, 9,10-DiHOME i 12,13-DiHOME derivats de LA i el 5-HETrE derivat de EDA (**Taula 47**).

**Taula 47.** Concentracions (ng/mL) de les oxilipines derivades dels diferents PUFA en plasma de femelles porc prepuberals del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).

Lipid	T2 average $\pm$ SEM	T3 average $\pm$ SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average $\pm$ SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
<b>AA derived lipids</b>						
PGD <sub>2</sub>	0,3 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,9779	0,1 $\pm$ 0,0	0,2496	0,1318
PGF <sub>2a</sub>	10,0 $\pm$ 3,3	12,5 $\pm$ 2,3	0,7227	4,9 $\pm$ 1,2	0,3071	0,0547
PGE <sub>2</sub>	0,3 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,9670	0,4 $\pm$ 0,2	0,9648	>0,9999
13,14-dihydro-15-keto-PGE <sub>2</sub>	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,9441	0,1 $\pm$ 0,0	0,6326	0,3835
8-isoPGE <sub>2</sub>	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,5184	0,0 $\pm$ 0,0	<b>0,0012</b>	<b>0,0102</b>
6-keto-PGF <sub>1a</sub>	0,4 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,7336	0,2 $\pm$ 0,0	0,1482	<b>0,0199</b>
12-HHTrE	4,0 $\pm$ 1,6	4,9 $\pm$ 0,9	0,7741	1,9 $\pm$ 0,4	0,3328	0,0698
5-HETE	6,4 $\pm$ 0,7	6,4 $\pm$ 0,6	0,9998	4,1 $\pm$ 0,3	<b>0,0143</b>	<b>0,0090</b>
5-KETE	0,4 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	0,1013	0,1 $\pm$ 0,0	<b>0,0341</b>	0,8509
8-HETE	1,0 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,2	0,8715	0,6 $\pm$ 0,1	0,1311	<b>0,0299</b>
9-HETE	3,7 $\pm$ 0,5	5,6 $\pm$ 1,2	0,3444	3,0 $\pm$ 0,5	0,8455	0,0870
11-HETE	1,3 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,2	0,8086	0,7 $\pm$ 0,1	<b>0,0446</b>	<b>0,0058</b>
12-HETE	4,0 $\pm$ 0,6	5,3 $\pm$ 1,3	0,5976	2,8 $\pm$ 0,4	0,6412	0,1220
15-HETE	1,8 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,2	0,8619	0,9 $\pm$ 0,1	<b>0,0263</b>	0,0560
15-KETE	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,0	0,3082	0,2 $\pm$ 0,0	<b>0,0107</b>	0,2103
20-HETE	2,9 $\pm$ 0,6	3,5 $\pm$ 0,6	0,6185	2,3 $\pm$ 0,1	0,7051	0,1431
5,6-DiHETrE	0,8 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,9722	0,4 $\pm$ 0,0	<b>0,0014</b>	<b>0,0003</b>
8,9-DiHETrE	0,2 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,8030	0,2 $\pm$ 0,0	0,2024	<b>0,0319</b>
11,12-DiHETrE	0,5 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,5183	0,4 $\pm$ 0,0	0,5150	<b>0,0490</b>
14,15-DiHETrE	1,7 $\pm$ 0,6	1,2 $\pm$ 0,2	0,8923	0,8 $\pm$ 0,0	0,3278	0,1004
5(6)-EpETrE	1,2 $\pm$ 0,5	0,7 $\pm$ 0,1	0,4834	0,7 $\pm$ 0,2	0,3880	0,9854
8(9)-EpETrE	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	0,9307	0,1 $\pm$ 0,0	0,2093	0,2885
11(12)-EpETrE	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,0	0,5840	0,2 $\pm$ 0,0	0,6718	0,1133
14(15)-EpETrE	0,6 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,1	0,9240	0,6 $\pm$ 0,1	0,3944	0,1856
TXB <sub>2</sub>	5,7 $\pm$ 2,2	4,8 $\pm$ 0,9	0,9383	3,5 $\pm$ 1,7	0,6507	0,8350
PGB <sub>2</sub>	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,9029	0,0 $\pm$ 0,0	0,3362	0,5462
12-KETE	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,9044	0,1 $\pm$ 0,0	0,7696	0,4408
LTB <sub>4</sub>	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,7365	0,0 $\pm$ 0,0	0,6811	0,2242
PGJ <sub>2</sub>	0,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,9785	0,1 $\pm$ 0,0	0,6355	0,7175
delta-12-PGJ <sub>2</sub>	0,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,4411	0,1 $\pm$ 0,0	0,5130	0,9901
5,15-DiHETE	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,9434	0,1 $\pm$ 0,0	<b>0,0017</b>	<b>0,0019</b>
5-iPGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> -VI	0,4 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,9906	0,3 $\pm$ 0,0	<b>0,0261</b>	<b>0,0109</b>
8-isoPGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	0,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,0	0,5364	0,2 $\pm$ 0,0	0,2213	<b>0,0159</b>
11-keto-TXB <sub>2</sub>	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,4330	0,0 $\pm$ 0,0	0,2570	0,9334
19-HETE	0,5 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,0	0,4168	0,3 $\pm$ 0,0	0,1280	0,7079
11B-PGF <sub>2a</sub>	ND	ND		ND		
20-COOH-LTB <sub>4</sub>	ND	ND		ND		
LTE <sub>4</sub>	ND	ND		ND		
6-trans-LTB <sub>4</sub>	ND	ND		ND		
20-OH-LTB <sub>4</sub>	ND	ND		ND		

Lipid	T2 average±SEM	T3 average±SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average±SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
8,15-DiHETE	ND	ND		ND		
LXA <sub>4</sub>	ND	ND		ND		
LXB <sub>4</sub>	ND	ND		ND		
iPGF <sub>2α</sub> -IV	ND	ND		ND		
tetranor-PGEM	ND	ND		ND		
tetranor-PGDM	ND	ND		ND		
15-epi-LXA <sub>4</sub>	ND	ND		ND		
14,15-LTE <sub>4</sub>	ND	ND		ND		
15-deoxy-delta-12,14-PGJ <sub>2</sub>	ND	ND		ND		
<b>LA derived lipids</b>						
9-HODE	61,1 ± 13,6	69,6 ± 10,5	0,8382	46,3 ± 7,1	0,5781	0,2315
9-KODE	3,8 ± 0,8	2,1 ± 0,2	<b>0,0494</b>	2,1 ± 0,4	0,0616	0,9934
9(10)-EpOME	1,2 ± 0,3	0,8 ± 0,1	0,2910	0,5 ± 0,1	0,0738	0,6798
12(13)-EpOME	6,0 ± 0,7	5,1 ± 0,5	0,6657	4,8 ± 0,7	0,4801	0,9384
9,10-DIHOME	32,3 ± 5,3	57,0 ± 10,2	0,0695	31,4 ± 3,6	0,9955	<b>0,0375</b>
12,13-DIHOME	50,6 ± 6,9	95,1 ± 16,2	<b>0,0401</b>	47,5 ± 6,0	0,9832	<b>0,0125</b>
9,10,13-TriHOME	1,6 ± 0,2	2,1 ± 0,2	0,1165	2,1 ± 0,2	0,1355	0,9990
9,12,13-TriHOME	1,6 ± 0,2	2,1 ± 0,2	0,0894	2,1 ± 0,2	0,0949	>0,9999
EKODE	3,9 ± 1,5	1,9 ± 0,4	0,2073	1,6 ± 0,5	0,1526	0,9816
12(13)-EpODE	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,8889	0,8 ± 0,1	0,1294	<b>0,0262</b>
<b>GLA derived lipids</b>						
13-HODE	100,0 ± 19,0	141,0 ± 26,4	0,3760	92,1 ± 13,3	0,9638	0,2056
13-KODE	2,2 ± 0,4	3,3 ± 0,6	0,3238	2,0 ± 0,3	0,9374	0,1260
<b>DGLA derived lipids</b>						
15-HETrE	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,8512	0,2 ± 0,0	0,3962	0,1272
PGE <sub>1</sub>	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,9208	0,1 ± 0,0	0,7993	0,5225
13-HOTrE(v)	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,8691	1,3 ± 0,2	<b>0,0009</b>	<b>0,0016</b>
TXB <sub>1</sub>	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1964	0,1 ± 0,0	0,5909	0,6769
PGD <sub>1</sub>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,8972	0,0 ± 0,0	0,9906	0,8156
8-HETrE	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,8818	0,7 ± 0,1	0,1862	0,3392
<b>DHA derived lipids</b>						
DHA	998,5 ± 138,2	1.352,8 ± 170,7	0,7515	5.563,1 ± 490,5	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
4-HDoHE	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,6990	3,5 ± 0,1	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
11-HDoHE	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,8024	0,6 ± 0,0	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
17-HDoHE	1,3 ± 0,7	0,6 ± 0,1	0,9980	1,4 ± 0,1	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
19,20-DiHDPA	1,4 ± 0,3	1,4 ± 0,2	0,9973	5,3 ± 0,5	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
16(17)-EpDPE	0,031 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2825	0,3 ± 0,0	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
19(20)-EpDPE	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,9659	2,9 ± 0,3	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
10,17-DiHDoHE	ND	ND		ND		
7-Maresin-1	ND	ND		ND		
RvD <sub>1</sub>	ND	ND		ND		
RvD <sub>2</sub>	ND	ND		ND		
17-epi-RvD <sub>1</sub>	ND	ND		ND		
8-HDoHE	ND	ND		ND		
14-HDoHE	ND	ND		ND		
<b>EPA derived lipids</b>						
EPA	212,8 ± 41,7	315,6 ± 51,6	0,8017	2.033,2 ± 164,2	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
12-HEPE	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,7426	1,2 ± 0,2	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
14,15-DiHETE	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,2	0,8480	8,3 ± 0,7	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
11-HEPE	0,037 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,9386	0,9 ± 0,1	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
8-HEPE	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,6859	0,7 ± 0,1	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
5-HEPE	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,4209	2,3 ± 0,2	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
17,18-DiHETE	9,4 ± 1,4	10,0 ± 1,6	0,9868	42,0 ± 3,1	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
18-HEPE	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	>0,9999	1,4 ± 0,1	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
TXB <sub>3</sub>	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,8443	0,5 ± 0,0	0,4402	0,7433
15-HEPE	0,062 ± 0,0	0,062 ± 0,0	>0,9999	0,2 ± 0,1	<b>0,0437</b>	<b>0,0276</b>

Lipid	T2 average±SEM	T3 average±SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average±SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
9-HEPE	0,026 ± 0,0	0,026 ± 0,0	>0,9999	0,402 ± 0,1	<b>0,0070</b>	<b>0,0035</b>
14(15)-EpETE	0,01 ± 0,0	0,01 ± 0,0	>0,9999	0,16 ± 0,0	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
17(18)-EpETE	0,027 ± 0,0	0,027 ± 0,0	>0,9999	0,733 ± 0,0	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
PGD <sub>3</sub>	ND	ND		ND		
PGE <sub>3</sub>	ND	ND		ND		
5,6-DiHETE	ND	ND		ND		
LXA <sub>5</sub>	ND	ND		ND		
8-iso-PGF <sub>3α</sub>	ND	ND		ND		
11-keto-TXB <sub>3</sub>	ND	ND		ND		
<b>EDA derived lipids</b>						
15-HEDE	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6173	0,5 ± 0,1	0,8944	0,2973
11-HEDE	1,3 ± 0,2	2,2 ± 0,4	0,1328	1,4 ± 0,3	0,9492	0,1629
15-KEDE	ND	ND		ND		
<b>ETA derived lipids</b>						
5-HETrE	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1838	0,1 ± 0,0	0,1858	<b>0,0010</b>
LTB <sub>3</sub>	ND	ND		ND		
<b>ALA derived lipids</b>						
9-HOTrE	3,9 ± 0,8	4,3 ± 0,6	0,9421	6,6 ± 1,0	0,1021	0,1593
9-KOTrE	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,5939	0,2 ± 0,0	0,9954	0,5002
13-HOTrE	4,1 ± 0,7	4,3 ± 0,5	0,9751	6,0 ± 0,9	0,1732	0,2156
<b>DPA derived lipids</b>						
7,17-hydroxy-DPA	ND	ND		ND		

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup i el valor de p aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey. **AA**: Àcid araquidònic; **LA**: Àcid linoleic; **GLA**: Àcid gamma-linoleic; **DGLA**: Àcid dihomo-γ-linolènic; **DHA**: Àcid docosahexaenoic; **EPA**: Àcid eicosapentaenoic; **EDA**: Àcid 11,14-eicosadienoic; **ETA**: Àcid 5,8,11-eicosatrienoic; **ALA**: Àcid α-linolènic; **DPA**: Àcid docosapentaenoic. **ND**: No detectable.

#### 4.3.2.3.3 Anàlisi composicional dels àcids grassos

Continuant amb l'estudi de la influència dels probiòtics en el perfil lipídomic s'ha realitzat l'anàlisi de la composició d'àcids grassos mitjançant GC-FID per tal de determinar si existeixen canvis després de l'administració dels probiòtics i de l'omega-3. En la **Taula 48** es mostren els resultats de tots els àcids grassos analitzats en les mostres de plasma on es mostren diferències significatives en la major part dels àcids grassos estudiats. El grup probiòtic mostra un augment significatiu dels àcids grassos 16:0 i una disminució significativa dels àcids C20:5 n3 i C22:5 n3 i n6 respecte al grup dieta hipercalòrica. El grup probiòtic i omega-3 mostra un augment en els àcids C16:0 i C18:3 n3 i una disminució significativa dels àcids C16:1 n7, C20:4 n6, C20:5 n3 i en C22:5 n3 i n6 respecte al grup dieta hipercalòrica. Comparant el grup probiòtic amb el grup probiòtic més omega-3 es veu que l'addició de l'omega-3 en la dieta produeix una disminució significativa en els àcids C16:1 n7, C20:4 n6, C20:5 n3 i C22:5 n6 i un augment significatiu dels àcids C18:3 n3, C20:3 n6 i C22:6 n3. Els àcids grassos que no varien significativament entre els grups són el C14:0, C18:0, C18:1 n9 cis, C18:1 n9 trans, C18:2 n6, C18:4 n3, C20:0, C20:1 n9, C20:2 n6, C22:0, C22:1 n9 i C22:4 n6.

**Taula 48.** Composició lipídica del plasma de femelles porc prepuberals del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).

Lipid	T2 average±SEM	T3 average±SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average±SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
C14:0	1,129 ± 0,2	1,219 ± 0,2	0,9615	1,629 ± 0,3	0,3122	0,4188
C16:0	18,423 ± 0,3	19,576 ± 0,3	<b>0,0217</b>	20,148 ± 0,3	<b>0,0004</b>	0,3192
C16:1 n7	1,258 ± 0,0	1,317 ± 0,1	0,5747	1,035 ± 0,0	<b>0,0017</b>	<b>&lt;0,0001</b>
C18:0	15,796 ± 0,4	15,056 ± 0,2	0,4003	15,981 ± 0,5	0,9403	0,2162
C18:1 n9 cis	21,162 ± 0,5	22,257 ± 0,5	0,3571	19,793 ± 0,6	0,1943	<b>0,0072</b>
C18:1 n9 trans	2,237 ± 0,1	2,223 ± 0,1	0,9884	2,069 ± 0,1	0,2042	0,2288
C18:2 n6	24,240 ± 0,9	22,599 ± 0,7	0,2444	23,876 ± 0,5	0,9298	0,3851
C18:3 n3	0,443 ± 0,0	0,552 ± 0,0	0,2775	1,445 ± 0,1	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
C18:4 n3	1,816 ± 0,1	1,775 ± 0,1	0,9745	2,265 ± 0,2	0,0607	<b>0,0281</b>
C20:0	0,272 ± 0,0	0,267 ± 0,0	0,9700	0,285 ± 0,0	0,8148	0,6515
C20:1 n9	0,324 ± 0,0	0,374 ± 0,1	0,7569	0,342 ± 0,0	0,9642	0,8814
C20:2 n6	0,024 ± 0,0	0,024 ± 0,0	>0,9999	0,023 ± 0,0	0,9364	0,9303
C20:3 n6	0,536 ± 0,1	0,415 ± 0,0	0,2032	0,690 ± 0,0	0,0822	<b>0,0006</b>
C20:4 n6	7,601 ± 0,3	7,522 ± 0,2	0,9718	5,394 ± 0,2	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
C20:5 n3	0,059 ± 0,0	0,036 ± 0,0	<b>&lt;0,0001</b>	0,023 ± 0,0	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0136</b>
C22:0	0,208 ± 0,0	0,209 ± 0,0	0,9984	0,245 ± 0,0	0,1465	0,1382
C22:1 n9	2,533 ± 0,1	2,344 ± 0,2	0,7478	2,964 ± 0,2	0,2101	<b>0,0405</b>
C22:4 n6	0,070 ± 0,0	0,062 ± 0,0	0,3387	0,073 ± 0,0	0,8543	0,1147
C22:5 n6	0,440 ± 0,0	0,386 ± 0,0	<b>0,0439</b>	0,198 ± 0,0	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
C22:5 n3	0,032 ± 0,0	0,016 ± 0,0	<b>0,0001</b>	0,023 ± 0,0	<b>0,0285</b>	0,0852
C22:6 n3	0,932 ± 0,1	0,810 ± 0,1	0,2087	1,084 ± 0,0	0,0942	<b>0,0008</b>

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup i el valor de p aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey.

#### 4.3.2.3.3.1 Índexs derivats de la composició d'àcids grassos

A partir de l'anàlisi composicional en àcids grassos s'han calculat els índexs que ens indiquen els canvis composicionals de forma global. La **Taula 49** mostra els valors dels índexs dels tres grups experimentals. Si ens centrem en primer lloc en l'efecte del probiòtic, no s'observen canvis estadísticament significatius respecte al grup dieta hipercalòrica. Per altra banda, la suplementació amb probiòtic més omega-3 mostra diferències significatives en alguns dels índexs calculats com és el cas en el contingut d'àcids grassos saturats, representat amb l'índex SFA, observant un augment respecte al grup probiòtic. Un altre dels índexs que varia en el grup probiòtic més omega-3 respecte als altres grups estudiats és l'índex PUFA n3. Per últim, aquest mateix grup mostra un augment significatiu respecte a tots els altres grups en l'índex AI.

#### 4.3.2.3.3.2 Estimació de les activitats desaturases i elongases

A partir de l'anàlisi composicional en àcids grassos s'han estimat les activitats desaturases (**Taula 50**) i elongases (**Taula 51**). Els resultats obtinguts mostren diferències significatives en la majoria de les activitats estimades de les desaturases i diferències significatives en les activitats de les elongases Elovl 1-3-7<sup>b</sup> (n9), Elovl 2-5 (n6) i Elovl 2-5 (n3).

**Taula 49.** Índexs derivats de la composició en àcids grassos en plasma de femelles porc prepuberals del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).

Fatty acid indexes	T2 average±SEM	T3 average±SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average±SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
ACL	17,767 ± 0,136	16,654 ± 0,893	0,3548	17,746 ± 0,056	>0,9999	0,3250
SFA	35,828 ± 0,372	33,44 ± 1,975	0,3875	38,247 ± 0,331	0,3783	<b>0,0222</b>
UFA	63,453 ± 0,996	59,839 ± 3,22	0,4538	61,298 ± 0,525	0,7698	0,8484
MUFA	27,26 ± 0,638	26,27 ± 2,132	0,8741	26,203 ± 0,544	0,8579	0,9993
PUFA	36,194 ± 0,741	33,569 ± 1,15	0,1012	35,094 ± 0,508	0,6503	0,4088
PUFAn6	32,911 ± 0,826	30,38 ± 1,128	0,1280	30,254 ± 0,552	0,1054	0,9940
PUFAn3	3,282 ± 0,155	3,189 ± 0,176	0,9075	4,841 ± 0,124	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
DBI	124,922 ± 1,226	116,391 ± 5,749	0,2492	119,06 ± 1,047	0,5100	0,8552
PI <sub>n</sub>	75,496 ± 0,825	69,245 ± 3,467	0,1633	69,889 ± 1,242	0,1880	0,9990
AI	20,482 ± 1,48	17,392 ± 1,337	0,3408	33,848 ± 1,615	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup i el valor de p aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey. **ACL:** Longitud mitjana de la cadena (de l'anglès, *Average chain length*); **SFA:** Àcids grassos saturats (de l'anglès, *Saturated fatty acids*); **UFA:** Àcids grassos insaturats (de l'anglès, *Unsaturated fatty acids*); **MUFA:** Àcids grassos monoinsaturats (de l'anglès, *Monounsaturated fatty acids*); **PUFA:** Àcids grassos poliinsaturats (de l'anglès, *Polyunsaturated fatty acids*); **PUFAn6:** Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n6 (de l'anglès, *n6 Polyunsaturated fatty acids*); **PUFAn3:** Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n3 (de l'anglès, *n3 Polyunsaturated fatty acids*); **DBI:** Índex de dobles enllaços (de l'anglès, *Double bond index*); **PI<sub>n</sub>:** Índex de peroxidibilitat (de l'anglès, *Peroxidizability index*); **AI:** Índex antiinflamatori (de l'anglès, *Anti-inflammatory index*).

**Taula 50.** Estimació de l'activitat desaturasa en plasma de femelles porc prepuberals del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).

		T2 average±SEM	T3 average±SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average±SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
Δ5 (n6)	C20:4/C20:3	0,252 ± 0,017	0,328 ± 0,029	0,7697	0,715 ± 0,12	<b>0,0006</b>	<b>0,0024</b>
Δ6 (n3)	C18:4/C18:3	4,202 ± 2,558	3,343 ± 0,324	0,1197	3,343 ± 0,324	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0005</b>
Δ8 (n6)	C20:3/C20:2	23,627 ± 4,775	18,425 ± 1,955	0,3820	32,62 ± 2,986	0,0672	<b>0,0016</b>
Δ9 (n7)	C16:1/C16:0	0,068 ± 0,211	0,069 ± 0,003	0,9433	0,051 ± 0,001	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Δ9 (n9)	C18:1/C18:0	1,491 ± 0,233	1,518 ± 0,148	0,9821	1,392 ± 0,08	0,7785	0,6544

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup i el valor de p aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey.

**Taula 51.** Estimació de l'activitat elongasa en plasma de femelles porc prepuberals del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).

		T2 average±SEM	T3 average±SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average±SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
Elovl 3 (n9)	C20:1/C18:1	0,014 ± 0,002	0,069 ± 0,056	0,5150	0,016 ± 0,001	0,9991	0,5079
Elovl 5 (n6)	C20:2/C18:2	0,001 ± 0	0,001 ± 0	0,8819	0,001 ± 0	0,9751	0,7501
Elovl 6 (n9)	C18:0/C16:0	0,862 ± 0,032	0,77 ± 0,023	0,0952	0,798 ± 0,032	0,2906	0,7725
Elovl 1-3-7 <sup>a</sup> (n9)	C20:0/C18:0	0,017 ± 0,001	0,017 ± 0,001	>0,9999	0,018 ± 0	0,6417	0,6272
Elovl 1-3-7 <sup>b</sup> (n9)	C22:0/C20:0	0,772 ± 0,025	0,78 ± 0,02	0,9759	0,866 ± 0,032	<b>0,0487</b>	0,0605
Elovl 2-5 (n6)	C22:4/C20:4	0,009 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,7723	0,014 ± 0,001	<b>0,0040</b>	<b>0,0004</b>
Elovl 2-5 (n3)	C22:5/C20:5	0,553 ± 0,056	0,489 ± 0,094	0,8526	1,026 ± 0,084	<b>0,0011</b>	<b>0,0001</b>

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup i el valor de p aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey.

#### 4.3.2.3.4 Anàlisi de marcadors de modificació oxidativa proteica

Respecte la quantificació de dany proteic en les mostres de plasma dels 3 grups experimentals mitjançant la tècnica GC/MS (**Taula 52**), s'observa que no hi ha diferències significatives en cap dels marcadors estudiats.

**Taula 52.** Marcadors de dany oxidatiu en plasma de femelles porc prepuberals del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).

Markers	T2 average±SEM	T3 average±SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average±SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
HAVA	6827,6 ± 472,8	6878,7 ± 560,6	0,9974	6692,6 ± 522,7	0,9814	0,9650
CEL	116 ± 7,8	107,9 ± 6,4	0,7593	113,4 ± 8,6	0,9669	0,8785
CML	1132,8 ± 79,3	1195,1 ± 86	0,4923	1147 ± 84,2	0,3770	0,9887
MDALys	148,1 ± 12,9	170,3 ± 12,7	>0,9999	172,9 ± 13,7	0,9239	0,9239
CMC	439,2 ± 57,3	436,8 ± 40,3	0,9993	505,2 ± 40,4	0,5745	0,5522

Els valors s'expressen com a µmol de HAVA, CEL, MDAL, CML i CMC / mol de lisina i es representen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals. El valor de p aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey. **HAVA:** Àcid aminovalèric; **CEL:** N<sup>ε</sup>-carboxietil-lisina; **CML:** N<sup>ε</sup>-carboximetil-lisina; **MDALys:** Malondialdehid-lisina; **CMC:** S-(carboximetil)-cisteïna.

#### 4.3.2.4 Anàlisi metabòlic i lipídomic en escorça frontal

##### 4.3.2.4.1 Estudi metabòlic i lipídomic no dirigit

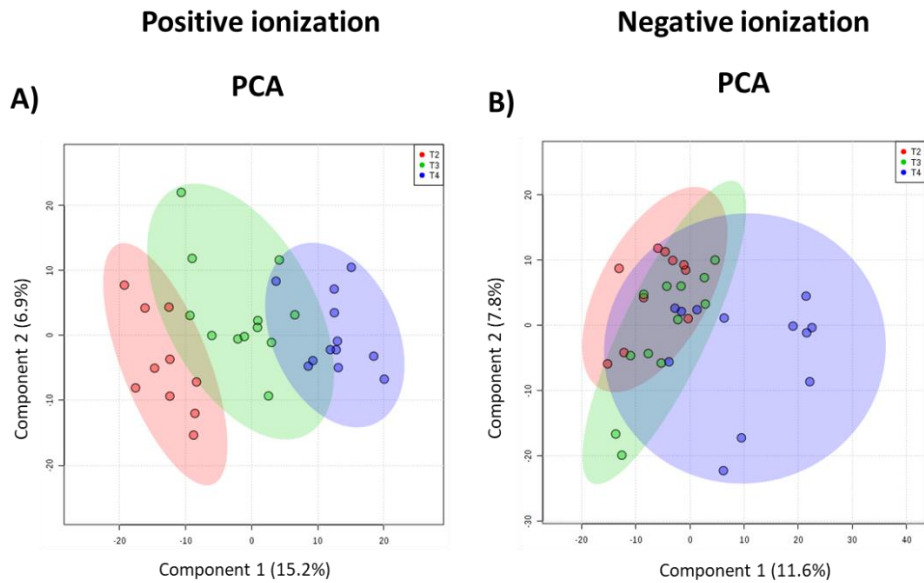
L'aproximació no supervisada de l'anàlisi estadístic multivariant, realitzat en les mostres extretes de l'anàlisi metabòlic en ionització positiva, mostra diferències clares entre els 3 grups estudiats amb una variabilitat explicada del 22,1%. Per tant, es podria dir que existeix un patró metabòlic capaç de separar de manera raonable els 3 grups (**Figura 62A**). D'altra banda, els resultats obtinguts en ionització negativa (**Figura 62B**) no mostren una diferència tan clara entre el grup dieta hipercalòrica i el grup probiòtic, ja que es troben agrupats però, sí que es pot veure com el grup dieta probiòtic més omega-3 es troba més separat. La variabilitat explicada en aquest cas és del 19,4%. Pel que fa als resultats obtinguts en l'anàlisi lipídomic, l'estadística multivariant no supervisada no mostra diferències clares entre els diferents grups d'estudi en cap de les dues ionitzacions (**Figura 62C** i **Figura 62D**). Per tant, així com la dieta sembla sé un factor clau a l'hora de determinar el metaboloma de l'escorça frontal, en el cas del lipídoma hi haurien altres factors que hi contribuirien més.

Continuant amb l'estadística no supervisada, l'anàlisi d'agrupació jeràrquica mostra els mateixos resultats que s'observaven en l'anàlisi PCA. Utilitzant totes les dades del metaboloma obtingudes en ionització positiva, es veu com la primera separació que es realitza és el grup probiòtic més omega-3 de la resta tot i que, alguns animals del grup probiòtic tendeixen a semblar-se més al grup probiòtic més omega-3 que al grup dieta hipercalòrica (**Figura 63A**). En canvi, en ionització negativa aquesta separació no és tan clara (**Figura 63C**). Quan s'utilitzen únicament les 100 espècies que presenten un valor menor de p (test ANOVA) s'observa que l'efecte del probiòtic més omega-3 és el que més preval en la separació d'aquestes mostres tot i que, també s'observen diferències en el metaboloma quan es compara el grup probiòtic respecte al grup dieta hipercalòrica (**Figura 63B** i **Figura 63D**). És important destacar la diferència d'abundància d'aquests metabòlits en les mostres, ja que la majoria dels metabòlits es troben en menor abundància en els animals alimentats amb dieta amb probiòtic i omega-3 quan es



comparen amb els animals dels altres grups. De manera general, sembla que la suplementació amb omega-3 en escorça frontal és un factor clau a l'hora d'explicar la variabilitat entre els diferents grups. En canvi, quan s'analitza el lipidoma de manera global, no es troben diferències clares entre els diferents grups d'estudi en cap de les dues ionitzacions (**Figura 64A i Figura 64C**). Tot i això, quan s'utilitzen els 100 lípids amb menor valor de p (test ANOVA) l'agrupació millora tot i no ser perfecta (**Figura 64B i Figura 64D**).

### METABOLOMIC PROFILE



### LIPIDOMIC PROFILE

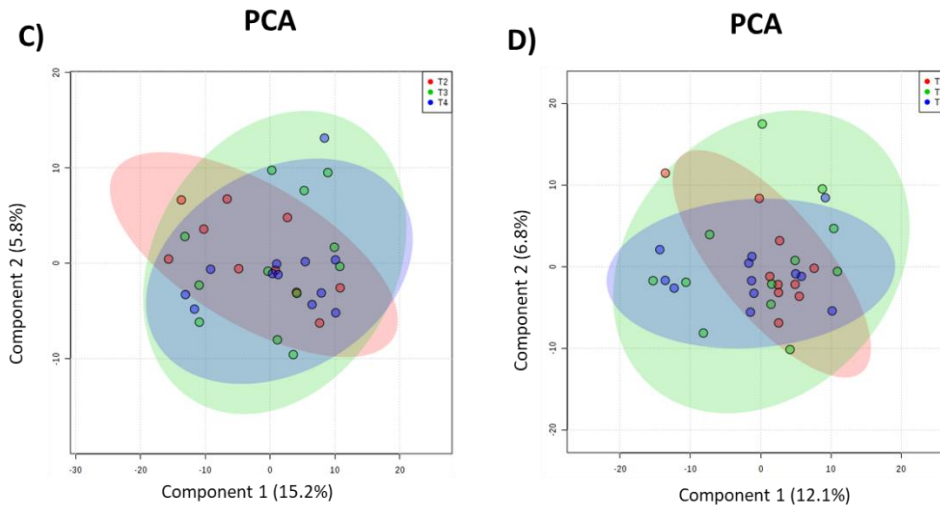
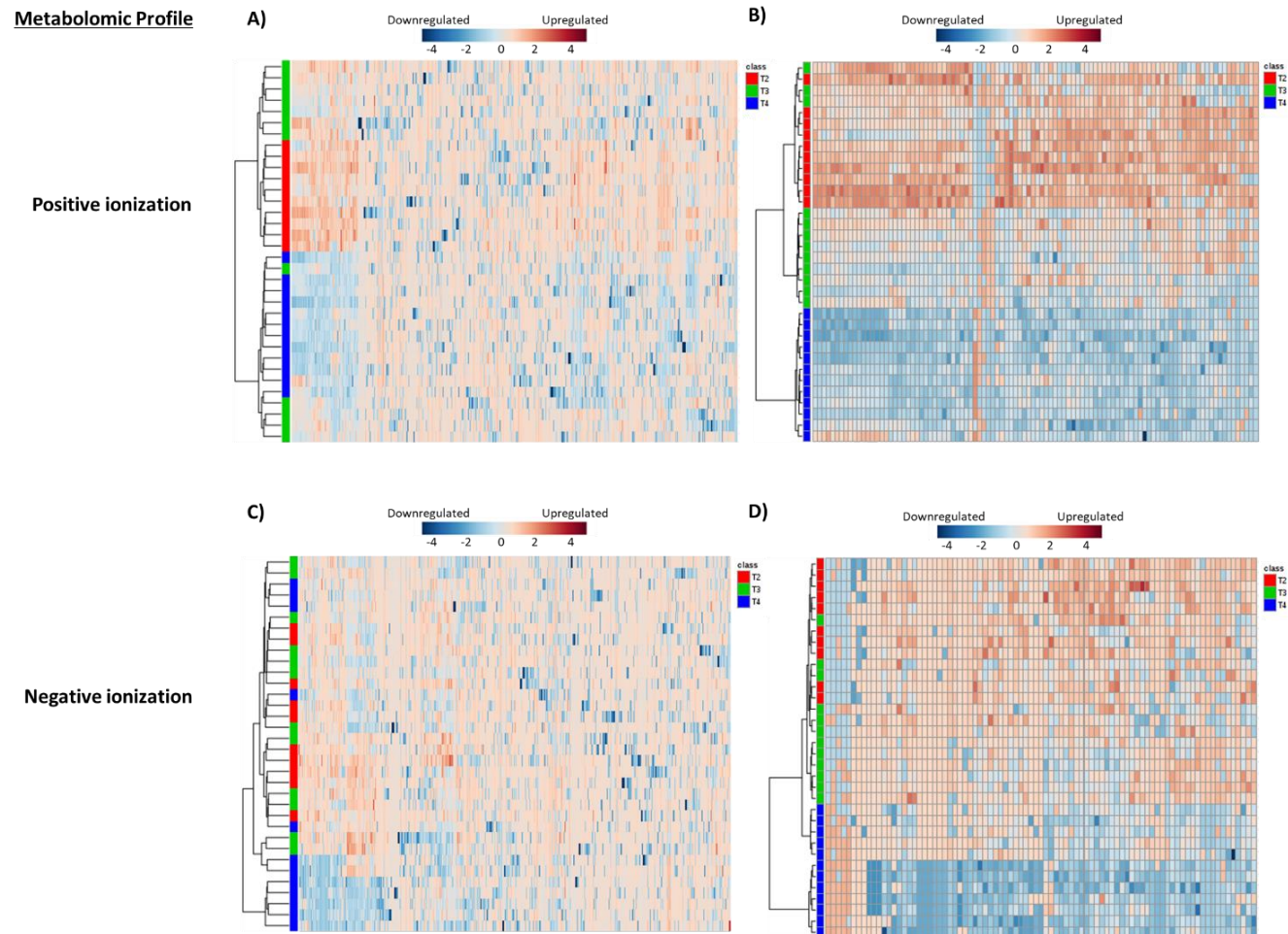
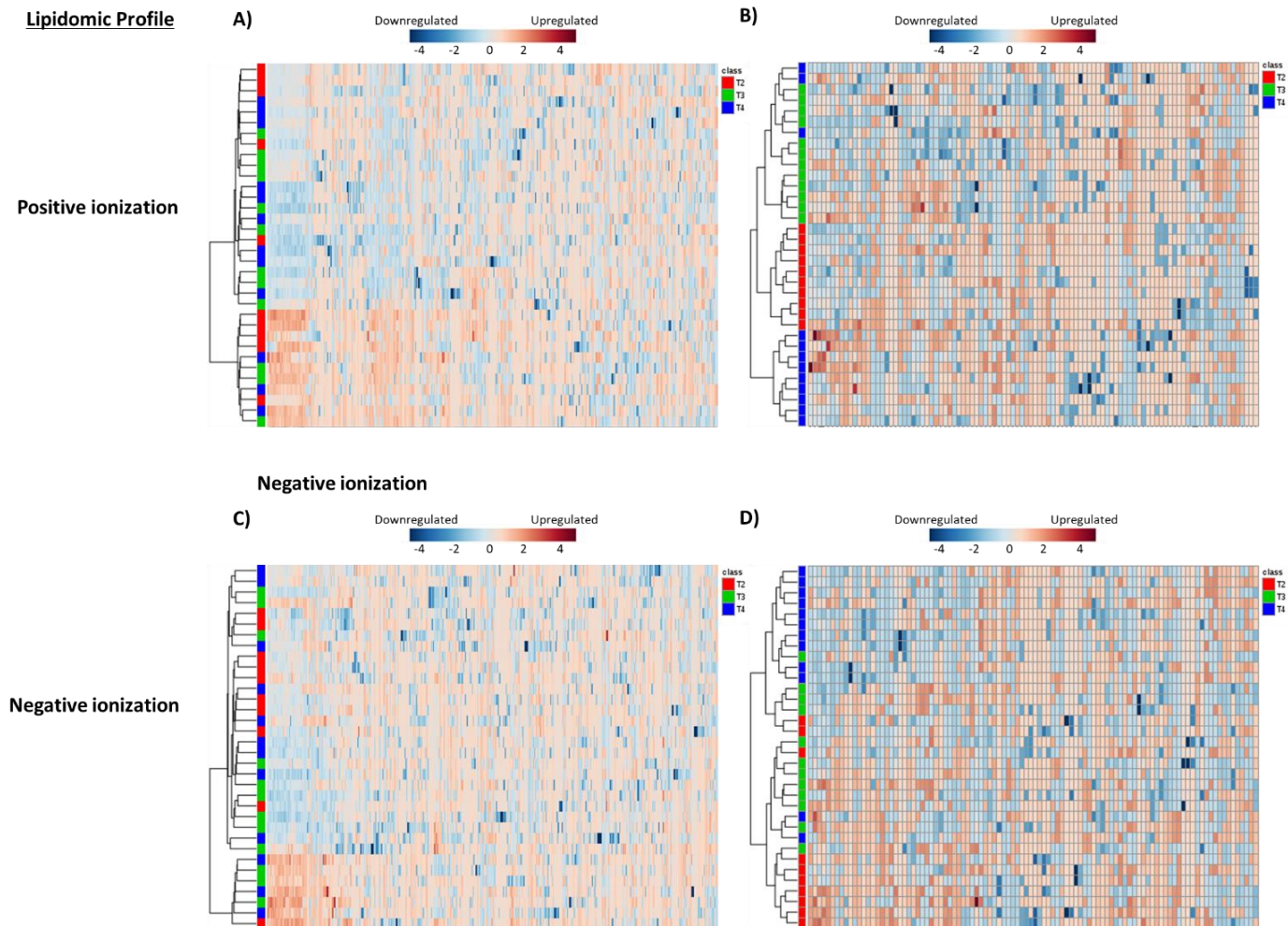


Figura 62. L'estadística multivariant no supervisada determina un perfil metabolòmic específic, en canvi l'efecte dels probiòtics no és el que més preval en la diferenciació del lipidoma de l'escorça frontal del model porcí d'obesitat prepuberal. Representació de l'anàlisi PCA en l'anàlisi metabolòmic **A)** en positiu i **B)** en negatiu i, en l'anàlisi lipidòmic **C)** en positiu i **D)** en negatiu. T2: grup dieta hipercalòrica, T3: grup probiòtic i T4: grup probiòtic més omega-3.



**Figura 63. Diferències metabolòmiques en escorça frontal dels animals obesos després de la suplementació amb probiòtics.** L'agrupació jeràrquica mostra l'abundància relativa de tot el metaboloma (A/C) i la dels 100 metabòlits més significatius (B/D) de l'escorça frontal en ionització positiva (part superior) i en ionització negativa (part inferior) del grup dieta hipercalòrica (T2), del grup probiòtic (T3) i del grup probiòtic més omega-3 (T4). Les mostres dels diferents grups s'agrupen en el dendrograma basant-se en una anàlisi de clusterització pel mètode Ward's, amb una mesura de distància d'Euclídea. L'escala del mapa de color es representa en base  $\log_2$  des del rang -4 (blau) a +4 (vermell) segons la seva abundància.



**Figura 64. Diferències lipídòmiques en escorça frontal dels animals obesos després de la suplementació amb probiòtics.** L'agrupació jeràrquica mostra l'abundància relativa de tot el lipidoma (A/C) i la dels 100 lípids més significatius (B/D) de l'escorça frontal en ionització positiva (part superior) i en ionització negativa (part inferior) del grup dieta hipercalòrica (T2), del grup probiòtic (T3) i del grup probiòtic més omega-3 (T4). Les mostres dels diferents grups s'agrupen en el dendrograma basant-se en una anàlisi de clusterització pel mètode Wards, amb una mesura de distància d'Euclídea. L'escala del mapa de color es representa en base  $\log_2$  des del rang -4 (blau) a +4 (vermell) segons la seva abundància.

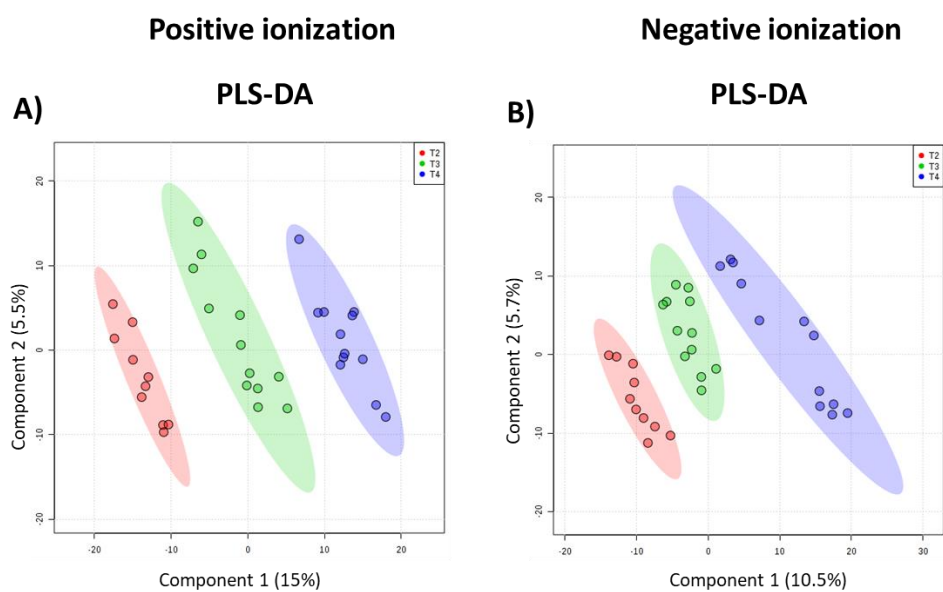
Un cop analitzat el metaboloma i el lipidoma de manera global i no supervisada, s'aplica una anàlisi específica per agrupament com és el PLS-DA. Utilitzant aquesta aproximació es veuen diferències clares causades per la influència dels probiòtics i aquests efectes es reflecteixen tant en el metaboloma (**Figura 65A** i **Figura 65B**) com en el lipidoma (**Figura 65C** i **Figura 65D**) d'aquest teixit, ja que els tres grups es troben separats. La prova de validació creuada en la metabolòmica en ionització positiva dóna com a resultat una precisió del 97% amb valors de  $R^2$  de 0,99 i valors de  $Q^2$  de 0,88 utilitzant cinc components. En el cas de la metabolòmica en ionització negativa els valors de precisió són del 83%,  $R^2$  de 0,99 i valors de  $Q^2$  de 0,65 utilitzant cinc components. L'error predictiu obtingut de l'anàlisi de boscos aleatoris és de 0,0294 en positiu i 0,235 en negatiu. Per altra banda, la prova de validació creuada en els resultats obtinguts en la lipidòmica no dirigida donen com a resultat una precisió del 39%, una  $R^2$  de 0,99 i una  $Q^2$  de 0,18 utilitzant cinc components en ionització positiva mentre que, els resultats en ionització negativa són d'una precisió del 47%, una  $R^2$  de 0,99 i una  $Q^2$  de 0,08 utilitzant tres components demostrant que el nostre model no té capacitat predictiva.

Per últim, per tal d'identificar metabòlits i lípids específics que mostren diferències significatives entre grups, s'ha realitzat una anàlisi univariant (ANOVA d'una via) seguit d'un test post Tukey per poder comparar tots els grups entre ells. En l'anàlisi metabolòmic en ionització positiva, a partir dels 675 metabòlits detectats i filtrats, s'han trobat 196 diferencials dels quals s'han identificat 40. En l'anàlisi lipidòmic, a partir de les 388 espècies lipídiques detectades i filtrades, es troben 13 espècies estadísticament diferents de les quals se n'identifiquen 2 (**Taula 53**). Per contra, en ionització negativa, dels 836 metabòlits detectats i filtrats, 92 presenten diferències significatives entre els 3 grups i només 12 s'han pogut identificar. En canvi, en l'anàlisi lipidòmic, dels 427 lípids, 25 presenten diferències significatives i s'han pogut identificar un total de 7 (**Taula 54**). La resta de compostos no identificats es troben en el repositori virtual Figshare (doi: 10.6084/m9.figshare.11663760).

Entre els compostos identificats en ionització positiva, la majoria d'aquests metabòlits es troben disminuïts en el grup probiòtic i en el grup probiòtic més omega-3 respecte el grup dieta hipercalòrica. En canvi, quan es comparen els dos grups probiòtics entre ells, la majoria d'aquests es troben augmentats en el grup probiòtic respecte el grup probiòtic més omega-3. Dins dels metabòlits identificats es troben aminoàcids com l'àcid aspàrtic i un aminoàcid acil, el N-estearoil-triptòfan, l'endocanabinoide esteroiletanolamina i el co-substrat SAM que intervé en la transferència de grups metilens en el metabolisme de la metionina. A més, també s'han trobat diferències en nucleòsids i nucleòtids implicats en el metabolisme de la purina i la

pirimidina. A partir d'aquí, tota la resta de metabòlits que s'han identificat en ionització positiva són lípids. Entre ells hi ha acils grassos, oxilipines derivades de l'AA i àcids grassos oxidats com l'àcid 7-oxo-11E,13-tetradecadienoic. Dins dels glicerofosfolípids tots són LysoGP, dins dels glicerolípid, només tenim el MG (18:1), esfingolípid com la glucosilesfingosina que és un derivat de la glucilceramida, i SM unides a àcid palmític (C16:0) i a àcid esteàric (C18:0). A més, també s'identifiquen lípids esterol com els àcids biliars, àcid quenodoxicòlic o ursodeoxicòlic i l'àcid litocòlic unit a un grup sulfat i esteroids com el colesterol sulfat o el ketocolesterol i l'ubiquinol 8 que pertany a la categoria de lípid prenol. En l'anàlisi lipidòmic s'identifica una PC (O-38:5) i una PC-N-metiletanolamina.

### METABOLOMIC PROFILE



### LIPIDOMIC PROFILE

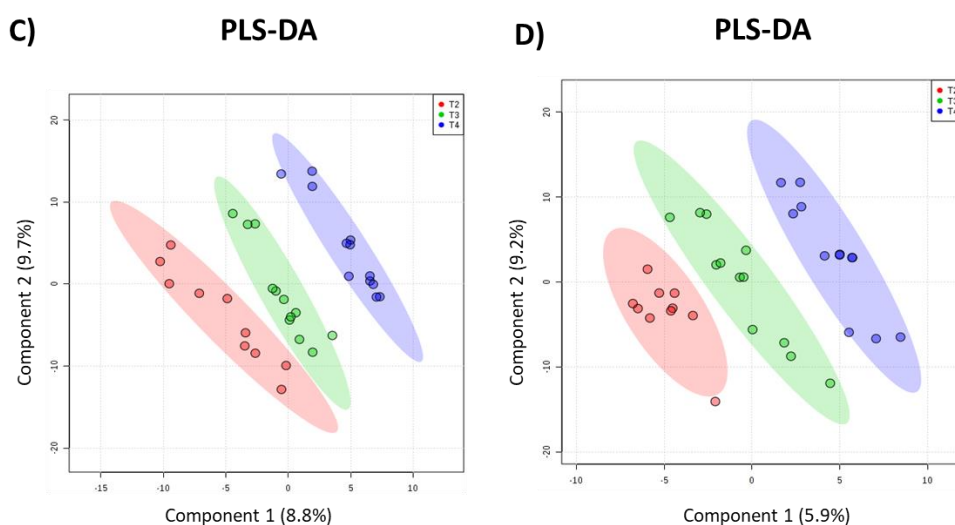


Figura 65. L'estadística multivariant determina un perfil metabolòmic i lipidòmic específic en l'escorça frontal d'aquests animals. Representació de l'anàlisi PLS-DA en l'anàlisi metabolòmic **A)** en positiu i **B)** en negatiu i, en l'anàlisi lipidòmic **C)** en positiu i **D)** en negatiu. T2: grup dieta hipercalòrica, T3: grup probiòtic i T4: grup probiòtic més omega-3.

**Taula 53.** Identitat dels metabòlits i de les espècies lipídiques d'escorça frontal en femelles de porc prepuberals en ionització positiva després de la suplementació amb probiòtics.

Classification	Compound	Mass	RT	FC (abs)	Regulation (T3 vs. T2)	FC (abs)	Regulation (T4 vs. T2)	FC (abs)	Regulation (T3 vs. T4)	P
<b>Metabolomic analysis</b>										
Aminoacids	L-Aspartic Acid	133,0376	0,5817779	1,1231301	down	1,2222964	down	1,0882945	up	0,00204321
	N-acetylaspartate	175,0482	0,49484453	1,1627433	down	1,3207698	down	1,1359082	up	0,00236754
	N-Formyl-L-glutamate	175,0482	0,58191115	1,1713737	down	1,3754373	down	1,1742086	up	1,44E-04
Acyl amino acids	N-stearoyl tryptophan	470,3473	4,2023115	1,1408905	down	1,3602222	down	1,1922461	up	1,62E-07
Endocannabinoids	Stearoylethanolamide	327,3138	11,563844	1,2130914	down	1,3926114	down	1,1479856	up	2,21E-06
Bile acids	Chenodeoxycholic acid sulfate Ursodeoxycholic acid 3-sulfate	472,248	11,715511	1,196859	down	1,4554247	down	1,2160369	up	6,23E-07
	Sulfolithocholic acid	456,2608	0,36454546	45,60136	down	4363,083	down	95,67879	up	7,26E-05
Methionine metabolism	S-Adenosylmethionine	288,9887	0,6005815	1,1621399	down	1,4142063	down	1,2168984	up	1,12E-05
Lipid mediators	5(6)-EpETrE methyl ester	334,2473	11,405814	2946,6392	up	1,9155973	up	1538,2357	up	6,04E-04
	5-HETE methyl ester,	350,2385	7,3414664	1,0731804	down	1,2305577	down	1,1466457	up	8,95E-10
	LTC4	625,2888	5,9059772	1,1641136	down	1,6500275	down	1,417411	up	5,92E-13
Fatty acyls	L-Citramalyl-CoA	897,1596	13,11055	14,578634	down	377,50833	down	25,89463	up	0,02736132
	S-3-oxodecanoyl cysteamine	245,1426	5,907387	1,0420223	up	1,1683367	down	1,217433	up	0,00244553
	Oleamide	281,2702	11,279333	1,1393973	down	1,3611656	down	1,1946366	up	2,34E-05
Glycerophospholipid	LysoPC(15:0)	481,316	11,271887	1,2877707	down	1,4141511	down	1,0981388	up	0,01502188
	LysoPC(18:0)	523,375	11,179132	1,1771653	down	1,5040224	down	1,2776645	up	9,78E-04
	LysoPE(16:0)	453,2856	10,5043335	1,2970139	down	1,9038725	down	1,467889	up	9,99E-04
	LysoPE(20:4)	501,2874	10,305333	1,3084404	down	1,6189587	down	1,2373194	up	0,00286916
	LysoPE(20:5)	499,2706	9,945223	1	up	2203,9358	up	2203,9358	down	1,59E-06
	LysoPE(22:2)	533,3441	11,440035	12,166588	up	111,18657	down	1352,7611	up	0,01567515
	LysoPE(22:4)	529,3188	10,840022	1,2992473	down	2,004903	down	1,5431266	up	3,85E-06
	LysoPE(22:5)	527,3022	10,656904	1,3225579	down	98,50693	down	74,48213	up	0,01452688
	LysoPE(22:6)	525,286	10,333821	1,3470457	down	1,3463653	down	1,0005052	down	0,01828577
LysoPE(24:0)	565,4209	11,708155	1,2107085	down	1,5792952	down	1,3044387	up	5,76E-05	

Classification	Compound	Mass	RT	FC (abs)	Regulation (T3 vs. T2)	FC (abs)	Regulation (T4 vs. T2)	FC (abs)	Regulation (T3 vs. T4)	P
	LysoPG(20:3)	534,3069	11,182179	1,0815421	down	1,2366496	down	1,1434133	up	5,81E-04
Glycerolipids	MG(18:1)	356,291	11,408822	1,0621775	down	1,3278893	down	1,2501576	up	0,01349985
Nucleotid	NADPH	745,0805	11,706954	1,2033699	down	1,6167507	down	1,3435193	up	3,79E-07
	Uridine diphosphate (UDP)	404,0134	0,58234096	1,3337579	down	1,6080513	down	1,2056546	up	2,35E-04
Oxo fatty acids	7-oxo-11E,13-Tetradecadienoic acid	238,1528	8,300067	1,0442932	down	1,1931559	down	1,1425488	up	0,00985873
Peptide	Glutathione	307,0853	0,5494773	1,0440722	down	1,2504138	down	1,1976316	up	5,77E-06
Pyrimidine nucleotide	Cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid	614,1459	12,981444	1,1853888	down	1,5173329	down	1,2800298	up	2,32E-09
Purine nucleosides	Inosine	268,0818	0,6862	1,1552578	down	1,3547299	down	1,1726645	up	9,59E-05
Prenol lipids	Ubiquinol 8	728,5796	13,218624	1,0982579	down	1,3510703	down	1,230194	up	0,01349985
Sphingolipids	Glucosylsphingosine	461,3404	6,564539	10,29588	down	604,3261	down	58,695923	up	0,02009945
	N-Stearoylsphingosine	565,5415	13,122267	1,6139802	down	2,1744456	down	1,3472568	up	4,18E-04
	SM(18:0)	730,5994	13,293956	1,5734224	down	1,8903936	down	1,2014532	up	1,12E-05
	SM(16:0)	702,5622	13,175512	1,2271318	down	1,4611055	down	1,1906672	up	0,00138767
Steroids	7-Ketocholesterol	400,3315	12,164818	2351,831	down	10,609395	down	221,67447	down	0,04612047
	Cholesterol Sulfate	466,3142	4,9433503	6430,6387	down	6430,6387	down	1	down	9,33E-12
<b>Lipidomic analysis</b>										
Glycerophospholipids	PC(O-38:5)	793,5889	7,584294	5,6330137	down	10780,035	down	1913,7256	up	5,58E-04
	PE-Nme(42:9)	827,564	6,9643745	1368,5769	down	29,43544	down	46,49419	down	0,00872618

L'anàlisi univariant (prova T d'Student) mostra determinades espècies diferencials ( $p < 0,05$ ) entre el grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4) i quina identitat es proposa basant-se en la massa exacta, RT i distribució isotòpica. **RT**: Temps de retenció (de l'anglès, *Retention time*); **FC**: Magnitud de canvi (de l'anglès, *Fold change value*).

**Taula 54.** Identitat dels metabòlits i de les espècies lipídiques d'escorça frontal en femelles de porc prepuberals en ionització negativa després de la suplementació amb probiòtics.

Classification	Compound	Mass	RT	FC (abs)	Regulation (T3 vs. T2)	FC (abs)	Regulation (T4 vs. T2)	FC (abs)	Regulation (T3 vs. T4)	P
<b>Metabolomic analysis</b>										
Fatty acid	Docosapentaenoic acid	330,2641	11,511257	1,0552323	down	976,3008	down	925,1994	up	0,00253348
Glycerophospholipids	PG(34:1)	748,5331	16,522266	1,1376327	down	1,2505816	down	1,0992842	up	0,04405895
	LysoPE(20:5)	499,2761	9,941232	2,2814474	up	65659,67	up	28779,838	down	9,54E-14
	LysoPE(22:4)	529,3322	10,840067	1,0542061	down	1,3688972	down	1,29851	up	0,00670716
	Phosphatidylinositol phosphate(34:1)	968,5599	16,165089	1,115599	down	1,1722751	down	1,0508033	up	0,02908296
	1-Stearoylglycerophosphoserine	525,3091	10,336406	1,1341062	down	10482,24	down	9242,732	up	0,00253348
Glycerolipids	MG(16:1)	328,2596	10,333946	7,7135835	down	865,2449	down	112,171524	up	0,04609235
Sphingolipids	Cer(17:0)	638,6104	13,393956	1,0511698	down	1,1819705	down	1,1244335	up	0,02567546
	Cer(18:0)	652,6264	13,481844	1,0504357	down	1,1490617	down	1,0938905	up	0,02197071
Lipid mediator	10-Hydroperoxy-H4-neuroprostane	392,2242	10,84712	4,3372912	down	842,438	down	194,2314	up	0,04609235
Prenol lipid	3,7R,11R,15-tetramethyl-hexadecanoic acid	312,309	12,37091	1,0024959	down	1,1189123	down	1,1161265	up	0,00478148
Pyrimidine nucleotide	Cytidine diphosphate	403,0236	0,58758974	1,1594279	down	354,71634	down	305,9408	up	0,00879109
<b>Lipidomic analysis</b>										
Glycerophospholipids	CL(70:3)	1431,0101	10,805936	1,0795579	down	21,272972	down	19,705261	up	0,0398014
	PE(48:0)	915,7541	8,623072	14,879518	down	21,57	up	320,95776	down	0,037215125
	LysoPA(20:4)	458,2432	4,1515	69,7868	down	1,1078	up	77,31227	down	0,013608836
	PS(40:3)	841,6008	7,205885	42,414806	up	4,273	down	181,23737	up	0,04113795
	PS(42:9)	857,5388	6,221143	28,861687	down	48,13	up	1389,1064	down	0,0024793
Glycerolipids	TG(54:8)	874,7269	10,085874	1254,5875	down	2,5009	down	501,6476	down	0,02071363
	TG(O-60:9)	942,8111	10,0675335	14,115778	down	1399,5	down	99,14177	up	0,038271103

L'anàlisi univariant (prova T d'Student) mostra determinades espècies diferencials ( $p < 0.05$ ) entre el grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4) i quina identitat es proposa basant-se en la massa exacta, RT i distribució isotòpica. **RT:** Temps de retenció (de l'anglès, *Retention time*); **FC:** Magnitud de canvi (de l'anglès, *Fold change value*).



En ionització negativa, la majoria de metabòlits segueixen la mateixa tendència que en ionització positiva, la majoria es troben disminuïts en el grup probiòtic i en el grup probiòtic més omega-3 respecte el grup dieta hipercalòrica i en canvi, quan es comparen els dos grups probiòtics entre ells, la majoria d'aquests es troben augmentats en el grup probiòtic respecte el grup probiòtic més omega-3. Dins dels metabòlits identificats hi ha l'àcid docosapentaenoic, dins dels glicerofosfolípids hi ha el PG (34:1) i diferents LysoGP, també s'identifica un MG (16:1), dos Cer, concretament la Cer (17:0) i la Cer (18:0), i la prostaglandina 10-hidroperoxi-H4-neuroprostan. També s'identifiquen un prenol lípid i un nucleòtid implicat en el metabolisme de la pirimidina. En l'anàlisi lipídomic s'identifiquen varis glicerofosfolípids, com la CL (70:3), PE i PS i el TG (54:8) i el TG (O-60:9).

A partir d'aquests resultats es realitza una anàlisi de vies (**Figura 66**) on s'observa que les vies metabòliques més alterades en l'escorça frontal del model animal després de la ingesta dels probiòtics són el metabolisme de la cisteïna i la metionina, el metabolisme de la pirimidina, el metabolisme de l'alanina, aspartat i glutamat, el metabolisme de l'alanina, aspartat i glutamat, el metabolisme del glutatió i el metabolisme dels glicerofosfolípids.

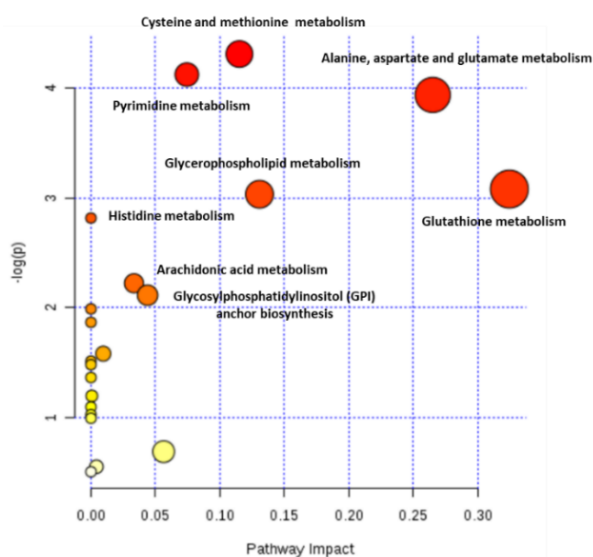


Figura 66. Representació gràfica de les vies metabòliques més alterades en escorça frontal després de la ingesta dels probiòtics. La gràfica representa el log del valor de p utilitzant un test Welch (eix Y) i el percentatge d'impacte de la via (eix X). La mida dels cercles representa el nombre de metabòlits identificats que formen part d'una mateixa via.

#### 4.3.2.4.2 Quantificació dels mediadors lipídics

A partir dels valors obtinguts en la quantificació d'oxilipines i aplicant estadística multivariant s'observa que l'anàlisi de PCA (**Figura 67A**) no separa les mostres segons el grup al que pertanyen. Aquests resultats també s'observen en l'anàlisi d'agrupació jeràrquica utilitzant les 25 oxilipines amb un valor de p més baix (test ANOVA) on es mostra que l'abundància d'aquests lípids no es capaç de separar els tres grups d'estudi (**Figura 67B**). L'anàlisi supervisat tampoc es

capaç de separar els tres grups (Figura 68A) on el lípid més rellevant és l'EPA en el grup probiòtic més omega-3 (Figura 68B).

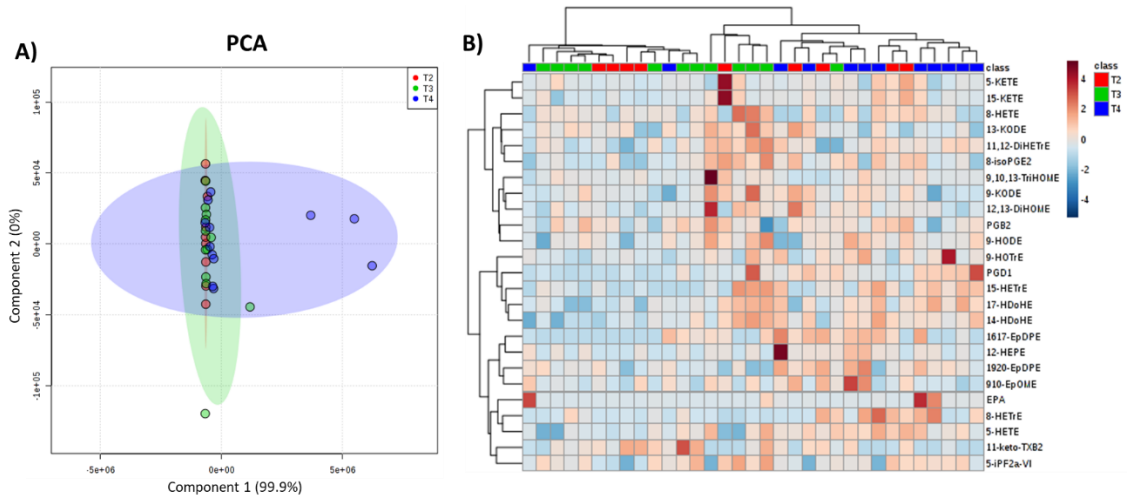


Figura 67. L'anàlisi multivariant no supervisada no revela un efecte dels probiòtics en perfil d'oxilipines en escorça frontal diferencial entre els tres d'estudi. A) Anàlisi PCA on es mostra la separació de les dades obtingudes en la lipidòmica dirigida. B) Anàlisi d'agrupació jeràrquica utilitzant les 25 oxilipines més significatives estadísticament aplicant un test ANOVA. Cada línia del gràfic representa una massa exacta ordenada pel seu RT i, els colors mostren quina és la seva abundància relativa. Les mostres dels diferents grups s'agrupen en el dendrograma basant-se en una anàlisi de clusterització pel mètode Wards amb una mesura de distància d'Euclídea. T2: grup dieta hipercalòrica, T3: grup probiòtic i T4: grup probiòtic més omega-3.

Els resultats obtinguts en la prova de validació creuada són d'una precisió del 0,42%, una R<sup>2</sup> del 0,15 i una Q<sup>2</sup> del 0,08 i el test de permutació dona valors de p més grans de 0,05 suggerint que la capacitat predictiva és millorable.

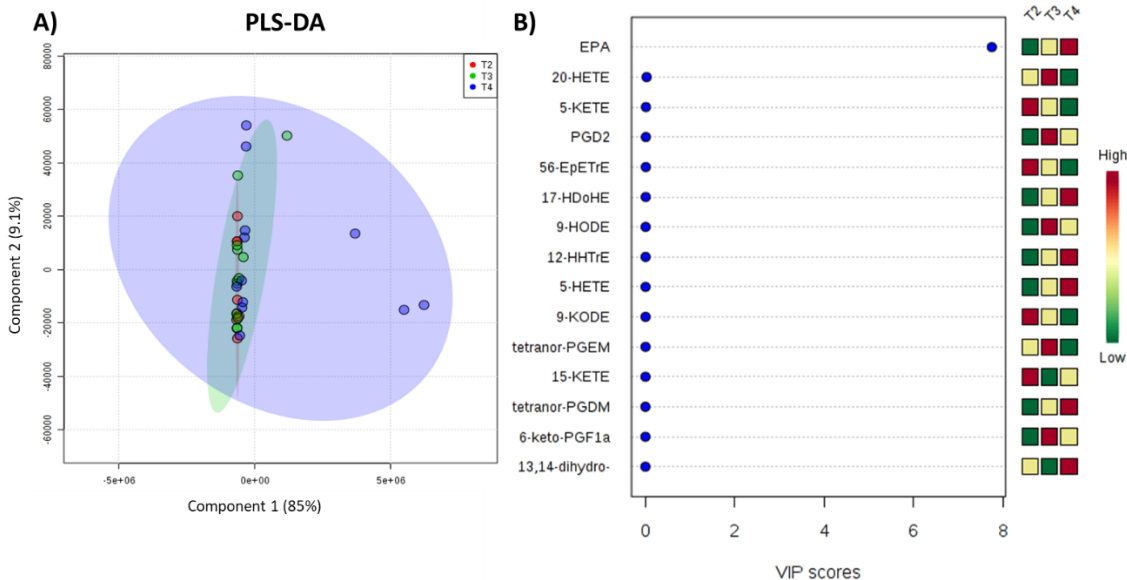


Figura 68. L'estadística multivariant supervisada indica que l'efecte probiòtic en el perfil d'oxilipines en escorça frontal no és capaç de discriminar els tres grups d'estudi. A) L'anàlisi PLS-DA no és capaç de definir una signatura lipidòmica específica per a cada grup; B) Oxilipines més importants que defineixen el PLS-DA. T2: grup dieta hipercalòrica, T3: grup probiòtic i T4: grup probiòtic més omega-3.

Els resultats individuals de cada oxilipina mostren que a nivell tissular no s'observen tants canvis com es poden observar a nivell plasmàtic (**Taula 55**). Tot i això, es veu un augment significatiu de 5-iPGF<sub>2α</sub>-VI derivat de AA i una disminució de 12(13)-EpOME derivat de LA quan es compara el grup probiòtic respecte al grup dieta hipercalòrica. En canvi, s'observa un augment de 15-HETrE, PGD<sub>1</sub> derivats de DGLA i de 4-HDoHE, 11-HDoHE i 17-HDoHE derivats de DHA en el grup dieta probiòtic més omega-3 respecte el grup dieta hipercalòrica. Quan es comparen els dos grups amb probiòtics s'observa un augment en el grup dieta probiòtic més omega-3 de 11-HDoHE, 19,20-DiHDDPA, 16(17)-EpDPE i de 19(20)-EpDPE derivats del DHA. No s'observen més canvis en les mostres d'escorça frontal d'aquests animals.

**Taula 55.** Concentracions (ng/mL) de les oxilipines derivades dels diferents PUFA en escorça frontal del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).

Lipid	T2 average±SEM	T3 average±SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average±SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
<b>AA derived lipids</b>						
PGD <sub>2</sub>	16,6 ± 2,5	20,7 ± 3,4	0,6958	23,6 ± 3,6	0,3540	0,8090
PGF <sub>2α</sub>	49,8 ± 7,9	62,0 ± 6,8	0,4753	56,3 ± 6,7	0,8036	0,8270
PGE <sub>2</sub>	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2	0,9363	1,2 ± 0,1	0,5071	0,6813
13,14-dihydro-15-keto-PGE <sub>2</sub>	3,5 ± 0,8	5,4 ± 1,2	0,4219	4,7 ± 0,9	0,7054	0,8719
8-isoPGE <sub>2</sub>	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2	0,9836	1,2 ± 0,1	0,5622	0,6268
6-keto-PGF <sub>1α</sub>	6,7 ± 0,8	9,7 ± 1,3	0,4247	8,9 ± 1,9	0,6202	0,9289
12-HHTrE	21,8 ± 3,4	28,2 ± 3,2	0,4662	26,7 ± 4,1	0,6348	0,9517
5-HETE	8,6 ± 0,9	10,6 ± 0,7	0,1605	9,8 ± 0,6	0,5052	0,6761
5-KETE	7,5 ± 1,4	7,4 ± 0,7	0,9946	6,9 ± 0,7	0,8759	0,8997
8-HETE	1,6 ± 0,3	2,7 ± 0,4	0,1319	1,9 ± 0,3	0,8103	0,3143
9-HETE	5,2 ± 1,2	5,9 ± 0,8	0,8181	4,8 ± 0,	0,9428	0,5875
11-HETE	5,8 ± 0,7	7,4 ± 1,1	0,4066	6,2 ± 0,6	0,9427	0,5521
12-HETE	4,2 ± 0,5	5,1 ± 0,7	0,5239	3,7 ± 0,5	0,8825	0,2117
15-HETE	9,9 ± 1,3	12,2 ± 1,7	0,4526	10,3 ± 0,8	0,9745	0,5333
15-KETE	5,8 ± 1,0	5,8 ± 0,5	>0,9999	5,8 ± 0,5	0,9962	0,9962
20-HETE	45,0 ± 5,8	42,7 ± 2,5	0,9132	43,1 ± 3,1	0,9361	0,9972
5,6-DiHETrE	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,4795	0,2 ± 0,0	0,6785	0,0917
8,9-DiHETrE	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,4359	0,3 ± 0,0	0,9884	0,2714
11,12-DiHETrE	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,2548	0,5 ± 0,0	0,6708	0,6944
14,15-DiHETrE	1,9 ± 0,2	2,1 ± 0,2	0,6632	1,9 ± 0,1	0,9768	0,7557
5(6)-EpETrE	35,7 ± 6,4	32,1 ± 3,3	0,8708	31,6 ± 5,1	0,8311	0,9960
8(9)-EpETrE	4,0 ± 0,6	3,9 ± 0,3	0,9868	4,3 ± 0,6	0,8994	0,7983
11(12)-EpETrE	3,2 ± 0,5	3,2 ± 0,3	0,9939	3,7 ± 0,5	0,7902	0,6918
14(15)-EpETrE	4,2 ± 0,6	4,0 ± 0,5	0,9623	4,9 ± 0,6	0,7315	0,5193
TXB <sub>2</sub>	3,8 ± 0,6	4,9 ± 0,7	0,4826	4,0 ± 0,6	0,9811	0,5472
PGB <sub>2</sub>	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,9597	0,1 ± 0,0	0,5308	0,6592
12-KETE	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,7894	0,4 ± 0,1	0,5794	0,9256
LTB <sub>4</sub>	ND	ND		ND		
PGJ <sub>2</sub>	ND	ND		ND		
delta-12-PGJ <sub>2</sub>	ND	ND		ND		
5,15-DiHETE	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4315	0,4 ± 0,0	0,9428	0,5817
5-iPGF <sub>2α</sub> -VI	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	<b>0,0373</b>	0,5 ± 0,0	0,6765	0,1593
8-isoPGF <sub>2α</sub>	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,5129	0,8 ± 0,1	0,9620	0,6340
11-keto-TXB <sub>2</sub>	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,9075	0,1 ± 0,0	0,5471	0,2627
19-HETE	ND	ND		ND		
11B-PGF <sub>2α</sub>	ND	ND		ND		

Lipid	T2 average±SEM	T3 average±SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average±SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
20-COOH-LTB <sub>4</sub>	ND	ND		ND		
LTE <sub>4</sub>	ND	ND		ND		
6-trans-LTB <sub>4</sub>	ND	ND		ND		
20-OH-LTB <sub>4</sub>	ND	ND		ND		
8,15-DiHETE	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5985	0,6 ± 0,0	0,3565	0,8904
LXA <sub>4</sub>	ND	ND		ND		
LXB <sub>4</sub>	ND	ND		ND		
iPGF <sub>2α</sub> -IV	ND	ND		ND		
tetranor-PGEM	ND	ND		ND		
tetranor-PGDM	ND	ND		ND		
15-epi-LXA <sub>4</sub>	ND	ND		ND		
14,15-LTE <sub>4</sub>	ND	ND		ND		
15-deoxy-delta-12,14-PGJ <sub>2</sub>	ND	ND		ND		
<b>LA derived lipids</b>						
9-HODE	13,8 ± 1,0	14,9 ± 1,3	0,7965	14,3 ± 0,9	0,9522	0,9257
9-KODE	9,2 ± 0,8	9,2 ± 1,1	0,9988	8,5 ± 0,6	0,8575	0,8085
9(10)-EpOME	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,4049	1,3 ± 0,2	0,9824	0,4550
12(13)-EpOME	1,7 ± 0,2	1,3 ± 0,1	<b>0,0405</b>	1,4 ± 0,1	0,1739	0,7271
9,10-DiHOME	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,2	0,7115	1,4 ± 0,1	0,9921	0,5876
12,13-DiHOME	1,6 ± 0,2	2,0 ± 0,2	0,4450	1,7 ± 0,2	0,9168	0,6225
9,10,13-TriHOME	1,7 ± 0,4	1,2 ± 0,1	0,2711	1,2 ± 0,2	0,3356	0,9879
9,12,13-TriHOME	1,2 ± 0,3	0,8 ± 0,1	0,3468	0,9 ± 0,1	0,5497	0,9119
EKODE	2,1 ± 1,1	0,6 ± 0,4	0,3260	1,6 ± 0,7	0,8479	0,5895
12(13)-EpODE	ND	ND		ND		
<b>GLA derived lipids</b>						
13-HODE	21,6 ± 1,9	24,7 ± 2,4	0,5149	22,1 ± 1,3	0,9843	0,5723
13-KODE	4,3 ± 0,5	4,5 ± 0,5	0,9641	3,6 ± 0,3	0,4316	0,2478
<b>DGLA derived lipids</b>						
15-HETrE	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,1824	0,9 ± 0,1	<b>0,0192</b>	0,4881
PGE <sub>1</sub>	0,7 ± 0,2	1,1 ± 0,4	0,4997	1,3 ± 0,2	0,9640	0,6127
13-HOTrE(y)	ND	ND		ND		
TXB <sub>1</sub>	ND	ND		ND		
PGD <sub>1</sub>	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,9686	0,5 ± 0,1	<b>0,0470</b>	0,0695
8-HETrE	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,8843	0,3 ± 0,1	0,4019	0,1494
<b>DHA derived lipids</b>						
DHA	ND	ND		ND		
4-HDoHE	2,8 ± 0,5	4,4 ± 0,3	0,1063	4,3 ± 0,4	<b>0,0141</b>	0,5168
11-HDoHE	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8881	1,3 ± 0,1	<b>0,0066</b>	<b>0,0091</b>
17-HDoHE	2,8 ± 0,6	4,2 ± 0,6	0,1955	5,6 ± 0,4	<b>0,0041</b>	0,1668
19,20-DiHDPA	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7171	0,9 ± 0,1	0,0787	<b>0,0073</b>
16(17)-EpDPE	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,9511	1,3 ± 0,1	0,0767	<b>0,0250</b>
19(20)-EpDPE	2,5 ± 0,3	2,2 ± 0,1	0,6332	3,4 ± 0,3	0,0768	<b>0,0768</b>
10,17-DiHDoHE	ND	ND		ND		
7-Maresin-1	ND	ND		ND		
RvD <sub>1</sub>	ND	ND		ND		
RvD <sub>2</sub>	ND	ND		ND		
17-epi-RvD <sub>1</sub>	ND	ND		ND		
8-HDoHE	ND	ND		ND		
14-HDoHE	3,1 ± 0,4	3,9 ± 0,5	0,4240	4,4 ± 0,4	0,1013	0,6272
<b>EPA derived lipids</b>						
EPA	21,2 ± 2,8	25,6 ± 3,9	0,9854	237,5 ± 30,5	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
12-HEPE	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,9790	0,3 ± 0,0	0,0691	0,0734
14,15-DiHETE	ND	ND		ND		
11-HEPE	ND	ND		ND		
8-HEPE	ND	ND		ND		
5-HEPE	ND	ND		ND		

Lipid	T2 average±SEM	T3 average±SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average±SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
17,18-DiHETE	ND	ND		ND		
18-HEPE	ND	ND		ND		
TXB <sub>3</sub>	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,2	0,9935	1,7 ± 0,2	0,8806	0,9149
15-HEPE	ND	ND		ND		
9-HEPE	ND	ND		ND		
14(15)-EpETE	ND	ND		ND		
17(18)-EpETE	ND	ND		ND		
PGD <sub>3</sub>	ND	ND		ND		
PGE <sub>3</sub>	ND	ND		ND		
5,6-DiHETE	ND	ND		ND		
LXA <sub>5</sub>	ND	ND		ND		
8-iso-PGF <sub>3α</sub>	ND	ND		ND		
11-keto-TXB <sub>3</sub>	ND	ND		ND		
<b>EDA derived lipids</b>						
15-HEDE	ND	ND		ND		
11-HEDE	ND	ND		ND		
15-KEDE	ND	ND		ND		
<b>ETA derived lipids</b>						
5-HETrE	ND	ND		ND		
LTB <sub>3</sub>	ND	ND		ND		
<b>ALA derived lipids</b>						
9-HOTrE	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,9987	0,3 ± 0,0	0,6433	0,6316
9-KOTrE	ND	ND		ND		
13-HOTrE	ND	ND		ND		
<b>DPA derived lipids</b>						
7,17-hydroxy-DPA	ND	ND		ND		

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup i el valor de p aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey. **AA**: Àcid araquidònic; **LA**: Àcid linoleic; **GLA**: Àcid gamma-linoleic; **DGLA**: Àcid dihomog-γ-linolènic; **DHA**: Àcid docosahexaenoic; **EPA**: Àcid eicosapentaenoic; **EDA**: Àcid 11,14-eicosadienoic; **ETA**: Àcid 5,8,11-eicosatrienoic; **ALA**: Àcid α-linolènic; **DPA**: Àcid docosapentaenoic. **ND**: No detectable.

#### 4.3.2.4.3 Anàlisi composicional dels àcids grassos

Continuant amb l'estudi lipídomic es realitza l'anàlisi de la composició d'àcids grassos per tal de determinar si existeixen canvis produïts per la influència dels probiòtics en les mostres d'escorça frontal. La tècnica utilitzada ha estat GC-FID que permet realitzar la detecció, la identificació i la quantificació d'aquests. En la **Taula 56** es mostren els canvis produïts en la composició d'àcids grassos. Concretament, quan es compara el grup probiòtic respecte al grup dieta hipercalòrica no s'observa cap canvi mentre que, quan es compara el grup probiòtic més omega-3 s'observa un augment significatiu dels àcids grassos C18:3 n3, C20:3 n6, C20:5 n3 i C22:6 n3 i una disminució significativa del C18:1 n9 trans, C22:5 n6 i C22:5 n3. Comparant el grup probiòtic més omega-3 respecte al grup probiòtic veiem que l'omega-3 produeix canvis en els àcids grassos C18:3 n3, C20:3 n6, C20:5 n3 i C22:6 n3 observant un augment significatiu d'aquests i, una disminució significativa en C18:1 n9 trans, C22:5 n6 i en l'àcid gras C22:5 n3. Els àcids grassos que no pateixen cap canvi significatiu entre els grups són el C14:0, C16:0, C16:1 n7, C18:0, C18:1 n9 cis, C18:2 n6, C18:4 n3, C20:0, C20:1 n9, C20:2 n6, C20:4 n6, C22:0, C22:1 n9 i C22:4 n6.

**Taula 56.** Composició lipídica de l'escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).

Lipid	T2 average±SEM	T3 average±SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average±SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
C14:0	0,831 ± 0,0	0,863 ± 0,0	0,8668	0,798 ± 0,1	0,8537	0,5302
C16:0	24,087 ± 0,2	23,453 ± 0,4	0,2992	23,409 ± 0,3	0,2537	0,9933
C16:1 n7	0,804 ± 0,0	0,781 ± 0,0	0,7794	0,803 ± 0,0	0,9995	0,7782
C18:0	23,268 ± 0,3	23,365 ± 0,2	0,9556	23,057 ± 0,2	0,8075	0,6090
C18:1 n9 cis	18,599 ± 0,3	18,871 ± 0,3	0,8513	18,624 ± 0,4	0,9986	0,8646
C18:1 n9 trans	5,559 ± 0,0	5,606 ± 0,1	0,8603	5,314 ± 0,0	<b>0,0271</b>	<b>0,0050</b>
C18:2 n6	0,723 ± 0,0	0,776 ± 0,0	0,4184	0,807 ± 0,0	0,1232	0,7158
C18:3 n3	0,025 ± 0,0	0,026 ± 0,0	0,9396	0,048 ± 0,0	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
C18:4 n3	0,138 ± 0,0	0,127 ± 0,0	0,3774	0,119 ± 0,0	0,0653	0,5625
C20:0	0,250 ± 0,0	0,273 ± 0,0	0,3017	0,249 ± 0,0	0,9975	0,2422
C20:1 n9	0,572 ± 0,0	0,594 ± 0,0	0,8707	0,568 ± 0,0	0,9950	0,8102
C20:2 n6	0,033 ± 0,0	0,032 ± 0,0	0,8779	0,029 ± 0,0	0,1433	0,3068
C20:3 n6	0,518 ± 0,0	0,520 ± 0,0	0,9971	0,791 ± 0,0	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
C20:4 n6	9,892 ± 0,2	9,431 ± 0,2	0,1318	9,334 ± 0,1	0,0562	0,8996
C20:5 n3	0,013 ± 0,0	0,012 ± 0,0	0,8666	0,022 ± 0,0	<b>0,0002</b>	<b>&lt;0,0001</b>
C22:0	0,352 ± 0,0	0,379 ± 0,0	0,5600	0,343 ± 0,0	0,9339	0,3305
C22:1 n9	0,701 ± 0,0	0,705 ± 0,0	0,9965	0,652 ± 0,0	0,5791	0,5290
C22:4 n6	0,102 ± 0,0	0,108 ± 0,0	0,8543	0,088 ± 0,0	0,4333	0,1633
C22:5 n6	4,442 ± 0,1	4,335 ± 0,1	0,6957	3,752 ± 0,1	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0002</b>
C22:5 n3	0,059 ± 0,0	0,061 ± 0,0	0,8634	0,048 ± 0,0	<b>0,0207</b>	<b>0,0037</b>
C22:6 n3	9,032 ± 0,3	8,345 ± 0,3	0,2479	10,838 ± 0,2	<b>0,0005</b>	<b>&lt;0,0001</b>

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup i el valor de p aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey.

#### 4.3.2.4.3.1 Índexs derivats de la composició d'àcids grassos

A partir de l'anàlisi composicional en àcids grassos s'han calculat els índexs que ens indiquen els canvis composicionals de forma global. La **Taula 57** mostra els valors dels índexs dels tres grups experimentals. Si es té en compte l'efecte del probiòtic, no s'observen canvis estadísticament significatius respecte al grup dieta hipercalòrica. Per altra banda, el grup probiòtic més omega-3 mostra diferències significatives en alguns dels índexs calculats. Un dels índexs que varia en aquest grup respecte als altres grups és en el contingut de PUFA, tant els de la sèrie n3 com n6, respecte al grup dieta hipercalòrica. Un altre dels índexs que varia és l'índex DBI i l'índex PIn on s'observa un augment d'ambdós índexs quan es compara el grup probiòtic més omega-3 respecte al grup probiòtic. Per últim, aquest mateix grup mostra un augment significatiu respecte a tots els altres grups en l'índex AI.

**Taula 57.** Índexs derivats de la composició en àcids grassos en escorça frontal de porc del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).

Fatty acid indexes	T2 average±SEM	T3 average±SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average±SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
ACL	18,282 ± 0,013	17,663 ± 0,429	0,4911	18,265 ± 0,07	0,9985	0,4901
SFA	48,789 ± 0,268	48,206 ± 0,531	0,6266	47,856 ± 0,417	0,3112	0,8292
UFA	51,211 ± 0,268	48,536 ± 1,902	0,5314	51,78 ± 0,315	0,9452	0,3181
MUFA	26,234 ± 0,29	24,767 ± 1,563	0,9008	25,907 ± 0,424	0,9751	0,9705
PUFA	24,977 ± 0,375	23,768 ± 0,521	0,1250	25,873 ± 0,305	0,3191	<b>0,0026</b>
PUFAn6	15,711 ± 0,213	15,2 ± 0,3	0,2794	14,799 ± 0,131	<b>0,0243</b>	0,4163

Fatty acid indexes	T2 average±SEM	T3 average±SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average±SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
PUFAn3	9,266 ± 0,269	8,568 ± 0,343	0,2359	11,074 ± 0,243	<b>0,0005</b>	<b>&lt;0,0001</b>
DBI	146,665 ± 1,835	138,782 ± 3,888	0,1251	152,387 ± 1,472	0,3219	<b>0,0027</b>
Pln	142,365 ± 2,606	134,382 ± 3,46	0,1447	150,951 ± 2,26	0,1094	<b>0,0006</b>
AI	96,797 ± 2,876	94,029 ± 3,261	0,7826	124,898 ± 2,549	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup i el valor de p aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey. **ACL**: Longitud mitjana de la cadena (de l'anglès, *Average chain length*); **SFA**: Àcids grassos saturats (de l'anglès, *Saturated fatty acids*); **UFA**: Àcids grassos insaturats (de l'anglès, *Unsaturated fatty acids*); **MUFA**: Àcids grassos monoinsaturats (de l'anglès, *Monounsaturated fatty acids*); **PUFA**: Àcids grassos poliinsaturats (de l'anglès, *Polyunsaturated fatty acids*); **PUFAn6**: Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n6 (de l'anglès, *n6 Polyunsaturated fatty acids*); **PUFAn3**: Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n3 (de l'anglès, *n3 Polyunsaturated fatty acids*); **DBI**: Índex de dobles enllaços (de l'anglès, *Double bond index*); **Pln**: Índex de peroxidabilitat (de l'anglès, *Peroxidizability index*); **AI**: Índex antiinflamatori (de l'anglès, *Anti-inflammatory index*).

#### 4.3.2.4.3.2 Estimació de les activitats desaturases i elongases

A partir de l'anàlisi composicional en àcids grassos s'han estimat les activitats desaturases (**Taula 58**) i elongases (**Taula 59**). Els resultats obtinguts mostren diferències significatives en la majoria de les activitats estimades de les desaturases i diferències significatives en les activitats de les elongases Elov1 5 (n6) i Elov1 2-5 (n3). Específicament, tots els canvis que s'observen principalment són enzims implicats en la síntesi d'àcids grassos de la sèrie n3 i n6.

**Taula 58.** Estimació de l'activitat desaturasa en escorça frontal de femelles porc prepuberal del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).

		T2 average±SEM	T3 average±SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average±SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
Δ5 (n6)	C20:4/C20:3	19,222 ± 0,6	18,309 ± 0,652	0,5026	11,932 ± 0,405	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Δ6 (n3)	C18:4/C18:3	5,736 ± 0,447	5,027 ± 0,263	0,3035	2,617 ± 0,266	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Δ8 (n6)	C20:3/C20:2	15,935 ± 0,881	16,466 ± 1,26	0,9361	27,278 ± 1,01	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Δ9 (n7)	C16:1/C16:0	0,033 ± 0,001	0,034 ± 0,002	0,8836	0,034 ± 0,001	0,8836	>0,9999
Δ9 (n9)	C18:1/C18:0	1,039 ± 0,015	0,979 ± 0,067	0,6169	1,04 ± 0,023	0,9999	0,5781

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup i el valor de p aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey.

**Taula 59.** Estimació de l'activitat elongasa en escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).

		T2 average±SEM	T3 average±SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average±SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
Elov1 3 (n9)	C20:1/C18:1	0,024 ± 0,001	0,024 ± 0,001	>0,9999	0,024 ± 0,001	>0,9999	>0,9999
Elov1 5 (n6)	C20:2/C18:2	0,047 ± 0,003	0,044 ± 0,003	0,7173	0,036 ± 0,002	<b>0,0204</b>	0,1003
Elov1 6 (n9)	C18:0/C16:0	0,967 ± 0,016	0,998 ± 0,015	0,2605	0,986 ± 0,009	0,5942	0,7939
Elov1 1-3-7 <sup>a</sup> (n9)	C20:0/C18:0	0,011 ± 0	0,012 ± 0,001	0,7024	0,011 ± 0,001	>0,9999	0,6794
Elov1 1-3-7 <sup>b</sup> (n9)	C22:0/C20:0	1,408 ± 0,024	1,383 ± 0,034	0,8016	1,37 ± 0,022	0,5910	0,9362
Elov1 2-5 (n6)	C22:4/C20:4	0,01 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,3623	0,009 ± 0,001	0,7704	0,0916
Elov1 2-5 (n3)	C22:5/C20:5	5,251 ± 0,519	5,325 ± 0,504	0,9913	2,22 ± 0,127	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>

Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup i el valor de p aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey.

#### 4.3.2.4.4 Anàlisi de marcadors de modificació oxidativa proteica

Per tal d'estudiar com afecta la ingesta de probiòtics i omega-3 al dany oxidatiu proteic en escorça frontal s'han estudiat diferents marcadors tant de dany oxidatiu directe (HAVA) com de dany glicooxidatiu (CEL), lipooxidatiu (MDAL) i glicooxidatiu i lipooxidatiu (CMC i CML). Els resultats, recollits en la **Taula 60**, indiquen que hi ha una disminució del dany oxidatiu a proteïnes derivat de l'oxidació de lípids, mesurat pel marcador MDAL, quan es compara la dieta

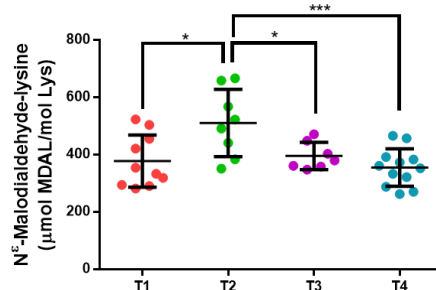
probiòtic i la dieta probiòtic més omega-3 respecte al grup dieta hipercalòrica. A més, aquesta reducció és més accentuada en el grup suplementat amb omega-3.

**Taula 60.** Marcadors de dany oxidatiu en escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4).

Markers	T2 average±SEM	T3 average±SEM	[T2 vs. T3] p-value	T4 average±SEM	[T2 vs. T4] p-value	[T3 vs. T4] p-value
HAVA	17649,9 ± 1198	12220,2 ± 1222,1	0,0695	12426,3 ± 1704,3	0,1104	0,9611
CEL	237,3 ± 17,6	261,8 ± 25,8	0,6156	214,8 ± 6,9	0,6390	0,1429
CML	1138,9 ± 49	1016,8 ± 50,5	0,2813	1043,2 ± 56,1	0,4235	0,9307
MDAL	510,8 ± 41,5	396,3 ± 18	<b>0,0299</b>	355,5 ± 18,9	<b>0,0009</b>	0,5477
CMC	256,9 ± 20,2	293,9 ± 30,9	0,5306	226,6 ± 15,5	0,6402	0,1019

Els valors s'expressen com a µmol de HAVA, CEL, MDAL, CML i CMC / mol de lisina i es representen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals. El valor de p aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey. **HAVA:** Àcid aminoal·lèric; **CEL:** N<sup>ε</sup>-carboxietil-lisina; **CML:** N<sup>ε</sup>-carboximetil-lisina; **MDALys:** Malondialdehid-lisina; **CMC:** S-(carboximetil)-cisteïna.

De manera interessant i tal com s'ha descrit anteriorment, els valors de MDAL es troben augmentats en la dieta hipercalòrica respecte la dieta control. La **Figura 69** mostra el resultat del dany oxidatiu proteic derivat de lipoxidació mitjançant la detecció i quantificació del marcador MDAL on es pot observar la disminució dels nivells de MDAL en els animals alimentats amb dieta hipercalòrica juntament amb els probiòtics. Per tant, tot i que la dieta hipercalòrica produeix un augment de la modificació oxidativa proteica, aquesta alteració és revertida quan s'administra una dieta hipercalòrica juntament amb el probiòtic.



**Figura 69.** La suplementació amb probiòtic i amb probiòtic més omega-3 modula la lesió oxidativa a nivell lipídic. Nivells de MDAL en escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup control (T1), grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4). Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM de mínim 8 animals per grup. Els asteriscs representen diferències significatives on \*p<0,05 i \*\*\*p<0,001 aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey.

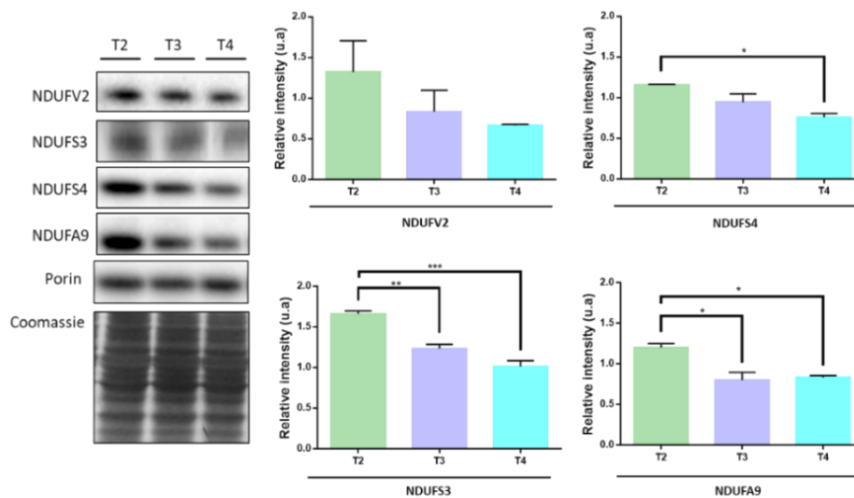
#### 4.3.2.4.4.1 Determinació del contingut de complexos en les mostres d'escorça frontal

Per tal de saber si la composició de la cadena respiratòria mitocondrial es veu també modificada per la ingesta de probiòtics, s'ha realitzat l'estimació de la quantitat d'algunes de les subunitats que formen els complexos de la cadena de transport electrònic mitocondrial, relativitzant els càlculs sempre a la càrrega de porina. A continuació es desglossen els resultats obtinguts.



#### 4.3.2.4.4.1.1 Complex I

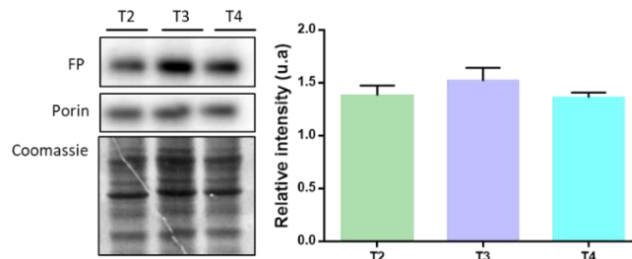
La **Figura 70** mostra els resultats obtinguts en les subunitats NDUFV2, NDUFS3, NDUFS4 i NDUFA9 del complex I de la cadena de transport electrònic mitocondrial. S'observa una disminució de les subunitats del complex I analitzades en els grups probiòtic i probiòtic més omega-3 respecte al grup dieta hipercalòrica. Aquests resultats són molt interessants ja que, com s'ha explicat en apartats anteriors, la dieta hipercalòrica augmenta la quantitat d'aquestes subunitats del complex I, fet que pot ser com a mínim parcialment revertit amb la suplementació de probiòtics i omega-3.



**Figura 70.** La suplementació amb probiòtic provoca una disminució en el contingut del complex I. Quantitat de les subunitats *NDUFV2*, *NDUFS3*, *NDUFS4* i *NDUFA9* del complex I en escorça frontal de porc del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4). Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi dels grups experimentals respecte al grup control calculant la relació de la densitometria de Cl/densitometria de porina i estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM de mínim 8 animals per grup. Els asteriscs representen diferències significatives on \*p<0,05, \*\*p<0,01 i \*\*\*p<0,001 aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey.

#### 4.3.2.4.4.1.2 Complex II

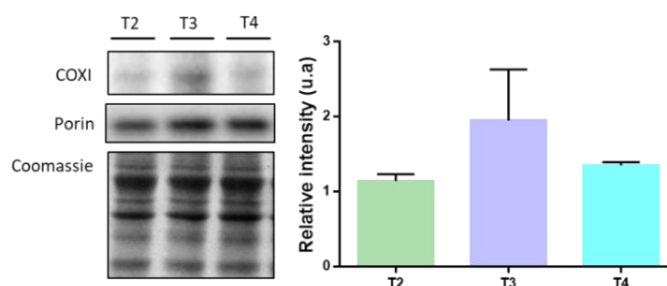
S'ha analitzat la subunitat Flavoproteïna del complex II de la cadena de transport electrònic mitocondrial (**Figura 71**) però no hi ha canvis significatius en el nivell del complex II entre els grups experimentals estudiats.



**Figura 71.** La suplementació amb probiòtic no induïx canvis en el contingut del complex II. Quantitat de les subunitats *Flavoprotein* del complex II en escorça frontal de porc del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4). Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi dels grups experimentals respecte al grup control calculant la relació de la densitometria de CII/densitometria de porina i estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM de mínim 8 animals per grup.

#### 4.3.2.4.4.1.3 Complex III

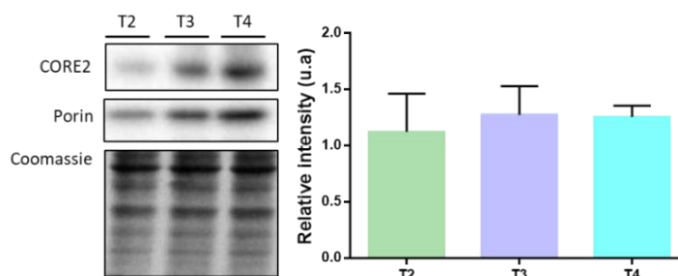
S'ha analitzat COXI del complex III de la cadena de transport electrònic mitocondrial (**Figura 73**) i tampoc s'observen diferències significatives en el contingut d'aquesta subunitat.



**Figura 72.** La suplementació amb probiòtic no induïx canvis en el contingut del complex III. Quantitat de les subunitats COXI del complex III en escorça frontal de porc del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4). Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi dels grups experimentals respecte al grup control calculant la relació de la densitometria de CII/densitometria de porina i estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM de mínim 8 animals per grup.

#### 4.3.2.4.4.1.4 Complex IV

S'ha analitzat CORE2 del complex IV de la cadena de transport electrònic mitocondrial (**Figura 72**) i no s'observen diferències significatives en el contingut d'aquesta subunitat del complex IV.



**Figura 73.** La suplementació amb probiòtic no induïx canvis en el contingut del complex IV. Quantitat de les subunitats CORE2 del complex IV en escorça frontal de porc del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4). Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi dels grups experimentals respecte al grup control calculant la relació de la densitometria de CII/densitometria de porina i estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM de mínim 8 animals per grup.

#### 4.3.2.4.4.2 Metabolisme energètic

Per últim, es mostren els resultats dels nivells dels metabòlits intermediaris del cicle de Krebs. En la **Figura 74** es pot observar com els nivells de citrat/isocitrat disminueixen significativament en el grup probiòtic respecte al grup dieta hipercalòrica. Per contra hi ha un augment significatiu quan es compara el grup probiòtic i el grup probiòtic més omega-3. Els metabòlits intermediaris fumarat i malat mostren un augment significatiu en el grup probiòtic més omega-3 respecte als altres dos grups i no s'observen canvis en els nivells de succinat.

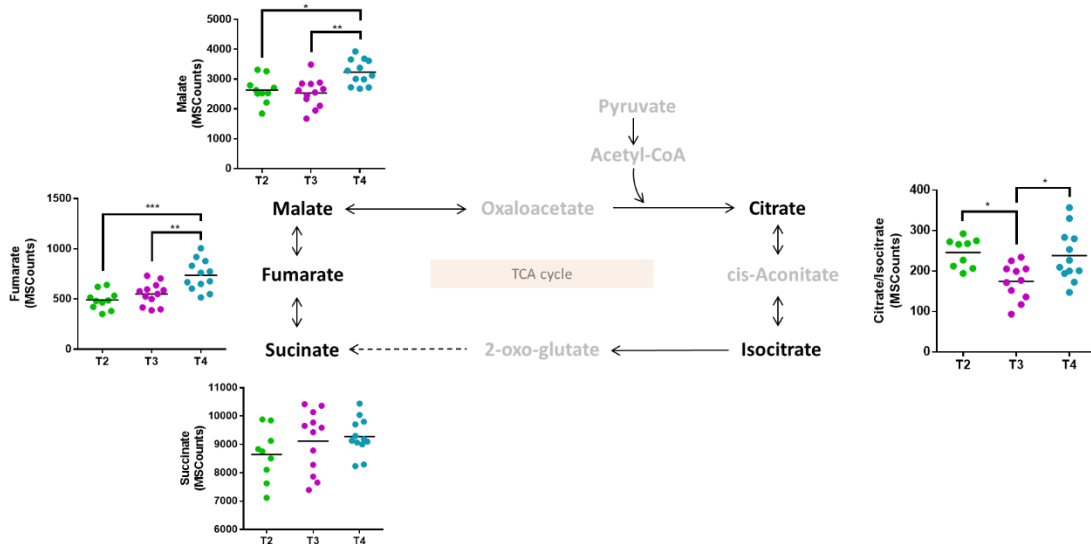


Figura 74. La suplementació amb probiòtic i omega-3 induïx canvis en la concentració dels metabòlits que formen el cicle del TCA. Esquema representatiu dels metabòlits que formen el cicle del TCA on els valors representats indiquen les concentracions (avaluades mitjançant l'espectre de masses (*MS Counts*)) en escorça frontal de femelles porc prepuberals del grup dieta hipercalòrica (T2), grup probiòtic (T3) i grup probiòtic més omega-3 (T4). Els asteriscs representen diferències significatives on \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  i \*\*\* $p < 0,001$  aplicant un test ANOVA seguit d'un test post hoc Tukey.

#### 4.4. Anàlisi de correlació

Per últim, i per tal d'intentar integrar els resultats, s'ha realitzat una anàlisi de correlacions utilitzant diferents variables d'interès com són el pes final, el percentatge de greix total i el percentatge de greix pèlvic-renal i s'han correlacionat amb els nivells d'oxilipines i la composició d'àcids grassos tant en plasma com en escorça frontal. La **Figura 75** i la **Figura 76** mostren que existeix una correlació entre les variables relacionades amb l'obesitat i els nivells d'oxilipines i àcids grassos, però no amb tots de la mateixa manera. Es pot observar com les variables que correlacionen en el grup control són diferents a les variables que correlacionen amb el grup dieta hipercalòrica. També, el diagrama de cordes permet observar com el grup probiòtic i el grup probiòtic més omega-3 són més semblants en comparació amb la resta. Específicament, en el grup control, les variables en plasma que més correlacionen de forma significativa amb altres variables són l'àcid eicosadienoic (C20:2n6) i l'oxilipina 11,12-DiHETrE, derivada de l'AA per l'acció de l'enzim CYP450, mentre que, l'EPA lliure en escorça frontal és la variable que més correlació amb les altres variables de l'estudi. En el grup d'animals que han ingerit una dieta hipercalòrica, les variables que més correlacionen són les oxilipines TXB<sub>2</sub>, derivada de l'AA per l'enzim COX i la 4-HDoHE derivada del DHA per l'enzim LOX quantificades en escorça frontal mentre que, les variables que més correlacionen de forma significativa amb el grup probiòtic són el 8-isoPGF2 $\alpha$ , 12-HHTrE, derivades de l'AA i la 17-HDoHE, derivada del DHA i precursora de la resolvína RvD1, per l'acció de l'enzim COX en escorça frontal. Per últim, les variables que més correlacionen en el grup probiòtic i omega-3 són oxilipines derivades del DHA com la 17-HDoHE

i la 19,20-DiHDPA i l'oxilipina derivada de EPA, 15-HEPE, totes elles productes d'oxidació per l'enzim COX.

Fins aquí hem descrit les variables que correlacionen amb més variables de forma significativa però, si només ens centrem en les variables pròpies de l'obesitat, com ara el pes final, el percentatge de greix i el greix pèlvic-renal també trobem que les correlacions són diferents entre els quatre grups d'estudi. La **Figura 77A** representa les 25 correlacions amb un valor menor de p en el grup control de les variables descrites anteriorment. Concretament, dins de les 25 correlacions amb menor valor de p, n'hi ha que són estadísticament significatives. Dins d'aquestes s'observa com la majoria d'oxilipines en escorça frontal, bàsicament derivats de DHA o d'AA, correlacionen de forma positiva amb el pes final mentre que, l'àcid mirístic i l'àcid palmític (SFA) així com el C18:4n3 (PUFA<sub>n3</sub>) detectats en plasma, correlacionen de forma negativa. En el greix pèlvic-renal, s'observa una correlació positiva amb els nivells de DHA en escorça frontal mentre que, els PUFA<sub>n3</sub> correlacionen de forma negativa. En el cas del contingut de greix total, totes les correlacions significatives són oxilipines quantificades en escorça frontal. A més, el 8-isoPFG2 $\alpha$  present en les mostres d'escorça, marcador descrit per mesurar la peroxidació lipídica, presenta una correlació negativa. L'estudi de correlació del grup amb dieta hipercalòrica és mostra en la **Figura 77B** on s'observa que els paràmetres analitzats han donat resultats diferents en comparació amb la dieta control. Per una banda, els nivells de EPA i DHA correlacionen negativament i significativament amb el pes final i el greix pèlvic-renal d'aquest grup mentre que no correlacionen amb el percentatge de greix total. Finalment, s'ha procedit a l'estudi de correlació amb els grups suplementats amb probiòtic (**Figura 77C** i la **Figura 77D**) on s'observa que l'efecte omega-3 es rellevant en l'anàlisi de correlacions, ja que són diferents segons si la dieta conté omega-3 o no.

Els resultats d'aquestes correlacions es troben en el repositori virtual Figshare (doi grup control: 10.6084/m9.figshare.11675916; doi grup dieta hipercalòrica: 10.6084/m9.figshare.11675919; doi grup dieta probiòtic: 10.6084/m9.figshare.11675928; doi grup dieta probiòtic més omega 3: 10.6084/m9.figshare.11675934).

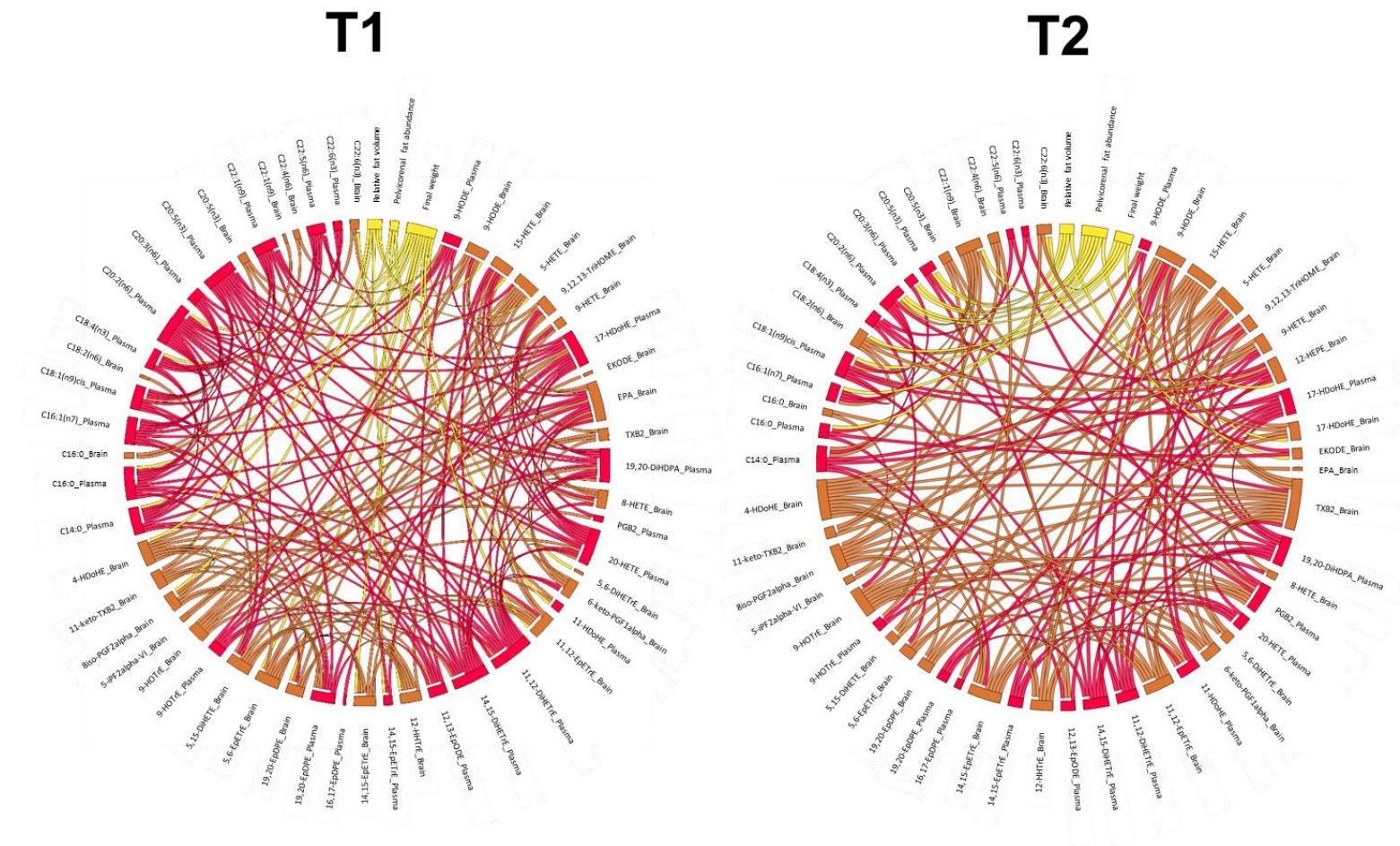


Figura 75. Diagrama de cordes de les variables relacionades amb l'obesitat i els nivells d'oxilipines i àcids grassos quantificats en les mostres de plasma i d'escorça frontal del grup control i del grup dieta hipercalòrica. El diagrama de cordes és un mètode gràfic que presenta interrelacions significatives per Spearman ( $p < 0.05$ ) entre les dades d'una matriu. Els diferents colors representen les variables pròpies de l'obesitat (groc), les variables de les mostres de plasma (vermell) i les variables en les mostres d'escorça (marró) que s'organitzen en un cercle com arcs. Les cordes són els vincles o connexions entre els arcs del cercle que mostren les relacions entre les dos variables. Com més gruix té l'arc d'una variable en concret, més correlacions presenta amb les altres dades de la matriu. S'han obtingut diferents diagrames de cordes segons la dieta dels animals. T1: grup dieta control i T2: grup dieta hipercalòrica.



Figura 76. Diagrama de cordes de les variables relacionades amb l'obesitat i els nivells d'oxilipines i àcids grassos quantificats en les mostres de plasma i d'escorça frontal del grup probiòtic i del grup probiòtic més omega-3. El diagrama de cordes és un mètode gràfic que presenta interrelacions significatives per Spearman ( $p < 0.05$ ) entre les dades d'una matriu. Els diferents colors representen les variables pròpies de l'obesitat (verd), les variables de les mostres de plasma (vermell) i les variables en les mostres d'escorça (marró) que s'organitzen en un cercle com arcs. Les cordes són els vincles o connexions entre els arcs del cercle que mostren les relacions entre les dos variables. Com més gruix té l'arc d'una variable en concret, més correlacions presenta amb les altres dades de la matriu. S'han obtingut diferents diagrames de cordes segons la dieta dels animals. T3: grup probiòtic i T4: grup probiòtic més omega-3.

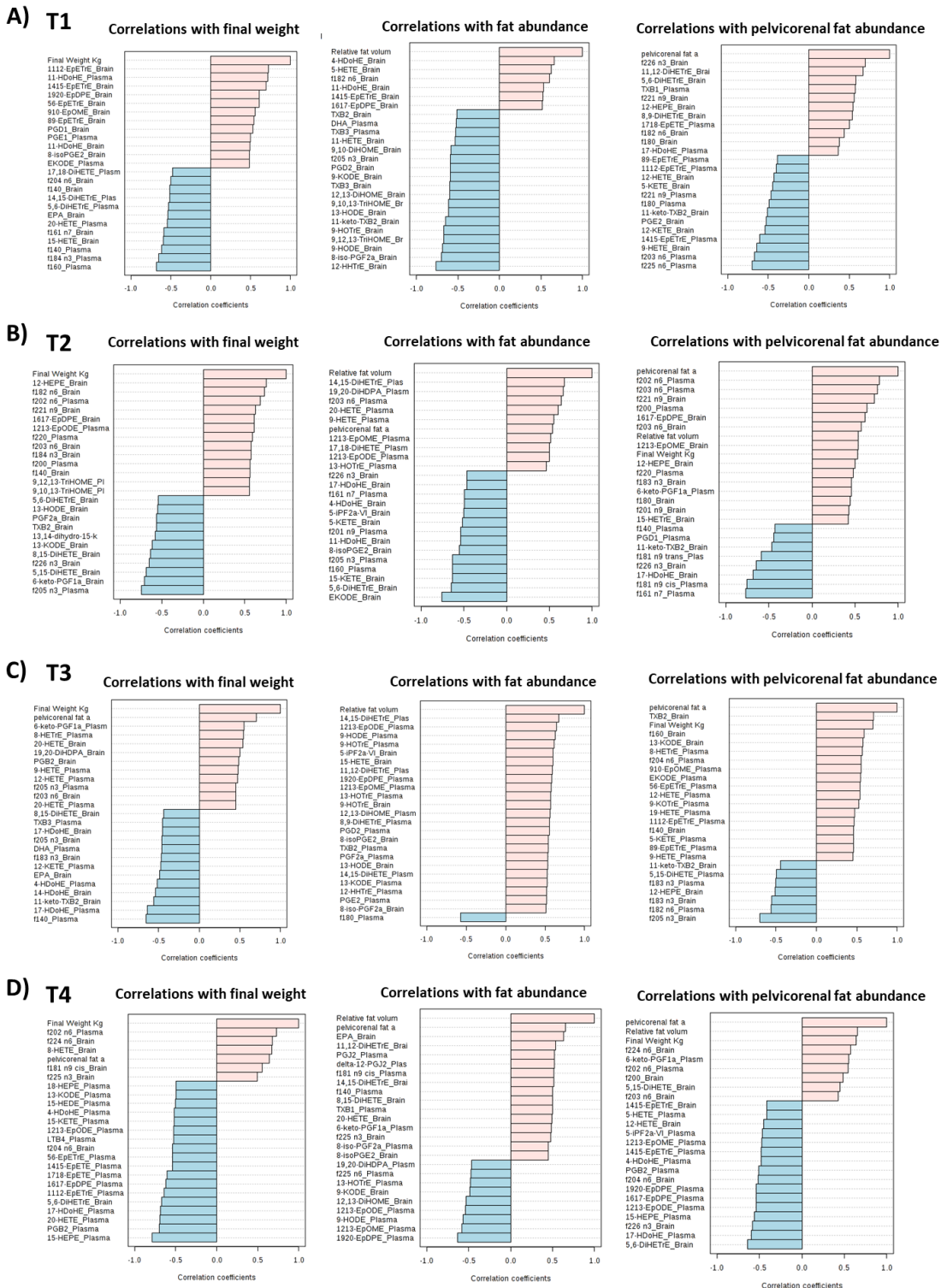


Figura 77. Correlacions entre lípids específics en plasma i en escorça frontal amb variables relacionades amb l'obesitat en el diferents grups d'estudi. Els nivells d'oxilipines i àcids grassos quantificats en les mostres de plasma i d'escorça frontal del model d'obesitat prepuberal mostren una correlació (correlacions amb menys valor de p) entre les variables de l'obesitat com el pes final, l'abundància de greix i el greix pèlvic-renal. **A)** T1: grup dieta control, **B)** T2: grup dieta hipercalòrica, **C)** T3: grup probiòtic i **D)** T4: grup probiòtic més omega-3.

# DISCUSSIÓ





## 5. DISCUSSIÓ

---

L'obesitat és un dels majors reptes de la salut pública del segle XXI, tant pel seu increment constant en la prevalença, com pel seu impacte en la morbiditat, mortalitat, qualitat de vida i cost sanitari. Avui en dia, l'obesitat infantil representa un predictor significatiu de partir obesitat en edat adulta considerant que, la majoria de nens i nenes i adolescents obesos, presentaran comorbiditats associades com T2DM o CVD, entre altres moltes complicacions metabòliques (Ebbeling et al. 2002; Kumar and Kelly 2017). La principal línia d'acció per tal de reduir l'obesitat és canviar l'estil de vida d'aquesta població, com per exemple millorant els hàbits alimentaris o realitzar més activitat física, tot i això, s'ha vist que són tractaments difícils de seguir a llarg termini. Per aquest motiu sorgeix la necessitat de desenvolupar noves estratègies terapèutiques i de prevenció.

Durant l'última dècada, s'ha identificat la microbiota intestinal com un dels possibles factors en la fisiopatologia de l'obesitat com dels trastorns metabòlics relacionats (Muscoiuri et al. 2019). Per això, una de les noves estratègies terapèutiques que s'estan proposant per tal de reduir els riscos i minimitzar la gravetat i les complicacions associades a l'obesitat pot ésser, basant-nos en la relació entre la microbiota intestinal i l'obesitat, l'ús de probiòtics com a suplement alimentari.

Partint d'aquests antecedents, la hipòtesi d'aquesta tesi ha estat realitzar una intervenció nutricional basada en probiòtics i, d'aquesta manera poder millorar o arribar a prevenir els efectes deleteris de l'obesitat, sobretot quan aquesta afecta a edats de creixement. A partir d'aquí, els objectius d'aquesta tesi han estat: i) avaluar, en primer lloc, quin és l'efecte d'una dieta hipercalòrica en un model animal prepuberal en plasma i en cervell, degut a la manca d'estudis de l'afectació de l'obesitat infantil en aquest teixit i ii) avaluar l'efecte d'uns probiòtics com a possible intervenció nutricional utilitzant tècniques metabòliques.

Aquestes tècniques permeten avaluar canvis metabòlics relacionats amb l'obesitat i, d'aquesta manera, obtenir una signatura metabòlica característica d'aquesta patologia, ja que permeten mesurar milers de metabòlits a partir d'una quantitat mínima de mostra, obrint una nova via per a la comprensió de les diferents alteracions que tenen lloc durant el desenvolupament d'aquesta i de les complicacions metabòliques associades, comparant les concentracions de metabòlits específics i vies crítiques per tractar-la o inclús prevenir-la.

Els models de rosegadors han sigut àmpliament utilitzats principalment degut a la seva proximitat evolutiva als humans, pel seu genoma ben caracteritzat, perquè són relativament

econòmics de mantenir i perquè es reproduïen ràpidament per tal de poder observar múltiples generacions a la vegada (Karimi 2012). Tot i això, els resultats dels models murins d'obesitat sovint no s'han pogut extrapolar als humans a causa de les diferències fisiopatològiques. Per aquest motiu, en aquesta tesi, s'ha escollit el porc com a model d'obesitat, ja que filogenèticament es troba molt més proper als humans amb nombroses similituds en l'anatomia, en el desenvolupament, en la nutrició i en la fisiologia (Haupt et al. 1979). A més, el model porcí presenta quasi totes les característiques fisiopatològiques relacionades amb l'obesitat i síndrome metabòlica en un període relativament curt de temps (Pant et al. 2015). Una altra de les característiques clau com a model d'obesitat és la similitud que presenta amb els humans envers el metabolisme lipoproteic (Royo et al. 2000), a diferència de molts rosegadors, com el ratolí i la rata, que requereixen una manipulació gènica en els receptors de lipoproteïnes per tal de generar perfils de risc cardiometabòlic associats a l'obesitat (Pastański et al. 2011). Amb tots aquests antecedents, s'ha cregut que, a nivell de representativitat en humans, podia ser més rellevant estudiar l'obesitat induïda per dieta en un model porcí en comparació amb altres models animals. Addicionalment, igual que en els humans, la microbiota intestinal consisteix principalment en Bacteroidetes i Firmicutes (Warensjö et al. 2006b), cosa que encara reforça més la utilització d'aquest model animal per a l'estudi dels possibles efectes provocats per la ingesta de probiòtics.

### **5.1. Efectes de la ingesta d'una dieta hipercalòrica i de dos probiòtics en variables morfològiques i bioquímiques clàssiques en l'estudi de l'obesitat**

En primer lloc, i per tal de caracteritzar el nostre model fenotípic i molecularment, s'han estudiat diferents variables morfològiques i bioquímiques relacionades amb l'obesitat. Respecte al pes, després d'alimentar els porcs amb una dieta hipercalòrica durant 10 setmanes, s'observa que la ingesta de calories al dia no és proporcional a l'augment de pes corporal, ja que aquests animals han ingerit un 37% més de calories al dia i només han tingut un increment de pes del 13%. Això s'ajusta a la idea que l'augment de pes i la ingesta de calories no són lineals (Hill et al. 2012) i, a més, va en la mateixa línia del que ja està publicat (Zhang and Lerman 2017). Estudis previs realitzats en rosegadors han descrit que l'activitat física, entre altres factors, podria desviar els greixos ingerits en la dieta cap a l'oxidació en lloc de cap a l'emmagatzematge, així com induir una major retenció neta de combustible a través de la lipogènesis *de novo* en el teixit adipós o l'expressió dels gens del múscul esquelètic involucrats en la captació, mobilització i oxidació de lípids (Steig et al. 2011). Tot i això, encara que aquest augment de pes no sigui lineal,

s'ha considerat aquest model animal com a bon model d'obesitat prepuberal, ja que la dieta hipercalòrica induïx augment de pes, augment de greix total i augment de greix pèlvic-renal en aquest grup.

Així mateix, també s'han volgut quantificar diferents paràmetres clàssics d'obesitat que s'utilitzen avui en dia com a biomarcadors diagnòstic per a diferents malalties metabòliques donant com a resultat nivells de colesterol, colesterol LDL, colesterol HDL, TG i glucosa augmentats respecte el grup control. Per tant, aquests animals presenten dislipèmia i un deteriorament primerenc en l'homeòstasi de la glucosa. Aquest fet ja s'ha descrit en porcs domèstics amb règims similars, on les intervencions a curt termini condueixen a l'augment de pes i a la dislipèmia, però no a la resistència a la insulina ni a la síndrome metabòlica (*Galili et al. 2007*). Existeixen diversos factors que podrien explicar l'impacte metabòlic relativament reduït en el nostre model en comparació amb altres models porcins descrits, incloent-hi l'edat dels animals, la manca de sucres refinats (fructosa o sacarosa), la raça o la durada del tractament.

Per tal d'avaluar l'efecte dels probiòtics en un context de dieta hipercalòrica, s'ha administrat una dosi de  $5 \cdot 10^{10}$  ufc/dia de *Bifidobacterium breve* com a probiòtic, ja que, com s'ha indicat en la introducció, té efectes beneficiosos sobre variables morfològiques i bioquímiques relacionades amb l'obesitat. La quantitat administrada d'aquest probiòtic es troba dins del rang efectiu descrit en la literatura (*Kondo et al. 2010; Wang et al. 2019a*). A més, la suplementació amb omega-3 també s'ha suggerit en la millora dels efectes causats per l'obesitat (*Hartweg et al. 2009; Pirillo and Catapano 2013; Rajkumar et al. 2014*).

Respecte al pes, s'observa que el grup probiòtic presenta una baixada de pes del 13% i el grup probiòtic més omega-3 del 16%. Tot i que el consum calòric no presenta diferències significatives, s'observa que aquests grups tendeixen a ingerir menys calories al dia. Estudis recents en animals han demostrat que la microbiota intestinal també es troba involucrada en la regulació de la ingesta d'aliments a l'afectar les hormones secretades pel tracte gastrointestinal que influeixen en la funció metabòlica i en les àrees del cervell associades amb el comportament alimentari (*Kairupan et al. 2016*). Aquest eix, anomenat eix intestí-cervell, representa un eix de senyalització bidireccional que regula el pes corporal equilibrant la gana, l'emmagatzematge i el desgast energètic (*de Clercq et al. 2016*). Aquests resultats obtinguts coincideixen amb els publicats per Kondo et al. (*Kondo et al. 2010*) on es veu una baixada de pes després de la suplementació amb *B. breve* durant 8 setmanes en ratolins alimentats amb una dieta alta en greixos.

En relació a l'anàlisi de les variables bioquímiques, l'anàlisi del perfil lipídic mostra que la ingesta d'una dieta hipercalòrica juntament amb el probiòtic i l'omega-3 disminueix significativament el colesterol LDL mentre que el colesterol total, HDL i TG no varien. En relació amb aquests resultats, Rajkumar et al. (*Rajkumar et al. 2014*) descriu que la combinació de probiòtics, incloent el *B. breve*, amb omega-3, millora el perfil lipídic disminuint el colesterol total, els TG i el colesterol LDL. Les diferències en aquest experiment poden ser degudes tant a la diferència en el model animal utilitzat, com de les soques probiòtiques utilitzades, així com en la dosi o la durada del tractament. Tot i això, l'efecte omega-3 disminueix els nivells de HDL i de TG en aquest estudi. En aquest sentit, ja s'ha descrit amb anterioritat que les concentracions de colesterol i TG disminueixen en plasma després de la suplementació amb omega-3, ja que actua per reduir la secreció hepàtica de VLDL i així disminuir els nivells de TG circulants (*Hartweg et al. 2009; Pirillo and Catapano 2013; Rajkumar et al. 2014; Perez-Matos et al. 2019*). No obstant, l'efecte dels probiòtics no és capaç de revertir els efectes induïts per la dieta en paràmetres com la glucèmia o la insulínemia.

## **5.2. Efecte de la ingesta d'una dieta hipercalòrica i de dos probiòtics en molècules rellevants en l'obesitat**

Continuant amb l'afectació de la dieta hipercalòrica i per tal d'esbrinar si els nostres probiòtics poden ser una alternativa per reduir els riscos i minimitzar la gravetat de l'obesitat, s'han comparat les concentracions específiques i les vies de formació de dues molècules rellevants descrites en obesitat, com el TMAO i l'HCys mitjançant una anàlisi de metabolòmica dirigida.

Per una banda, tenim el TMAO, que és un metabòlit derivat de l'activitat microbiana a partir del seu precursor, TMA, format a partir de la carnitina i la colina ingerides en la dieta, que mostra una relació molt alta amb l'ateromatosi en humans (*Barrea et al. 2018*). L'anàlisi d'aquest biomarcador, juntament amb la colina i carnitina, mostra un augment de TMAO i colina amb la ingesta d'una dieta hipercalòrica. Aquests resultats van en relació amb altres estudis en els quals s'ha observat que el consum d'una dieta hipercalòrica condueix a un augment dels nivells de TMAO circulants (*Boutagy et al. 2015a, b*). Per altra banda, està despertant molt interès quin pot ser l'impacte de la dieta i la microbiota en la funcionalitat del CNS. Un treball recent, basat en un innovador sistema de microfisiologia planteja la hipòtesi de que la molècula TMAO podria creuar la barrera hematoencefàlica (*Vernetti et al. 2017*). Aquesta hipòtesi és recolzada el mateix any per Rio et al. (*Rio et al. 2017*) quan descriu la presència de TMAO en líquid cefalorraquidi. Per aquest motiu i com a estudi pioner, s'han quantificat els nivells de TMAO, colina i carnitina en escorça frontal. Els resultats indiquen la presència de TMAO en el cervell

amb nivells quantificables en totes les mostres analitzades. A més, la quantificació del TMAO en les mostres de plasma ens permeten descriure que només seria el 5% del TMAO que es troba en circulació capaç de travessar aquesta barrera i acumular-se en el cervell. En aquest sentit, s'ha descrit anteriorment que la suplementació amb TMAO afecta el cervell, induint senescència neuronal, augmentant l'estrès oxidatiu, deteriorant la funció mitocondrial i inhibint la senyalització de mTOR (*Li et al. 2018a*), contribuint, d'aquesta manera, a l'envelliment cerebral i al deteriorament cognitiu. A més, el TMAO regula els receptors captadors de macròfags i indueix l'expressió de CD68 (*Koeth et al. 2013; Seldin et al. 2016*), un marcador cel·lular associat positivament amb la demència (*Minett et al. 2016*).

En relació als grups suplementats, el grup probiòtic no mostra cap canvi en els nivells de TMAO plasmàtic ni en escorça frontal. Aquests resultats van en la mateixa línia que l'estudi de Boutagy et al. (*Boutagy et al. 2015b*) on s'ha descrit que la suplementació amb probiòtics juntament amb una dieta hipercalòrica no indueix canvis en la concentració d'aquest metabòlit en humans. De la mateixa manera, Tripolt et al. (*Tripolt et al. 2015*) observa que la suplementació amb probiòtic no canvia els nivells de TMAO en pacients amb síndrome metabòlica. En canvi, els nivells de TMAO plasmàtics augmenten en el grup suplementat amb probiòtic i omega-3 respecte el grup amb dieta hipercalòrica, canvis que no s'observen en l'escorça frontal.

Per altra banda, l'HCys és un aminoàcid sulfurós que actua com a molècula intermediària en el metabolisme de la metionina. La hiperhomocisteïnèmia s'ha identificat com un factor de risc independent de CVD on molts estudis han demostrat que està relacionada amb el dany endotelial (*Cao et al. 2015*), l'ateroesclerosi (*McCully 2016*) i la trombosi venosa (*Den Heijer et al. 1998*). L'anàlisi d'aquest biomarcador i del metabolisme de la metionina en les mostres de plasma mostra una disminució dels nivells d'HCys i cisteïna i un augment de betaïna en el grup amb dieta hipercalòrica. En les mostres d'escorça frontal s'observa una disminució també dels nivells d'HCys i cistationina en el grup amb dieta hipercalòrica. Tot i que inicialment s'esperava un augment d'aquest metabòlit, els resultats en la bibliografia també són contradictoris, ja que altres autors indiquen que existeix una relació negativa entre l'obesitat general en dones i els nivells d'HCys plasmàtics (*Wang et al. 2019c*). A més, en relació a l'obesitat infantil, hi ha nombrosos estudis que descriuen canvis en els nivells d'HCys i aquests varien segons l'edat, el sexe, si tenen o no resistència a la insulina o en quina etapa puberal es troben (*Brasileiro et al. 2005; Narin et al. 2005; Martos et al. 2006; Ustundag et al. 2007; Papandreou et al. 2007*).

Tot i això, no hi ha cap estudi que descriu quin és l'efecte d'una dieta hipercalòrica en porcs prepuberals ni en els nivells d'HCys ni en la via de la metionina. Intentant anar una mica més

enllà i donar una possible explicació a la disminució significativa d'aquesta molècula, en aquest treball s'observa que la betaïna, producte de l'oxidació de la colina i donador de grups metils a l'HCys, té els nivells augmentats en el grup amb dieta hipercalòrica en comparació amb el grup control. En aquest sentit, s'hipotetitzava que la disminució que s'observa en els nivells d'HCys podria ser deguda a l'augment de l'activitat de l'enzim betaïna-homocisteïna metiltransferasa (BHMT). Aquesta hipòtesi seria compatible amb els resultats de l'estudi de Dahlhoff et al. (Dahlhoff et al. 2013), on es descriu una major expressió de l'activitat de BHMT en ratolins alimentats amb una dieta alta en greixos. Per tant, els resultats suggereixen que la via de transsulfuració està regulada negativament (ja que també s'han trobat disminuïts els nivells de cisteïna), mentre que la remetilació de l'HCys dependent de betaïna es troba incrementada, possiblement degut a un augment de l'activitat de BHMT. En aquest sentit, estudis futurs hauran de determinar si l'activitat d'aquest enzim és clau en la modulació d'aquesta via metabòlica en obesitat infantil. Per altra banda, no es troba cap canvi en els nivells de la metionina en els porcs obesos i això podria ser perquè, donat que la metionina és un aminoàcid essencial, una reducció dels nivells d'aquesta afectaria críticament a la capacitat de síntesi de proteïnes i per tant, a l'organisme.

Respecte a la suplementació amb probiòtics, en les mostres de plasma no s'observen diferències en els nivells d'aquest metabòlit mentre que, en les mostres d'escorça frontal s'observa un augment dels nivells en el grup suplementat amb el probiòtic que disminueix per la suplementació amb el probiòtic i l'omega-3. Realitzant una cerca bibliogràfica exhaustiva no s'ha trobat cap estudi relacionat amb la suplementació de probiòtics i omega-3 en el via de la metionina en el cervell per tant, caldria realitzar més estudis per tal de poder generar una hipòtesi del que podria estar succeint després de la suplementació amb probiòtic i omega-3 en aquesta via en concret.

### **5.3. Efecte de la ingesta d'una dieta hipercalòrica i de dos probiòtics en el perfil d'aminoàcids**

Per tal de completar la anàlisi de metabòlica dirigida, s'han quantificat alguns aminoàcids, ja que, tal com s'ha explicat en la introducció, són un dels principals grups de metabòlits alterats en l'obesitat. Específicament, dins dels aminoàcids més afectats en aquesta patologia trobem els BCAA (leucina, isoleucina i valina), els aminoàcids aromàtics (fenilalanina, tirosina i triptòfan) i la glicina. L'anàlisi del perfil d'aminoàcids mostra que la ingesta de la dieta hipercalòrica produeix canvis en aquest perfil tant en les mostres de plasma com en les d'escorça frontal. Dins d'aquests canvis, s'observen diferències significatives en els aminoàcids arginina, cisteïna, en la

leucina/isoleucina i en la valina en les mostres de plasma. En canvi, en l'escorça frontal hi ha diferències significatives en l'arginina, l'àcid aspàrtic, serina i treonina. A més d'aquests canvis específics generats per la ingesta de la dieta hipercalòrica, també s'observa que la composició d'aminoàcids és diferent en el plasma i l'escorça frontal d'aquests animals.

Dins dels canvis observats en plasma es troba una disminució dels nivells d'arginina i cisteïna. Aquests resultats coincideixen amb altres estudis que descriuen una disminució de l'arginina en ratolins alimentats amb una dieta alta en greixos i amb una dieta alta en colesterol (*She et al. 2007; Erdely et al. 2010; Sailer et al. 2013*). A més, en humans amb T2DM també s'han descrit concentracions més baixes d'arginina associada a disfunció endotelial i progressió de CVD (*Tang et al. 2009*). Aquesta disminució d'arginina pot ser indicativa d'una alteració de la síntesi d'urea al fetge, és a dir, d'un bloqueig en les reaccions citosòliques (nivells elevats d'ornitina i citrul·lina) i/o un dèficit d'arginina degut a l'augment del metabolisme (*She et al. 2007*). Per tant, una possible hipòtesi podria ser que existeixi una alteració del cicle de la urea tot i que, per poder-ho confirmar, s'haurien de quantificar els nivells d'ornitina i citrul·lina. Per altra banda, existeix un augment dels nivells de prolina, leucina/isoleucina i valina. Ja s'han descrit associacions de concentracions augmentades de BCAA en obesitat, resistència a la insulina, dislipèmia, síndrome metabòlica i altres complicacions (*Felig et al. 1969; Newgard et al. 2009; Wang et al. 2011*). De fet, diversos estudis han descrit nivells de BCAA en sang augmentats tant en nens obesos (*Butte et al. 2015*) com en obesitat adulta (*Newgard et al. 2009; Kim et al. 2010; Jia et al. 2014*) així com correlacions positives entre aquests aminoàcids i marcadors antropomètrics i de massa de greix (*Foerster et al. 2015*). A més, tot i que s'esperava trobar canvis en els aminoàcids aromàtics (triptòfan, tirosina i fenilalanina) aquests canvis no són visibles en aquest model d'obesitat possiblement degut a l'edat dels animals o per la durada del tractament.

En relació a les mostres d'escorça frontal, es troben nivells disminuïts d'arginina i treonina i nivells augmentats d'àcid aspàrtic i serina. Per la funció adequada del CNS es requereixen una sèrie d'aminoàcids com els aminoàcids aromàtics, ja que són imprescindibles per a la síntesi de neurotransmissors com la serotonina, la dopamina i la noradrenalina, i aminoàcids àcids, com l'àcid glutàmic i l'àcid aspàrtic, que actuen com a propis neurotransmissors (*Fernstrom 1994*). En aquest sentit, els aminoàcids que es troben en més concentració són els aminoàcids àcids (concentracions al voltant de 300 µM) i canvis en aquests poden modificar la funció cerebral o fins i tot causar dany neuronal (*Fernstrom 1994*). Tot i això, no només són importants els aminoàcids aromàtics i àcids en la funció cerebral, sinó que el cervell també en necessita d'altres per tal de poder sintetitzar altres neurotransmissors. Per aquest motiu, existeixen diferents



mecanismes específics per tal de poder transportar selectivament aquests aminoàcids al cervell (Lieberman 1999).

La suplementació amb probiòtics també té efectes en el perfil d'aminoàcids plasmàtics. Els resultats obtinguts coincideixen amb els publicats per Dai, Wu i Zhu (Dai et al. 2011), on descriuen canvis en el metabolisme dels aminoàcids plasmàtics després de la suplementació amb probiòtics en models animals i en humans. Específicament, el probiòtic produeix canvis augmentant els nivells d'alanina i glicina i disminuint els nivells de treonina, leucina/isoleucina i valina en les mostres de plasma. Cal destacar que la suplementació amb els nostres probiòtics reverteix l'efecte provocat per la dieta hipercalòrica disminuint la concentració de BCAA en aquests grups, fet que reforça la idea que aquests probiòtics tenen efectes beneficiosos sobre l'organisme. Altres publicacions ja han descrit una disminució dels nivells de BCAA associats a una pèrdua de pes en subjectes obesos (Geidenstam et al. 2017), a la pèrdua de pes mitjançant canvis en la dieta (Kim et al. 2013; Zheng et al. 2016b; Hernández-Alonso et al. 2019) o a canvis associats a l'estil de vida com ara augmentant l'activitat física (Mills et al. 2019). Per altra banda, l'efecte del probiòtic també provoca canvis en el perfil d'aminoàcids cerebrals afectant els nivells de prolina, treonina i triptòfan mentre que la suplementació amb el probiòtic i omega-3 té efecte en l'asparagina, metionina, treonina, triptòfan i valina.

#### **5.4. Efecte de la dieta hipercalòrica i de dos probiòtics sobre el perfil metabolòmic i lipídomic en un model d'obesitat infantil**

Fins aquest moment, ens hem centrat només en l'estudi de l'efecte de la dieta hipercalòrica o l'efecte dels probiòtics en uns metabòlits concrets o en vies específiques però, i per tal d'obtenir una signatura metabòlica característica de l'obesitat, també s'han realitzat anàlisis de metabòlica i lipídica no dirigida, permetent d'aquesta manera, realitzar un estudi més exhaustiu o global d'una gran varietat de metabòlits obrint una nova via per a la comprensió de les diferents alteracions que poden tenir lloc en l'obesitat.

En primer lloc, i continuant amb els canvis metabolòmics en el cervell, s'ha aplicat una anàlisi de metabòlica no dirigida. En segon lloc, s'ha seguit amb una anàlisi de lipídica no dirigida en les mateixes mostres i, per últim, dins d'aquest apartat de la discussió, també s'exposaran els canvis lipídics obtinguts en el plasma en el model d'obesitat prepuberal induïda per dieta.

El metaboloma cerebral resultant s'ha analitzat mitjançant diferents anàlisis estadístics multivariants no supervisats on el PCA mostra com s'agrupa cada grup de forma separada suggerint l'existència d'un metaboloma específic cerebral influenciat per la dieta. Aquests

resultats es recolzen en l'anàlisi d'agrupació jeràrquica realitzat d'una banda amb tot el conjunt de metabòlits i d'altra banda amb els 100 primers metabòlits obtinguts en l'anàlisi estadístic univariant. Aquest metaboloma específic podria definir-se per 118 metabòlits en ionització positiva i 17 metabòlits en negativa.

Dins d'aquests metabòlits que defineixen la signatura metabòlica cerebral durant l'obesitat, només s'ha identificat un 17.8% del total. Dins dels metabòlits identificats hi ha certs aminoàcids com l'àcid aspàrtic, el N-acetilaspàrtat i el N-formil-L-glutamat. Concretament, l'àcid aspàrtic (aminoàcid àcid) actua com a neurotransmissor (*Fernstrom 1994*) i per tant, canvis en aquest, poden modificar la funció cerebral o fins i tot causar dany neuronal (*Fernstrom 1994*), tal i com es comentava anteriorment. El N-acetil-aspartat és una molècula que es troba en concentracions elevades en el cervell, es sintetitza en les neurones a partir de l'aspartat i l'acetil-CoA i s'han descrit nivells baixos en diverses malalties i trastorns com la isquèmia cerebral, la lesió cerebral, l'esclerosi múltiple i l'Alzheimer en animals i humans (*Moffett et al. 2007*). A més, les concentracions d'aquest metabòlit també es troben influenciades per l'obesitat (*Bogner-Strauss 2017*). Un altre metabòlit diferencial en el cervell després de la ingesta de dieta hipercalòrica és l'angiotensina II involucrada en la regulació de múltiples funcions en el cervell, incloent-hi el desenvolupament cerebral, la migració neuronal, el procés d'informació sensorial, la cognició, la regulació de les respostes emocionals i el flux sanguini cerebral (*Saavedra 2005; Mogi et al. 2012*). A més, també s'obtenen nivells disminuïts d'HCys en el grup obès. Aquests resultats, juntament amb l'anàlisi de les principals vies alterades durant l'obesitat, obtinguts a partir dels metabòlits identificats, demostren que el metabolisme de la cisteïna i la metionina i el metabolisme de l'alanina, l'aspartat i el glutamat són algunes d'aquestes vies alterades recolzant d'aquesta manera els resultats obtinguts en la anàlisi de metabolòmica dirigida. Cal destacar també el metabolisme del glutatió suggerint canvis en la capacitat antioxidant d'aquests animals.

És important recordar que, tal i com s'ha comentat anteriorment, la anàlisi de metabolòmica no dirigida permet la detecció de petits metabòlits apolars incloent-hi diverses espècies lipídiques. Entre les espècies lipídiques identificades hi ha glicerolípid amb els MG de cadena llarga d'àcids grassos i diferents glicerofosfolípids, bàsicament LysoGP. Aquests se sintetitzen mitjançant l'acció de les fosfolipases o les aciltransferases i actuen com a precursors en la síntesi de glicerofosfolípids (*Gurr et al. 2002; Hishikawa et al. 2014*). Entre els LysoGP identificats, el LysoPA (22:2) és el que presenta major magnitud de canvi entre els dos grups. El LysoPA és un potent lípid bioactiu que influeix profundament en la senyalització cel·lular i actua com a segon

missatger específic acoblat a proteïnes G (*D'Souza et al. 2018*). Alteracions en la senyalització de LysoPA ja s'han descrit amb anterioritat en trastorns metabòlics i inflamatoris que inclouen l'obesitat, la resistència a la insulina i les CVD (*Rancoule et al. 2013; Yung et al. 2014*). A més, els LysoPA s'expressen en el teixit nerviós del CNS influint en nombrosos processos de desenvolupament neuronal i glial, en la migració cel·lular i en la supervivència (*Yung et al. 2015*). Addicionalment, factors ambientals estressants com la hipòxia o la inflamació fa que s'alteri la senyalització d'aquest lípid generant múltiples neuropatologies (*Yung et al. 2015*). Dins dels lípids esterol identificats, també s'hi troben els àcids biliars, on s'observen diferències en l'escorça frontal d'aquest model després de la ingesta d'una dieta hipercalòrica. Els àcids biliars se sintetitzen bàsicament en el fetge i s'excreten al duodè amb la funció principal d'ajudar a la digestió i a l'absorció dels lípids de la dieta i de les vitamines liposolubles. Quan els àcids biliars se secreten en l'intestí, gran part es reabsorbeixen a través de la circulació enterohepàtica però, alguns d'ells també es troben presents a baixes concentracions en la circulació sistèmica (*Dawson et al. 2009*). Alguns estudis han descrit que la presència d'àcids biliars en el cervell pot ser deguda a la síntesi *de novo* a través de l'oxidació del colesterol (*McMillin and DeMorrow 2016*) i, a més, també s'ha descrit un efecte neuroprotector d'aquests en el cervell en diverses malalties neurodegeneratives (*Ackerman and Gerhard 2016*). Un altre dels lípids identificats amb més magnitud de canvi és l'oxilipina LTB<sub>4</sub>, leucotrien derivat de l'AA per mitjà de l'acció de l'enzim LOX. Els leucotriens de l'AA són substàncies proinflamatories abundants en nombroses malalties (*Peters-Golden and Henderson 2007*). Per tant, la inactivació i/o l'eliminació d'aquests, especialment del LTB<sub>4</sub>, són una part crucial en la resolució de la inflamació i el retorn a l'homeòstasi normal (*Johnson et al. 2015*). Una manera que té l'organisme d'eliminar els efectes deleteris del LTB<sub>4</sub> és generant el seu derivat hidroxil (LTB<sub>4</sub>-OH) que s'oxida ràpidament per formar l'àcid carboxílic d'aquesta oxilipina (LTB<sub>4</sub>-COOH). Aquest últim passa a ser un objectiu per a la  $\beta$ -oxidació o a la conjugació amb glucurònid perdent d'aquesta manera la seva activitat proinflamatòria. Tot i això, en l'anàlisi de mediadors lipídics no som capaços de mesurar els nivells de LTB<sub>4</sub>-OH ni els de LTB<sub>4</sub>-COOH, ja que es troben per sota els límits de detecció.

De manera paral·lela a la anàlisi de metabolòmica no dirigida, s'ha dut a terme la realització d'una anàlisi de lipidòmica no dirigida, ja que els lípids tenen un paper crucial en la senyalització cel·lular i en la fisiologia del cervell demostrat pel gran nombre de malalties i trastorns neurològics en què el metabolisme dels lípids es troba alterat (*Wenk 2005; Adibhatla et al. 2006; Ibáñez et al. 2015; Naudí et al. 2015; Wang and Han 2016*). Per aquest motiu, no és d'estranyar que el metabolisme lipídic sigui de gran importància en el cervell, ja que aquest òrgan té la

concentració més alta en lípids després del teixit adipós, aproximadament un 60% del seu pes final i, a més, conté la màxima diversitat d'aquestes espècies (*Piomelli et al. 2007*).

Mitjançant l'anàlisi estadístic multivariant s'observa com les mostres no se separen en dos grups indicant que el factor dieta, en aquest cas, no és el que més preval en la diferenciació del lipidoma de l'escorça frontal en el nostre model animal, fet que suggereix una possible adaptació per part del cervell per tal d'evitar alteracions en el seu perfil lipídic. Tot i això, si que hi ha certs lípids, un total de 52, que varien d'un grup a un altre de forma significativa on només se n'identifiquen un total de 13.

Dins dels lípids identificats hi ha glicerofosfolípids, bàsicament PE i PS i plasmalògens de PE tots ells augmentats en el grup obès. El teixit cerebral conté grans quantitats de glicerofosfolípids com PC, PE, PS i PI (*Horrocks 2007*). A més, els plasmalògens representen fins al 80-90% de la matèria blanca i la mielina i generalment presenten més del 50% de la classe de lípids de tot el cervell. En les membranes neurals, els glicerofosfolípids realitzen funcions importants com ara contribuir a la fluïdesa de la membrana, en la permeabilitat, en la curvatura local, en l'empaquetament molecular o la hidratació, en la càrrega i reactivitat per regular l'activitat dels enzims units a les proteïnes i canals iònics, entre altres (*Paltauf 1994*). Degut a que totes les membranes posseeixen una composició típica amb més o menys les mateixes classes de glicerofosfolípids, la relació entre aquestes classes i les seves espècies moleculars és única i proporciona membranes de diferents òrgans amb característiques específiques (*Frisardi et al. 2011*). A més de ser un component integral de les membranes, els glicerofosfolípids tenen moltes altres funcions. Avui en dia es consideren molècules dinàmiques on la seva distribució i catabolisme específics són el resultat de molts processos altament regulats que poden conduir a una gran quantitat de respostes biològiques importants durant la traducció de senyals (*Horrocks 2007*). Els resultats obtinguts mostren que el metabolisme dels glicerofosfolípids és un dels més afectats en les mostres de cervell després de la ingesta d'una dieta hipercalòrica fet que podria afectar tant a les funcions de les membranes com a les funcions específiques realitzades per aquests tipus de lípids. Altrament, també s'identifica una CL. Les CL són components principals de les membranes mitocondrials i tenen un paper crucial en molts processos mitocondrials, incloent-hi la respiració i la conversió d'energia (*Dudek 2017*). Els canvis patològics en la quantitat de CL pot tenir conseqüències perjudicials per a la funció de la mitocondria i desencadenar la producció de ROS en el cervell (*Dudek 2017*).

En relació a la suplementació amb probiòtics, l'anàlisi estadístic multivariant no supervisat determina que el perfil metabolòmic cerebral agrupa de forma separada els tres grups d'estudi,

sent el factor “dieta” el que més preval en aquesta separació. En canvi, quan es tracta del lipidoma aquesta separació no es tan clara. Aquest fet, tal com s’ha comentat, podria ser degut a possibles adaptacions per part del cervell per tal d’evitar alteracions en el perfil lipídomic cerebral o a que canvis en el metabolisme lipídic cerebral podria conduir a greus trastorns neurològics i per tant, seria una manera de protegir al cervell enfront a aquests problemes. Aquests resultats es recolzen en l’anàlisi d’agrupació jeràrquica realitzat d’una banda amb tot el conjunt de metabòlits o lípids i d’altra banda amb els 100 primers metabòlits o lípids obtinguts en l’anàlisi estadístic multivariant sent el metaboloma de l’escorça frontral dels animals que han suplementat la dieta hipercalòrica amb probiòtic i omega-3 els més diferents en termes d’abundància.

A banda de la importància del metabolisme lipídic en el cervell, alteracions en els lípids també s’han relacionat amb moltes malalties relacionades amb l’obesitat com en el desenvolupament de CVD, la resistència a la insulina i la T2DM (*Rangel-Huerta et al. 2019*). Fins ara, hi ha diferents estudis lipídomic en plasma en diversos models animal d’obesitat, com la rata, el ratolí i primats no humans, i en obesitat humana (*Barber et al. 2012; Floegel et al. 2013; Eisinger et al. 2014; Miao et al. 2015; Wang et al. 2019b*) però no en porcs. Amb aquests antecedents, en el present estudi, i continuant amb la caracterització dels trets moleculars característics de l’obesitat, s’ha aplicat una anàlisi de lipidòmica no dirigida, on es veuen canvis específics en el lipidoma plasmàtic que es poden atribuir únicament a la dieta. Aquesta signatura metabòlica podria definir-se per 146 molècules lipídiques on s’identifiquen un total de 75 pertanyents a les categories de glicerofosfolípids, glicerolípids i esfingolípids. A nivell global, de les 36 espècies identificades de glicerofosfolípids, el 86% es troben disminuïts, mentre que el 14% es troben augmentats; de les 27 espècies de fosfolípids, el 100% es troba disminuït i, de les 11 espècies d’esfingolípids identificades, el 91% es troba disminuït i el 9% es troba augmentat en el plasma dels porcs amb dieta hipercalòrica en comparació amb el grup control.

Dins dels lípids identificats, hi ha certs lípids que criden l’atenció, ja que la magnitud de canvi d’un grup a un altre és molt més gran que la resta. Dins d’aquests hi ha el PE (41:3), PE (44:4), PE (O-20:0), PS (44:2), PS (O38:3) i el cerebròsid D. L’anàlisi de correlacions suggereix el paper d’una PE, específicament la PE-NMe2 (34:1), com a potencial biomarcador circulant d’obesitat. Aquests productes són intermediaris en la síntesi hepàtica de la biosíntesi de la PC *de novo* mitjançant la metilació de la PE (*Wu et al. 2013*). Aquesta conversió està catalitzada per l’enzim fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT), l’activitat de la qual està regulada pels nivells de PE i SAM. Atès que aquesta activitat és essencial per a la secreció de VLDL, s’hipotetitza que

els nivells augmentats de la PE detectada podrien ser derivats de la disminució de l'activitat de PEMT en secreció hepàtica i de la secreció de VLDL, necessària per a l'exportació de lípids hepàtics cap al seu depòsit adipós. Curiosament, la pèrdua de PEMT proporciona protecció davant l'obesitat induïda per dieta (*Jacobs et al. 2010*), cosa que suggereix que en aquest model animal d'obesitat aquesta activitat s'incrementa. Existeixen altres lípids que també correlacionen amb la ingesta calòrica de forma significativa, específicament les PE formades per cadenes llargues d'àcids grassos. Aquests resultats van en la mateixa línia que altres dades obtingudes mitjançant anàlisis lipídomic en plasma d'individus sans amb sobrepès i obesitat (*Holčapek et al. 2015*). Curiosament, en altres cohorts de pacients amb prediabetis o diabètics, també s'han observat nivells augmentats de PE (*Meikle et al. 2013*). En aquest context, reforçant la validesa del metabolisme dels lípids porcins en el context de l'obesitat humana, s'observen increments en espècies específiques relacionades amb les PE (*Heilbronn et al. 2013*), com ara els plasmalògens, en subjectes obesos. Els plasmalògens poden tenir activitat antioxidants davant un augment de l'estrès oxidatiu després d'una ingesta hipercalòrica (*Wallner and Schmitz 2011; Liu et al. 2019*). A més, utilitzant el mateix enfocament metodològic diversos glicerofosfolípids correlacionen tant amb el BMI en una cohort humana com en l'abundància de greix en els porcs, reforçant el porc com a bon model per a l'estudi de l'obesitat infantil i donant més pes als resultats obtinguts en aquesta tesi.

Altres lípids, com un MG de cadena llarga o el cerebròsid D, s'associen de manera significativa amb l'adipositat mesurada amb TC en aquest model. En els ratolins, la supressió d'un dels enzims lligats a la degradació del MG, la monoacilglicerol lipasa (MGL), condueix a un augment de les concentracions de MG i resistència a l'obesitat, així com a l'absorció retardada de lípids (*Douglass et al. 2015*). Per tant, s'hipotetitza que l'augment dels nivells detectats d'aquest lípid podrien venir d'una possible reducció de l'activitat de la MGL. En relació al cerebròsid D, s'ha informat que és un agent immunomodulador potent en models de ratolins (*Wu et al. 2012*). A més, els glucocerebròsids ofereixen protecció sobre la síndrome metabòlica induïda per la pèrdua de leptina en els ratolins (*Margalit et al. 2006*). Se sap que els compostos relacionats estructuralment, com les Cer glucosilades i les Cer, tenen un paper clau en la resistència a la insulina i en esdeveniments inflamatoris (*Chavez and Summers 2012*), per la qual cosa l'augment del cerebròsid D es pot considerar com una resposta compensatòria per evitar la inflamació derivada de l'alta ingesta calòrica. Cal destacar que el cerebròsid D també s'ha descrit en la cohort humana usada per a l'aplicabilitat translacional del model, reforçant així la seva importància en la fisiologia de l'obesitat.

D'acord amb la rellevància fisiopatològica de la localització dels dipòsits de teixit adipós (*Jové et al. 2014a*), els lípids que correlacionen amb l'adipositat total són diferents dels que correlacionen amb la quantitat de greix pèlvic-renal, una ubicació visceral típica. Respecte al ChOLE (18:3), en aquest treball es troba una correlació positiva entre aquest lípid i el % d'abundància de greix pèlvic-renal. Per contra, un estudi realitzat en un model murí d'obesitat troba el mateix lípid però reduït sota condicions d'obesitat (*Eisinger et al. 2014*). Tanmateix, i reforçant la similitud del model porcí amb els humans, *Weir et al. (Weir et al. 2013)* descriu, mitjançant una anàlisi de lipidòmica, una associació significativa entre els ChOLE i el BMI en humans. En relació a la PS, no s'ha relacionat prèviament amb l'obesitat però sí amb la preeclàmpsia en dones embarassades (*Korkes et al. 2014*). Les PS tenen un paper estructural clau en les membranes cel·lulars (*Leventis and Grinstein 2010*), on poden regular les respostes a l'estrès oxidatiu i l'apoptosi, però fins ara no estaven associades a la ingesta elevada d'energia. Cal destacar que també es troba una PS entre els biomarcadors comuns entre l'estudi porcí i la cohort humana. Aquests tipus de lípids s'han relacionat recentment a canvis en el lipidoma postprandial després de l'activitat física en humans amb T2DM (*Grace et al. 2017*).

Per últim, els esfingolípidis són alguns dels lípids que han correlacionat amb els nivells d'insulina i HOMA-IR. Això coincideix amb el paper ben descrit de les Cer en la resistència a la insulina relacionada amb l'obesitat (*Aburasayn et al. 2016*). Aquests resultats reforçarien encara més la validesa d'aquest model en l'avaluació de la fisiopatologia de l'obesitat.

Cal remarcar que la cohort humana escollida està formada per homes i dones obesos (BMI=35.1 ± 10.7 kg/m<sup>2</sup>) entre 35 i 65 anys. Tot i que la condició d'obesitat és comú en la cohort humana i la cohort animal, existeixen una sèrie de diferències que s'han de tenir en compte a l'hora d'avaluar els resultats obtinguts. En primer lloc, en la cohort humana s'han inclòs dins de l'estudi tant homes com dones, ja que s'ha assumit que utilitzar només dones dificultaria l'aplicació d'aquests resultats a la fisiologia humana, especialment en aquells trets relacionats amb la influència de les hormones sexuals en el perfil lipídic. Per altra banda, s'ha de tenir en compte el factor edat, ja que aquest model animal és un model d'obesitat prepuberal on els porcs només tenen 19 setmanes d'edat. No obstant això, tal com s'observa en els resultats, el fet que diferents marcadors es repliquin de manera completament independent al sexe o l'edat en una cohort humana dóna suport a la utilitat de l'enfocament escollit.

Pel que fa a la suplementació amb els probiòtics d'estudi, els resultats obtinguts mostren que la suplementació amb aquests components induïx canvis en el perfil lipídic. L'anàlisi estadístic multivariant suggereix que el grup probiòtic més omega-3 té un perfil lipídic i diferent de la

resta de grups. Això estaria indicant una alta biodisponibilitat de l'omega-3 emprat. En aquest cas, la signatura metabòlica està formada per 667 espècies lipídiques on 161 són diferencials entre els tres grups d'estudi i s'identifiquen 84 en total. Específicament, l'acció dels probiòtics afecta les concentracions d'alguns glicerofosfolípids com les PE i PS. La majoria de PE es sintetitzen a partir de PS en la mitocondria tenint un paper important en l'estructura i la funció d'aquesta (Tamura et al. 2012). Per tant, s'hipotetitzava que les mitocondries hepàtiques podrien estar afectades després de la ingesta de la dieta hipercalòrica. També s'observen canvis en plasmalògens de PS, incrementant els seus nivells respecte al grup obès potser com a mesura compensatòria per evitar l'oxidació d'altres lípids més importants (Sindelar et al. 1999; Liu et al. 2019). Per altra banda, altres lípids que disminueixen per la suplementació amb probiòtics respecte als trobats en el grup obès són els esfingolípids. Estudis recents demostren que el metabolisme dels esfingolípids, especialment les Cer, les GlcCer i la Sph1P, estan alterats en obesitat i poden estar involucrats en complicacions derivades d'aquesta com la resistència a la insulina, la T2DM o l'ateroesclerosi (Samad 2007). Tot i que no se sap quin paper particular pot tenir la Cer (18:1), la Cer (20:4) o la GlcCer (d44:2) sí que s'ha descrit anteriorment que les ceramides poden estar involucrades en diferents processos relacionats amb la inflamació (MacEyka and Spiegel 2014).

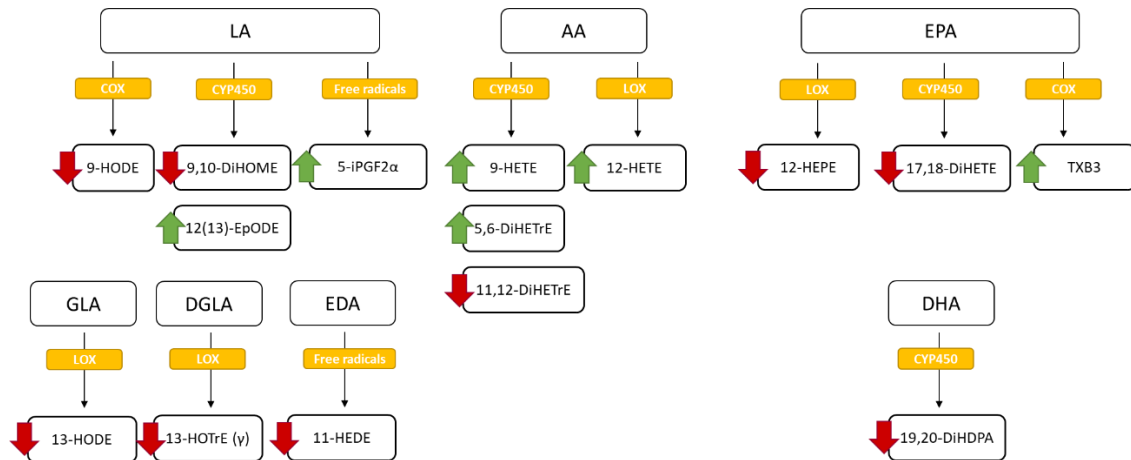
### **5.5. Efecte de la dieta hipercalòrica i de dos probiòtics sobre mediadors lipídics inflamatoris en un model d'obesitat infantil**

Donada la importància dels lípids en aquest context, s'ha volgut estudiar, de forma més concreta, un altre grup de lípids específics com els derivats de l'oxidació enzimàtica dels diferents PUFA com l'AA, el DHA o el EPA, i que tenen una funció molt important en la mediació de la inflamació. El paper d'aquests lípids en obesitat i, específicament, en el cervell de persones obeses encara està per definir. Tot i els avenços que hi ha en la tecnologia i els nous equips de MS, l'anàlisi dels mediadors lipídics ha comportat certes dificultats i, per aquest motiu no s'ha pogut realitzar la detecció, la identificació i la quantificació de tots ells. Algunes d'aquestes dificultats han estat els límits de detecció tan baixos d'algunes famílies d'oxilipines, l'alta inestabilitat i la ràpida degradació d'alguns d'aquests, o degut a l'efecte matriu. No obstant això, s'ha pogut quantificar el 70% de les oxilipines optimitzades en aquest mètode en les mostres de plasma i el 52% en les mostres d'escorça frontal.

Els resultats obtinguts demostren que existeix un perfil inflamatori específic en les mostres de plasma després d'una dieta hipercalòrica, ja que la majoria d'oxilipines augmentades en aquest grup deriven de l'AA i del LA, fet que no s'observa en les mostres d'escorça frontal. En la **Figura**



78 es pot trobar un resum dels canvis observats en les mostres de plasma induïts per la dieta hipercalòrica.



**Figura 78.** Resum dels canvis plasmàtics observats induïts per la dieta hipercalòrica. Les fletxes negres connecten els àcids grassos originals amb les oxilipines derivades juntament amb els enzims capaços de facilitar la producció d'aquestes oxilipines. Les fletxes verdes indiquen una major quantitat d'aquesta oxilipina i les fletxes vermelles una menor quantitat després de la dieta hipercalòrica.

L'anàlisi multivariant en plasma mostra que el DHA és el lípid que més pes té definint aquesta empremta, i que la seva abundància és menor en el grup obès respecte el grup control. En relació a les mostres de plasma, dins de les oxilipines diferencials entre els dos grups, hi ha certs lípids derivats de l'AA on la majoria es troben augmentats en el grup amb dieta hipercalòrica. Aquests resultats obtinguts coincideixen amb els publicats recentment per Wang et al. (Wang et al. 2017) on es veu un major efecte d'una dieta hipercalòrica en ratolins sobre les oxilipines derivades de l'AA. Específicament, en el nostre treball es troba un augment en el 5-iPGF $\alpha$  pertanyent a la categoria d'isoprostans. Els isoprostans s'han relacionat amb les diferents etapes de la inflamació crònica, ja que augmenten l'expressió de citocines inflamatòries (Aronoff et al. 2006) i, per tant, s'han considerat bons biomarcadors d'inflamació (Morrow and Roberts 1996). També es troben augmentats certs lípids hidroxilats com el 9-HETE, 12-HETE i el 5,6-DiHETrE. El 9-HETE és un producte derivat de l'AA igual que el 5-iPGF $\alpha$ , indicatiu de presència d'estrès oxidatiu (Shishehbor et al. 2006). En l'obesitat, augmenta tant la peroxidació lipídica com les ROS (Ma et al. 2014) per tant, nivells elevats de 9-HETE i 5-iPGF $\alpha$  podria estar indicant un augment de ROS després de la ingesta de dieta hipercalòrica, probablement degut a la inflamació associada a l'obesitat. A més, el 12-HETE ja s'ha relacionat amb la síndrome metabòlica (Grzesiak et al. 2019) o el 5,6-DiHETrE que també s'ha descrit en obesitat amb anterioritat (Strassburg et al. 2014).

Els resultats en conjunt indiquen que hi ha una possible desregulació de l'enzim CYP450 en aquest model d'obesitat. Estudis preclínic suggereixen que l'expressió d'aquest enzim a nivell

hepàtic i renal es troba alterat en rosegadors genèticament predisposats a l'obesitat, incloent-hi les rates Zucker obeses (*Zhao et al. 2005, 2006*), els ratolins *ob/ob* (*Enriquez et al. 1999; Rishniw 2012*) i els ratolins *db/db* (*Lam et al. 2010*). Però, no només s'ha vist alterada la funció de CYP450 en models murins genèticament modificats per desenvolupar obesitat, sinó que també s'ha vist alterada la funció d'aquest enzim després de la ingesta d'una dieta alta en greixos (*Theken et al. 2012*). Tot i això, per tal de validar aquesta hipòtesi, s'hauria d'analitzar l'expressió gènica d'aquest enzim.

Després de la quantificació de les oxilipines en les mostres de plasma i d'escorça frontal ens vàrem plantejar la idea que, algunes d'aquestes oxilipines podrien estar-se generant *in situ* en el cervell o que podrien passar a través de la barrera hematoencefàlica i acumular-se, ja que després de la quantificació, certes oxilipines presenten una concentració molt més elevada en aquest òrgan respecte a les oxilipines que es troben en circulació. L'anàlisi de les ratios, només realitzat en les mostres del grup control, ja que no volem que interfereixi el canvi de dieta, determina l'existència de certes oxilipines amb concentracions superiors en escorça frontal. Un exemple seria PGD<sub>2</sub>, prostaglandina derivada de l'AA per l'enzim COX, on ja s'ha descrit que és la prostaglandina més abundant en el cervell que modula processos de neuroinflamació (*Pietiläinen et al. 2007*). A més, volíem saber si l'obesitat era capaç de variar la permeabilitat a aquests productes per la barrera hematoencefàlica, quina funció s'ha estimat a través de les ratios, s'ha trobat l'oxilipina 13-HODE que és un mediador lipídic molt poc concentrat en cervell respecte el plasma.

Aquesta oxilipina és el major producte sintetitzat a partir de la via LOX, concretament per 15LOX, sintetitzada en el fetge i implicada en complicacions de patologies hepàtiques en humans (*Raszeja-Wyszomirska et al. 2012*), a través d'inducció d'estrès oxidatiu, de reticle i senyalització de mort cel·lular (*Zhang et al. 2017*). De mode rellevant al nostre model, la pèrdua en ratolins de 15LOX prevé parcialment l'esteatosi hepàtica derivada de l'alcohol. Donat que 13-HODE induïx estrès, tant oxidatiu com de reticle, el fet que augmenti la ratio significativament en resposta a la ingesta d'alts nivells de calories suggereix que la potencial entrada d'aquest agent en cervell podria contribuir a llarg termini, a l'increment de l'estrès oxidatiu objectivat per altres marcadors. Cal constatar també, que altres autors han descrit que aquesta oxilipina produeix un increment del creixement axonal, de forma dependent al gènere (exclusivament en mascles), en neurones *in vitro*, reforçant el doble paper potencial d'aquests agents lipídics (*Hennebelle et al. 2020*). Tanmateix, en aquest cas, el 13-HODE es va mesurar en cervell de ratolins en desenvolupament, essent una de les oxilipines més abundants en aquest òrgan. A més, reforçant

la complexitat d'aquest sistema, en el mateix treball es va demostrar que l'estat de maduració i desenvolupament afecten marcadament la concentració tissular d'aquest mediador.

En relació a la suplementació amb probiòtic, l'estadística multivariant revela un perfil lipídomic clarament diferent del grup probiòtic més omega-3, resultats que van en la mateixa línia amb els resultats obtinguts en la lipídica no dirigida. A més, els lípids amb més contribució que defineixen el PLS-DA són el DHA i l'EPA, recolzant encara més la biodisponibilitat de l'omega-3 ingerit en la dieta. A més, la suplementació amb probiòtic i omega-3 dóna com a resultat nivells de DHA de quasi 7 vegades més i nivells d'EPA de fins a 12 vegades donant com a resultat un augment de les seves oxilipines derivades. Aquests resultats també es poden observar en les mostres d'escorça frontal tot i que, els nivells de DHA lliure no s'han pogut quantificar perquè es trobaven per damunt dels límits quantificables, possiblement degut a l'alta concentració d'aquest àcid gras en escorça frontal (*Fraser et al. 2010*). Resultats similars s'han descrit amb anterioritat en humans sans, on s'ha vist que la suplementació amb DHA i EPA augmenta els metabòlits lipídics derivats d'aquests en cervell (*Schmöcker et al. 2018*). Dins de les oxilipines derivades de l'AA, hi ha una prostaglandina, la 8-iso-PGE<sub>2</sub>, lípids hidroxilats com el 5-HETE, 11-HETE, 5,6-DiHETrE i 5,15-DiHETrE i l'isoprostà 5-iPGF<sub>2</sub> $\alpha$ , tots ells disminuïts en el grup probiòtic més omega-3. Els PUFA de la sèrie n3 i els de la sèrie n6 competeixen pels mateixos enzims de les famílies LOX, COX i CYP450 per a generar els seus mediadors lipídics (*Dasilva and Medina 2019*). Per tant, gràcies a la suplementació amb el probiòtic més omega-3, s'estaria produint una disminució dels mediadors lipídics derivats dels PUFA n6 i d'aquesta manera s'estarien disminuint els efectes biològics adversos d'aquesta classe de lípids.

## **5.6. Efecte de la dieta hipercalòrica i de dos probiòtics sobre la vulnerabilitat a l'estrès oxidatiu i el dany oxidatiu proteic en un model d'obesitat infantil**

Fins al moment s'han analitzat lípids intactes, ja siguin glicerofosfolípids, glicerolípid, esfingolípid, àcids grassos lliures i oxilipines. En canvi, en l'anàlisi del contingut d'àcids grassos es contemplen tots els àcids grassos presents en totes les espècies lipídiques que formen la mostra, bàsicament lípids de membrana. Els resultats obtinguts mostren diferències en el perfil d'àcids grassos en plasma però aquestes diferències no es veuen reflexades en escorça frontal quan comparem els porcs del grup control amb els porcs del grup alimentats amb una dieta hipercalòrica. Aquests resultats concorden amb altres estudis, com per exemple l'estudi realitzat per Norman et al. (*Norman et al. 2020*) on tampoc observa canvis en la composició d'àcids grassos en el cervell de ratolins després de la ingesta d'una dieta hipercalòrica.

Diversos estudis publicats descriuen alteracions en el perfil d'àcids grassos circulants relacionats amb diversos trastorns metabòlics com la resistència a la insulina, les CVD, la T2DM, la inflamació de baix grau i la mateixa obesitat (*Wang et al. 2003; Klein-Platat et al. 2005; Warensjö et al. 2006a, d; VESSBY et al. 2006; Perreault et al. 2014; Fekete et al. 2015*). Un exemple d'àcid gras relacionat amb l'obesitat i amb totes les altres malalties descrites anteriorment és l'àcid palmitoleic (C16:1 n7) (*Frigolet and Gutiérrez-Aguilar 2017*) on, en el present treball, es troben nivells plasmàtics augmentats després de la ingesta d'una dieta hipercalòrica. A més, aquests nivells es reverteixen per l'efecte del probiòtic i l'omega-3, reforçant l'efecte beneficiós d'aquests suplementos alimentaris. Aquests resultats van en la mateixa línia que altres estudis realitzats en nens (*Okada et al. 2005*) i adults (*Paillard et al. 2008*) obesos on s'ha descrit un contingut significativament major d'àcid palmitoleic en el plasma del grup obès. Per tant, la lipogènesis endògena que causa l'augment de palmitoleat podria ser un factor important involucrat en la patogènesi de l'obesitat. En contrast, en rosegadors, el palmitoleic s'ha atribuït a senyalització des del teixit adipós fins al fetge tenint un paper beneficiós (*Cao et al. 2008*).

A nivell global, s'observa una disminució del 5% en els SFA (C16:0, C20:0 i C22:0) i un augment del 7% en els PUFA n6 (C20:3 n6 i C22:4 n6). En canvi, la reducció dels PUFA n3 és del 28%. Està descrit que els nivells augmentats dels PUFA n6 s'associen a increments en el contingut de TG cel·lulars en augmentar la permeabilitat de la membrana (*Hennig and Watkins 1989*) contribuint a la patogènesi de l'obesitat, mentre que els PUFA n3 redueixen la deposició de greix en el teixit adipós en correlacionar amb una menor activitat dels enzims lipogènics i augmentant la  $\beta$ -oxidació (*Ukropec et al. 2003*). A més, aquests resultats també poden indicar una modulació de l'activitat de les elongases i desaturases, especialment en les elongases ELOVL1-3-7 i 2-5 i les desaturases  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$ ,  $\Delta 8$  i  $\Delta 9$ . L'allargament i la dessaturació dels àcids grassos són processos crucials en la biosíntesi dels SFA, MUFA i PUFA. Tant estudis en animals com en humans han suggerit que la desregulació de l'activitat d'aquests enzims està relacionada amb diverses alteracions metabòliques com la dislipèmia, la resistència a la insulina o la T2DM (*Vessby 2003; Ntambi and Miyazaki 2004; Das 2010*). Per tant, alteracions en el metabolisme endogen dels àcids grassos podria estar explicant alguns dels canvis relacionats amb l'obesitat que s'observen en aquest estudi.

Després de la suplementació amb probiòtic no s'observen diferències en relació a la composició d'àcids grassos en escorça frontal. Contràriament, un estudi de Wall et al. (*Wall et al. 2012*) demostra que l'administració de la soca *B. breve* NCIMB 702258 produeix canvis en els nivells de DHA, EPA i AA en el cervell. Tot i això, també s'ha descrit en el mateix treball que hi ha certes

soques, com la soca *B. breve* DPC 6330, que no té cap efecte sobre la composició d'àcids grassos del cervell. Aquests resultats suggereixen que la soca utilitzada en aquest treball segueix la mateixa tendència que la soca *B. breve* DPC 6330. En canvi, en les mostres de plasma s'observen canvis en C16:0, C20:5 n3 (EPA), C22:5 n6 i C22:5 n3 en el grup probiòtic respecte el grup dieta hipercalòrica però, aquests canvis són tan petits que no produeixen alteracions en cap dels índexs calculats. Per altra banda, quan el probiòtic conté omega-3 incrementa el contingut de PUFA n3, tant en DHA, EPA i ALA, entre altres, tant en les mostres d'escorça com en les mostres de plasma. Aquests resultats suggereixen que hi ha una alta biodisponibilitat de l'omega-3 emprat que és capaç de creuar la barrera hematoencefàlica i ser incorporat en les membranes lipídiques generant més fluïdesa, més permeabilitat i millorant el transport transmembrana (*Kremmyda et al. 2011*).

La importància biològica dels canvis de membrana després de la suplementació amb omega-3 és complexa i no del tot coneguda però, se sap que aquests PUFA n3 es poden alliberar podent actuar com a molècules de senyalització, lligants o precursors de lligants per factors de transcripció com PPAR donant com a resultat una reducció de la concentració de TG en plasma, augmentant la sensibilitat a la insulina, reduint la inflamació o com a precursors per la biosíntesi de mediadors lipídics amb propietats antiinflamatòries (*Calder 2012*). A més, l'augment dels PUFA n3 en les membranes lipídiques fa que disminueixin els PUFA n6, com és el cas de l'AA, degut a la competència pels mateixos enzims, potenciant un estat antiinflamatori, tal com indica l'índex AI.

Tanmateix, els canvis en el perfil d'àcids grassos després de la suplementació amb probiòtic i omega-3 també podria estar relacionat amb alteracions en el metabolisme endogen dels àcids grassos, ja que s'observen canvis compatibles amb diferències en l'activitat de la majoria de desaturases i elongases.

No obstant això, l'augment dels PUFA n3 en el grup suplementat amb probiòtic i omega-3 pot determinar una susceptibilitat diferencial davant l'estrès oxidatiu, ja que es coneix que els PUFA són fàcilment oxidables en comparació amb els SFA o MUFA, que són més resistents a la peroxidació (*Hulbert et al. 2007*). A més, a major grau d'insaturació dels PUFA, més susceptibles seran a la lesió oxidativa (*Holman 1954*). En aquest sentit, el cervell és un dels òrgans amb més susceptibilitat davant l'oxidació degut al seu alt contingut en lípids i a la seva elevada demanda energètica (*Purdon et al. 2002; Hagen et al. 2010; Aviram et al. 2016*).

Existeixen maneres diferents de calcular la susceptibilitat d'una membrana a ser oxidada. Entre ells trobem el PIN (una de les mesures de susceptibilitat a la peroxidació) que s'obté combinant la susceptibilitat relativa dels diferents àcids grassos amb la composició en àcids grassos dels lípids d'una membrana en particular (Jové *et al.* 2017). En aquest context, els resultats obtinguts en el present treball mostren que, tot i suplementar la dieta amb probiòtic i omega-3, no hi ha diferències en aquest paràmetre.

En plasma, a banda d'aquest resultat, també s'han quantificat els nivells del marcador de dany oxidatiu proteic derivat de lipoxidació, MDAL, que ens indicaria la presència de peroxidació lipídica. En aquest sentit, els resultats mostren que la dieta hipercalòrica suplementada amb probiòtic i omega-3, no fa que augmentin els nivells d'aquest marcador de dany lipoxidatiu en aquest biofluid. Aquests resultats segueixen la mateixa línia que un estudi realitzat per Iraz *et al.* (Iraz *et al.* 2005) on es descriu que l'augment del contingut de PUFA n3, bàsicament de les membranes lipídiques, no produeix canvis en els nivells de MDAL en plasma de rates, possiblement degut a la incorporació de vitamina E en les membranes per tal d'evitar la seva peroxidació. A més, també s'han analitzat altres marcadors de modificacions a proteïnes produïdes per l'estrès oxidatiu. Els resultats mostren que no existeixen diferències significatives entre els diferents grups, tant a nivells de marcadors de glicoxidació, mixtes de glico i lipoxidació i d'estrès. Aquest fet pot ser explicat perquè les modificacions oxidatives poden ser molt perjudicials en edats de creixement i per tant, s'hipotetitza que els porcs prepuberals podrien tenir un sistema antioxidant elevat. Aquests resultats van en la mateixa línia amb altres estudis previs en humans i nens obesos i en models animals que descriuen una elevació dels sistemes antioxidants per contrarestar l'estrès oxidatiu en les primeres etapes del desenvolupament (Woo *et al.* 2012; Albuali 2014).

En canvi, en cervell, els nivells de dany oxidatiu proteic derivat de peroxidació lipídica són molt més alts que en les mostres de plasma possiblement degut a l'alt contingut lipídic i l'elevat consum d'oxigen i, a més, la dieta hipercalòrica indueix més peroxidació lipídica respecte el grup control. A banda d'això, els valors de MDAL en escorça frontal correlacionen amb el pes final d'aquests animals i amb variables relacionades amb el teixit adipós, així com amb el lípid 8-isoPFG2 $\alpha$  utilitzat en clínica per determinar presència de peroxidació lipídica. En aquest sentit, estudis en rosegadors determinen major contingut de ROS en el cervell després d'una dieta alta en greixos (Freeman *et al.* 2013; Ma *et al.* 2014) i més peroxidació lipídica mesurada amb el marcador MDA (Ma *et al.* 2014).

Un dels possibles mecanismes per explicar l'increment de marcadors de peroxidació lipídica després de la ingesta d'una dieta hipercalòrica en el cervell pot està mediat per alteracions en el metabolisme mitocondrial. Tal com s'ha comentat anteriorment, el cervell és un dels òrgans que pot ésser més sensible a l'acció de ROS que són generades en la cadena de transport mitocondrial (*Loschen et al. 1974; Boveris and Cadenas 1975*). Per tal d'estudiar si existeix una modificació en els components d'aquesta cadena, lloc on es generen principalment les ROS dins de les cèl·lules, s'ha realitzat la quantificació d'algunes subunitats dels diferents complexos que formen aquesta cadena de transport per tal de determinar si aquest augment de peroxidació lipídica pot ser degut a alguna alteració que podria provocar l'augment de ROS i per tant, l'augment d'estrès oxidatiu. En aquest sentit, els resultats suggereixen un augment del contingut de les subunitats que formen el complex I i el complex II, fet que podria provocar una disfunció mitocondrial, sent el complex I el major generador de ROS dins la mitocòndria (*Hirst et al. 2008*). Ja s'ha demostrat amb anterioritat que una dieta alta en greixos pot provocar canvis mitocondrials en cervell de rosegadors amb obesitat induïda per dieta (*Ma et al. 2014; de Mello et al. 2019*). En canvi, després de la suplementació amb probiòtics, el contingut de les subunitats que formen el complex I disminueixen i tornen als nivells basals, indicant un efecte protector d'aquests suplementes enfront la producció de ROS i l'aparició de dany oxidatiu, fet que es reforça amb la disminució del marcador MDAL en els grups suplementats amb probiòtics. En aquesta línia, diversos autors han descrit el paper protector dels probiòtics reduint la inflamació crònica i l'estrès oxidatiu (*Cani and Delzenne 2009; Wall et al. 2009; Reilly and Saltiel 2017*) així com el marcador MDA en plasma (*Zamani et al. 2019*).

A continuació, i donat que existeixen alteracions mitocondrials, s'han analitzat diferents metabòlits relacionats amb el metabolisme energètic. En les mitocòndries, el cicle del TCA i la cadena respiratòria són els responsables de la major part de producció d'ATP (*Osellame et al. 2012*). Quan hi ha un excés de nutrients, com és el cas de les dietes hipercalòriques, hi ha una proporció elevada d'ATP/ADP i NADH/NAD<sup>+</sup>, fet que inhibeix la fosforilació oxidativa, que comporta a una acumulació dels metabòlits que formen el cicle del TCA (*Frizzell et al. 2012*). Tot i això, el nostre model animal no mostra canvis en el cicle del TCA. En canvi, el grup suplementat amb probiòtic i omega-3 mostra uns nivells augmentats de citrat/isocitrat, fumarat i malat. El fumarat i el succinat poden actuar com a factors neuroprotectors a través de l'activació de respostes adaptatives dissenyades per tal de disminuir l'impacte proteic i millorar l'estrès mitocondrial. Un dels mecanismes involucrats és la via de senyalització de resposta antioxidant mediada per NRF2 (*Adam et al. 2011; Ooi et al. 2011*). NRF2 controla la resposta adaptativa de les cèl·lules neuronals a l'estrès oxidatiu (*Ferrer et al. 2017*), a través de l'activació de gens diana

que contenen elements de resposta antioxidant (*Villeneuve et al. 2010; Zhang 2010*) per tant, NRF2 pot contribuir a la protecció neuronal promovent d'aquesta manera la seva supervivència. Fins on sabem, aquest és el primer estudi on s'informa de l'efecte del probiòtic *B. breve* i del omega-3 sobre els metabòlits que formen el TCA i de la cadena respiratòria mitocondrial en el cervell de porcs obesos induïts amb una dieta hipercalòrica.

En conclusió, els resultats obtinguts d'aquesta tesi defineixen l'existència d'importants diferències metabòliques i cerebrals associades a la dieta. Tot i això, aquests canvis són més visibles en les mostres de plasma en comparació amb les mostres d'escorça frontal suggerint que no sempre el plasma és el reflex del que succeeix a la resta d'òrgans o teixits. A més, la dieta hipercalòrica és capaç de modificar tant el metaboloma com el lipidoma i, tot i que a través de la nostra anàlisi es cobreixen vies metabòliques i s'estudien molts metabòlits, està lluny de ser complet. Per tant, és evident que es necessiten més estudis per tal de cobrir altres vies metabòliques implicades en la patologia de l'obesitat. En relació a la intervenció nutricional basada en probiòtics, es demostra que els animals són capaços de respondre a la suplementació amb probiòtics, donant rellevància a l'efecte sinèrgic que té el probiòtic juntament amb l'omega-3, ja que sembla contribuir a una major resistència enfront la inflamació i l'estrès oxidatiu arribant a contribuir a la disminució dels efectes deleteris de l'obesitat induïda per dieta.

## 5.7. Limitacions del treball d'investigació

Com a limitacions de la present tesi tenim:

- i) La utilització d'un sol gènere, edat i fons genètic (*Duroc*) pot dificultar l'aplicació d'aquests resultats en la fisiopatologia humana, especialment aquells que es troben relacionats amb la influència d'hormones sexuals en el metabolisme. Tot i això, el fet de que alguns dels marcadors s'hagin replicat de manera completament independent en mostres de plasma d'una cohort humana (amb ambdós sexes i amb edat més avançada) amb obesitat, recolza la utilitat de l'enfocament escollit.
- ii) En els grups de tractament amb probiòtics, no és possible separar el possible efecte prebiòtic de la proteïna d'arròs hidrolitzada, ja que faria falta un altre grup control que només presentés, juntament amb la dieta hipercalòrica, la suplementació amb només proteïna d'arròs hidrolitzada. Tanmateix, és una aproximació que vol validar *in toto* l'efecte d'un aliment. Com passa en estudis de nutrició, cal tenir en compte que un sol aliment o fins



i tot un ingredient pot presentar multiplicitat de components individuals (molècules) fet que fa que la translació o assignació d'un efecte a una sola molècula no sigui possible.

- iii) No es presenten aspectes analítics de quantificació respecte el mètode de metabolòmica dirigida. Caldrà establir els rangs de linealitat, els límits de detecció (LOD) i de quantificació (LOQ), la variació intra i interassaig (precisió, exactitud i estabilitat), així com la utilització de patrons interns marcats isotòpicament i externs per tal de fer una validació quantitativa. Per aquest motiu, molts dels resultats es presenten de manera relativa (MS Counts) i no absoluta, no esdevenint possible les comparacions quantitatives entre els diferents metabòlits.
- iv) A més, la identificació metabolòmica i lipidòmica actualment es troba en procés, per la qual cosa són compostos anotats preliminarment, en el nivell 2 de la iniciativa *Metabolomics Standards Initiative* (per exemple, sense estàndards de referència, basats en propietats fisicoquímiques i/o semblança espectral amb biblioteques públiques o comercials) (Sumner et al. 2007). Per tant, alguns d'aquests metabòlits reportats poden variar la seva identificació final, però pensem que les dades aportades podrien ser d'interès per obtenir un benefici complet d'aquest model preclínic en l'obesitat prepuberal.
- v) Tot i que a través de la nostra anàlisi s'han cobert moltes vies metabòliques i s'han estudiat molts dels canvis fisiopatològics de l'obesitat, està molt lluny d'esdevenir complet i per tant, es evident que es necessiten més estudis per tal de cobrir tots els canvis en la patologia de l'obesitat d'aquest model.

# CONCLUSIONS



## 6. CONCLUSIONS

---

1. The administration of a hypercaloric diet for ten weeks to prepubertal nine weeks-old pigs increases 13% of final weight and up to twice the percentage of total fat and pelvic-renal fat. Also, these animals exhibit early dyslipidemia and impairment in glucose homeostasis. These results support the use of pigs as an animal model of prepubertal obesity.

2. The supplementation of a hypercaloric diet with  $5 \cdot 10^{10}$  ufc/day of *B. breve* as a probiotic, with or without 2% of omega-3, decreases the weight gain in prepubertal pigs. Additionally, the mixt of probiotic with omega-3 is capable of lowering LDL cholesterol levels while only omega-3 supplementation is capable of lowering HDL cholesterol and TG levels.

3. The hypercaloric diet increases plasma TMAO, and choline levels and TMAO frontal cortex levels. TMAO produced in the liver could be found in the frontal cortex. Supplementation with evaluated probiotics does not affect plasma TMAO concentrations, whereas probiotic with omega-3 causes an increase in this metabolite in plasma.

4. The hypercaloric diet affects the methionine cycle by decreasing plasma HCys concentration. In contrast, supplementation with chosen probiotics does not affect the levels of this metabolite. In the frontal cortex, the ingestion of the hypercaloric diet specifically lowers the levels of HCys, cystathionine, and taurine, while supplementation with probiotic affects only the concentration of HCys and cystathionine.

5. The ingestion of the hypercaloric diet induces marked changes in the composition of soluble amino acids in both plasma and frontal cortex, changes that can be reversed by the intake of the chosen probiotic with or without omega-3.

6. The hypercaloric diet induces changes in plasma lipidome, correlating with variables related to adipose tissue gain. A cohort of obese humans presents some of the differential lipids, a fact that reinforces the model's validity. Probiotic supplementation also altered the lipid profile, especially with omega-3.

7. The hypercaloric diet induces changes in the lipidomic and metabolomic profiles to a greater extent in the frontal cortex compared to the plasma. In the same way, supplementation with probiotics and omega-3 induces a differential metabolomic profile, including the amino acid synthesis and glutathione metabolism pathways.

8. Ingestion of a hypercaloric diet affects the profile of concentrations of oxylipins and related molecules, compatible with changes in CYP450 activity, an increase in inflammation, and oxidative stress. Supplementation with probiotics and omega-3 reverses hypercaloric diet-induced changes by reducing the concentration of AA derivatives with proinflammatory properties and by increasing those of DHA and EPA derivatives with anti-inflammatory properties. All of these changes take place in plasma; the intake of a hypercaloric diet has no effect on measured lipid mediators in the frontal cortex.

9. The hypercaloric diet induces changes in the composition profile of circulating fatty acids, especially in the content of SFA, PUFA n6, and PUFA n3. In contrast, there are no changes in the frontal cortex. Supplementation with probiotics and omega-3 changes the fatty acid composition profile described above by increasing PUFA n3 demonstrating the bioavailability of ingested omega-3.

10. The hypercaloric diet is associated with increased protein oxidative damage from lipid peroxidation in the frontal cortex. This increase is coincident with an increase in the content of complex I of the mitochondrial respiratory chain. Supplementation with both probiotic and probiotic and omega-3 reverses these effects.

11. The intake of a hypercaloric diet does not alter the metabolite concentration of the Krebs cycle metabolites analyzed in the frontal cortex. Probiotic and omega-3 supplementation affect the concentration of these metabolites, which is compatible with an adaptive response to oxidative stress.

12. Overall, comparing probiotic to probiotic with omega-3, administration of the latter involves changes in the concentration of fatty acids, lipid mediators, and metabolites in both plasma and frontal cortex, demonstrating the high bioavailability of the omega-3 employed.

# **BIBLIOGRAFIA**



## 7. BIBLIOGRAFIA

---

- Abete I, Goyenechea E, Zulet MA, Martínez JA (2011) Obesity and metabolic syndrome: Potential benefit from specific nutritional components. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21:B1–B15. doi: 10.1016/j.numecd.2011.05.001
- Abu Bakar MH, Sarmidi MR, Cheng KK, et al (2015) Metabolomics - the complementary field in systems biology: a review on obesity and type 2 diabetes. *Mol Biosyst* 11:1742–1774. doi: 10.1039/c5mb00158g
- Aburasayn H, Al Batran R, Ussher JR (2016) Targeting ceramide metabolism in obesity. *Am J Physiol Metab* 311:E423–E435. doi: 10.1152/ajpendo.00133.2016
- Ackerman HD, Gerhard GS (2016) Bile Acids in Neurodegenerative Disorders. *Front Aging Neurosci* 8:. doi: 10.3389/fnagi.2016.00263
- Adam J, Hatipoglu E, O'Flaherty L, et al (2011) Renal Cyst Formation in Fh1-Deficient Mice Is Independent of the Hif/Phd Pathway: Roles for Fumarate in KEAP1 Succination and Nrf2 Signaling. *Cancer Cell* 20:524–537. doi: 10.1016/j.ccr.2011.09.006
- Adams SH (2011) Emerging Perspectives on Essential Amino Acid Metabolism in Obesity and the Insulin-Resistant State. *Adv Nutr* 2:445–456. doi: 10.3945/an.111.000737
- Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ (2006) Lipids and lipidomics in brain injury and diseases. *AAPS J* 8:E314–E321. doi: 10.1007/bf02854902
- Adkins Y, Kelley DS (2010) Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem* 21:781–792. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.12.004
- Al-Assal K, Martinez AC, Torrinhas RS, et al (2018) Gut microbiota and obesity. *Clin Nutr Exp* 20:60–64. doi: 10.1016/j.yclnex.2018.03.001
- Albracht-Schulte K, Kalupahana NS, Ramalingam L, et al (2018) Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: a mechanistic update. *J Nutr Biochem* 58:1–16. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.02.012
- Albuali WH (2014) Evaluation of oxidant-antioxidant status in overweight and morbidly obese Saudi children. *World J Clin Pediatr* 3:6. doi: 10.5409/wjcp.v3.i1.6
- Almanza-Aguilera E, Brunius C, Bernal-Lopez MR, et al (2018) Impact in Plasma Metabolome as Effect of Lifestyle Intervention for Weight-Loss Reveals Metabolic Benefits in Metabolically Healthy Obese Women. *J Proteome Res* 17:2600–2610. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00042
- An HM, Park SY, Lee DK, et al (2011) Antiobesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium* spp. in high fat diet-induced obese rats. *Lipids Health Dis* 10:116. doi: 10.1186/1476-511X-10-116
- Andresen H M, Regueira H T, Leighton F (2006) [Oxidative stress in critically ill patients]. *Rev Med Chil* 134:649–56. doi: 10.4067/s0034-98872006000500015
- Angelakis E, Armougom F, Million M, Raoult D (2012) The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiol* 7:91–109. doi: 10.2217/fmb.11.142
- Ard JD, Miller G, Kahan S (2016) Nutrition Interventions for Obesity. *Med Clin North Am* 100:1341–1356. doi: 10.1016/j.mcna.2016.06.012
- Aronoff DM, Canetti C, Peters-Golden M (2004) Prostaglandin E<sub>2</sub> Inhibits Alveolar Macrophage Phagocytosis through an E-Prostanoid 2 Receptor-Mediated Increase in Intracellular Cyclic AMP. *J*



- Immunol 173:559–565. doi: 10.4049/jimmunol.173.1.559
- Aronoff DM, Carstens JK, Chen GH, et al (2006) Differences between macrophages and dendritic cells in the cyclic AMP-dependent regulation of lipopolysaccharide-induced cytokine and chemokine synthesis. *J Interf Cytokine Res* 26:827–833. doi: 10.1089/jir.2006.26.827
- Arpino P, Baldwin MA, McLafferty FW (1974) Liquid chromatography-mass spectrometry. II—continuous monitoring. *Biol Mass Spectrom* 1:80–82. doi: 10.1002/bms.1200010117
- Astarita G, Ahmed F, Piomelli D (2009) Lipidomic analysis of biological samples by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 579:201–219. doi: 10.1007/978-1-60761-322-0\_10
- Atabek ME, Keskin M, Yazici C, et al (2006) Protein oxidation in obesity and insulin resistance. *Eur J Pediatr* 175:753–756. doi: 10.1007/s00431-006-0165-5
- Atabek ME, Vatansev H, Erkul I (2004) Oxidative stress in childhood obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab* 17:1063–1068. doi: 10.1515/JPEM.2004.17.8.1063
- Atkins R (2000) *Weight Loss and Good Health The Atkins Way*. AVON BOOKS, New York
- Aureli M, Samarani M, Murdica V, et al (2014) Gangliosides and Cell Surface Ganglioside Glycohydrolases in the Nervous System. In: *Advances in Neurobiology*. pp 223–244. doi: 10.1007/978-1-4939-1154-7\_10
- Aviram R, Manella G, Kopelman N, et al (2016) Lipidomics Analyses Reveal Temporal and Spatial Lipid Organization and Uncover Daily Oscillations in Intracellular Organelles. *Mol Cell* 62:636–648. doi: 10.1016/j.molcel.2016.04.002
- Aydin S, Aksoy A, Aydin S, et al (2014) Today's and yesterday's of pathophysiology: Biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition* 30:1–9. doi: 10.1016/j.nut.2013.05.013
- Azad MAK, Sarker M, Li T, Yin J (2018) Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *Biomed Res. Int.* 2018. doi: 10.1155/2018/9478630
- Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI (2007) Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:979–984. doi: 10.1073/pnas.0605374104
- Badoud F, Lam KP, Perreault M, et al (2015) Metabolomics reveals metabolically healthy and unhealthy obese individuals differ in their response to a caloric challenge. *PLoS One* 10:e0134613. doi: 10.1371/journal.pone.0134613
- Baker M (2011) Metabolomics: From small molecules to big ideas. *Nat Methods* 8:117–121. doi: 10.1038/nmeth0211-117
- Balcer LJ, Liu GT, Forman S, et al (1999) Idiopathic intracranial hypertension: Relation of age and obesity in children. *Neurology* 52:870–872. doi: 10.1212/wnl.52.4.870
- Ballinger MN, Hubbard LLN, McMillan TR, et al (2008) Paradoxical role of alveolar macrophage-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary host defense post-bone marrow transplantation. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 295:L114–L122. doi: 10.1152/ajplung.00309.2007
- Banerjee S, Mazumdar S (2012) Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int J Anal Chem* 2012:1–40. doi: 10.1155/2012/282574

- Barber MN, Risis S, Yang C, et al (2012) Plasma lysophosphatidylcholine levels are reduced in obesity and type 2 diabetes. *PLoS One* 7:. doi: 10.1371/journal.pone.0041456
- Barrea L, Annunziata G, Muscogiuri G, et al (2018) Trimethylamine-N-oxide (TMAO) as novel potential biomarker of early predictors of metabolic syndrome. *Nutrients* 10:. doi: 10.3390/nu10121971
- Barton RH, Nicholson JK, Elliott P, Holmes E (2008) High-throughput <sup>1</sup>H NMR-based metabolic analysis of human serum and urine for large-scale epidemiological studies: Validation study. *Int J Epidemiol* 37:i31–i40. doi: 10.1093/ije/dym284
- Bassaganya-Riera J, Hontecillas R, Beitz DC (2002) Colonic anti-inflammatory mechanisms of conjugated linoleic acid. *Clin Nutr* 21:451–459. doi: 10.1054/clnu.2002.0594
- Bays HE, Tighe AP, Sadovsky R, Davidson MH (2008) Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 6:391–409. doi: 10.1586/14779072.6.3.391
- Bennett BJ, Vallim TQDA, Wang Z, et al (2013) Trimethylamine-N-Oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation. *Cell Metab* 17:49–60. doi: 10.1016/j.cmet.2012.12.011
- Berg JM (Jeremy M, Tymoczko JL, Stryer L, Stryer L (2002) *Biochemistry*. W.H. Freeman
- Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porras JA, et al (2016) Papel de las lipasas metabólicas y la lipotoxicidad en el desarrollo de esteatosis hepática y esteatohepatitis no alcohólica. *Clínica e Investig en Arterioscler* 28:47–61. doi: 10.1016/j.arteri.2015.03.003
- Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porras JA, Auguet T (2014) Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 7:221–239. doi: 10.2147/CEG.S62831
- Boada I, Bardera A, Spinola J, et al (2009) II Workshop on the use of Computed Tomography (CT) in pig carcass classification. Other CT applications: live animals and meat technology VisualPork towards the simulation of a Virtual Butcher
- Boesch C (2004) Erratum: Nobel Prizes for nuclear magnetic resonance: 2003 and historical perspectives (*Journal of Magnetic Resonance Imaging* (May 2004)). *J. Magn. Reson. Imaging* 20:177–179. doi: 10.1002/jmri.20120
- Bogner-Strauss JG (2017) N-acetylaspartate metabolism outside the brain: Lipogenesis, histone acetylation, and cancer. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 8 doi: 10.3389/fendo.2017.00240
- Boots AW, Haenen GRMM, Bast A (2008) Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.* 585:325–337. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.03.008
- Boutagy NE, Neilson AP, Osterberg KL, et al (2015a) Short-term high-fat diet increases postprandial trimethylamine-N-oxide in humans. *Nutr Res* 35:858–864. doi: 10.1016/j.nutres.2015.07.002
- Boutagy NE, Neilson AP, Osterberg KL, et al (2015b) Probiotic supplementation and trimethylamine-N-oxide production following a high-fat diet. *Obesity* 23:2357–2363. doi: 10.1002/oby.21212
- Boveris A, Cadenas E (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* 54:311–314. doi: 10.1016/0014-5793(75)80928-8
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

- Brandacher G, Hoeller E, Fuchs D, Weiss H (2007) Chronic Immune Activation Underlies Morbid Obesity: Is IDO A Key Player? *Curr Drug Metab* 8:289–295. doi: 10.2174/138920007780362590
- Brasileiro RS, Escrivão MAMS, Taddei JAAC, et al (2005) Plasma total homocysteine in Brazilian overweight and non-overweight adolescents: A case-control study. *Nutr Hosp* 20:313–319. doi: 10.3305/nutr
- Breiman L (2001) Random forests. *Mach Learn* 45:5–32. doi: 10.1023/A:1010933404324
- Broniec A, Klosinski R, Pawlak A, et al (2011) Interactions of plasmalogens and their diacyl analogs with singlet oxygen in selected model systems. *Free Radic Biol Med* 50:892–898. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.002
- Brunkwall L, Orho-Melander M (2017) The gut microbiome as a target for prevention and treatment of hyperglycaemia in type 2 diabetes: from current human evidence to future possibilities. *Diabetologia* 60:943–951. doi: 10.1007/s00125-017-4278-3
- Butte NF, Liu Y, Zakeri IF, et al (2015) Global metabolomic profiling targeting childhood obesity in the Hispanic population. *Am J Clin Nutr* 102:256–267. doi: 10.3945/ajcn.115.111872
- Calder PC (2012) Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. *J Nutr* 142:592S-599S. doi: 10.3945/jn.111.155259
- Calvani R, Brasili E, Praticò G, et al (2014) Application of NMR-based metabolomics to the study of gut microbiota in obesity. In: *Journal of Clinical Gastroenterology*. pp S5–S7. doi: 10.1097/MCG.0000000000000236
- Cammack R (2007) Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology. *Choice Rev Online* 44:44-3627-44–3627. doi: 10.5860/choice.44-3627
- Cani P, Delzenne N (2009) The Role of the Gut Microbiota in Energy Metabolism and Metabolic Disease. *Curr Pharm Des* 15:1546–1558. doi: 10.2174/138161209788168164
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1761–1772. doi: 10.2337/db06-1491
- Cantero A-V, Portero-Otín M, Ayala V, et al (2007) Methylglyoxal induces advanced glycation end product (AGEs) formation and dysfunction of PDGF receptor- $\beta$ : implications for diabetic atherosclerosis. *FASEB J* 21:3096–3106. doi: 10.1096/fj.06-7536com
- Cao C, Hu J, Dong Y, et al (2015) Gender differences in the risk factors for endothelial dysfunction in Chinese hypertensive patients: Homocysteine is an independent risk factor in females. *PLoS One* 10:. doi: 10.1371/journal.pone.0118686
- Cao H, Gerhold K, Mayers JR, et al (2008) Identification of a Lipokine, a Lipid Hormone Linking Adipose Tissue to Systemic Metabolism. *Cell* 134:933–944. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.048
- Carabús A, Gispert M, Font-i-Furnols M (2016) Imaging technologies to study the composition of live pigs: A review. *Spanish J. Agric. Res.* 14. doi: 10.5424/sjar/2016143-8439
- Castaner O, Goday A, Park Y-M, et al (2018) The Gut Microbiome Profile in Obesity: A Systematic Review. *Int J Endocrinol* 2018:4095789. doi: 10.1155/2018/4095789
- Castro BM, Prieto M, Silva LC (2014) Ceramide: A simple sphingolipid with unique biophysical properties. *Prog. Lipid Res.* 54:53–67. doi: 10.1016/j.plipres.2014.01.004
- Chalvon-Demersay T, Blachier F, Tomé D, Blais A (2017) Animal Models for the Study of the Relationships between Diet and Obesity: A Focus on Dietary Protein and Estrogen Deficiency. *Front. Nutr.* 4:5. doi:

10.3389/fnut.2017.00005

- Chavez JA, Summers SA (2012) A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metab.* 15:585–594. doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.002
- Chen S, Bin P, Ren W, et al (2017) Alpha-ketoglutarate (AKG) lowers body weight and affects intestinal innate immunity through influencing intestinal microbiota. *Oncotarget* 8:38184–38192. doi: 10.18632/oncotarget.17132
- Cho K, Moon JS, Kang JH, et al (2017) Combined untargeted and targeted metabolomic profiling reveals urinary biomarkers for discriminating obese from normal-weight adolescents. *Pediatr Obes* 12:93–101. doi: 10.1111/ijpo.12114
- Chooi YC, Ding C, Magkos F (2019) The epidemiology of obesity. *Metabolism* 92:6–10. doi: 10.1016/j.metabol.2018.09.005
- Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, et al (2007) The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: The ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17:590–597. doi: 10.1016/j.numecd.2006.05.007
- Cionci NB, Baffoni L, Gaggia F, Di Gioia D (2018) Therapeutic microbiology: The role of bifidobacterium breve as food supplement for the prevention/treatment of paediatric diseases. *Nutrients* 10. doi: 10.3390/nu10111723
- Cirulli ET, Guo L, Leon Swisher C, et al (2019) Profound Perturbation of the Metabolome in Obesity Is Associated with Health Risk. *Cell Metab* 29:488-500.e2. doi: 10.1016/j.cmet.2018.09.022
- Codoñer-Franch P, Boix-García L, Simó-Jordá R, et al (2010) Is obesity associated with oxidative stress in children? *Int J Pediatr Obes* 5:56–63. doi: 10.3109/17477160903055945
- Codoñer-Franch P, Valls-Bellés V, Arilla-Codoñer A, Alonso-Iglesias E (2011) Oxidant mechanisms in childhood obesity: The link between inflammation and oxidative stress. *Transl. Res.* 158:369–384. doi: 10.1016/j.trsl.2011.08.004
- Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH (2000) Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: International survey. *Br Med J* 320:1240–1243. doi: 10.1136/bmj.320.7244.1240
- Cortassa S, Caceres V, Bell LN, et al (2015) From metabolomics to fluxomics: A computational procedure to translate metabolite profiles into metabolic fluxes. *Biophys J* 108:163–172. doi: 10.1016/j.bpj.2014.11.1857
- Coskun O (2016) Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. *North Clin Istanbul* 3:156–160. doi: 10.14744/nci.2016.32757
- D'Souza K, Paramel G V., Kienesberger PC (2018) Lysophosphatidic acid signaling in obesity and insulin resistance. *Nutrients* 10. doi: 10.3390/nu10040399
- Dadvar S, Ferreira DMS, Cervenka I, Ruas JL (2018) The weight of nutrients: kynurenine metabolites in obesity and exercise. *J Intern Med* 284:519–533. doi: 10.1111/joim.12830
- Dahlhoff C, Desmarchelier C, Sailer M, et al (2013) Hepatic Methionine Homeostasis Is Conserved in C57BL/6N Mice on High-Fat Diet Despite Major Changes in Hepatic One-Carbon Metabolism. *PLoS One* 8:e57387. doi: 10.1371/journal.pone.0057387
- Dai ZL, Wu G, Zhu WY (2011) Amino acid metabolism in intestinal bacteria: Links between gut ecology and host health. *Front Biosci* 16:1768–1786. doi: 10.2741/3820

- Dalgliesh C, Horning E, Horning M, et al (1966) A gas-liquid-chromatographic procedure for separating a wide range of metabolites occurring in urine or tissue extracts. *Biochem J* 101:792–810. doi: 10.1042/bj1010792
- Dansinger ML, Gleason JA, Griffith JL, et al (2005) Comparison of the Atkins, Ornish, Weight Watchers, and Zone Diets for weight loss and heart disease risk reduction: A randomized trial. *J Am Med Assoc* 293:43–53. doi: 10.1001/jama.293.1.43
- Dardmeh F, Alipour H, Gazerani P, et al (2017) *Lactobacillus rhamnosus* PB01 (DSM 14870) supplementation affects markers of sperm kinematic parameters in a diet-induced obesity mice model. *PLoS One* 12:e0185964. doi: 10.1371/journal.pone.0185964
- Das UN (2010) A defect in  $\Delta 6$  and  $\Delta 5$  desaturases may be a factor in the initiation and progression of insulin resistance, the metabolic syndrome and ischemic heart disease in South Asians. *Lipids Health Dis* 9:. doi: 10.1186/1476-511X-9-130
- Dasilva G, Medina I (2019) Lipidomic methodologies for biomarkers of chronic inflammation in nutritional research:  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 lipid mediators. *Free Radic. Biol. Med.* 144:90–109. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.017
- Davis CD (2016) The gut microbiome and its role in obesity. *Nutr Today* 51:167–174. doi: 10.1097/NT.000000000000167
- Dawson PA, Lan T, Rao A (2009) Thematic review series: Bile acids. Bile acid transporters. *J. Lipid Res.* 50:2340–2357. doi: 10.1194/jlr.R900012-JLR200
- de Carvalho Marchesin J, Celiberto LS, Orlando AB, et al (2018a) A soy-based probiotic drink modulates the microbiota and reduces body weight gain in diet-induced obese mice. *J Funct Foods* 48:302–313. doi: 10.1016/j.jff.2018.07.010
- de Clercq NC, Groen AK, Romijn JA, Nieuwdorp M (2016) Gut Microbiota in Obesity and Undernutrition. *Adv Nutr An Int Rev J* 7:1080–1089. doi: 10.3945/an.116.012914
- De Ferranti S, Mozaffarian D (2008) The perfect storm: Obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin. Chem.* 54:945–955. doi: 10.1373/clinchem.2007.100156
- de Mello AH, Schraiber R de B, Goldim MP de S, et al (2019) Omega-3 Fatty Acids Attenuate Brain Alterations in High-Fat Diet-Induced Obesity Model. *Mol Neurobiol* 56:513–524. doi: 10.1007/s12035-018-1097-6
- Decker Y, McBean G, Godson C (2009) Lipoxin A4 inhibits IL-1 $\beta$ -induced IL-8 and ICAM-1 expression in 1321N1 human astrocytoma cells. *Am J Physiol - Cell Physiol* 296:C1420–C1427. doi: 10.1152/ajpcell.00380.2008
- Delzenne NM, Neyrinck AM, Bäckhed F, Cani PD (2011) Targeting gut microbiota in obesity: Effects of prebiotics and probiotics. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7:639–646. doi: 10.1038/nrendo.2011.126
- Den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, et al (1998) Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: A meta-analysis. *Thromb Haemost* 80:874–877. doi: 10.1055/s-0037-1615380
- Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* 26:51–78. doi: 10.1002/mas.20108
- Dias DA, Koal T (2016) Progress in Metabolomics Standardisation and its Significance in Future Clinical Laboratory Medicine. *EJIFCC* 27:331–343
- Dinan TG, Stanton C, Cryan JF (2013) Psychobiotics: A novel class of psychotropic. *Biol. Psychiatry* 74:720–

726. doi: 10.1016/j.biopsycho.2013.05.001

- Dirren H, Robinson AB, Pauling L (1975) Sex related patterns in the profiles of human urinary amino acids. *Clin Chem* 21:1970–1975. doi: 10.1093/clinchem/21.13.1970
- Dorn GW (2015) Mitochondrial dynamism and heart disease: changing shape and shaping change. *EMBO Mol Med* 7:865–877. doi: 10.15252/emmm.201404575
- Douglass JD, Zhou YX, Wu A, et al (2015) Global deletion of MGL in mice delays lipid absorption and alters energy homeostasis and diet-induced obesity. *J Lipid Res* 56:1153–1171. doi: 10.1194/jlr.M058586
- Dowhan W (2017) Understanding phospholipid function: Why are there so many lipids? *J Biol Chem* 292:10755–10766. doi: 10.1074/jbc.X117.794891
- Dowling AM, Steele JR, Baur LA (2001) Does obesity influence foot structure and plantar pressure patterns in prepubescent children? *Int J Obes* 25:845–852. doi: 10.1038/sj.ijo.0801598
- Du F, Virtue A, Wang H, Yang XF (2013) Metabolomic analyses for atherosclerosis, diabetes, and obesity. *Biomark. Res.* 1:17. doi: 10.1186/2050-7771-1-17
- Dudek J (2017) Role of cardiolipin in mitochondrial signaling pathways. *Front. Cell Dev. Biol.* 5. doi: 10.3389/fcell.2017.00090
- Dunn WB, Erban A, Weber RJM, et al (2013) Mass appeal: Metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics* 9:44–66. doi: 10.1007/s11306-012-0434-4
- Duvnjak M, Lerotić I, Baršić N, et al (2007) Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 13:4539–4550. doi: 10.3748/wjg.v13.i34.4539
- Dvorak R V., DeNino WF, Ades PA, Poehlman ET (1999) Phenotypic characteristics associated with insulin resistance in metabolically obese but normal-weight young women. *Diabetes* 48:2210–2214. doi: 10.2337/diabetes.48.11.2210
- Ebbeling CB, Leidig MM, Sinclair KB, et al (2003) A reduced-glycemic load diet in the treatment of adolescent obesity. *Arch Pediatr Adolesc Med* 157:773–779. doi: 10.1001/archpedi.157.8.773
- Ebbeling CB, Pawlak DB, Ludwig DS (2002) Childhood obesity: Public-health crisis, common sense cure. In: *Lancet*. pp 473–482. doi: 10.1016/S0140-6736(02)09678-2
- Eichmann TO, Lass A (2015) DAG tales: The multiple faces of diacylglycerol - Stereochemistry, metabolism, and signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 72:3931–3952. doi: 10.1007/s00018-015-1982-3
- Eisinger K, Liebisch G, Schmitz G, et al (2014) Lipidomic analysis of serum from high fat diet induced obese mice. *Int J Mol Sci* 15:2991–3002. doi: 10.3390/ijms15022991
- Eknoyan G (1999) Santorio Sanctorius (1561-1636) - Founding father of metabolic balance studies. In: *American Journal of Nephrology*. pp 226–233. doi: 10.1159/000013455
- Emwas AH, Roy R, McKay RT, et al (2019) NMR spectroscopy for metabolomics research. *Metabolites* 9:123. doi: 10.3390/metabo9070123
- Enriquez A, Leclercq I, Farrell GC, Robertson G (1999) Altered expression of hepatic CYP2E1 and CYP4A in obese, diabetic ob/ob mice, and fa/fa Zucker rats. *Biochem Biophys Res Commun* 255:300–306. doi: 10.1006/bbrc.1999.0202
- Erdely A, Kepka-Lenhart D, Salmen-Muniz R, et al (2010) Arginase activities and global arginine bioavailability in wild-type and ApoE-deficient mice: Responses to high fat and high cholesterol

- diets. *PLoS One* 5:e15253. doi: 10.1371/journal.pone.0015253
- Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S (2011) Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1811:637–647. doi: 10.1016/j.bbalip.2011.06.009
- Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, et al (2005) A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 46:839–861. doi: 10.1194/jlr.E400004-JLR200
- Fahy E, Sud M, Cotter D, Subramaniam S (2007) LIPID MAPS online tools for lipid research. *Nucleic Acids Res* 35:. doi: 10.1093/nar/gkm324
- Farese R V, Standaert ML, Ishizuka T, et al (1991) The role of diacylglycerol/protein kinase C signaling in insulin-stimulated glucose transport. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 104:187–193. doi:
- Farooqui AA, Horrocks LA (2007) Glycerophospholipids in the brain: Phospholipases A2 in neurological disorders
- Fattuoni C, Mandò C, Palmas F, et al (2018) Preliminary metabolomics analysis of placenta in maternal obesity. *Placenta* 61:89–95. doi: 10.1016/j.placenta.2017.11.014
- Fekete K, Györei E, Lohner S, et al (2015) Long-chain polyunsaturated fatty acid status in obesity: A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 16:488–497. doi: 10.1111/obr.12280
- Felig P, Marliss E, Cahill GF (1969) Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity. *N Engl J Med* 281:811–816. doi: 10.1056/NEJM196910092811503
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, et al (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* (80-. ). 246:64–71. doi: 10.1155/2012/282574
- Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, et al (2011) Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int. J. Mol. Sci.* 12:3117–3132. doi: 10.3390/ijms12053117
- Fernstrom JD (1994) Dietary amino acids and brain function. *J Am Diet Assoc* 94:71–77. doi: 10.1016/0002-8223(94)92045-1
- Ferrer I, Gil-Villar MP, Ayala V, et al (2017) Region-specific vulnerability to lipid peroxidation and evidence of neuronal mechanisms for polyunsaturated fatty acid biosynthesis in the healthy adult human central nervous system. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1862:485–495. doi: 10.1016/j.bbalip.2017.02.001
- Fiehn O, Timothy Garvey W, Newman JW, et al (2010) Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women. *PLoS One* 5:1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0015234
- Figuroa-Muñoz JI, Chinn S, Rona RJ (2001) Association between obesity and asthma in 4-11 year old children in the UK. *Thorax* 56:133–137. doi: 10.1136/thorax.56.2.133
- Floegel A, Stefan N, Yu Z, et al (2013) Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach. *Diabetes* 62:639–648. doi: 10.2337/db12-0495
- Foerster J, Hyötyläinen T, Oresic M, et al (2015) Serum Lipid and Serum Metabolite Components in relation to anthropometric parameters in EPIC-Potsdam participants. *Metabolism* 64:1348–1358. doi: 10.1016/j.metabol.2015.07.004
- Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB (2007) Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J. Pediatr. (Rio. J)*. 83:S192-203. doi: 10.2223/jped.1709

- Forkosh E, Ilan Y (2019) The heart-gut axis: New target for atherosclerosis and congestive heart failure therapy. *Open Hear* 6:e000993. doi: 10.1136/openhrt-2018-000993
- Fraser T, Tayler H, Love S (2010) Fatty acid composition of frontal, temporal and parietal neocortex in the normal human brain and in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 35:503–513. doi: 10.1007/s11064-009-0087-5
- Frazier TH, DiBaise JK, McClain CJ (2011) Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *J Parenter Enter Nutr* 35:14–20. doi: 10.1177/0148607111413772
- Freeman LR, Zhang L, Nair A, et al (2013) Obesity increases cerebrocortical reactive oxygen species and impairs brainfunction. *Free Radic Biol Med* 56:226–233. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.577
- Freeman MW, Walford GA (2015) Lipoprotein Metabolism and the Treatment of Lipid Disorders. In: *Endocrinology: Adult and Pediatric*. pp 715-736.e7. doi: 10.1016/B978-0-323-18907-1.00041-X
- Frei B, Kim MC, Ames BN (1990) Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4879–4883. doi: 10.1073/pnas.87.12.4879
- Friend A, Craig L, Turner S (2013) The prevalence of metabolic syndrome in children: A systematic review of the literature. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 11:71–80 doi: 10.1089/met.2012.0122
- Friesen CA, Roberts CC (1989) Clinical Characteristics in Children: Case Analysis and Literature Review. *Clin Pediatr (Phila)* 28:294–298. doi: 10.1177/000992288902800701
- Friгоlet ME, Gutiérrez-Aguilar R (2017) The Role of the Novel Lipokine Palmitoleic Acid in Health and Disease. *Adv Nutr An Int Rev J* 8:173S-181S. doi: 10.3945/an.115.011130
- Frisardi V, Panza F, Seripa D, et al (2011) Glycerophospholipids and glycerophospholipid-derived lipid mediators: A complex meshwork in Alzheimer's disease pathology. *Prog. Lipid Res.* 50:313–330. doi: 10.1016/j.plipres.2011.06.001
- Frizzell N, Thomas SA, Carson JA, Baynes JW (2012) Mitochondrial stress causes increased succination of proteins in adipocytes in response to glucotoxicity. *Biochem J* 445:247–254. doi: 10.1042/BJ20112142
- Frost RA, Nystrom GJ, Lang CH (2002) Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 283:R698–R709. doi: 10.1152/ajpregu.00039.2002
- Fukami K, Inanobe S, Kanemaru K, Nakamura Y (2010) Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance. *Prog. Lipid Res.* 49:429–437. doi: 10.1016/j.plipres.2010.06.001
- Furet JP, Kong LC, Tap J, et al (2010) Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: Links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* 59:3049–3057. doi: 10.2337/db10-0253
- Galili O, Versari D, Sattler KJ, et al (2007) Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 292:H904-11. doi: 10.1152/ajpheart.00628.2006
- Gallistl S, Sudi K, Mangge H, et al (2000) Insulin is an independent correlate of plasma homocysteine levels in obese children and adolescents. *Diabetes Care* 23:1348–1352. doi: 10.2337/diacare.23.9.1348
- Geidenstam N, Al-Majdoub M, Ekman M, et al (2017) Metabolite profiling of obese individuals before and after a one year weight loss program. *Int J Obes* 41:1369–1378. doi: 10.1038/ijo.2017.124



- Glish GL, Vachet RW (2003) The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:140–150. doi: 10.1038/nrd1011
- Goday A, Barneto I, García-Almeida JM, et al (2015) Obesity as a risk factor in cancer: A national consensus of the Spanish Society for the Study of Obesity and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol* 17:763–771. doi: 10.1007/s12094-015-1306-y
- Gogna N, Krishna M, Oommen AM, Dorai K (2015) Investigating correlations in the altered metabolic profiles of obese and diabetic subjects in a South Indian Asian population using an NMR-based metabolomic approach. *Mol Biosyst* 11:595–606. doi: 10.1039/c4mb00507d
- Gómez-Barrado JJ, Polo J, Gómez-Martino JR, et al (2012) Juvenile obesity: What is its real prevalence in Spain? *Endocrinol y Nutr (English Ed)* 59:151–152. doi: 10.1016/j.endoen.2011.08.005
- González-Muniesa P, Martínez-González MA, Hu FB, et al (2017) Obesity. *Nat Rev Dis Prim* 3:17034. doi: 10.1038/nrdp.2017.34
- Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, et al (2004) Metabolomics by numbers: Acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol.* 22:245–25. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.03.007
- Goto K, Hozumi Y, Nakano T, et al (2008) Lipid messenger, diacylglycerol, and its regulator, diacylglycerol kinase, in cells, organs, and animals: History and perspective. *Tohoku J. Exp. Med.* 214:199–212. doi: 10.1620/tjem.214.199
- Goulding A, Jones IE, Taylor RW, et al (2001) Bone mineral density and body composition in boys with distal forearm fractures: A dual-energy x-ray absorptiometry study. *J Pediatr* 139:509–515. doi: 10.1067/mpd.2001.116297
- Grace MS, Dempsey PC, Sethi P, et al (2017) Breaking up prolonged sitting alters the postprandial plasma lipidomic profile of adults with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 102:1991–1999. doi: 10.1210/jc.2016-3926
- Gregor MF, Hotamisligil GS (2011) Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu Rev Immunol* 29:415–445. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101322
- Gregory W, Liebig J, Webster JW (2011) Animal chemistry; or, Organic chemistry in its application to physiology and pathology. doi: 10.5962/bhl.title.31626
- Griffin JL, Kauppinen RA (2007) A metabolomics perspective of human brain tumours. *FEBS J.* 274:1132–1139
- Griffiths J (2008) A brief history of mass spectrometry. *Anal. Chem.* 80:5678–5683. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05676.x
- Grossmann M (2018) Hypogonadism and male obesity: Focus on unresolved questions. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 89:11–21. doi: 10.1111/cen.13723
- Grzesiak K, Rył A, Stachowska E, et al (2019) The relationship between eicosanoid levels and serum levels of metabolic and hormonal parameters depending on the presence of metabolic syndrome in patients with benign prostatic hyperplasia. *Int J Environ Res Public Health* 16:. doi: 10.3390/ijerph16061006
- Guillou H, Zadavec D, Martin PGP, Jacobsson A (2010) The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog. Lipid Res.* 49:186–199. doi: 10.1016/j.plipres.2009.12.002

- Gurr MI, Harwood JL, Frayn KN (2002) Lipid Biochemistry. Wiley. doi: 10.1007/978-94-009-5907-1
- Hagen RM, Rodriguez-Cuenca S, Vidal-Puig A (2010) An allostatic control of membrane lipid composition by SREBP1. *FEBS Lett* 584:2689–2698. doi: 10.1016/j.febslet.2010.04.004
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141:312–322. doi: 10.1104/pp.106.077073
- Han TS, Lean ME (2016) A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *JRSM Cardiovasc Dis* 5:204800401663337. doi: 10.1177/2048004016633371
- Hannun YA, Obeid LM (2018) Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19:175–191. doi: 10.1038/nrm.2017.107
- Hansen HS, Rosenkilde MM, Holst JJ, Schwartz TW (2012) GPR119 as a fat sensor. *Trends Pharmacol. Sci.* 33:374–381. doi: 10.1016/j.tips.2012.03.014
- Harden TK, Sondek J (2006) REGULATION OF PHOSPHOLIPASE C ISOZYMES BY RAS SUPERFAMILY GTPASES. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46:355–379. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141223
- Hardie DG (2008) AMPK: A key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *Int. J. Obes.* 32:S7–S12. doi: 10.1038/ijo.2008.116
- Harford KA, Reynolds CM, McGillicuddy FC, Roche HM (2011) Fats, inflammation and insulin resistance: Insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 70:408–417. doi: 10.1017/S0029665111000565
- Harrigan GG, Goodacre R (2003) Introduction. In: *Metabolic Profiling: Its Role in Biomarker Discovery and Gene Function Analysis*. Springer US, Boston, MA, pp 1–8. doi: 10.1007/978-1-4615-0333-0\_1
- Hartweg J, Farmer AJ, Holman RR, Neil A (2009) Potential impact of omega-3 treatment on cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Curr. Opin. Lipidol.* 20:30–38. doi: 10.1097/MOL.0b013e328321b3be
- Harwell B (2007) Biochemistry of oxidative stress. In: *Biochemical Society Transactions*. pp 1147–1150. doi: 10.1042/BST0351147
- Haufe S, Witt H, Engeli S, et al (2016) Branched-chain and aromatic amino acids, insulin resistance and liver specific ectopic fat storage in overweight to obese subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 26:637–642. doi: 10.1016/j.numecd.2016.03.013
- He Q, Ren P, Kong X, et al (2012) Comparison of serum metabolite compositions between obese and lean growing pigs using an NMR-based metabolomic approach. *J Nutr Biochem* 23:133–139. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.11.007
- Heilbronn LK, Coster ACF, Campbell L V., et al (2013) The effect of short-term overfeeding on serum lipids in healthy humans. *Obesity* 21:. doi: 10.1002/oby.20508
- Hendijani F, Akbari V (2018) Probiotic supplementation for management of cardiovascular risk factors in adults with type II diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Clin Nutr* 37:532–541. doi: 10.1016/j.clnu.2017.02.015
- Hennebelle M, Morgan RK, Sethi S, et al (2020) Linoleic acid-derived metabolites constitute the majority of oxylipins in the rat pup brain and stimulate axonal growth in primary rat cortical neuron-glia co-cultures in a sex-dependent manner. *J Neurochem* 152:195–207. doi: 10.1111/jnc.14818
- Hennig B, Watkins BA (1989) Linoleic acid and linolenic acid: Effect on permeability properties of cultured

- endothelial cell monolayers. *Am J Clin Nutr* 49:301–305. doi: 10.1093/ajcn/49.2.301
- Hernández-Alonso P, Giardina S, Cañueto D, et al (2019) Changes in Plasma Metabolite Concentrations after a Low-Glycemic Index Diet Intervention. *Mol Nutr Food Res* 63:e1700975. doi: 10.1002/mnfr.201700975
- Hill JO, Wyatt HR, Peters JC (2012) Energy balance and obesity. *Circulation* 126:126–132. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.087213
- Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, et al (2001) Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* 193:255–261. doi: 10.1084/jem.193.2.255
- Hirst J, King MS, Pryde KR (2008) The production of reactive oxygen species by complex I. In: *Biochemical Society Transactions*. pp 976–980. doi: 10.1042/BST0360976
- Hishikawa D, Hashidate T, Shimizu T, Shindou H (2014) Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells. *J. Lipid Res.* 55:799–807. doi: 10.1194/jlr.R046094
- Hivert MF, Perng W, Watkins SM, et al (2015) Metabolomics in the developmental origins of obesity and its cardiometabolic consequences. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 6:65–78. doi: 10.1017/S204017441500001X
- Hla T (2004) Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate. *Semin Cell Dev Biol* 15:513–520. doi: 10.1016/j.semcdb.2004.05.002
- Ho JE, Larson MG, Ghorbani A, et al (2016) Metabolomic profiles of body mass index in the framingham heart study reveal distinct cardiometabolic phenotypes. *PLoS One* 11:. doi: 10.1371/journal.pone.0148361
- Hodge AM, Simpson JA, Gibson RA, et al (2007) Plasma phospholipid fatty acid composition as a biomarker of habitual dietary fat intake in an ethnically diverse cohort. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17:415–426. doi: 10.1016/j.numecd.2006.04.005
- Hofmann AF, Hagey LR (2014) Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications: History of the last eight decades. *J. Lipid Res.* 55:1553–1595. doi: 10.1194/jlr.R049437
- Holčápek M, Ovčáčíková M, Lísa M, et al (2015) Continuous comprehensive two-dimensional liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of complex lipidomic samples. *Anal Bioanal Chem* 407:5033–5043. doi: 10.1007/s00216-015-8528-2. doi: 10.1007/s00216-015-8528-2
- Holman RT (1954) Autoxidation of Fats and Related Substances, in: Holman, R.T., Lundberg, W.O., Malkin, T. (Eds.), *Progress in Chemistry of Fats and Other Lipids*. Pergamon Press 51–98.
- Horrocks LAAAF (2007) *Glycerophospholipids in the Brain: Phospholipases A2 in Neurological Disorders*. Springer. doi: 10.1016/S0009-3084(00)00128-6
- Hosoi T, Sugikawa E, Chikada A, et al (2005) TG1019/OXE, a G $\alpha$ i/o-protein-coupled receptor, mediates 5-oxo-eicosatetraenoic acid-induced chemotaxis. *Biochem Biophys Res Commun* 334:987–995. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.06.191
- Haupt KA, Haupt TR, Pond WG (1979a) The pig as a model for the study of obesity and of control of food intake: A review. *Yale J. Biol. Med.* 52:307–329.
- Houttu N, Mokka K, Laitinen K (2018) Overweight and obesity status in pregnant women are related to intestinal microbiota and serum metabolic and inflammatory profiles. *Clin Nutr* 37:1955–1966. doi:

10.1016/j.clnu.2017.12.013

- Hruby A, Hu FB (2015) The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics* 33:673–689. doi: 10.1007/s40273-014-0243-x
- Hulbert AJ, Kelly MA, Abbott SK (2014) Polyunsaturated fats, membrane lipids and animal longevity. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 184:149–166. doi: 10.1007/s00360-013-0786-8
- Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA (2007) Life and death: Metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol. Rev.* 87:1175–1213. doi: 10.1152/physrev.00047.2006
- Ibáñez C, Cifuentes A, Simó C (2015) Recent Advances and Applications of Metabolomics to Investigate Neurodegenerative Diseases. In: *International Review of Neurobiology*. Academic Press Inc., pp 95–132. doi: 10.1016/bs.irn.2015.05.015
- Iraz M, Erdogan H, Ozyurt B, et al (2005) Brief communication: Omega-3 essential fatty acid supplementation and erythrocyte oxidant/antioxidant status in rats. *Ann Clin Lab Sci* 35:169–173. doi:
- Iwao S, Iwao N, Muller DC, et al (2001) Does waist circumference add to the predictive power of the body mass index for coronary risk? *Obes Res* 9:685–695. doi: 10.1038/oby.2001.93
- Jacobs RL, Zhao Y, Koonen DPY, et al (2010) Impaired de novo choline synthesis explains why phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-deficient mice are protected from diet-induced obesity. *J Biol Chem* 285:22403–22413. doi: 10.1074/jbc.M110.108514
- Jacques PF, Bostom AG, Wilson PWF, et al (2001) Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr* 73:613–621. doi: 10.1093/ajcn/73.3.613
- Jaime TJ, Balich LL, Acevedo GB, et al (2015) Efecto de la restricción calórica sobre el gasto energético en mujeres adultas con sobrepeso u obesidad. *Nutr Hosp* 31:2428–2436. doi: 10.3305/nh.2015.31.6.8782
- Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R (2002) Body mass index, waist circumference, and health risk: Evidence in support of current national institutes of health guidelines. *Arch Intern Med* 162:2074–2079. doi: 10.1001/archinte.162.18.2074
- Jéquier E, Tappy L (1999) Regulation of body weight in humans. *Physiol Rev* 79:451–480. doi: 10.1152/physrev.1999.79.2.451
- Jia W, Xie G, Ma X, et al (2014) The metabolite profiles of the obese population are gender-dependent. *J Proteome Res* 13:4062–4073. doi: 10.1021/pr500434s
- Johnson AL, Edson KZ, Totah RA, Rettie AE (2015) Cytochrome P450  $\omega$ -Hydroxylases in Inflammation and Cancer. In: *Advances in Pharmacology*. Academic Press Inc., pp 223–262. doi: 10.1016/bs.apha.2015.05.002
- Jonsson P, Bruce SJ, Moritz T, et al (2005) Extraction, interpretation and validation of information for comparing samples in metabolic LC/MS data sets. *Analyst* 130:701–707. doi: 10.1039/b501890k
- Jové M, Moreno-Navarrete JM, Pamplona R, et al (2014a) Human omental and subcutaneous adipose tissue exhibit specific lipidomic signatures. *FASEB J* 28:1071–1081. doi: 10.1096/fj.13-234419
- Jové M, Naudí A, Aledo JC, et al (2013) Plasma long-chain free fatty acids predict mammalian longevity. *Sci Rep* 3:3346. doi: 10.1038/srep03346

- Jové M, Naudí A, Gambini J, et al (2017) A stress-resistant lipidomic signature confers extreme longevity to humans. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* 72:30–37. doi: 10.1093/gerona/glw048
- Jové M, Naudí A, Ramírez-Núñez O, et al (2014b) Caloric restriction reveals a metabolomic and lipidomic signature in liver of male mice. *Aging Cell* 13:828–837. doi: 10.1111/accel.12241
- József L, Zouki C, Petasis NA, et al (2002) Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF-κB and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13266–13271. doi: 10.1073/pnas.202296999
- Jung SP, Lee KM, Kang JH, et al (2013) Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on overweight and obese adults: A randomized, double-blind clinical trial. *Korean J Fam Med* 34:80–89. doi: 10.4082/kjfm.2013.34.2.80
- Kadooka Y, Sato M, Imaizumi K, et al (2010) Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 64:636–643. doi: 10.1038/ejcn.2010.19
- Kadooka Y, Sato M, Ogawa A, et al (2013) Effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in fermented milk on abdominal adiposity in adults in a randomised controlled trial. *Br J Nutr* 110:1696–1703. doi: 10.1017/S0007114513001037
- Kairupan TS, Amitani H, Cheng KC, et al (2016) Role of gastrointestinal hormones in feeding behavior and obesity treatment. *J. Gastroenterol.* 51:93–103. doi: 10.1007/s00535-015-1118-4
- Kaplowitz PB, Slora EJ, Wasserman RC, et al (2001) Earlier onset of puberty in girls: Relation to increased body mass index and race. *Pediatrics* 108:347–353. doi: 10.1542/peds.108.2.347
- Karelis AD, Faraj M, Bastard JP, et al (2005) The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4145–4150. doi: 10.1210/jc.2005-0482
- Karelis AD, St-Pierre DH, Conus F, et al (2004) Metabolic and body composition factors in subgroups of obesity: What do we know? In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. pp 2569–2575. doi: 10.1210/jc.2004-0165
- Karimi I (2012) Animal Models as Tools for Translational Research: Focus on Atherosclerosis, Metabolic Syndrome and Type-II Diabetes Mellitus. In: *Lipoproteins - Role in Health and Diseases*. InTech. doi: 10.5772/47769
- Katajamaa M, Orešič M (2005) Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. *BMC Bioinformatics* 6:179. doi: 10.1186/1471-2105-6-179
- Keun HC, Athersuch TJ (2011) Nuclear magnetic resonance (NMR)-based metabolomics. *Methods Mol Biol* 708:321–334. doi: 10.1007/978-1-61737-985-7\_19
- Khan MJ, Gerasimidis K, Edwards CA, Shaikh MG (2016) Role of Gut Microbiota in the Aetiology of Obesity: Proposed Mechanisms and Review of the Literature. *J. Obes.* 2016:7353642. doi: 10.1155/2016/7353642
- Khan NI, Naz L, Yasmeen G (2006) Obesity: an independent risk factor for systemic oxidative stress. *Pak J Pharm Sci* 19:62–65. doi:
- Kien CL, Bunn JY, Poynter ME, et al (2013) A lipidomics analysis of the relationship between dietary fatty acid composition and insulin sensitivity in young adults. *Diabetes* 62:1054–1063. doi: 10.2337/db12-0363
- Kim HY, Kim M, Park HM, et al (2014) Lysophospholipid profile in serum and liver by high-fat diet and

- tumor induction in obesity-resistant BALB/c mice. *Nutrition* 30:1433–1441. doi: 10.1016/j.nut.2014.04.013
- Kim J, Yun JM, Kim MK, et al (2018) Lactobacillus gasseri BNR17 Supplementation Reduces the Visceral Fat Accumulation and Waist Circumference in Obese Adults: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J Med Food* 21:454–461. doi: 10.1089/jmf.2017.3937
- Kim JY, Park JY, Kim OY, et al (2010) Metabolic profiling of plasma in overweight/obese and lean men using ultra performance liquid chromatography and Q-TOF Mass spectrometry (UPLC-Q-TOF MS). *J Proteome Res* 9:4368–4375. doi: 10.1021/pr100101p
- Kim MJ, Yang HJ, Kim JH, et al (2013) Obesity-related metabolomic analysis of human subjects in black soybean peptide intervention study by ultraperformance liquid chromatography and quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Obes* 2013:. doi: 10.1155/2013/874981
- Kim Y, Park T (2010) DNA microarrays to define and search for genes associated with obesity. *Biotechnol. J.* 5:99–112. doi: 10.1002/biot.200900228
- Kim YJ, Huh I, Kim JY, et al (2017) Integration of traditional and metabolomics biomarkers identifies prognostic metabolites for predicting responsiveness to nutritional intervention against oxidative stress and inflammation. *Nutrients* 9:. doi: 10.3390/nu9030233
- Kind T, Liu KH, Lee DY, et al (2013) LipidBlast in silico tandem mass spectrometry database for lipid identification. *Nat Methods* 10:755–758. doi: 10.1038/nmeth.2551
- Kirk S, Brehm B, Saelens BE, et al (2012) Role of carbohydrate modification in weight management among obese children: A randomized clinical trial. *J Pediatr* 161:. doi: 10.1016/j.jpeds.2012.01.041
- Kitano H (2002) Systems biology: A brief overview. *Science* 295:1662–1664. doi: 10.1126/science.1069492
- Klein-Platat C, Drai J, Oujaa M, et al (2005) Plasma fatty acid composition is associated with the metabolic syndrome and low-grade inflammation in overweight adolescents. *Am J Clin Nutr* 82:1178–1184. doi: 10.1093/ajcn/82.6.1178
- Kobayashi Y, Sugahara H, Shimada K, et al (2017) Therapeutic potential of Bifidobacterium breve strain A1 for preventing cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Sci Rep* 7:. doi: 10.1038/s41598-017-13368-2
- Koelmel JP, Kroeger NM, Ulmer CZ, et al (2017) LipidMatch: An automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics* 18:331. doi: 10.1186/s12859-017-1744-3
- Koeth RA, Wang Z, Levison BS, et al (2013) Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 19:576–585. doi: 10.1038/nm.3145
- Kondo S, Kamei A, Xiao JZ, et al (2013) Bifidobacterium breve B-3 exerts metabolic syndrome-suppressing effects in the liver of diet-induced obese mice: A DNA microarray analysis. *Benef Microbes* 4:247–252. doi: 10.3920/BM2012.0019
- Kondo S, Xiao JZ, Satoh T, et al (2010) Antiobesity effects of bifidobacterium breve Strain B-3 supplementation in a mouse model with high-fat diet-induced obesity. *Biosci Biotechnol Biochem* 74:1656–1661. doi: 10.1271/bbb.100267
- Kordalewska M, Markuszewski MJ (2015) Metabolomics in cardiovascular diseases. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113:121–136. doi: 10.1016/j.jpba.2015.04.021
- Korkes HA, Sass N, Moron AF, et al (2014) Lipidomic assessment of plasma and placenta of women with

- early-onset preeclampsia. *PLoS One* 9:. doi: 10.1371/journal.pone.0110747
- Kremmyda LS, Tvrzicka E, Stankova B, Zak A (2011) Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease - a review. part 2: Fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomed Pap* 155:195–218. doi: 10.5507/bp.2011.052
- Krey G, Braissant O, L’Horset F, et al (1997) Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 11:779–791. doi: 10.1210/mend.11.6.0007
- Kritchevsky D, Tepper SA, Wright S, et al (2000) Influence of Conjugated Linoleic Acid (CLA) on Establishment and Progression of Atherosclerosis in Rabbits. *J Am Coll Nutr* 19:472S-477S. doi: 10.1080/07315724.2000.10718950
- Kumar S, Kelly AS (2017) Review of Childhood Obesity: From Epidemiology, Etiology, and Comorbidities to Clinical Assessment and Treatment. *Mayo Clin. Proc.* 92:251–265. doi: 10.1016/j.mayocp.2016.09.017
- Lackey DE, Olefsky JM (2016) Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12:15–20. doi: 10.1038/nrendo.2015.189
- Lam JL, Jiang Y, Zhang T, et al (2010) Expression and functional analysis of hepatic cytochromes P450, nuclear receptors, and membrane transporters in 10- and 25-week-old db/db mice. *Drug Metab Dispos* 38:2252–2258. doi: 10.1124/dmd.110.034223
- Lavoisier (1789) A-L de (1743-1794) *Traité élémentaire de chimie.*
- Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, et al (2013) Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500:541–546. doi: 10.1038/nature12506
- Leal-Witt MJ, Ramon-Krauel M, Samino S, et al (2018) Untargeted metabolomics identifies a plasma sphingolipid-related signature associated with lifestyle intervention in prepubertal children with obesity. *Int J Obes* 42:72–78. doi: 10.1038/ijo.2017.201
- Lee SY, Gallagher D (2008) Assessment methods in human body composition. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 11:566–572. doi: 10.1097/MCO.0b013e32830b5f23
- Lelouvier B, Servant F, Païssé S, et al (2016) Changes in blood microbiota profiles associated with liver fibrosis in obese patients: A pilot analysis. *Hepatology* 6:2015-2017. doi: 10.1002/hep.28829.
- Lerner RA, Siuzdak G, Prospero-Garcia O, et al (1994) Cerebrodiene: A brain lipid isolated from sleep-deprived cats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9505–9508. doi: 10.1073/pnas.91.20.9505
- Leventis PA, Grinstein S (2010) The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. *Annu Rev Biophys* 39:407–427. doi: 10.1146/annurev.biophys.093008.131234
- Levy BD, Petasis NA, Serhan CN (1997) Polyisoprenyl phosphates in intracellular signalling. *Nature* 389:985–990. doi: 10.1038/40180
- Lewy VD, Danadian K, Witchel SF, Arslanian S (2001) Early metabolic abnormalities in adolescent girls with polycystic ovarian syndrome. *J Pediatr* 138:38–44. doi: 10.1067/mpd.2001.109603
- Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, et al (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11070–11075. doi: 10.1073/pnas.0504978102
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI (2006) Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444:1022–1023. doi: 10.1038/4441022a

- Li D, Ke Y, Zhan R, et al (2018a) Trimethylamine-N-oxide promotes brain aging and cognitive impairment in mice. *Aging Cell* 17:. doi: 10.1111/accel.12768
- Li X, Song Y, Ma X, et al (2018b) *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* alone or in combination regulate intestinal flora composition and systemic immunity to alleviate obesity syndrome in high-fat diet rat. *Int J Food Sci Technol* 53:137–146. doi: 10.1111/ijfs.13567
- Lieberman HR (1999) *The Role of Protein and Amino Acids in Sustaining and Enhancing Performance*. National Academies Press (US). doi: 10.17226/9620
- Lima SCVC, Arrais RF, Almeida MG, et al (2004) Plasma lipid profile and lipid peroxidation in overweight or obese children and adolescents. *J Pediatr (Rio J)* 80:23–8. doi: 10.2223/jped.1129
- Lindsay KL, Kennelly M, Culliton M, et al (2014) Probiotics in obese pregnancy do not reduce maternal fasting glucose: A double-blind, placebo-controlled, randomized trial (Probiotics in Pregnancy Study). *Am J Clin Nutr* 99:1432–1439. doi: 10.3945/ajcn.113.079723
- Lipina C, Hundal HS (2015) Ganglioside GM3 as a gatekeeper of obesity-associated insulin resistance: Evidence and mechanisms. *FEBS Lett*. 589:3221–3227. doi: 10.1016/j.febslet.2015.09.018
- Liu J, Lu W, Shi B, et al (2019) Peroxisomal regulation of redox homeostasis and adipocyte metabolism. *Redox Biol*. 24. doi: 10.1016/j.redox.2019.101167
- Liu Y, Song D, Xu B, et al (2017) Development of a matrix-based candidate reference material of total homocysteine in human serum. *Anal Bioanal Chem* 409:3329–3335. doi: 10.1007/s00216-017-0272-3
- López M (2017) Hypothalamic AMPK: A golden target against obesity? *Eur. J. Endocrinol*. 176:R235–R246. doi: 10.1530/EJE-16-0927
- Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohé L (1974) Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 42:68–72. doi: 10.1016/0014-5793(74)80281-4
- Lowe MR (1999) An initial evaluation of a commercial weight loss program: short-term effects on weight, eating behavior, and mood. *Obes Res* 7:51–59. doi: 10.1002/j.1550-8528.1999.tb00390.x
- Lu W, Bennett BD, Rabinowitz JD (2008) Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 871:236–242. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.04.031
- Lucki NC, Sewer MB (2008) Multiple roles for sphingolipids in steroid hormone biosynthesis. *Subcell Biochem* 49:387–412. doi: 10.1007/978-1-4020-8831-5\_15
- Ludwig DS, Ebbeling CB (2001) Type 2 diabetes mellitus in children: Primary care and public health considerations. *J. Am. Med. Assoc*. 286:1427–1430. doi: 10.1001/jama.286.12.1427
- Luoma AM, Kuo F, Cakici O, et al (2015) Plasmalogen phospholipids protect internodal myelin from oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 84:296–310. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.012
- Ma B, Jing M, Villalta PW, et al (2016) Simultaneous determination of 8-oxo-2-deoxyguanosine and 8-oxo-2-deoxyadenosine in human retinal DNA by liquid chromatography nanoelectrospray-tandem mass spectrometry. *Sci Rep* 6:. doi: 10.1038/srep22375
- Ma W, Yuan L, Yu H, et al (2014) Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in the brain of diet-induced obese rats but not in diet-resistant rats. *Life Sci* 110:53–60. doi: 10.1016/j.lfs.2014.07.018
- MacEyka M, Spiegel S (2014) Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* 510:58–67. doi: 10.1038/nature13475



- Mahieu NG, Patti GJ (2017) Systems-Level Annotation of a Metabolomics Data Set Reduces 25 000 Features to Fewer than 1000 Unique Metabolites. *Anal Chem* 89:10397–10406. doi: 10.1021/acs.analchem.7b02380
- Margalit M, Shalev Z, Pappo O, et al (2006) Glucocerebroside ameliorates the metabolic syndrome in OB/OB mice. *J Pharmacol Exp Ther* 319:105–110. doi: 10.1124/jpet.106.104950
- Martín-García E, Darbra S, Pallarès M (2007) Implicación de los neuroesteroides en la conducta normal y patológica. *Rev Neurol* 44:661–676. doi: 10.33588/rn.4411.2006178
- Martin AJP, Synge RLM (1941) A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochem J* 35:1358–1368. doi: 10.1042/bj0351358
- Martos R, Valle M, Morales R, et al (2006) Hyperhomocysteinemia correlates with insulin resistance and low-grade systemic inflammation in obese prepubertal children. *Metabolism* 55:72–77. doi: 10.1016/j.metabol.2005.07.008
- Masoodi M, Mir AA, Petasis NA, et al (2008) Simultaneous lipidomic analysis of three families of bioactive lipid mediators leukotrienes, resolvins, protectins and related hydroxy-fatty acids by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22:75–83. doi: 10.1002/rcm.3331
- Massey KA, Nicolaou A (2013) Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids. *Free Radic. Biol. Med.* 59:45–55. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.565
- McCully KS (2016) Homocysteine metabolism, atherosclerosis, and diseases of aging. *Compr Physiol* 6:471–505. doi: 10.1002/cphy.c150021
- McGill HC, McMahan CA, Zieske AW, et al (2000a) Association of coronary heart disease risk factors with microscopic qualities of coronary atherosclerosis in youth. *Circulation* 102:374–379. doi: 10.1161/01.CIR.102.4.374
- McGill J, McMahan CA, Herderick EE, et al (2000b) Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. In: *American Journal of Clinical Nutrition*. pp 1307s-1315s. doi: 10.1093/ajcn/72.5.1307s
- McJarrow P, Schnell N, Jumpsen J, Clandinin T (2009) Influence of dietary gangliosides on neonatal brain development. *Nutr. Rev.* 67:451–463. doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00211.x
- McMillin M, DeMorrow S (2016) Effects of bile acids on neurological function and disease. *FASEB J.* 30:3658–3668. doi: 10.1096/fj.201600275R
- Meikle PJ, Wong G, Barlow CK, et al (2013) Plasma Lipid Profiling Shows Similar Associations with Prediabetes and Type 2 Diabetes. *PLoS One* 8:e74341. doi: 10.1371/journal.pone.0074341
- Merrill AH, Dennis EA, McDonald JG, Fahy E (2013) Lipidomics Technologies at the End of the First Decade and the Beginning of the Next. *Adv Nutr* 4:565–567. doi: 10.3945/an.113.004333
- Merrill AH, Sandhoff K (2002) Chapter 14 Sphingolipids: metabolism and cell signaling. *New Compr Biochem* 36:373–407. doi: 10.1016/s0167-7306(02)36016-2
- Meucci M, Baldari C, Guidetti L, et al (2018) Metabolomic Shifts Following Play-Based Activity in Overweight Preadolescents. *Curr Pediatr Rev* 13:. doi: 10.2174/1573396313666170113145553
- Miao H, Chen H, Pei S, et al (2015) Plasma lipidomics reveal profound perturbation of glycerophospholipids, fatty acids, and sphingolipids in diet-induced hyperlipidemia. *Chem Biol Interact* 228:79–87. doi: 10.1016/j.cbi.2015.01.023

- Mihalik SJ, Michaliszyn SF, De Las Heras J, et al (2012) Metabolomic profiling of fatty acid and amino acid metabolism in youth with obesity and type 2 diabetes: Evidence for enhanced mitochondrial oxidation. *Diabetes Care* 35:605–611. doi: 10.2337/DC11-1577
- Milhas D, Clarke CJ, Hannun YA (2010) Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: Implications for bioactive sphingolipids. *FEBS Lett.* 584:1887–1894. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.058
- Mills HL, Patel N, White SL, et al (2019) The effect of a lifestyle intervention in obese pregnant women on gestational metabolic profiles: Findings from the UK Pregnancies Better Eating and Activity Trial (UPBEAT) randomised controlled trial. *BMC Med* 17:. doi: 10.1186/s12916-018-1248-7
- Minami J, Iwabuchi N, Tanaka M, et al (2018) Effects of *Bifidobacterium breve* B-3 on body fat reductions in pre-obese adults: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Biosci Microbiota, Food Heal* 37:67–75. doi: 10.12938/bmfh.18-001
- Minami JI, Kondo S, Yanagisawa N, et al (2015) Oral administration of *Bifidobacterium breve* B-3 modifies metabolic functions in adults with obese tendencies in a randomised controlled trial. *J Nutr Sci* 4:e17. doi: 10.1017/jns.2015.5
- Minett T, Classey J, Matthews FE, et al (2016) Microglial immunophenotype in dementia with Alzheimer's pathology. *J Neuroinflammation* 13:. doi: 10.1186/s12974-016-0601-z
- Moco S, Vervoort J, Moco S, et al (2007) Metabolomics technologies and metabolite identification. *TrAC - Trends Anal Chem* 26:855–866. doi: 10.1016/j.trac.2007.08.003
- Moffett JR, Ross B, Arun P, et al (2007) N-Acetylaspartate in the CNS: From neurodiagnostics to neurobiology. *Prog. Neurobiol.* 81:89–131. doi: 10.1016/j.pneurobio.2006.12.003
- Moghadasian MH, Shahidi F (2016) Fatty Acids. In: *International Encyclopedia of Public Health, Second Edi.* Elsevier, pp 114–122. doi: 10.1016/B978-0-12-803678-5.00157-0
- Mogi M, Iwanami J, Horiuchi M (2012) Roles of brain angiotensin II in cognitive function and dementia. *Int. J. Hypertens.* 2012. doi: 0.1155/2012/169649
- Monteiro R, Azevedo I (2010) Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm.* 2010. doi: 10.1155/2010/289645
- Moore SC, Matthews CE, Sampson JN, et al (2014) Human metabolic correlates of body mass index. *Metabolomics* 10:259–269. doi: 10.1007/s11306-013-0574-1. doi: 10.1007/s11306-013-0574-1
- Morris C, O'Grada C, Ryan M, et al (2012) The relationship between BMI and metabolomic profiles: A focus on amino acids. In: *Proceedings of the Nutrition Society.* pp 634–638. doi: 10.1017/S0029665112000699
- Morrow JD (2003) Is oxidant stress a connection between obesity and atherosclerosis? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:368–370. doi: 10.1161/01.ATV.0000063107.86298.FD
- Morrow JD, Roberts LJ (1996) The isoprostanes: Current knowledge and directions for future research. *Biochem. Pharmacol.* 51:1–9. doi: 0.1016/0006-2952(95)02072-1
- Mullin GE (2010) High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Nutr. Clin. Pract.* 25:310–311. doi: 10.1177/0884533610368714
- Muscogiuri G, Cantone E, Cassarano S, et al (2019) Gut microbiota: a new path to treat obesity. *Int J Obes Suppl* 9:10–19. doi: 10.1038/s41367-019-0011-7. doi: 10.1038/s41367-019-0011-7
- Nagrath D, Caneba C, Karedath T, Bellance N (2011) Metabolomics for mitochondrial and cancer studies.

- Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 1807:650–663. doi: 10.1016/j.bbabbio.2011.03.006
- Naito-Matsui Y, Davies LRL, Takematsu H, et al (2017) Physiological exploration of the long term evolutionary selection against expression of N-Glycolylneuraminic Acid in the Brain. *J Biol Chem* 292:2557–2570. doi: 10.1074/jbc.M116.768531
- Nakagawa Y, Sonobe H (2016) *Handbook of Hormones - Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research - Chapter 98*. doi: 10.1016/B978-0-12-801028-0.00485-2
- Narin F, Emre Atabek M, Karakukcu M, et al (2005) The association of plasma homocysteine levels with serum leptin and apolipoprotein B levels in childhood obesity. *Ann Saudi Med* 25:209–214. doi: 10.5144/0256-4947.2005.209
- Naudí A, Cabré R, Jové M, et al (2015) Lipidomics of Human Brain Aging and Alzheimer's Disease Pathology. In: *International Review of Neurobiology*. Academic Press Inc., pp 133–189. doi: 10.1016/bs.irn.2015.05.008
- Naudí A, Jové M, Ayala V, et al (2013a) Estudio de la vulnerabilidad neuronal selectiva en el sistema nervioso central humano. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 48:216–223. doi: 10.1016/j.regg.2013.04.005
- Naudí A, Jové M, Ayala V, et al (2011) Regulation of Membrane Unsaturation as Antioxidant Adaptive Mechanism in Long-lived Animal Species. *Free Radicals Antioxidants* 1:3–12. doi: 10.5530/ax.2011.3.2
- Naudí A, Jové M, Cacabelos D, et al (2013b) Formation of S-(carboxymethyl)-cysteine in rat liver mitochondrial proteins: Effects of caloric and methionine restriction. *Amino Acids* 44:361–371. doi: 10.1007/s00726-012-1339-2
- Newgard CB (2017) Metabolomics and Metabolic Diseases: Where Do We Stand? *Cell Metab.* 25:43–56. doi: 10.1017/S204017441500001X
- Newgard CB, An J, Bain JR, et al (2009) A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metab* 9:311–326. doi: 10.1016/j.cmet.2009.02.002
- Niccolai E, Boem F, Russo E, Amedei A (2019) The gut–brain axis in the neuropsychological disease model of obesity: A classical movie revised by the emerging director “microbiome.” *Nutrients* 11:156. doi: 10.3390/nu11010156
- Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E (1999) “Metabonomics”: Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29:1181–1189. doi: 10.1080/004982599238047
- Nielsen J (2006) Metabolomics in Functional Genomics and Systems Biology. In: *Metabolome Analysis: An Introduction*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp 1–14. doi: 10.1002/9780470105511.ch1
- Niki E (2008) Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *BioFactors* 34:171–180. doi: 10.1002/biof.5520340208
- Node K, Huo Y, Ruan X, et al (1999) Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science* (80- ) 285:1276–1279. doi: 10.1126/science.285.5431.1276
- Nordström A, Want E, Northen T, et al (2008) Multiple ionization mass spectrometry strategy used to reveal the complexity of metabolomics. *Anal Chem* 80:421–429. doi: 10.1021/ac701982e
- Norman JE, Aung HH, Otoki Y, et al (2020) A single meal has the potential to alter brain oxylipin content. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 154:102062. doi: 10.1016/j.plefa.2020.102062

- Ntambi JM, Miyazaki M (2004) Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog. Lipid Res.* 43:91–104. doi: 10.1016/S0163-7827(03)00039-0
- Nyangale EP, Mottram DS, Gibson GR (2012) Gut microbial activity, implications for health and disease: The potential role of metabolite analysis. *J. Proteome Res.* 11:5573–5585. doi: 10.1021/pr300637d
- O’Flaherty JT, Kuroki M, Nixon AB, et al (1996) 5-Oxo-eicosatetraenoate is a broadly active, eosinophil-selective stimulus for human granulocytes. *J Immunol* 157:336–42
- Oberbach A, Blüher M, Wirth H, et al (2011) Combined proteomic and metabolomic profiling of serum reveals association of the complement system with obesity and identifies novel markers of body fat mass changes. *J Proteome Res* 10:4769–4788. doi: 10.1021/pr2005555
- Oh R, Uppaluri KR (2019) *Low Carbohydrate Diet*. StatPearls Publishing
- Okada T, Furuhashi N, Kuromori Y, et al (2005) Plasma palmitoleic acid content and obesity in children. *Am J Clin Nutr* 82:747–750. doi: 10.1093/ajcn/82.4.747
- Ontario L (2002) *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*.
- Ooi A, Wong JC, Petillo D, et al (2011) An Antioxidant Response Phenotype Shared between Hereditary and Sporadic Type 2 Papillary Renal Cell Carcinoma. *Cancer Cell* 20:511–523. doi: 10.1016/j.ccr.2011.08.024
- Osellame LD, Blacker TS, Duchon MR (2012) Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 26:711–723. doi: 10.1016/j.beem.2012.05.003
- Osganian SK, Stampfer MJ, Spiegelman D, et al (1999) Distribution of and factors associated with serum homocysteine levels in children: Child and adolescent trial for cardiovascular health. *J Am Med Assoc* 281:1189–1196. doi: 10.1001/jama.281.13.1189
- Osterberg KL, Boutagy NE, McMillan RP, et al (2015) Probiotic supplementation attenuates increases in body mass and fat mass during high-fat diet in healthy young adults. *Obesity* 23:2364–2370. doi: 10.1002/oby.21230
- Paillard F, Catheline D, Duff F Le, et al (2008) Plasma palmitoleic acid, a product of stearoyl-coA desaturase activity, is an independent marker of triglyceridemia and abdominal adiposity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18:436–440. doi: 10.1016/j.numecd.2007.02.017
- Paltauf F (1994) Ether lipids in biomembranes. *Chem. Phys. Lipids* 74:101–139. doi: 10.1016/0009-3084(94)90054-X
- Pamplona R (2011) Advanced lipoxidation end-products. In: *Chemico-Biological Interactions*. pp 14–20. doi: 10.1016/j.cbi.2011.01.007
- Pamplona R, Costantini D (2011) Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301:R843–R863. doi: 10.1152/ajpregu.00034.2011
- Pant SD, Karlskov-Mortensen P, Jacobsen MJ, et al (2015) Comparative analyses of QTLs influencing obesity and metabolic phenotypes in pigs and humans. *PLoS One* 10:e0137356. doi: 10.1371/journal.pone.0137356
- Papandreou D, Rousso I, Makedou A, et al (2007) Association of blood pressure, obesity and serum homocysteine levels in healthy children. *Acta Paediatr Int J Paediatr* 96:1819–1823. doi: 10.1111/j.1651-2227.2007.00563.x

- Park S, Sadanala KC, Kim EK (2014) A metabolomic approach to understanding the metabolic link between obesity and diabetes. *Mol. Cells* 38:587–596. doi: 10.14348/molcells.2015.0126
- Pasławski R, Pasławska U, Szuba A, Nicpoń J (2011) Swine as a model of experimental atherosclerosis. *Adv. Clin. Exp. Med.* 20:211–215. doi:
- Patti GJ (2011) Separation strategies for untargeted metabolomics. *J. Sep. Sci.* 34:3460–3469. doi: 10.1002/jssc.201100532
- Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G (2012) Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13:263–269. doi: 10.1038/nrm3314
- Pedret A, Valls RM, Calderón-Pérez L, et al (2019) Effects of daily consumption of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CECT 8145 on anthropometric adiposity biomarkers in abdominally obese subjects: a randomized controlled trial. *Int J Obes* 43:1863–1868. doi: 10.1038/s41366-018-0220-0
- Perez-Cornago A, Brennan L, Ibero-Baraibar I, et al (2014) Metabolomics identifies changes in fatty acid and amino acid profiles in serum of overweight older adults following a weight loss intervention. *J Physiol Biochem* 70:593–602. doi: 10.1007/s13105-013-0311-2
- Pérez-Enciso M, Tenenhaus M (2003) Prediction of clinical outcome with microarray data: A partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) approach. *Hum Genet* 112:581–592. doi: 10.1007/s00439-003-0921-9
- Perez-Matos MC, Sandhu B, Bonder A, Jiang ZG (2019) Lipoprotein metabolism in liver diseases. *Curr. Opin. Lipidol.* 30:30–36. doi: 10.1097/MOL.0000000000000569
- Perreault M, Zulyniak MA, Badoud F, et al (2014) A distinct fatty acid profile underlies the reduced inflammatory state of metabolically healthy obese individuals. *PLoS One* 9:e88539. doi: 10.1371/journal.pone.0088539
- Peters-Golden M, Henderson WR (2007) Mechanisms of disease: Leukotrienes. *N. Engl. J. Med.* 357:1841–1854. doi: 10.1056/NEJMra071371
- Pietiläinen KH, Sysi-Aho M, Rissanen A, et al (2007) Acquired obesity is associated with changes in the serum lipidomic profile independent of genetic effects - A monozygotic twin study. *PLoS One* 2:73–78. doi: 10.1371/journal.pone.0000218
- Pihl E, Zilmer K, Kullisaar T, et al (2006) Atherogenic inflammatory and oxidative stress markers in relation to overweight values in male former athletes. *Int J Obes* 30:141–146. doi: 10.1038/sj.ijo.0803068
- Piomelli D, Astarita G, Rapaka R (2007) A neuroscientist's guide to lipidomics. *Nat. Rev. Neurosci.* 8:743–754. doi: 10.1038/nrn2233
- Pirillo A, Catapano AL (2013) Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of hypertriglyceridaemia. *Int J Cardiol* 170:S16–S20. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.06.040
- Pouliot M, Serhan CN (1999) Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 inhibit tumor necrosis factor- $\alpha$ -initiated neutrophil responses and trafficking: Novel regulators of a cytokine-chemokine axis relevant to periodontal diseases. *J Periodontal Res* 34:370–373. doi: 10.1111/j.1600-0765.1999.tb02268.x
- Poursharifi P, Madiraju SRM, Prentki M (2017) Monoacylglycerol signalling and ABHD6 in health and disease. *Diabetes, Obes. Metab.* 19:76–89. doi: 10.1111/dom.13008
- Purdon AD, Rosenberger TA, Shetty HU, Rapoport SI (2002) Energy consumption by phospholipid

- metabolism in mammalian brain. *Neurochem Res* 27:1641–1647. doi: 10.1023/A:1021635027211
- Putri SP, Yamamoto S, Tsugawa H, Fukusaki E (2013) Current metabolomics: Technological advances. *J. Biosci. Bioeng.* 116:9–16. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.01.004
- Pyne NJ, Pyne S (2017) Sphingosine 1-phosphate receptor 1 signaling in mammalian cells. *Molecules* 22:344. doi: 10.3390/molecules22030344
- Raichur S, Brunner B, Bielohuby M, et al (2019) The role of C16:0 ceramide in the development of obesity and type 2 diabetes: CerS6 inhibition as a novel therapeutic approach. *Mol Metab* 21:36–50. doi: 10.1016/j.molmet.2018.12.008
- Rajkumar H, Mahmood N, Kumar M, et al (2014) Effect of probiotic (VSL#3) and omega-3 on lipid profile, insulin sensitivity, inflammatory markers, and gut colonization in overweight adults: A randomized, controlled trial. *Mediators Inflamm* 2014:348959. doi: 10.1155/2014/348959
- Rancoule C, Attané C, Grès S, et al (2013) Lysophosphatidic acid impairs glucose homeostasis and inhibits insulin secretion in high-fat diet obese mice. *Diabetologia* 56:1394–1402. doi: 10.1007/s00125-013-2891-3
- Rangel-Huerta OD, Gil A (2016) Nutrimental metabolomics: An update on analytical approaches to investigate the role of plant-based foods and their bioactive compounds in non-communicable chronic diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 17. doi: 10.3390/ijms17122072
- Rangel-Huerta OD, Pastor-Villaescusa B, Gil A (2019) Are we close to defining a metabolomic signature of human obesity? A systematic review of metabolomics studies. *Metabolomics* 15. doi: 10.1007/s11306-019-1553-y
- Raszeja-Wyszomirska J, Safranow K, Milkiewicz M, et al (2012) Lipidic last breath of life in patients with alcoholic liver disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 99:51–56. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2012.06.001
- Rauschert S, Kirchberg FF, Marchioro L, et al (2017) Early Programming of Obesity Throughout the Life Course: A Metabolomics Perspective. *Ann Nutr Metab* 70:201–209. doi: 10.1159/000459635
- Rauschert S, Uhl O, Koletzko B, et al (2016) Lipidomics reveals associations of phospholipids with obesity and insulin resistance in young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 101:871–879. doi: 10.1210/jc.2015-3525
- Redline S, Tishler P V., Schluchter M, et al (1999) Risk factors for sleep-disordered breathing in children: Associations with obesity, race, and respiratory problems. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1527–1532. doi: 10.1164/ajrccm.159.5.9809079
- Reilly SM, Saltiel AR (2017) Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13:633–643. doi: 10.1038/nrendo.2017.90
- Requena JR (2001) Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc Natl Acad Sci* 98:69–74. doi: 10.1073/pnas.011526698
- Rio D Del, Zimetti F, Caffarra P, et al (2017) The gut microbial metabolite trimethylamine-N-oxide is present in human cerebrospinal fluid. *Nutrients* 9:. doi: 10.3390/nu9101053
- Rishniw M (2012) Cardiovascular Diseases. In: *The Cat.* pp 300–328. doi: 10.1016/B978-1-4377-0660-4.00020-X
- Riva A, Borgo F, Lassandro C, et al (2017) Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in Firmicutes populations. *Environ Microbiol* 19:95–105. doi: 10.1111/1462-

2920.13463

- Rivera C (2008) Pathophysiology of Obesity. *Pathophysiology* 15:69–70. doi: 0.1016/j.pathophys.2008.04.006
- Root M, Collier SR, Zwetsloot KA, et al (2013) A randomized trial of fish oil omega-3 fatty acids on arterial health, inflammation, and metabolic syndrome in a young healthy population. *Nutr J* 12:. doi: 10.1186/1475-2891-12-40
- Roy Sarkar S, Banerjee S (2019) Gut microbiota in neurodegenerative disorders. *J. Neuroimmunol.* 328:98–104. doi: 10.1016/j.jneuroim.2019.01.004
- Royo T, Alfón J, Berrozpe M, Badimon L (2000) Effect of gemfibrozil on peripheral atherosclerosis and platelet activation in a pig model of hyperlipidemia. *Eur J Clin Invest* 30:843–852. doi: 10.1046/j.1365-2362.2000.00711.x
- Saavedra JM (2005) Brain angiotensin II: New developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25:485–512. doi: 10.1007/s10571-005-4011-5
- Sailer M, Dahlhoff C, Giesbertz P, et al (2013) Increased Plasma Citrulline in Mice Marks Diet-Induced Obesity and May Predict the Development of the Metabolic Syndrome. *PLoS One* 8:. doi: 10.1371/journal.pone.0063950
- Salem N, Wegher B, Mena P, Uauy R (1996) Arachidonic and docosahexaenoic acids are biosynthesized from their 18-carbon precursors in human infants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:49–54. doi: 10.1073/pnas.93.1.49
- Samad F (2007) Contribution of sphingolipids to the pathogenesis of obesity. *Future Lipidol.* 2:625–639. doi: 10.2217/17460875.2.6.625
- Sanchis-Chordà J, del Pulgar EMG, Carrasco-Luna J, et al (2019) Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT 7765 supplementation improves inflammatory status in insulin-resistant obese children. *Eur J Nutr* 58:2789–2800. doi: 10.1007/s00394-018-1828-5
- Sandhoff R (2010) Very long chain sphingolipids: Tissue expression, function and synthesis. *FEBS Lett.* 584:1907–1913. doi: 10.1016/j.febslet.2009.12.032
- Sauleau P, Lapouble E, Val-Laillet D, Malbert CH (2009) The pig model in brain imaging and neurosurgery. *Animal* 3:1138–1151. doi: 10.1017/S1751731109004649
- Schmöcker C, Zhang IW, Kiesler S, et al (2018) Effect of omega-3 fatty acid supplementation on oxylipins in a routine clinical setting. *Int J Mol Sci* 19:. doi: 10.3390/ijms19010180
- Schroeder BO, Bäckhed F (2016) Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med* 22:1079–1089. doi: 10.1038/nm.4185
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, et al (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661–671. doi: 10.1038/35007534
- Seldin MM, Meng Y, Qi H, et al (2016) Trimethylamine N-oxide promotes vascular inflammation through signaling of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$ b. *J Am Heart Assoc* 5:. doi: 10.1161/JAHA.115.002767
- Serena C, Ceperuelo-Mallafré V, Keiran N, et al (2018) Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota. *ISME J* 12:1642–1657. doi: 10.1038/s41396-018-0068-2

- Serhan CN, Hong S, Lu Y (2006) Lipid mediator informatics-lipidomics: Novel pathways in mapping resolution. *AAPS J* 8:E284–E297. doi: 10.1007/bf02854899
- Serrano JCE, Gonzalo-Benito H, Jové M, et al (2013) Dietary intake of green tea polyphenols regulates insulin sensitivity with an increase in AMP-activated protein kinase  $\alpha$  content and changes in mitochondrial respiratory complexes. *Mol Nutr Food Res* 57:459–470. doi: 10.1002/mnfr.201200513
- Sharafedinov KK, Plotnikova OA, Alexeeva RI, et al (2013) Hypocaloric diet supplemented with probiotic cheese improves body mass index and blood pressure indices of obese hypertensive patients - A randomized double-blind placebo-controlled pilot study. *Nutr J* 12:138. doi: 10.1186/1475-2891-12-138
- She P, Van Horn C, Reid T, et al (2007) Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 293:. doi: 10.1152/ajpendo.00134.2007
- Shen J, Obin MS, Zhao L (2013) The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol. Aspects Med.* 34:39–58. doi: 10.1016/j.mam.2012.11.001
- Shen MH, Chu NF, Wu DM, Chang JB (2002) Plasma homocyst(e)ine, folate and vitamin B12 levels among school children in Taiwan: The Taipei Children Heart Study. *Clin Biochem* 35:495–498. doi: 10.1016/S0009-9120(02)00344-2
- Shi Y, Burn P (2004) Lipid metabolic enzymes: Emerging drug targets for the treatment of obesity. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3:695–710. doi: 10.1038/nrd1469
- Shi Y, Cheng D (2009) Beyond triglyceride synthesis: The dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 297:E10-8. doi: 10.1152/ajpendo.90949.2008
- Shin JH, Nam MH, Lee H, et al (2018) Amelioration of obesity-related characteristics by a probiotic formulation in a high-fat diet-induced obese rat model. *Eur J Nutr* 57:2081–2090. doi: 10.1007/s00394-017-1481-4
- Shishehbor MH, Zhang R, Medina H, et al (2006) Systemic elevations of free radical oxidation products of arachidonic acid are associated with angiographic evidence of coronary artery disease. *Free Radic Biol Med* 41:1678–1683. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.09.001
- Siddique MM, Li Y, Chaurasia B, et al (2015) Dihydroceramides: From bit players to lead actors. *J Biol Chem* 290:15371–15379. doi: 10.1074/jbc.R115.653204
- Sies H (1997) Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82:291–295. doi: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024
- Simopoulos AP (2002) The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother* 56:365–379. doi: 10.1016/S0753-3322(02)00253-6
- Sims EAH (2001) Are there persons who are obese, but metabolically healthy? *Metabolism.* 50:1499–1504. doi: 10.1053/meta.2001.27213
- Sindelar PJ, Guan Z, Dallner G, Ernster L (1999) The protective role of plasmalogens in iron-induced lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 26:318–324. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00221-4
- Singla P (2010) Metabolic effects of obesity: A review. *World J Diabetes* 1:76. doi: 10.4239/wjd.v1.i3.76
- Siuzdak G (2004) An introduction to mass spectrometry ionization: An excerpt from *The Expanding Role*



- of Mass Spectrometry in Biotechnology, 2nd ed.; MCC Press: San Diego, 2005. *J Assoc Lab Autom* 9:50–63. doi: 10.1016/j.jala.2004.01.004
- Slotte JP (2013) Biological functions of sphingomyelins. *Prog. Lipid Res.* 52:424–437. doi: 10.1016/j.plipres.2013.05.001
- Smith AC, Swindle MM (2006) Preparation of swine for the laboratory. *ILAR J.* 47:358–363. doi: 10.1093/ilar.47.4.358
- Smith CA, Want EJ, O’Maille G, et al (2006) XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem* 78:779–787. doi: 10.1021/ac051437y
- Smith PM, Howitt MR, Panikov N, et al (2013) The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic T reg cell homeostasis. *Science* 341:569–573. doi: 10.1126/science.1241165
- Sobradillo B, Aguirre A, Uresti U, et al (2004) Curvas y tablas de crecimiento. Estudios longitudinal y transversal. Bilbao: Fundación Faustino Orbegozo Eizaguirre.
- Solito A, Ricotti R, Archero F, et al (2018) Efficacy of the treatment with bifidobacterium breve b632 and bifidobacterium breve br03 on endocrine response to the oral glucose tolerance test in pediatric obesity: a cross-over double blind randomized controlled trial. *High blood Press Cardiovasc Prev* 25:226–227. doi: 10.1007/s40292-018-0249-0
- Sondike SB, Copperman N, Jacobson MS (2003) Effects of a low-carbohydrate diet on weight loss and cardiovascular risk factors in overweight adolescents. *J Pediatr* 142:253–258. doi: 10.1067/mpd.2003.4
- Spicer R, Salek RM, Moreno P, et al (2017) Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis. *Metabolomics* 13. doi: 10.1007/s11306-017-1242-7
- Spiteller G (2001) Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Exp Gerontol* 36:1425–1457. doi: 10.1016/S0531-5565(01)00131-0
- Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG (2009) Clinical applications of metabolomics in oncology: A review. *Clin. Cancer Res.* 15:431–440. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1059
- Spurlock ME, Gabler NK (2008) The Development of Porcine Models of Obesity and the Metabolic Syndrome. *J Nutr* 138:397–402. doi: 10.1093/jn/138.2.397
- Stefely JA, Pagliarini DJ (2017) Biochemistry of Mitochondrial Coenzyme Q Biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 42:824–843. doi: 10.1016/j.tibs.2017.06.008
- Steig AJ, Jackman MR, Giles ED, et al (2011) Exercise reduces appetite and traffics excess nutrients away from energetically efficient pathways of lipid deposition during the early stages of weight regain. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 301:. doi: 10.1152/ajpregu.00212.2011
- Stenman LK, Lehtinen MJ, Meland N, et al (2016) Probiotic With or Without Fiber Controls Body Fat Mass, Associated With Serum Zonulin, in Overweight and Obese Adults—Randomized Controlled Trial. *EBioMedicine* 13:190–200. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.10.036
- Storck EM, Özbalci C, Eggert US (2018) Lipid Cell Biology: A Focus on Lipids in Cell Division. *Annu Rev Biochem* 87:839–869. doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-012448
- Strassburg K, Esser D, Vreeken RJ, et al (2014) Postprandial fatty acid specific changes in circulating oxylipins in lean and obese men after high-fat challenge tests. *Mol Nutr Food Res* 58:591–600. doi: 10.1002/mnfr.201300321

- Strauss RS, Barlow SE, Dietz WH (2000) Prevalence of abnormal serum aminotransferase values in overweight and obese adolescents. *J Pediatr* 136:727–733. doi: 10.1016/S0022-3476(00)24645-3
- Stroeve JHM, Saccenti E, Bouwman J, et al (2016) Weight loss predictability by plasma metabolic signatures in adults with obesity and morbid obesity of the DiOGenes study. *Obesity* 24:379–388. doi: 10.1002/oby.21361
- Strong JP, Malcom GT, McMahan CA, et al (1999) Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: Implications for prevention from the pathobiological determinants of atherosclerosis in youth study. *J Am Med Assoc* 281:727–735. doi: 10.1001/jama.281.8.727
- Sumner LW, Amberg A, Barrett D, et al (2007) Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* 3:211–221. doi: 10.1007/s11306-007-0082-2
- Sun YP, Oh SF, Uddin J, et al (2007) Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer: Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation. *J Biol Chem* 282:9323–9334. doi: 10.1074/jbc.M609212200
- Szulińska M, Łoniewski I, van Hemert S, et al (2018) Dose-dependent effects of multispecies probiotic supplementation on the lipopolysaccharide (LPS) level and cardiometabolic profile in obese postmenopausal women: A 12-week randomized clinical trial. *Nutrients* 10:773. doi: 10.3390/nu10060773
- Tai CC, Ding ST (2010) N-3 polyunsaturated fatty acids regulate lipid metabolism through several inflammation mediators: mechanisms and implications for obesity prevention. *J. Nutr. Biochem.* 21:357–363. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.09.010
- Talvani A, Machado FS, Santana GC, et al (2002) Leukotriene B4 induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. *Infect Immun* 70:4247–4253. doi: 10.1128/IAI.70.8.4247-4253.2002
- Tamura Y, Onguka O, Itoh K, et al (2012) Phosphatidylethanolamine biosynthesis in mitochondria: Phosphatidylserine (PS) trafficking is independent of a PS decarboxylase and intermembrane space proteins Ups1p and Ups2p. *J Biol Chem* 287:43961–43971. doi: 10.1074/jbc.M112.390997
- Tang WHW, Wang Z, Cho L, et al (2009) Diminished Global Arginine Bioavailability and Increased Arginine Catabolism as Metabolic Profile of Increased Cardiovascular Risk. *J Am Coll Cardiol* 53:2061–2067. doi: 10.1016/j.jacc.2009.02.036
- Tecott LH (2007) Serotonin and the Orchestration of Energy Balance. *Cell Metab.* 6:352–361. doi: 10.1016/j.cmet.2007.09.012
- Theken KN, Deng Y, Schuck RN, et al (2012) Enalapril reverses high-fat diet-induced alterations in cytochrome P450-mediated eicosanoid metabolism. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 302:E500–E509. doi: 10.1152/ajpendo.00370.2011
- Thorpe SR, Baynes JW (1996) Role of the maillard reaction in diabetes mellitus and diseases of aging. *Drugs and Aging* 9:69–77. doi: 10.2165/00002512-199609020-00001
- Tinahones FJ (2017) Mesa Redonda Avances Fisiopatológicos En Obesidad. *Rev Esp Endocrinol Pediatr* 8:15–20. doi: 10.3266/RevEspEndocrinolPediatr.pre2017.Apr.394
- Tourdot BE, Ahmed I, Holinstat M (2014) The emerging role of oxylipins in thrombosis and diabetes. *Front. Pharmacol.* 4 JAN:176. doi: 10.3389/fphar.2013.00176
- Tripolt NJ, Leber B, Triebel A, et al (2015) Effect of *Lactobacillus casei* Shirota supplementation on

- trimethylamine-N-oxide levels in patients with metabolic syndrome: An open-label, randomized study. *Atherosclerosis* 242:141–144. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.05.005
- Trøseid M, Ueland T, Hov JR, et al (2015) Microbiota-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide is associated with disease severity and survival of patients with chronic heart failure. *J Intern Med* 277:717–726. doi: 10.1111/joim.12328
- Tulipani S, Griffin J, Palau-Rodriguez M, et al (2016) Metabolomics-guided insights on bariatric surgery versus behavioral interventions for weight loss. *Obesity* 24:2451–2466. doi: 10.1002/oby.21686
- Tungtrongchitr R, Pongpaew P, Tongboonchoo C, et al (2003) Serum homocysteine, B12 and folic acid concentration in Thai overweight and obese subjects. *Int J Vitam Nutr Res* 73:8–14. doi: 10.1024/0300-9831.73.1.8
- Turpin-Nolan SM, Hammerschmidt P, Chen W, et al (2019) CerS1-Derived C18:0 Ceramide in Skeletal Muscle Promotes Obesity-Induced Insulin Resistance. *Cell Rep* 26:1-10.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2018.12.031
- Turunen M, Olsson J, Dallner G (2004) Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1660:171–199. doi: 10.1016/j.bbamem.2003.11.012
- Ukropec J, Reseland JE, Gasperikova D, et al (2003) The Hypotriglyceridemic Effect of Dietary n-3 FA Is Associated with Increased  $\beta$ -Oxidation and Reduced Leptin Expression. *Lipids* 38:1023–1029. doi: 10.1007/s11745-006-1156-z
- Ustundag B, Gungor S, Aygün AD, et al (2007) Oxidative status and serum leptin levels in obese prepubertal children. *Cell Biochem Funct* 25:479–483. doi: 10.1002/cbf.1334
- Val-Laillet D, Layec S, Guérin S, et al (2011) Changes in brain activity after a diet-induced obesity. *Obesity* 19:749–756. doi: 10.1038/oby.2010.292
- Van Meer G (2005) Cellular lipidomics. *EMBO J* 24:3159–3165. doi: 10.1038/sj.emboj.7600798
- Vang K, Ziboh VA (2005) 15-Lipoxygenase metabolites of  $\gamma$ -linolenic acid/eicosapentaenoic acid suppress growth and arachidonic acid metabolism in human prostatic adenocarcinoma cells: Possible implications of dietary fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 72:363–372. doi: 10.1016/j.plefa.2005.02.002
- Vanlear GE, McClafferty FW (1969) Biochemical Aspects of High-Resolution Mass Spectrometry. *Annu Rev Biochem* 38:289–322. doi: 10.1146/annurev.bi.38.070169.001445
- Venable ME, Lee JY, Smyth MJ, et al (1995) Role of ceramide in cellular senescence. *J Biol Chem* 270:30701–30708. doi: 10.1074/jbc.270.51.30701
- Venarucci D, Venarucci V, Vallese A, et al (1999) Free radicals: Important cause of pathologies refer to ageing. *Panminerva Med.* 41:335–339.
- Verneti L, Gough A, Baetz N, et al (2017) Functional Coupling of Human Microphysiology Systems: Intestine, Liver, Kidney Proximal Tubule, Blood-Brain Barrier and Skeletal Muscle. *Sci Rep* 7:42296. doi: 10.1038/srep42296
- Vessby B (2003) Dietary fat, fatty acid composition in plasma and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol.* 14:15–19. doi: 10.1097/00041433-200302000-00004
- Vessby B, Gustafsson I-B, Tenglad S, et al (2006) Desaturation and Elongation of Fatty Acids and Insulin Action. *Ann N Y Acad Sci* 967:183–195. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04275.x

- Villarreal-Pérez JZ, Villarreal-Martínez JZ, Lavallo-González FJ, et al (2014) Plasma and urine metabolic profiles are reflective of altered beta-oxidation in non-diabetic obese subjects and patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr* 6:129. doi: 10.1186/1758-5996-6-129
- Villas-Bôas SG, Højer-Pedersen J, Åkesson M, et al (2005) Global metabolite analysis of yeast: Evaluation of sample preparation methods. *Yeast* 22:1155–1169. doi: 10.1002/yea.1308
- Villeneuve NF, Lau A, Zhang DD (2010) Regulation of the Nrf2-keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: An insight into cullin-ring ubiquitin ligases. *Antioxidants Redox Signal.* 13:1699–1712. doi: 10.1089/ars.2010.3211
- Vodička P, Smetana K, Dvořánková B, et al (2005) The miniature pig as an animal model in biomedical research. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. New York Academy of Sciences, pp 161–171. doi: 10.1196/annals.1334.015
- Wahl S, Yu Z, Kleber M, et al (2012) Childhood obesity is associated with changes in the serum metabolite profile. *Obes Facts* 5:660–670. doi: 10.1159/000343204
- Wall R, Marques TM, O'Sullivan O, et al (2012) Contrasting effects of *Bifidobacterium breve* NCIMB 702258 and *Bifidobacterium breve* DPC 6330 on the composition of murine brain fatty acids and gut microbiota. *Am J Clin Nutr* 95:1278–1287. doi: 10.3945/ajcn.111.026435
- Wall R, Ross RP, Shanahan F, et al (2009) Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues. *Am J Clin Nutr* 89:1393–1401. doi: 10.3945/ajcn.2008.27023
- Wallner S, Schmitz G (2011) Plasmalogens the neglected regulatory and scavenging lipid species. *Chem. Phys. Lipids* 164:573–589. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2011.06.008
- Wang Z Bin, Xin SS, Ding LN, et al (2019a) The Potential Role of Probiotics in Controlling Overweight/Obesity and Associated Metabolic Parameters in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2019. doi: 10.1155/2019/3862971
- Wang J, Zhang L, Xiao R, et al (2019b) Plasma lipidomic signatures of spontaneous obese rhesus monkeys. *11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sciences. Lipids Health Dis* 18:8. doi: 10.1186/s12944-018-0952-9
- Wang L, Folsom AR, Zheng ZJ, et al (2003) Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study 1-3. *Am J Clin Nutr* 78:91–98. doi: 10.1093/ajcn/78.1.91
- Wang M, Han X (2016) Advanced shotgun lipidomics for characterization of altered lipid patterns in neurodegenerative diseases and brain injury. *Methods Mol Biol* 1303:405–422. doi: 10.1007/978-1-4939-2627-5\_24
- Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, et al (2011) Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* 17:448–453. doi: 10.1038/nm.2307
- Wang TY, Liu M, Portincasa P, Wang DQH (2013) New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *Eur. J. Clin. Invest.* 43:1203–1223. doi: 10.1111/eci.12161
- Wang W, Yang J, Qi W, et al (2017) Lipidomic profiling of high-fat diet-induced obesity in mice: Importance of cytochrome P450-derived fatty acid epoxides. *Obesity* 25:132–140. doi: 10.1002/oby.21692
- Wang Y, Jiang Y, Wang N, et al (2019c) Central but not general obesity is positively associated with the risk of hyperhomocysteinemia in middle-aged women. *Nutrients* 11:. doi: 10.3390/nu11071614

- Want EJ, O'Maille G, Smith CA, et al (2006) Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction for serum profiling with mass spectrometry. *Anal Chem* 78:743–752. doi: 10.1021/ac051312t
- Warensjö E, Öhrvall M, Vessby B (2006a) Fatty acid composition and estimated desaturase activities are associated with obesity and lifestyle variables in men and women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16:128–136. doi: 10.1016/j.numecd.2005.06.001
- Warensjö E, Sundström J, Lind L, Vessby B (2006b) Factor analysis of fatty acids in serum lipids as a measure of dietary fat quality in relation to the metabolic syndrome in men. *Am J Clin Nutr* 84:442–448. doi: 10.1093/ajcn/84.2.442
- Watanabe M, Houten SM, Wang L, et al (2004) Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest* 113:1408–1418. doi: 10.1172/JCI21025
- Watmough NJ, Frerman FE (2010) The electron transfer flavoprotein: Ubiquinone oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1797:1910–1916. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.10.007
- Weckwerth W (2003) METABOLOMICS IN SYSTEMS BIOLOGY. *Annu Rev Plant Biol* 54:669–689. doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.135014
- Wei Y, Chen K, Whaley-Connell AT, et al (2008) Skeletal muscle insulin resistance: Role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294. doi: 10.1152/ajpregu.00561.2007
- Weir JM, Wong G, Barlow CK, et al (2013) Plasma lipid profiling in a large population-based cohort. *J Lipid Res* 54:2898–2908. doi: 10.1194/jlr.P035808
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796–1808. doi: 10.1172/jci19246
- Wenk MR (2005) The emerging field of lipidomics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4:594–610. doi: 10.1038/nrd1776
- Westerhuis JA, Hoefsloot H CJ, Smit S, et al (2008) Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics* 4:81–89. doi: 10.1007/s11306-007-0099-6
- Williams EP, Mesidor M, Winters K, et al (2015) Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. *Curr. Obes. Rep.* 4:363–370. doi: 10.1007/s13679-015-0169-4
- Wishart DS, Tzur D, Knox C, et al (2007) HMDB: The human metabolome database. *Nucleic Acids Res* 35. doi: 10.1093/nar/gkl923
- Woo J, Shin KO, Yoo JH, et al (2012) The effects of detraining on blood adipokines and antioxidant enzyme in Korean overweight children. *Eur J Pediatr* 171:235–243. doi: 10.1007/s00431-011-1518-2
- Woods AG (2014) *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research*, Second edi. Singer Nature. doi: 10.1007/978-3-319-06068-2
- Wu G, Zhang L, Li T, et al (2013) Choline supplementation promotes hepatic insulin resistance in phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-deficient mice via increased glucagon action. *J Biol Chem* 288:837–847. doi: 10.1074/jbc.M112.415117
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, et al (2011) Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science (80- )* 334:105–108. doi: 10.1126/science.1208344

- Wu XF, Wu XX, Guo WJ, et al (2012) Cerebroside D, a glycosphingolipid, improves experimental colitis in mice with multiple targets against activated T lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 263:296–302. doi: 10.1016/j.taap.2012.07.001
- Yabut JM, Crane JD, Green AE, et al (2019) Emerging Roles for Serotonin in Regulating Metabolism: New Implications for an Ancient Molecule. *Endocr Rev* 40:1092–1107. doi: 10.1210/er.2018-00283
- Yanes O (2015) La metabolómica: un déjà vu por la historia de la bioquímica. *Rev la Soc Española Bioquímica y Biol Mol | SEEBM* 186:4–6.
- Yanes O, Tautenhahn R, Patti GJ, Siuzdak G (2011) Expanding coverage of the metabolome for global metabolite profiling. *Anal Chem* 83:2152–2161. doi: 10.1021/ac102981k
- Yang Q, Vijayakumar A, Kahn BB (2018) Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19:654–672. doi: 10.1038/s41580-018-0044-8
- Yetukuri L, Ekroos K, Vidal-Puig A, Orešič M (2008) Informatics and computational strategies for the study of lipids. *Mol Biosyst* 4:121–127. doi: 10.1039/b715468b
- Yin YN, Yu QF, Fu N, et al (2010) Effects of four Bifidobacteria on obesity in high-fat diet induced rats. *World J Gastroenterol* 16:3394–3401. doi: 10.3748/wjg.v16.i27.3394
- Yoshida Y, Niki E (2006) Bio-markers of lipid peroxidation in vivo: Hydroxyoctadecadienoic acid and hydroxycholesterol. *BioFactors* 27:195–202. doi: 10.1002/biof.5520270117
- Young MM, Kester M, Wang HG (2013) Sphingolipids: Regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. *J. Lipid Res.* 54:5–19. doi: 10.1194/jlr.R031278
- Yu HT, Fu XY, Xu B, et al (2018) Untargeted metabolomics approach (UPLC-Q-TOF-MS) explores the biomarkers of serum and urine in overweight/obese young men. *Asia Pac J Clin Nutr* 27:1067–1076. doi: 10.6133/apjcn.052018.07
- Yung YC, Stoddard NC, Chun J (2014) LPA receptor signaling: Pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J. Lipid Res.* 55:1192–1214. doi: 10.1194/jlr.R046458
- Yung YC, Stoddard NC, Mirendil H, Chun J (2015) Lysophosphatidic Acid Signaling in the Nervous System. *Neuron* 85:669–682. doi: 10.1016/j.neuron.2015.01.009
- Zamani B, Sheikhi A, Namazi N, et al (2019) The Effects of Supplementation with Probiotic on Biomarkers of Oxidative Stress in Adult Subjects: a Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Trials. *Probiotics Antimicrob Proteins*. doi: 10.1007/s12602-018-9500-1
- Zhang DD (2010) The Nrf2-keap1-ARE signaling pathway: The regulation and dual function of Nrf2 in cancer. *Antioxidants Redox Signal.* 13:1623–1626. doi: 10.1089/ars.2010.3301
- Zhang W, Zhong W, Sun Q, et al (2017) Hepatic overproduction of 13-HODE due to ALOX15 upregulation contributes to alcohol-induced liver injury in mice. *Sci Rep* 7:. doi: 10.1038/s41598-017-02759-0
- Zhang X, Lerman LO (2017) The metabolic syndrome and chronic kidney disease. *Transl. Res.* 183:14–25. doi: 10.1016/j.trsl.2016.12.004
- Zhao J, Grant SFA (2011) Genetics of Childhood Obesity. *J Obes* 2011:1–9. doi: 10.1155/2011/845148
- Zhao X, Dey A, Romanko OP, et al (2005) Decreased epoxygenase and increased epoxide hydrolase expression in the mesenteric artery of obese Zucker rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 288:. doi: 10.1152/ajpregu.00018.2004

- Zhao X, Gang X, Liu Y, et al (2016) Using Metabolomic Profiles as Biomarkers for Insulin Resistance in Childhood Obesity: A Systematic Review. *J. Diabetes Res.* 2016:1–12. doi: 10.1155/2016/8160545
- Zhao X, Quigley JE, Yuan J, et al (2006) PPAR- $\alpha$  activator fenofibrate increases renal CYP-derived eicosanoid synthesis and improves endothelial dilator function in obese Zucker rats. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 290:. doi: 10.1152/ajpheart.00937.2005
- Zheng H, Lorenzen JK, Astrup A, et al (2016a) Metabolic effects of a 24-week energy-restricted intervention combined with low or high dairy intake in overweightwomen: An NMR-based metabolomics investigation. *Nutrients* 8:108. doi: 10.3390/nu8030108
- Zheng Y, Ceglarek U, Huang T, et al (2016b) Weight-loss diets and 2-y changes in circulating amino acids in 2 randomized intervention trials. *Am J Clin Nutr* 103:505–511. doi: 10.3945/ajcn.115.117689
- Zhu ZJ, Schultz AW, Wang J, et al (2013) Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry characterization of metabolites guided by the METLIN database. *Nat Protoc* 8:451–460. doi: 10.1038/nprot.2013.004

#### **PÀGINES WEB**

- WHO|Obesity and overweight. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Accessed 24 May 2019
- EU Action Plan on Childhood. Accessed 24 May 2019
- WHO Child Growth Standards. *Rev Chil pediatria* 80. Accessed 24 May 2019
- IDF consensus definition of metabolic syndrome in children and adolescent. <https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/61-idf-consensus-definition-of-metabolic-syndrome-in-children-and-adolescents.html>. Accessed 4 Jun 2019
- Human Metabolome Database. <http://www.hmdb.ca/>. Accessed 5 Nov 2019
- METLIN. <https://metlin.scripps.edu/>. Accessed 4 Dec 2019
- LIPID MAPS Lipidomics gateway. In: Lipid Maps. <http://www.lipidmaps.org/>. Accessed 18 Nov 2019
- MetaboAnalyst. <https://www.metaboanalyst.ca>. Accessed 18 Dec 2019

